

図1. 平板培養法，マイクロコロニー法，蛍光活性染色法（CFDA-DAPI 二重染色法）により求めた試料水中の細菌数．■：蛍光顕微鏡操作に習熟していない者の群．▨：蛍光顕微鏡操作に習熟している者の群．平板培養法については操作の習熟度を一定と見なし群に分けずに解析．N.D.：検出限界以下．

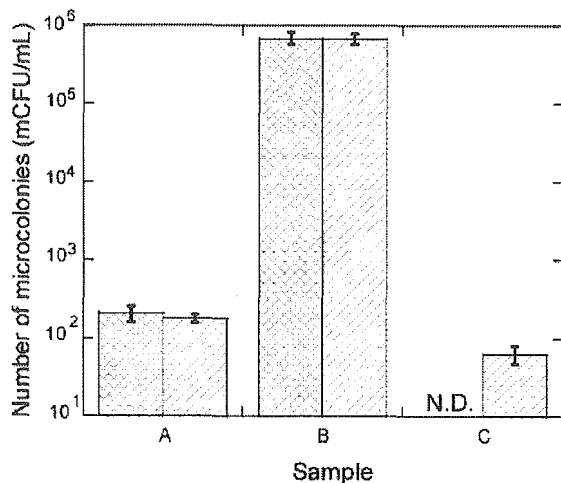


図2. マイクロコロニー計数における蛍光顕微鏡での測定値と自動計数装置での測定値の比較．▨：蛍光顕微鏡，▧：自動計数装置．N.D.：検出限界以下．

厚生科学研究費補助金(医薬品医療機器等レギュラトリーサイエンス総合研究事業)  
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)

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(IFO)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。昨年度までにsmall subunit ribosomal DNA (ssu rDNA) 塩基配列の決定や市販同定キットを用いた性状調査を行い、これら菌株に分類学的な問題がないことを明らかにした。今年度は5株についてパラオキシ安息香酸エチルおよびパラオキシ安息香酸プロピルによる最小発育阻止濃度の測定、8株について抗生物質による発育阻止円の測定を行った。

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. 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. 市販同定キットによる性状調査を行い、保存菌株の性状を明らかにする。
4. 微生物限度試験、微生物による抗生物質力価試験に指定されている菌株のそれら試験に関わる性状を調査する。

B. 研究方法

1. パラオキシ安息香酸エチルおよびパラオキシ安息香酸プロピルによる最小発育阻止濃度の測定

(1). 被検菌株

*Staphylococcus aureus* NBRC 13276  
*Pseudomonas aeruginosa* NBRC 13275

*Candida albicans* NBRC 1594

*Aspergillus niger* NBRC 9455

*Escherichia coli* NBRC 3972

(2). 方法

① 増殖用・感受性測定用培地

増殖用培地として *S. aureus* NBRC 13276, *P. aeruginosa* NBRC 13275, *E. coli* NBRC 3972 には Mueller Hinton Broth (Difco) を, *C. albicans* NBRC 1594 にはグルコースペプトン培地(日水製薬)を, *A. niger* NBRC 9455 にはポテデキストロス寒天培地(栄研化学)を用いた。感受性測定用培地として *S. aureus* NBRC 13276, *P. aeruginosa* NBRC 13275, *E. coli* NBRC 3972 には Mueller Hinton Agar (Difco) を, *C. albicans* NBRC 1594 と *A. niger* NBRC 9455 にはサブロー寒天培地(日水製薬)を用いた。

② 感受性測定用平板培地の作製

DMSO を用いてパラオキシ安息香酸エチルおよびパラオキシ安息香酸プロピルの 320,000 µg/ml

溶液をそれぞれ作製した後、これらを DMSO で希釈して 2 倍希釈系列溶液を作製した。高圧滅菌後 50~60°C に保った感受性測定用培地に前述の希釈系列溶液を 1/99 量添加し、混合後シャーレに分注して固化し、感受性測定用平板培地とした。

### ③ 接種用菌液の調製

*S. aureus* NBRC 13276, *P. aeruginosa* NBRC 13275, *E. coli* NBRC 3972 は 37°C で 18~20 時間, *C. albicans* NBRC 1594 は 25°C で 2 日間培養した後、それぞれを菌数が約 10<sup>6</sup>/ml になるように増殖用培地をもちいて希釈した。*A. niger* NBRC 9455 は 25°C で 7 日間培養し、形成された胞子を 0.05% ホリソルベート 80 添加生理食塩水に懸濁して約 10<sup>6</sup>/ml になるように調製した。

### ④ 最小生育阻止濃度の測定

感受性測定用平板培地に上記菌液を 1~2 cm の長さで画線し, *S. aureus* NBRC 13276, *P. aeruginosa* NBRC 13275, *E. coli* NBRC 3972 は 37°C で 18~20 時間, *C. albicans* NBRC 1594 は 25°C で 2 日間, *A. niger* NBRC 9455 は 25°C で 7 日間培養を行い、発育が阻止された最小濃度をもってパラオキシ安息香酸エチルおよびパラオキシ安息香酸プロピルの最小発育阻止濃度とした。

#### 2. 抗生物質による発育阻止円の測定

以下の菌株と抗生物質の組み合わせについて、第十四改正日本薬局方に準じて円筒平板法により測定を行った。

#### *Staphylococcus aureus* NBRC 13276

硫酸ネチルマイシン

エリスロマイシン

#### *Bacillus subtilis* NBRC 3134

ミデカマイシン

クロキサシリンナトリウム

キタサマイシン

セフラジン

#### *Micrococcus luteus* NBRC 13867

ミデカマイシン

バシトラシン

#### *Kocuria rhizophila* NBRC 12708

ミデカマイシン

#### *Staphylococcus epidermidis* NBRC 12993

硫酸シソマイシン

#### *Klebsiella pneumoniae* NBRC 3512

塩酸スペクチノマイシン

#### *Pseudomonas aeruginosa* NBRC 12582

セフォペラゾンナトリウム

#### *Comamonas terrigena* NBRC 13299

スルバクタムナトリウム

### C. 結果および考察

#### 1. パラオキシ安息香酸エチルおよびパラオキシ安息香酸プロピルによる最小発育阻止濃度の測定

表1に記載した。

#### 2. 抗生物質による発育阻止円の測定

表2~14に記載した。

## D. 研究発表

### 1. 論文発表

- (1). Khan, S.T., Nakagawa, Y. & Harayama, S. *Krokinobacter* gen. nov., with three novel species in the family *Flavobacteriaceae*. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.*, 56: 323-328 (2006).
- (2). 中川恭好. 微生物の保存方法－微生物管理の実際－. *防菌防黴*, 34: 95-103 (2006).
- (3). Khan, S.T., Nakagawa, Y. & Harayama, S. *Sandarakinotalea sediminis* gen. nov., sp. nov., a novel member of the family *Flavobacteriaceae*. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.*, in press.
- (4). Khan, S.T., Nakagawa, Y. & Harayama, S. *Sedimicola luteus* gen. nov., sp. nov., a novel member of the family *Flavobacteriaceae*. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.*, in press.

### 2. 学会発表

- (1). 村松由貴, 笠井宏朗, 鈴木健一郎, 中川恭好. *Alphaproteobacteria* 綱細菌に属する新属新種 *Stellatibacter mobilis* の提案. 日本農芸化学会 2006 年度大会, 京都, 2006 年 3 月.
- (2). 高橋麻衣, 金安美香, 飯野隆夫, 鈴木健一郎, 中川恭好. *Flavobacterium-Cytophaga* 類縁細菌群の 1 属, *Persicobacter* の新種について. 日本農芸化学会 2006 年度大会, 京都, 2006 年 3 月.

## E. 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. パラオキシ安息香酸エチルおよびパラオキシ安息香酸プロピルの最小発育阻止濃度

	MIC (µg/ml)	
	パラオキシ安息香酸エチル	パラオキシ安息香酸プロピル
<i>Staphylococcus aureus</i> NBRC 13276	1,600	800
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> NBRC 13275	>3,200	>3,200
<i>Candida albicans</i> NBRC 1594	800	400
<i>Aspergillus niger</i> NBRC 9455	800	400
<i>Escherichia coli</i> NBRC 3972	800	400

>3,200, 3,200 µg/ml (培地にて析出しない最高濃度)にて生育阻害なし。

表2. 硫酸ネチルマイシンによる *Staphylococcus aureus* NBRC 13276 の発育阻止円直径

濃度 (µg/ml)	濃度の対数	阻止円直径 平均値 (mm)	回帰直線上 阻止円直径値 (mm)
0.5	-0.301	16.60	16.79
1.0	0.000	18.65	18.37
2.0	0.301	19.95	19.95
4.0	0.602	21.48	21.53
8.0	0.903	23.08	23.11

0.5~8.0 µg/ml の濃度範囲において濃度の対数と阻止円直径平均値の間で相関係数 0.99764 の直線性。

表3. エリスロマイシンによる *Staphylococcus aureus* NBRC 13276 の発育阻止円直径

濃度 (µg/ml)	濃度の対数	阻止円直径 平均値 (mm)	回帰直線上 阻止円直径値 (mm)
2.5	0.398	17.03	17.38
5.0	0.699	19.56	19.19
10	1.000	21.06	21.00
20	1.301	22.98	22.81
40	1.602	24.38	24.63

2.5~40 µg/ml の濃度範囲において濃度の対数と阻止円直径平均値の間で相関係数 0.99472 の直線性。

表4. ミテカマイシンによる *Bacillus subtilis* NBRC 3134 の発育阻止円直径

濃度 (µg/ml)	濃度の対数	阻止円直径 平均値 (mm)	回帰直線上 阻止円直径値 (mm)
2.5	0.398	11.57	11.80
5.0	0.699	14.20	14.08
10	1.000	16.56	16.36
20	1.301	18.77	18.63
40	1.602	20.68	20.91

2.5~40 µg/ml の濃度範囲において濃度の対数と阻止円直径平均値の間で相関係数 0.99825 の直線性。

表5. クロキサリナトリウムによる *Bacillus subtilis* NBRC 3134 の発育阻止円直径

濃度 (µg/ml)	濃度の対数	阻止円直径 平均値 (mm)	回帰直線上 阻止円直径値 (mm)
2.5	0.398	10.55	10.49
5.0	0.699	13.04	13.14
10	1.000	15.69	15.79
20	1.301	18.67	18.44
40	1.602	20.99	21.09

2.5~40 µg/ml の濃度範囲において濃度の対数と阻止円直径平均値の間で相関係数 0.99938 の直線性。

表6. キタサマイシンによる *Bacillus subtilis* NBRC 3134 の発育阻止円直径

濃度 (μg/ml)	濃度の対数	阻止円直径 平均値 (mm)	回帰直線上 阻止円直径値 (mm)
3.75	0.574	14.45	14.55
7.5	0.875	16.87	16.74
15	1.176	18.95	18.93
30	1.477	21.10	21.12
60	1.778	23.27	23.30

3.75～60 μg/ml の濃度範囲において濃度の対数と阻止円直径平均値の間で相関係数 0.99969 の直線性。

表7. セフラジンによる *Bacillus subtilis* NBRC 3134 の発育阻止円直径

濃度 (μg/ml)	濃度の対数	阻止円直径 平均値 (mm)	回帰直線上 阻止円直径値 (mm)
2.5	0.398	14.60	14.47
5.0	0.699	17.57	17.60
10	1.000	20.51	20.73
20	1.301	23.83	23.86
40	1.602	27.12	26.99

2.5～40 μg/ml の濃度範囲において濃度の対数と阻止円直径平均値の間で相関係数 0.99957 の直線性。

表8. ミテ'カマイシンによる *Micrococcus luteus* NBRC 13867 の発育阻止円直径

濃度 (μg/ml)	濃度の対数	阻止円直径 平均値 (mm)	回帰直線上 阻止円直径値 (mm)
5.0	0.699	14.74	15.09
10	1.000	17.68	17.49
20	1.301	20.24	19.89
40	1.602	22.38	22.29
80	1.903	24.39	24.69

5.0～80 μg/ml の濃度範囲において濃度の対数と阻止円直径平均値の間で相関係数 0.99672 の直線性。

表9. バシトラシンによる *Micrococcus luteus* NBRC 13867 の発育阻止円直径

濃度 (単位/ml)	濃度の対数	阻止円直径 平均値 (mm)	回帰直線上 阻止円直径値 (mm)
0.25	-0.602	16.83	16.98
0.5	-0.301	19.03	18.75
1.0	0.000	20.43	20.53
2.0	0.301	22.27	22.30
4.0	0.602	24.07	24.07

0.25～4.0 単位/ml の濃度範囲において濃度の対数と阻止円直径平均値の間で相関係数 0.99826 の直線性。

表 10. ミテ'カマイシンによる *Kocuria rhizophila* NBRC 12708 の発育阻止円直径

濃度 (μg/ml)	濃度の対数	阻止円直径 平均値 (mm)	回帰直線上 阻止円直径値 (mm)
0.625	-0.204	15.85	16.07
1.25	0.097	19.12	18.99
2.5	0.398	22.02	21.91
5.0	0.699	25.08	24.83
10	1.000	27.48	27.75

0.625～10 μg/ml の濃度範囲において濃度の対数と阻止円直径平均値の間で相関係数 0.99875 の直線性。

表 11. 硫酸ソマイシンによる *Staphylococcus epidermidis* NBRC 12993 の発育阻止円直径

濃度 (μg/ml)	濃度の対数	阻止円直径 平均値 (mm)	回帰直線上 阻止円直径値 (mm)
0.125	-0.903	12.27	12.28
0.25	-0.602	14.38	14.47
0.5	-0.301	16.76	16.76
1.0	0.000	18.98	18.98
2.0	0.301	20.93	20.93

0.125～2.0 μg/ml の濃度範囲において濃度の対数と阻止円直径平均値の間で相関係数 0.99951 の直線性.

表 12. 塩酸スペクチノマイシンによる *Klebsiella pneumoniae* NBRC 3512 の発育阻止円直径

濃度 (μg/ml)	濃度の対数	阻止円直径 平均値 (mm)	回帰直線上 阻止円直径値 (mm)
25	1.398	10.65	10.71
50	1.699	13.10	13.07
100	2.000	15.53	15.43
200	2.301	17.77	17.80
400	2.602	20.12	20.16

25～400 μg/ml の濃度範囲において濃度の対数と阻止円直径平均値の間で相関係数 0.99985 の直線性.

表 13. セフトラゾラムによる *Pseudomonas aeruginosa* NBRC 12582 の発育阻止円直径

濃度 (μg/ml)	濃度の対数	阻止円直径 平均値 (mm)	回帰直線上 阻止円直径値 (mm)
12.5	1.097	16.11	16.27
25	1.398	18.31	18.27
50	1.699	20.51	20.27
100	2.000	22.33	22.27
200	2.301	24.10	24.27

1.25～200 μg/ml の濃度範囲において濃度の対数と阻止円直径平均値の間で相関係数 0.99853 の直線性.

表 14. スルバクタムナトリウムによる *Comamonas terrigena* NBRC 13299 の発育阻止円直径

濃度 (μg/ml)	濃度の対数	阻止円直径 平均値 (mm)	回帰直線上 阻止円直径値 (mm)
5.0	0.699	13.36	13.74
10	1.000	17.67	17.29
20	1.301	20.89	20.84
40	1.602	24.64	24.38
80	1.903	27.62	27.93

5～80 μg/ml の濃度範囲において濃度の対数と阻止円直径平均値の間で相関係数 0.99819 の直線性.

## 厚生科学研究費補助金（医薬品医療機器等イノベーション総合研究事業）

### 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部門長  
共同研究者 佐々木次雄 国立感染症研究所細菌部室長  
五反田亨（社団法人北里研究所 生物製剤研究所副所長）  
吉野千春（社団法人北里研究所 生物製剤研究所品質部門長補佐）  
飯嶋正也（社団法人北里研究所 生物製剤研究所品質部門）  
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）による滅菌効果の検証を行う。平成17年度の研究目的は、パルス光を照射による菌種における滅菌効果を及び容器・容量での滅菌効果に関して、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. 平成16年度における研究においては、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インフルエンザHAワクチンを用い検証したが、短時間ではあるが多少熱が発生するため、有効性において低下が見られた。
2. 平成17年度の研究目的としては、比較的熱に強い製剤を想定し、パルス光を照射による菌種における滅菌効果を及び容器・容量での滅菌効果に関して検証することとした。

#### B. 研究方法

1. ①バイアル容器（ポリプロピレン製）を用い、代表的な菌種（*B.subtilis*, *A.niger*, *S.aureus*, *P.aeruginosa*, *C.albicans*, *E.coli*）を選択し、パルス光に

よる滅菌効果を検証する。②容器（材質）による滅菌効果の検証として、シリンジ容器（高機能樹脂COP製）2mL,5mL,10mLの3種類の容量を用い検証する。なお、検証する際に使用する菌種としては、最も光に耐性（光の透過率が低い）があると思われる菌種（*A.niger* *B.subtilis*）を選択した。④パルス光の透過率が高いことがのぞまれることから容器の透過率、菌種ごとの透過率を確認する。⑤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。

#### C. 研究経過

1. 平成17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17年11月に北里研究所が試験品を作成し、平



成17年12月及び平成18年1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「パルス光照射による滅菌効果に関する研究」(別添資料1)に作成した。

#### D. 考察

1. バイアル容器(ポリプロピレン製)及びシリンジ容器(高性能樹脂COP製)における分光透過率を測定した結果、(別添資料1)図5と図7に比較してみるとほぼ同様の透過率であった。
2. 菌液での透過率では、*A.niger*が*B.subtilis*に比べわずかに低い結果であった。ただし、滅菌効果のある波長(200~300nm)では同様の結果であることから差はないと考えられる。
3. バイアル容器を用いたチャレンジ試験結果は、1500Jにおいて $10^6$ の滅菌効果が得られた。ただし、菌種でみれば*C.albicans*において、 $10^6$ では生存している。これは、菌のサイズ(大きい)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。平成16

年度の結果では $10^3$ は滅菌効果が得られている。

4. シリンジ容器を用いたチャレンジ試験結果では、各菌種とも減少傾向は認められるが生存している。これはシリンジがゴム栓(トップキャップ)により封かんされているため、パルス光が照射されない箇所があるためと考察される。

#### 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、このことから、パルス光を用い滅菌する場合にはバイアル容器のように全て樹脂製であることが必要条件となることが考察される。菌種では、*A.niger*、*B.subtilis*等は $10^6$ では生存している可能性があること。また、パルス光滅菌装置による滅菌は、光が透過する容器の材質・厚みが求められること。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。

#### 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・実用新案登録

なし

##### 2. その他

なし

# パルス光照射による滅菌効果に関する研究

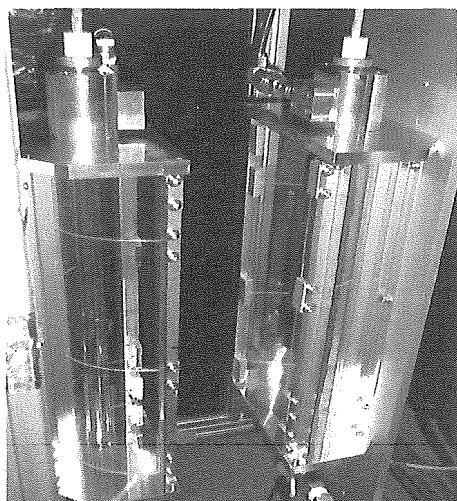
## 1 目的

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「医薬品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）による滅菌効果の検証を行う。平成17年度の研究目的は、パルス光を照射による菌種における滅菌効果を及び容器・容量での滅菌効果を検証する。

## 2 パルス光滅菌装置

### 2.1 滅菌装置

図1（パルスドキセノン滅菌装置）



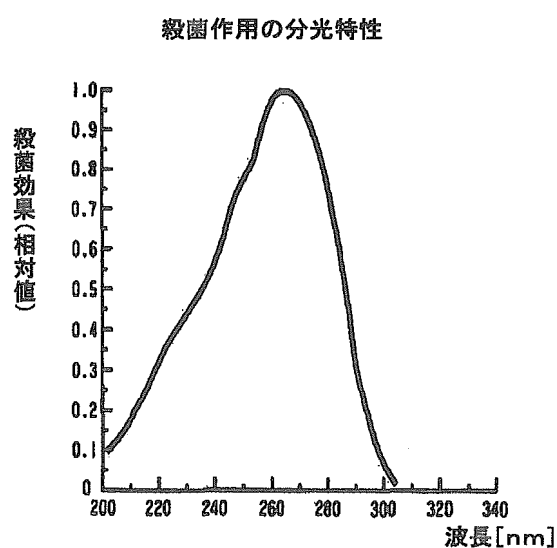
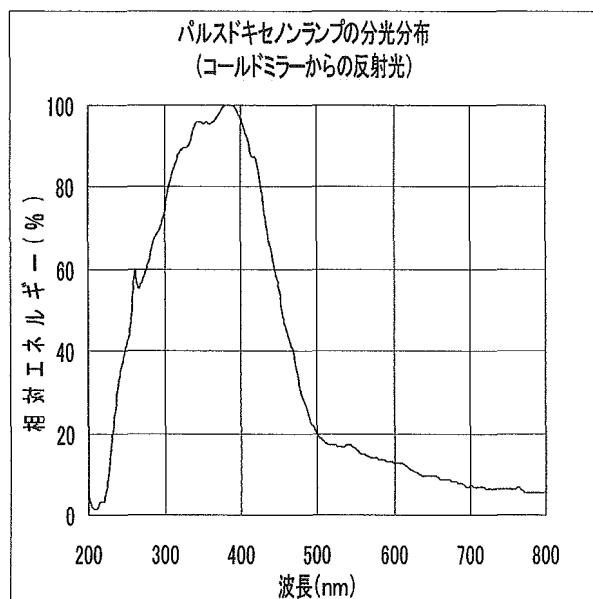
使用装置：パルスドキセノン滅菌装置  
使用ランプ：PXL2000L-ES2

### 2.2 滅菌条件

パルスドキセノンランプの分光分布は図1となり、殺菌効果がある波長は200nm～300nmが条件（図2）となる。

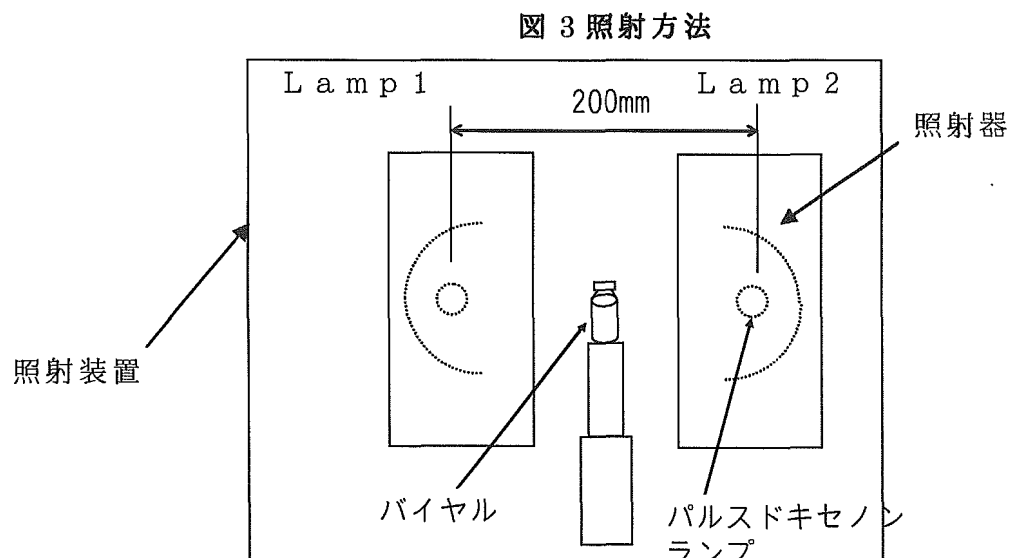
図1

図2



## 2.3 照射条件及び照射方法

- 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3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1パルスにて照射を行う。



## 3 試験方法

試験目的は、パルス光を照射による菌種における滅菌効果及び容器の形状による滅菌効果を確認する。

### 3.1 菌種による滅菌効果

ポリプロピレン製のバイアル容器を用い菌種ごとの滅菌効果の確認

#### 3.1.1 容器の材質

形状 : バイアル容器  
容量 : 2 mL  
材質 : ポリプロピレン

#### 3.1.2 菌の種類及び試験方法使用する菌種

菌種 : 6種類の菌 (表1. 菌の種類)  
菌数 : 生理食塩水に  $10^6$  個/mL  
容量 : 1 mL  
判定日 : 7日目  
評価 : 生菌数測定と菌数確認から、生存率を算出する。

表 1. 菌の種類

菌種	菌数	培地	培養日数
<i>Bacillus subtilis</i>	1 0 <sup>6</sup> 個	SCDA 培地+グルコース(0.5%)培地	25±2°C、7 日間
<i>Aspergillus niger</i>	1 0 <sup>6</sup> 個	PDA 培地	25±2°C、7 日間
<i>Staphylococcus aureus</i>	1 0 <sup>6</sup> 個	SCDA 培地+グルコース(0.5%)培地	25±2°C、7 日間
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	1 0 <sup>6</sup> 個	SCDA 培地+グルコース(0.5%)培地	25±2°C、7 日間
<i>Candida albicans</i>	1 0 <sup>6</sup> 個	PDA 培地	25±2°C、7 日間
<i>Escherichia coli</i>	1 0 <sup>6</sup> 個	SCDA 培地+グルコース(0.5%)培地	25±2°C、7 日間

## 3.1.3 照射条件における混釈培養方法等

表 2. 500J 照射

500J 照射	バイアル容器	5mL ラウンドチューブ	シャーレ
<i>Bacillus subtilis</i>	3 本	15 本	45 枚
<i>Aspergillus niger</i>	3 本	15 本	45 枚
<i>Staphylococcus aureus</i>	3 本	15 本	45 枚
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	3 本	15 本	45 枚
<i>Candida albicans</i>	3 本	15 本	45 枚
<i>Escherichia coli</i>	3 本	15 本	45 枚
計	18 本	90 本	270 枚

表 3. 1000J 照射

1000J 照射	バイアル容器	5mL ラウンドチューブ	シャーレ
<i>Bacillus subtilis</i>	3 本	15 本	45 枚
<i>Aspergillus niger</i>	3 本	15 本	45 枚
<i>Staphylococcus aureus</i>	3 本	15 本	45 枚
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	3 本	15 本	45 枚
<i>Candida albicans</i>	3 本	15 本	45 枚
<i>Escherichia coli</i>	3 本	15 本	45 枚
計	18 本	90 本	270 枚

表 4. 1500J 照射

1500J 照射	バイアル容器	5mL ラウンドチューブ	シャーレ
<i>Bacillus subtilis</i>	3 本	15 本	45 枚
<i>Aspergillus niger</i>	3 本	15 本	45 枚
<i>Staphylococcus aureus</i>	3 本	15 本	45 枚
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	3 本	15 本	45 枚
<i>Candida albicans</i>	3 本	15 本	45 枚
<i>Escherichia coli</i>	3 本	15 本	45 枚
計	18 本	90 本	270 枚

表 5. 未照射

未照射	バイアル容器	5mLラウンドチューブ	シャーレ
<i>Bacillus subtilis</i>	1本	5本	15枚
<i>Aspergillus niger</i>	1本	5本	15枚
<i>Staphylococcus aureus</i>	1本	5本	15枚
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	1本	5本	15枚
<i>Candida albicans</i>	1本	5本	15枚
<i>Escherichia coli</i>	1本	5本	15枚
計	6本	30本	90枚

### 3.1.3 試験検査場所

試験検査は、以下（表 6. 試験検査場所）の場所において実施する。

表 6. 試験検査場所

検体の準備	パルス光照射	照度・透過率の測定	培養及び判定
北里研究所	岩崎電気	岩崎電気	北里研究所

### 3.1.4 試験実施日

照射日：2005年12月13日

培養：2005年12月13日～2005年12月19日

判定日：2005年12月19日

## 3.2 容器の容量及び材質における滅菌効果

高機能樹脂COPのシリンジ容器を用い、容量ごとの滅菌効果を確認する。

### 3.2.1 容器の材質

形 状：シリンジ容器

容 量：2 mL、5 mL、10 mL

材 質：高機能樹脂COP（シクロオレフィンポリマー）

製 品 名：ゼオノア（日本ゼオン株式会社）

### 3.2.2 菌の種類及び試験方法使用する菌種

菌 種：2種類の菌（表 7. 菌の種類）

菌 数：生理食塩水に $10^6$ 個/mL

容 量：1 mL

判定日：7日目

評 価：生菌数測定と菌数確認から、生存率を算出する。

表 7. 菌の種類

菌種	菌数	培地	培養日数
<i>Bacillus subtilis</i>	$10^6$ 個	SCDA 培地+ケルコース(0.5%)培地	25±2°C、7日間
<i>Aspergillus niger</i>	$10^6$ 個	PDA 培地	25±2°C、7日間

### 3.2.3 照射条件における混釈培養方法等

表 8. 500J 照射

500J 照射	シリンジ 2mL	シリンジ 5mL	シリンジ 10mL	5mL ラウン ドチューブ	シャーレ
<i>Bacillus subtilis</i>	3 本	3 本	3 本	45 本	135 枚
<i>Aspergillus niger</i>	3 本	3 本	3 本	45 本	135 枚
計	6 本	6 本	6 本	90 本	270 枚

表 9. 1000J 照射

1000J 照射	シリンジ 2mL	シリンジ 5mL	シリンジ 10mL	5mL ラウン ドチューブ	シャーレ
<i>Bacillus subtilis</i>	3 本	3 本	3 本	45 本	135 枚
<i>Aspergillus niger</i>	3 本	3 本	3 本	45 本	135 枚
計	6 本	6 本	6 本	90 本	270 枚

表 10. 1500J 照射

1500J 照射	シリンジ 2mL	シリンジ 5mL	シリンジ 10mL	5mL ラウン ドチューブ	シャーレ
<i>Bacillus subtilis</i>	3 本	3 本	3 本	45 本	135 枚
<i>Aspergillus niger</i>	3 本	3 本	3 本	45 本	135 枚
計	6 本	6 本	6 本	90 本	270 枚

表 11. 未照射

未照射	シリンジ 2mL	シリンジ 5mL	シリンジ 10mL	5mL ラウン ドチューブ	シャーレ
<i>Bacillus subtilis</i>	1 本	1 本	1 本	15 本	45 枚
<i>Aspergillus niger</i>	1 本	1 本	1 本	15 本	45 枚
計	2 本	2 本	2 本	30 本	90 枚

## 3.1.3 試験検査場所

試験検査は、以下（表 12. 試験検査場所）の場所において実施する。

表 12. 試験検査場所

検体の準備	パルス光照射	照度・透過率の測定	培養及び判定
北里研究所	岩崎電気	岩崎電気	北里研究所

## 3.1.4 試験実施日

照射日：2006年1月31日

培養：2006年1月31日～2006年2月5日

判定日：2006年2月5日

## 4 検証結果

#### 4.1 照度測定結果

表13. 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 <sup>2</sup> )	光量(mJ/cm <sup>2</sup> )	ピーク照度(W/cm <sup>2</sup> )	光量(mJ/cm <sup>2</sup> )
500	204.6	78.63	220.5	84.80
	203.8	78.49	220.4	84.50
	204.5	78.70	220.8	84.60
平均	204.3	78.61	220.6	84.63
1000	554.9	195.4	578.1	203.0
	547.9	193.5	575.6	202.7
	545.0	192.8	574.3	202.4
平均	549.3	193.9	576.0	202.7
1500	965.7	342.7	1025	357.1
	946.6	337.4	1016	355.5
	937.4	335.3	1013	354.7
平均	949.9	338.5	1018	355.8

測定日：2005年12月12日

測定器 照度計：DFE-2000

受光部：SZ0303-044-3

#### 4.2 各容器における分光透過率測定結果

バイヤル容器(ポリプロピレン製)及びシリンジ容器(高性能樹脂COP)の透過率は、図4、図5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4. バイヤル容器(PP製)

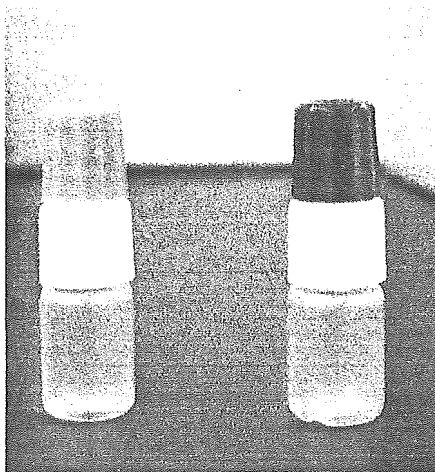


図5. (バイヤル容器の分光透過率)

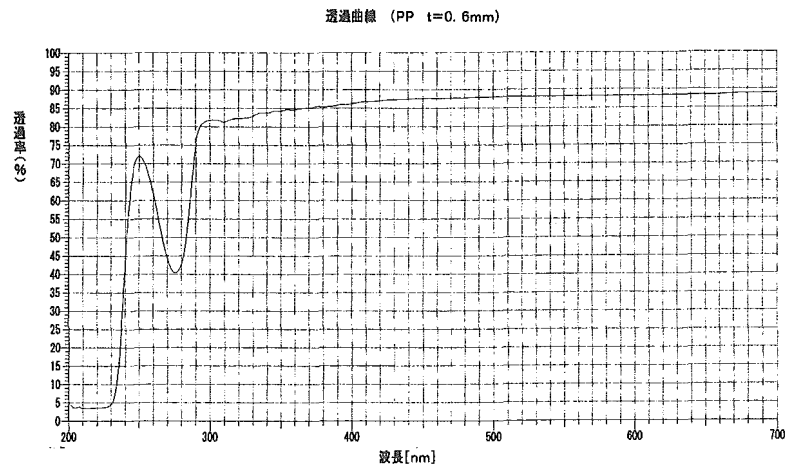


図 6. シリンジ容器 (COP 製)

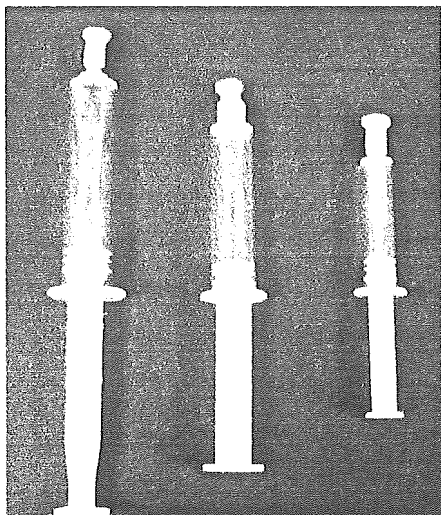
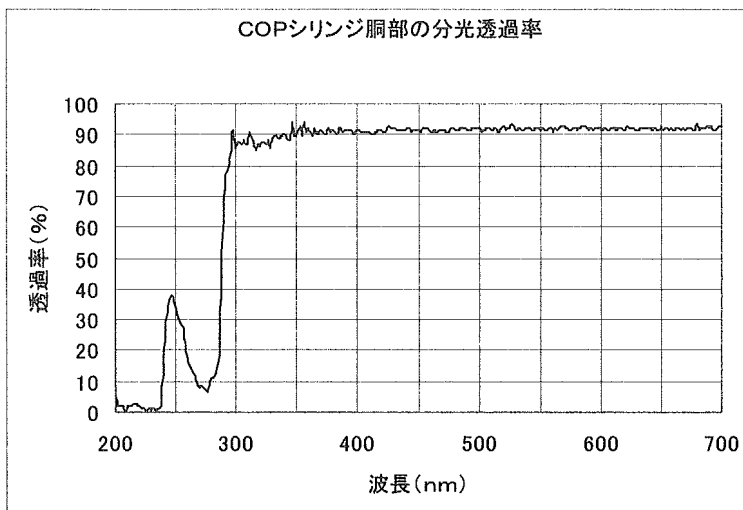


図 7 (シリンジ容器の分光透過率)



測定器 : 分光光度計 UV3101PC (島津製作所製)

#### 4.3 菌液の分光透過率

各菌液 (A.niger B.subtilis) における分光透過率は、A.niger は B.subtilis に比べわずかに透過率は低くなっている。

図 8. A.niger の分光透過率

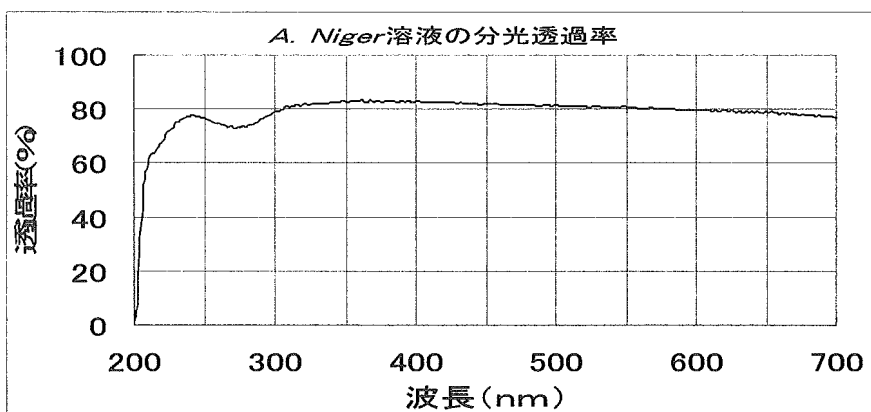
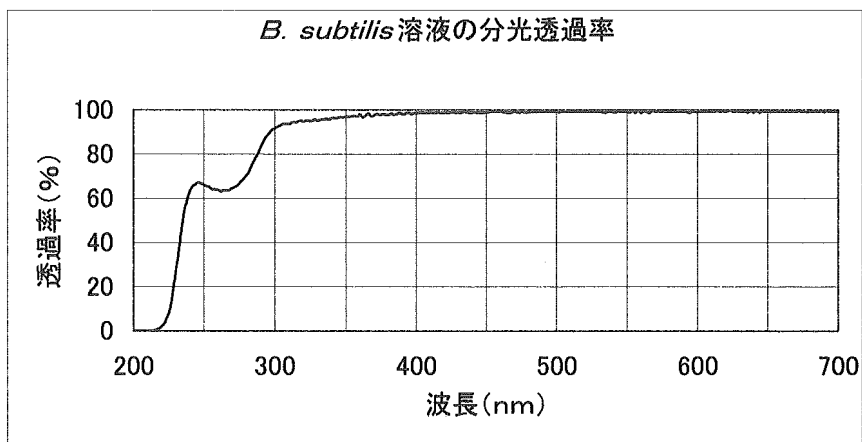


図 9. B.subtilis の分光透過率



測定器 : 分光光度計 UV3101PC (島津製作所製)



4.4 照射結果

表 14. バイアル容器（ポリプロピレン製）

	A.niger		B.subtilis		C.albicans	
500J	$1.5 \times 10^3$	0.065%	$9.0 \times 10^2$	0.021%	$1.3 \times 10^4$	0.43%
	$1.8 \times 10^3$	0.078%	$6.7 \times 10^2$	0.016%	$1.3 \times 10^4$	0.43%
	$1.3 \times 10^3$	0.056%	$7.0 \times 10^2$	0.016%	$1.1 \times 10^5$	3.7%
1000J	$1.3 \times 10^2$	0.0056%	0	0%	0	0%
	$8.7 \times 10^2$	0.038%	0	0%	$2.4 \times 10^5$	8.0%
	$1.7 \times 10^2$	0.0074%	0	0%	$1.7 \times 10^5$	5.7%
1500J	0	0%	0	0%	$3.8 \times 10^4$	1.27%
	0	0%	0	0%	0	0%
	0	0%	0	0%	$1.8 \times 10^6$	60%
未照射	$2.3 \times 10^6$		$4.3 \times 10^6$		$3.0 \times 10^6$	

	E.coli		S.aureus		P.aeruginosa	
500J	0	0%	0	0%	$1.3 \times 10^2$	0.001%
	0	0%	$1.4 \times 10^3$	0%	$1.3 \times 10^2$	0.001%
	$1.6 \times 10^3$	0.0043%	0	0.0043%	$7.7 \times 10^3$	0.0059%
1000J	0	0%	0	0%	$2.2 \times 10^3$	0.0017%
	0	0%	0	0%	0	0%
	0	0%	0	0%	0	0%
1500J	0	0%	0	0%	0	0%
	0	0%	0	0%	0	0%
	0	0%	0	0%	0	0%
未照射	$3.7 \times 10^7$		$1.1 \times 10^7$		$1.3 \times 10^8$	

表 14. シリンジ容器（高機能樹脂COP）

	B.subtilis 2mL		B.subtilis 5mL		B.subtilis 10mL	
500J	$2.2 \times 10^3$	3.14%	$2.8 \times 10^4$	4.0%	$4.5 \times 10^3$	6.42%
	$3.4 \times 10^4$	48.6%	$1.5 \times 10^4$	2.14%	$2.6 \times 10^3$	3.71%
	$2.1 \times 10^3$	3.0%	$8.9 \times 10^3$	1.27%	$2.2 \times 10^3$	3.14%
1000J	$1.5 \times 10^3$	2.14%	$1.8 \times 10^3$	0.26%	$2.3 \times 10^3$	3.29%
	$3.7 \times 10^2$	0.53%	$2.2 \times 10^3$	0.31%	$1.7 \times 10^3$	2.43%
	$7.3 \times 10^2$	1.04%	$2.1 \times 10^3$	0.3%	$5.0 \times 10^2$	0.71%
1500J	$3.7 \times 10^2$	0.53%	$1.2 \times 10^3$	0.17%	$0.3 \times 10^2$	0.043%
	$2.7 \times 10^2$	0.39%	$5.0 \times 10^3$	0.71%	$2.0 \times 10^2$	0.29%
	$0.7 \times 10^2$	0.1%	$1.5 \times 10^3$	0.21%	$1.0 \times 10^2$	0.14%
未照射	$0.7 \times 10^5$		$0.7 \times 10^6$		$0.7 \times 10^5$	

	A.niger 2mL		A.niger 5mL		A.niger 10mL	
500J	$1.1 \times 10^4$	11.0%	$1.1 \times 10^5$	8.46%	$2.3 \times 10^4$	1.77%
	$1.3 \times 10^4$	13%	$3.1 \times 10^4$	2.38%	$1.7 \times 10^4$	1.31%
	$2.1 \times 10^4$	21%	$4.9 \times 10^4$	3.77%	$1.2 \times 10^4$	0.92%
1000J	$1.2 \times 10^4$	12%	$3.2 \times 10^4$	2.46%	$3.2 \times 10^4$	2.46%
	$1.4 \times 10^4$	14%	$2.7 \times 10^4$	2.08%	$3.4 \times 10^3$	0.26%
	$1.6 \times 10^4$	16%	$3.8 \times 10^4$	2.92%	$3.5 \times 10^3$	0.27%
1500J	$5.8 \times 10^3$	5.8%	$7.0 \times 10^3$	0.54%	$1.5 \times 10^3$	0.12%
	$1.2 \times 10^3$	1.2%	$6.2 \times 10^3$	0.48%	$3.2 \times 10^3$	0.25%
	$5.8 \times 10^3$	5.8%	$6.3 \times 10^3$	0.48%	$3.7 \times 10^3$	0.28%
未照射	$1.0 \times 10^5$		$1.3 \times 10^6$		$1.3 \times 10^6$	

## 5 まとめ

### 5.1 研究結果

分光透過率測定、チャレンジ試験の結果は表15.にあるような結果となった。この結果から、バイアル容器(ポリプロピレン製)においては滅菌効果が認められた。シリンジ容器(高機能樹脂COP)においては、チャレンジ菌の菌数が多いため、生菌数が多少認められた。ただし、同様の条件ならば滅菌効果が同様の結果が得られると想定される。

表15. 試験結果のまとめ

試験項目	バイアル容器 (ポリプロピレン)	シリンジ容器 (高機能樹脂COP)
分光透過率測定結果	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。透過率は高い	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。透過率は高いがポリプロピレン製よりも透過率は少し低い
チャレンジ試験結果	①1500Jの照射により滅菌されていることが確認された。 ②菌種ではC.albicansにおいて、 $10^6$ では生存している。これは、菌のサイズ(大きい)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。	①封かんはゴム栓が用いられているため菌が生存している。これはゴム栓によりパルス光が照射されない部分があるためと考えられる。 ②照射量とともに減少傾向があることから、ポリプロピレン製と同様の条件ならばほぼ同等の結果が得られると思われる。

### 5.2 考察

項目	考察
形状・容量	シリンジの形状又は、容量のサイズ等に関しては有意の差が認められない。パルス光が透過する工夫がなされるならば問題は無いと考えられる。
材質	ガラス製(平成16年度の検証結果)は、殺菌効果がある波長(200nm~300nm)において透過率が低いため滅菌効果が得られていない。樹脂製のものは透過率が高く滅菌効果が認められる。ただし、厚み、色、材質の影響も認められると想定される。
菌種	A.nigerは、黒色であることから透過率が低下すること。また、C.albicansは、菌のサイズが大きいことにより菌が生存している。ただし、清浄度が管理されている製造施設において菌数が $10^6$ 以上の汚染は想定されないことからパルス光を照射による滅菌は有用であると考えられる。
薬剤	インフルエンザHAワクチンの力価試験結果(平成16年度の検証結果)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。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。
照射量	1500Jでは、C.albicansを除いて他の菌種においては、滅菌効果が認められ。

研究成果の刊行に関する一覧表

課題番号	H16-医薬-043
氏名	棚元憲一

著者（発表者）氏名 論文タイトル名 発表誌名 巻号，ページ，出版年

論文発表

1. Mutsuga M., Kawamura Y., Sugita-Konishi Y., Hara-Kudo Y. Takatori K., Tanamoto K. Migration of formaldehyde and acetaldehyde into mineral water in polyethylene terephthalate (PET) bottles. *Food Addit Contam.* 23, 212-218, 2006
2. Muroi M. & Tanamoto K. Lipid A and its precursor lipid IVa require different region of mouse MD-2 molecule to induce Toll-like receptor 4-mediated NF- $\kappa$ B activation. *J. Biol. Chem.* 2006
3. Mutsuga M., Tojima T., Kawamura Y., Tanamoto K. Survey of formaldehyde, acetaldehyde and oligomers in polyethylene terephthalate food-packaging materials. *Food Addit. Contam.* 2005 22(8):783-789.
4. Kawasaki Y., Kubota T., Yomota T. & Tanamoto K. Determination of sodium chlorite in processed herring roe by CD-ion chromatography with a conductivity detector. *J. Food Hyg. Soc. Japan*, 46, 161-164, 2005
5. Ohkado Y., kawamura Y., Mutsuga M., Tamura H & Tanamoto K. Analysis of formaldehyde and oligomers in recycled polyethylene terephthalate. *J. Food Hyg. Soc. Japan*, 46, 218-223, 2005.
6. Tada A., Kin Z-L., Sugimoto N., Sato K., Yamazaki T. & Tanamoto K. Analysis of the constituents in Jojoba Wax, a natural gum base, by GC/MS and LC/MS/MS. *J. Food Hyg. Soc. Japan*, 46, 198-204, 2005
7. Ohkado Y., kawamura Y., Mutsuga M., Tamura H & Tanamoto K. Metals in recycled terephthalate and discrimination method for its use. *J. Food Hyg. Soc. Japan*, 46, 109-115, 2005.
8. Shimomura-Shimizu M., Sugiyama K., Muroi M. & Tanamoto K. Alachlor and Carbaryl suppress lipopolysaccharide-induced iNOS expression by inhibiting NH- $\kappa$ B activation. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 332, 793-799, 2005
9. Yagyu F., Okitsu S., Tanamoto K. & Ushijima H. Determination of HIV-1 subtypes (A-D, F, G, CRF01\_AE) by PCR with novel designed primers. *J. Med virol.* 76, 16-23, 2005
10. Hatao F., Hiki N., Mimura Y., Ogawa T., Kojima J., Mafune K., Hawkins LD., Muroi M., Tanamoto K., Kaminishi M. The induction of super-resistance using synthetic lipopolysaccharide receptor agonist rescues fatal endotoxemia in rats without excessive immunosuppression. *Shock.* 23, 365-370, 2005.
11. Iso T., Sugimoto N., Sato K., Yamazaki T., Ishibashi K., Shiomi S. & Tanamoto K. Identification Test of Alo extract from *Aloe arborescens*, a natural thickening stabilizer. *Jpn. J. Food Hyg. Chem.*, 12(1), 23-27, 2005
12. Ohkado Y., kawamura Y., Mutsuga M., Tamura H. & Tanamoto K. Analysis of Residual volatiles in recycled polyethylene terephthalate. *J. Food Hyg. Soc. Japan*, 46, 13-20, 2005.
13. Jin Z-L., Tada A., Sugimoto N., Sato K., Yamazaki T. & Tanamoto K. Constituents of Fish Scale Foil, a natural Food Colorant. *Jpn. J. Food Chem.* 12(2), 85-87, 2005
14. Kawamura Y., Mutsuga M., Kato T., Iida M. and Tanamoto K. Estrogenic and anti-androgenic activities of benzophenones tested by the human estrogen and androgen receptor mediated receptor gene assays. *J. Health Sci.* 51, 48-54, 2005
15. 佐々木次雄: 日本版「無菌医薬品製造ガイドライン」について, *PHARM TECH JAPAN*, 21 (7):7-11, 2005.
16. 佐々木次雄: 日本版無菌医薬品の製造ガイドラインの紹介, *クリーンテクノロジー*, 3-5, 2006.
17. Nakajima, K., Nonaka, K., Yamamoto, N., Yamaguchi, K., Tani and M. Nasu. Rapid monitoring of microbial contamination on herbal medicines by fluorescent staining method. *Lett. Appl. Microbiol.*, 40: 128-132 (2005)
18. Yamaguchi, N., C. Sakamoto, M. Nasu. Rapid and simple quantification of bacterial cells using a microfluidic device. *Appl. Environ. Microbiol.*, 71: 1117-1121 (2005)
19. Kitaguchi, A., N. Yamaguchi, and M. Nasu: Enumeration of respiring milk spoilage bacteria within six hours by fluorescence in situ hybridization following formazan reduction. *Appl. Environ. Microbiol.*, 71(5):2748-52 2005.
20. Kenzaka T., Tamaki S., Yamaguchi N., Tani K., Nasu M. Recognition of individual genes in diverse microorganisms by cycling primed in situ amplification. *Appl Environ Microbiol.* 71(11):7236-44.2005.
21. Maruyama F., Kenzaka T., Yamaguchi N., Tani K., Nasu M. Visualization and enumeration of bacteria carrying a specific gene sequence by in situ rolling circle amplification. *Appl Environ Microbiol.* 71(12):7933-40, 2005.
22. Ogawa M., K. tani, A. Ochiai, N. Yamaguchi and M. Nasu: Multicolour digital image analysis system for identification of bacteria and concurrent assessment of their respiratory activity. *J. Appl. Microbiol.* 98(5): 1101-1106, (2005)

23. Khan, S.T., Nakagawa, Y. & Harayama, S. *Krokinobacter* gen. nov., with three novel species in the family *Flavobacteriaceae*. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.*, 56: 323-328 (2006).
24. 中川恭好. 微生物の保存方法—微生物管理の実際—. *防菌防黴*, 34: 95-103 (2006).
25. Khan, S.T., Nakagawa, Y. & Harayama, S. *Sandarakinotalea sediminis* gen. nov., sp. nov., a novel member of the family *Flavobacteriaceae*. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.*, in press.
26. Khan, S.T., Nakagawa, Y. & Harayama, S. *Sediminicola luteus* gen. nov., sp. nov., a novel member of the family *Flavobacteriaceae*. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.*, in press.

#### 学会発表

1. 畑尾史彦, 室井正志, 棚元憲一: Toll-like receptor 刺激による IRAK-4 の down regulation の機構解析、第 78 回日本細菌学会総会(2005, 4)
2. 杉山圭一, 室井正志, 棚元憲一: 2 種類の農薬アラクロールとカルバリルの TLR4 シグナル伝達に与える影響、第 78 回日本細菌学会総会(2005, 4)
3. 室井正志, 棚元憲一: Lipid IVa のアンタゴニスト作用発現に必要なヒト MD-2 分子領域の探索、第 78 回日本細菌学会総会(2005, 4)
4. 大西貴弘, 室井正志, 棚元憲一: TLR4 細胞内領域の会合は MyD88 との結合に必要である第 78 回日本細菌学会総会(2005, 4)
5. 室井正志, 棚元憲一: Lipid IVa のアゴニスト/アンタゴニスト活性を支配する MD-2 の分子領域、第 11 回日本エンドキシン研究会
6. 室井正志, 棚元憲一: Lipid IVa のアゴニスト/アンタゴニスト変換を支配する MD-2 の分子領域の役割、第 79 回日本細菌学会総会(2006, 3)
7. 大西貴弘, 室井正志, 棚元憲一: MD-2 非発現細胞における LPS 認識機構の解析、第 79 回日本細菌学会総会(2006, 3)
8. 杉山圭一, 室井正志, 棚元憲一: TLR4 をターゲットとした LPS シグナル阻害作用ペプチドの探索、第 79 回日本細菌学会総会(2006, 3)
9. 村松由貴, 笠井宏朗, 鈴木健一朗, 中川恭好. *Alphaproteobacteria* 綱細菌に属する新属新種 *Stellatibacter mobilis* の提案. 日本農芸化学会 2006 年度大会, 京都, 2006 年 3 月.
10. 高橋麻衣, 金安美香, 飯野隆夫, 鈴木健一朗, 中川恭好. *Flavobacterium-Cytophaga* 類縁細菌群の 1 属, *Persicobacter* の新種について. 日本農芸化学会 2006 年度大会, 京都, 2006 年 3 月.
11. 中川恭好. 微生物の保存方法 —微生物管理の実際—, 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.
12. 宮下美香, 鈴木健一朗, 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.
13. 高橋麻衣, 鈴木健一朗, 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.