

20050107/B

厚生労働科学研究費補助金

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

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

平成15年度～17年度 総合研究報告書

主任研究者 棚 元 憲 一 (国立医薬品食品衛生研究所)
分担研究者 佐々木 次 雄 (国立感染症研究所)
那 須 正 雄 (大阪大学大学院)
川 村 邦 夫 (大鵬製薬工業株式会社)
中 川 恭 好 (独立行政法人製品評価技術基盤機構)
佐々木 学 (社団法人北里研究所)

平成18(2006)年 4月

厚生労働科学研究費補助金

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

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

研究組織

主任研究者

棚元 憲一 国立医薬品食品衛生研究所 食品添加物部 部長

分担研究者

佐々木次雄 国立感染症研究所 細菌第二部 室長

那須 正夫 大阪大学大学院 薬学研究科 教授

川村 邦夫 大鵬製薬工業株式会社 製薬技術センター 顧問

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

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

協力研究者

飯嶋 正也 社団法人北里研究所 生物製剤研究所品質部門

浦山 由巳 千代田化工建設株式会社医薬品プロジェクト部

梶原 庸生 日本製薬株式会社 東京研究所

木下 忍 岩崎電気株式会社 光応用営業部技術グループ

小久保 護 澁谷工業株式会社微生物制御技術部

小暮 慶明 デンカ生研株式会社ワクチン部

五反田 亨 社団法人北里研究所 生物製剤研究所

佐々木公一 エーザイ株式会社

佐々木裕子 国立感染症研究所細菌第二部

白木澤 治 日揮株式会社GMP技術部

城野久美子 日本製薬株式会社 東京研究所
菅谷 真二 キリンビール株式会社医薬カンパニー品質保証室
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)
田尻 浩章 バクスター株式会社
田中 憲志 日本製薬株式会社 東京研究所
谷 壽一 シーアンドエス株式会社
出口 統也 澁谷工業株式会社 微生物制御技術部
中井 哲志 三浦工業株式会社メディカル技術部
長井 正昭 社団法人北里研究所 生物製剤研究所
西畑 利明 参天製薬株式会社研究開発本部
服部 信章 社団法人北里研究所 生物製剤研究所
原 芳明 ザルトリウス株式会社マーケティング部
樋本 勉 参天製薬株式会社生産物流本部
藤田 弘之 (財) 阪大微生物病研究会観音寺研究所品質保証部
曲田 純二 日本ミリボア株式会社バイオフィーマシューティカル事業本部
松原 正利 日本製薬株式会社 東京研究所
水田 泰一 デンカ生研株式会社信頼性保証本部
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)
村上大吉郎 株式会社大氣社
山口 進康 大阪大学大学院 薬学研究科
吉野 千春 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

目 次

I. 総合研究報告

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 ----- 1
棚元 憲一

II. 研究成果の刊行に関する一覧表 ----- 13

III. 研究成果の刊行物・別刷

厚生労働科学研究費補助金（医薬品医療機器等イノベーション総合研究事業）

総合研究報告書

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

主任研究者 棚元憲一 国立医薬品食品衛生研究所食品添加物部長

研究要旨：「無菌操作法による無菌医薬品の製造指針案」の日本語版及び英語版を完成させた。「最終滅菌法による無菌医薬品の製造指針案」は高圧蒸気滅菌医薬品に対するパラメトリックリリース要件を纏め上げた。最終滅菌法としてのパルス光滅菌の医薬品滅菌への適用と滅菌要件を示した。微生物迅速検出法を日局に取り込むに当たり、CFDA-DAPI 二重染色法及びマイクロコロニー法のプロトコールを作成した。さらにこれらの試験法の再現性、精度、感度、ラボ間のばらつき等の検証を行い、迅速かつ簡便な微生物検出法として実施可能であることを実証した。局方収載標準菌株について small subunit rRNA 塩基配列、同定キット、抗菌剤に対する感受性等の性状検討を行い、現状を明らかにした。

分担研究者

佐々木次雄	国立感染症研究所 細菌第二部 室長
那須正夫	大阪大学大学院薬学研究科 生化学・教授
川村邦夫	大鵬製薬株式会社、製品技術 センター・顧問
中川恭好	独立行政法人製品評価技術基 盤機構 研究員
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

されている。本研究では医薬品の無菌製造法に関する ISO 規格案や欧米から出されている無菌製造法に関するガイドライン等を参考に、日本版「無菌医薬品製造に関するガイドライン」を作成する。指針は「無菌操作法」と「最終滅菌法」とに分けて作成する。これらの指針は外国に向けての発信として英文版の作成も行う。また無菌製造の一例として、新しい最終滅菌技術として注目されている光パルス滅菌法を取り上げ、無菌性保証（チャレンジテスト）及び有効性に関する検討を行う。

さらに本研究では国際規格を反映した日局微生物試験法の充実を目指す。具体的には「微生物の迅速検出法の日局導入」、「日局指定菌株の特性と維持管理」及び USP/EP 収載試験法の日局導入評価研究を行う。自然環境中の微生物の大部分は通常の方法での培養、もしくは肉眼でのコロニー観察が困難であることが明らかとなってきたことから、蛍光染色法のような新規技術を用いた、迅速・簡便、さらには高精度に定量す

A. 研究目的

わが国では、医薬品の製造及び品質管理は、省令 GMP として施行されている。現在、医薬品 GMP 中に、無菌医薬品の製造に関する要件がかなり導入されてきてはいるが、多岐にわたる無菌医薬品製造工程について詳細に触れることは困難である。無菌医薬品の製造に関しては、米国では FDA ガイドラインとして、EU では EU-GMP として発行

るための手法が検討されている。本研究ではそのような最新の科学技術を使った新規の微生物迅速検出法として蛍光活性染色法やマイクロコロニー法を取り上げて検証を行い、適切な日局導入のための検討を行うものである。

また、日局指定株が適正に維持することは日局微生物試験法全体に関わる重要な課題である。これらの指標菌は、培養中に変異を起こすことがあり、試験目的としている性状からかけ離れてしまう可能性が常にある。そのため、菌株が本来有すべき性状を示すと同時に理想的な保存管理方法について日局参考情報に示す方向で検討する。

B. 研究方法

1. 無菌医薬品製造に関するガイドライン作成：無菌操作法による無菌医薬品製造指針案作成班として、製薬、エンジニアリング、膜メーカー等の専門家 15 名の協力研究者からなる研究班を立ち上げ、指針作成に必要な関連資料（無菌医薬品製造に関する ISO 13408 シリーズ、空気清浄に関する ISO 14644 シリーズ、FDA ガイドライン、EU-GMP、PICs ガイドライン等）をベースにガイドライン素案と、その英訳版の作成を行った。

「最終滅菌法による無菌医薬品の製造指針案」は最終滅菌医薬品へのパラメトリックリリース適用を目指すため、監視指導・麻薬対策課及び医薬品医療機器総合機構からの参加を得て班会議を開催し指針案を作成した。

2. 防腐剤無添加製剤の無菌性保証に関する研究：最終滅菌法としてのパルス光滅菌についてインフルエンザ HA ワクチンを例として無菌性の検証を行った。容器として

ポリプロピレン容器、高機能樹脂 COP 製容器、ガラス容器を選択し、容器の分光特性（容器の透過率）の確認を、また光量は 500J、1000J、1500J とし照射条件の確認を行った。無菌性保証の検証（チャレンジテスト）は、5 種の代表的な菌種（*B. subtilis*, *A. niger*, *S. aureus*, *P. aeruginosa*, *C. albicans*, *E. coli*）を使用し、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）、有効性の確認は、力価試験（SRD 法）で検証した。

3. 微生物の迅速検出法の日局導入：微生物の迅速検出法研究では、医薬品製造用水（精製水）、ナチュラルミネラルウォーターおよび河川水に対し、6CFDA-DAPI 二重染色を行い、蛍光顕微鏡下で全細菌数ならびにエステラーゼ活性を有する細菌数を測定した。また、微生物による汚染が危惧される動物性生薬であるゴオウ（牛黄）を試料として、6CFDA-DAPI 二重染色法により存在する微生物を蛍光顕微鏡下で定量した。マイクロコロニー法は、ナチュラルミネラルウォーター中の細菌を孔径 0.2・・m のポリカーボネートフィルター上に捕集し、フィルターを SCD 培地および R2A 培地上に 24 時間静置した。生じたマイクロコロニーを蛍光染色剤 DAPI で染色し、蛍光顕微鏡下で観察・計数した。さらに、これらの方法を日局に導入するに当たり、微生物迅速検出法の技術研修会を開催し、蛍光活性染色法およびマイクロコロニー法での操作の習熟度と測定値の個人差の関係について検討した。データの解析は、蛍光顕微鏡操作に習熟した者の群としていない者の群に分けた。

4. 日局指定菌株の特性と維持管理：NBRC に保存されている 19 種 20 株と

Salmonella typhimurium NBRC 13245 について、small subunit ribosomal DNA (ssu rDNA) 塩基配列を決定し再同定を行った。また 16 細菌株について、各種炭素源からの酸の生成や、腸内細菌以外のグラム陰性桿菌同定キット、腸内細菌及び他のグラム陰性桿菌同定キット及びブドウ球菌・ミクロコッカス同定キットを用いた自動細菌検査装置による試験を行った。さら 5 菌株につき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を、また 8 菌種につき 11 種の抗生物質に対する感受性を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。

C. 研究経過

1. 無菌医薬品製造に関するガイドライン作成

計 7 回の班会議を開催し「最終滅菌法による無菌医薬品の製造指針 (案)」作成を行った。日本 PDA での検証及び監視指導麻薬対策課を通してのパブコメを反映した最終指針案を纏め上げ、監視指導麻薬対策課に研究班の成果物として提出した。さらに本指針を医薬品 GMP 解説事例集に収載するために法令担当官が精査した用語の使い方や表現法について確認作業を行い、最終版とした。また、指針の英訳版を作成し、国内外の関係者や関係機関に配信した。一方、「最終滅菌法による無菌医薬品の製造指針 (案)」についても 4 回の班会議を開催し、高圧蒸気滅菌医薬品に対するパラメトリックリリース要件を纏め上げた。

2. 防腐剤無添加製剤の無菌性保証に関する研究

パルス光滅菌は、インフルエンザ HA ワク

チンに用いた場合、力価が低下すること等課題があることが判明した。透過率測定、チャレンジ試験、力価試験等の結果、ガラス容器には効果はなかったが、ポリプロピレン容器において滅菌効果を認めた。シリンジ容器 (高機能樹脂 COP) では、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。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、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、さらに多少熱が発生するため、光が透過し、且つ耐熱性であることなどが明らかになった。

3. 微生物の迅速検出法の日局導入

CFDA-DAPI 二重染色法のプロトコールを作成した。DAPI 染色に比べ、6CFDA を用いた場合に陽性・陰性の判定の個人差が見られた。ゴオウ中の細菌数測定では、SCD 培地の平板培養法ではコロニーを形成しなかったが、CFDA-DAPI 二重染色法では 3×10^8 cells/g、エステラーゼ活性を持つ細菌数は 3×10^8 cells/g であった。

河川水、ナチュラルミネラルウォーター、海水、にがり水中の細菌は、R2A 培地上、短時間で観察可能な大きさのマイクロコロニーを形成した。ナチュラルミネラルウォーターで SCD 培地を用いた平板培養法で得られた生菌数は、マイクロコロニー法で得られた値の 100 分の 1 以下、河川水ではマイクロコロニー法と平板培養法で得られた生菌数に約 5 倍、海水では 100 倍以上の差が見られた。にがり水中の細菌は平板培養法では全くコロニーを生じず、マイクロコロニーのみを形成した。以上の結果をまとめ、マイクロコロニー法のプロトコールを

作成した。

迅速試験法を日局に取り込むに当たり、試験法の再現性、精度、感度、ラボ間のばらつき等の検証を行い、蛍光活性染色法は蛍光顕微鏡操作の習熟度及び蛍光顕微鏡 1 視野あたりの細菌数が結果に影響すること、さらには蛍光活性染色法に比べ、マイクロコロニー法の方が相対標準偏差は小さいことを明らかにした。これらの検証結果として、蛍光活性染色法やマイクロコロニー法が、迅速かつ簡便な細菌試験法として実施可能であることを実証した。

4. 日局指定菌株の特性と維持管理

ssu rDNA 塩基配列の検証では 14 株中 13 株は登録されている学名と一致したが、*Micrococcus luteus* NBRC 12708 は、*Kocuria rhizophila* であることを明らかにした。また、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が、3 株については属名が一致したが種名は一致せずまた属名も一致しない菌株が 2 つあった。

日局の微生物試験法中で、特に用いられる標準菌株が問題となると思われる試験法は、判定に直接関係してくる抗生物質力価試験法と、保存効力試験法であることから、抗菌力試験と抗生物質の力価試験に関連する標準菌を用いての検討も行った。

D. 考 察

本研究班は大きく分けて二つの研究項目からなる。一つは「国際規格を反映した無菌医薬品の製造に関する指針作成」であり、もう一つは「国際規格を反映した日局微生物試験法の充実」である。日本薬局方参考

情報には、最終滅菌法及び滅菌指標体、最終滅菌医薬品の無菌性保証、培地充てん試験法、無菌医薬品製造区域の微生物評価試験法等の無菌医薬品製造に関するチャプターが幾つかある。これらのチャプターは GMP を補完する目的で導入されたが、無菌医薬品の製造法は多岐にわたるため、一つの完結したチャプターとして導入することは日局には馴染まないと考えられる。以上の理由から、FDA ガイドライン (Guideline for Industry Sterile Drug Products Produced by Aseptic Processing, 2002 年)、EU-GMP、WHO-GMP 等を参考にして、無菌医薬品製造に関する日本版ガイドラインを作成し、省令 GMP と対にして製薬企業や薬事監視の場で活用できる指針作成を行い、EU-GMP や FDA ガイドライン等と比肩できる日本版「無菌操作法による無菌医薬品の製造指針」を作成した。本指針が「医薬品 GMP 解説事例集」に掲載されたことより、国内企業に広く利用されることは間違いない。また、本指針の英訳版を完成させたことにより、海外の規制当局や製薬企業に日本における無菌医薬品の製造レベルが理解され、無菌医薬品の国際流通にも好影響をもたらすものと期待される。平成 17 年度より作成を開始した「最終滅菌法による無菌医薬品の製造指針案」は高圧蒸気滅菌医薬品に対するパラメトリックリリース要件を纏め上げたが、完成に至らず平成 18 年度に先送りとなった。

新しい最終滅菌法としてパルス光照射を取り上げ、インフルエンザ HA ワクチンへの適用、及びその滅菌効果を菌種及び容器・容量について検討した。その結果、この滅菌法では熱を生じることから、インフルエン

ザ HA ワクチンのようなタンパク製剤には適用が難しいと思われる。また滅菌効果は用いた容器の材質・厚みに大きく影響されること、さらに多少熱が発生するため、光が透過し且つ耐熱性である必要があること等が明らかになった。

一方、「国際規格を反映した日局微生物試験法の充実」として、日局が現在検討中の「培養法を用いない微生物の迅速検出法」や「日局指定菌株の特性と維持管理」に関するチャプターの導入のための基盤となる研究の推進を行った。

培養法を用いない微生物の迅速検出法では蛍光活性染色法とマイクロコロニー法について日局導入を視野に入れてプロトコルの作成を行った。また研修会を開くなどしてその理解と普及に務め、さらに試験法の再現性、精度、感度、ラボ間のばらつき等の検証を行った。研修会後のアンケートの結果、蛍光活性染色法とマイクロコロニー法のいずれも速性・簡便性が高く評価されていること、蛍光顕微鏡操作の簡便化と計数基準の明確化が課題であることがわかった。微生物迅速検出法の共同実験の結果、操作の習熟により、計数値の個人差は小さくなることがわかった。また、蛍光顕微鏡操作の習熟度にかかわらず、蛍光活性染色法に比べてマイクロコロニー法は計数対象が大きく、蛍光強度も強いために計数値の相対標準偏差が小さくなったと考えられる。

現在あらゆる分野での微生物管理は有害微生物の迅速・適確・高感度な検出・同定が求められている。しかし従来法は煩雑な操作と長期にわたる培養、さらには科学的な不確定さ等、時代に対応できない本質的な欠陥を抱えていて、有害微生物による被

害が生じた際に迅速・適確な対応がなされていない。諸分野における科学技術が発展した今日、最新の技術を応用した迅速・適確な検出法を確立し、微生物問題を対処する必要がある。本研究はその意味においても画期的な研究であり、世界に先駆けて局方に記載されることになる。

一方、現在日局に多数微生物関連の試験法が記載されているが、その多くの試験法に標準菌株が記載されている。言うまでもなく試験成績はこの標準菌株を基準として行われ、評価されるものであることから、標準菌株の品質は科学的に十分保証されたものでなければならない。そのような見地から、標準菌株の科学的検証を行っている。

本研究では日局記載の標準菌株についてそれらの small subunit rRNA 塩基配列や全タンパク質の SDS 電気泳動パターン、同定キットを用いた自動細菌検査装置、及び抗菌剤及び抗生物質に対する感受性測定等により性状検討を行った。局方微生物試験法が正しく行われるためにも、安定した標準株の提供を維持することが必要であり、今後は日本で供給している NBRC 株と、ATCC 株の性状差について明らかにすることと、少なくとも国際的に共通認識となりつつある継代数 5 代までの菌株の性状変化を確認し、保証された菌株の供給が出来る体制を作る必要がある。

E. 結論

本研究では、以下の成果を得た。

1) 日本版無菌ガイドラインである「無菌操作法による無菌医薬品の製造指針案」の日本語版及び英語版を完成させた。「最終滅菌法による無菌医薬品の製造指針案」は

高圧蒸気滅菌医薬品に対するパラメトリックリリース要件を纏め上げた。

2) 最終滅菌法としてのパルス光滅菌の医薬品滅菌への適用と滅菌要件を示した。

3) 微生物迅速検出法を日局に取り込むに当たり、CFDA-DAPI 二重染色法及びマイクロコロニー法のプロトコールを作成した。さらに試験法の再現性、精度、感度、ラボ

間のばらつき等の検証を行い、これらは迅速かつ簡便な微生物検出法として実施可能であることを実証した。

4) 局方に収載されている標準菌株について small subunit rRNA 塩基配列、同定キット、抗菌剤及び抗生物質に対する感受性等の性状検討を行い、現状を明らかにした。

F. 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. 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- κ B activation. *J. Biol. Chem.* 2006
3. 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
4. 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.
5. 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
6. 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
7. 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
8. 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
9. 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.

10. 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.
11. 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.
12. 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.
13. 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.
14. Nakajima, K., 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)
15. 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.
16. 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.
17. 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.
18. Shimomura-Shimizu M., Sugiyama K., Muroi M. & Tanamoto K. Alachlor and Carbaryl suppress lipopolysaccharide-induced iNOS expression by inhibiting NH- κ B activation. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 332, 793-799, 2005
19. 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
20. 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
21. Yamaguchi, N., C. Sakamoto, M. Nasu. Rapid and simple quantification of bacterial cells using a microfluidic device. *Appl. Environ. Microbiol.*, 71: 1117-1121 (2005)
22. 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.
23. 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).
24. 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.
25. Hatao H., Muroi M., Hiki N., Ogawa T., Mimura Y., Kaminishi M & Tanamoto K. Prolonged

- Toll-like receptor stimulation leads to down-regulation of IRAK-4 protein. *L. Leukocyte Biol.* 2004
26. Hong C-C., Shimizu M., Muroi M. & Tanamoto K. Effects of endocrine disrupting chemicals on lipopolysaccharide-induced tumor necrosis factor- and nitric oxide production by mouse macrophages. *Biol. Pharm. Bull.* 27(7), 1136-1139, 2004
 27. Kawai, M., J. Yamagishi, N. Yamaguchi, K. Tani and M. Nasu. Bacterial population dynamics and community structure in a pharmaceutical manufacturing water supply system determined by real-time PCR and PCR-denaturing gradient gel electrophoresis. *J. Appl. Microbiol.*, 97: 1123-1131 (2004)
 28. Kawamura K: A Novel Approach to the Statistical Evaluation of Media Fill Tests by the Difference from No Contamination Data, *PDA Journal of Pharmaceutical Science and Technology*, Vol.58, No.6, Nov-Dec.2004
 29. Kenri T., Seto S., Horino A., Sasaki Y, Sasaki T. and Miyata M.: Use of fluorescent-protein tagging to determine the subcellular localization of *Mycoplasma pneumoniae* proteins encoded by the cytoadherence regulatory locus. *J. Bacteriol.*, 2004; 186 (20): 6944-6955.
 30. Maruyama F, Yamaguchi N, Kenzaka T, Tani K and Nasu M. Simplified sample preparation using frame spotting method for direct counting of total bacteria by fluorescence microscopy. *J. Microbiol. Methods*, 59: 427-431 (2004)
 31. Matsuoka M. and Sasaki T.: Inactivation of macrolides by producers and pathogens. *Current Drug Targets-Infectious Disorders*, 2004; 4 (3): 217-240.
 32. Matsuoka M., Narita M., Okazaki N., Ohya H., Yamazaki T., Ouchi K., Suzuki I., Andoh T., Kenri T., Sasaki Y., Horino A., Shintani M., Arakawa A. and Sasaki T.: Characterization and molecular analysis of macrolide-resistant *Mycoplasma pneumoniae* clinical isolates obtained in Japan. *Antimicrob. Agents Chemother.* 2004; 48 (12): 4624-4630.
 33. 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).
 34. Yamaguchi O, Ichijo T, Ogawa M, Tani K and Nasu M. Automated digital image analysis software 'BACS II', for direct counting of bacteria by fluorescent microscopy with multiple excitation. *Bioimages*, 12: 1-7 (2004)
 35. 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).
 36. 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).
37. 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).
 38. 荒賀昌幸, 山口進康, 那須正夫, 蛍光活性染色法による注射用水製造工程の衛生微生物学的評価。防菌防黴, 印刷中。
 39. 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)
 40. 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
 41. 佐々木次雄, 那須正夫, 坂根健, 城野久美子, 松原正利, 田中憲志, 梶原庸生, 棚元憲一: 製薬用水中の微生物評価培地“R2A 培地”に関する研究, 医薬品研究, 35 (12): 638-652, 2004.
 42. 佐々木次雄: 製薬用水の国際調和, 今後の展開について, Pharm Tech Japan 20: 2505-2510, 2004.
 43. 佐々木次雄: 第14改正日本薬局方非無菌医薬品の微生物学的品質特性とその要件, p.65-81, 技術情報協会編, 2004.
 44. 佐々木次雄: 第14改正日本薬局方無菌試験法, p.149-162, 技術情報協会編, 2004.
 45. 佐々木次雄: 日本薬局方15局へ向けての新しい考え方, PDA Journal of GMP and Validation in Japan, 6(1): 38-45, 2004.
 46. 佐々木次雄: 滅菌技術, パラメトリックリリースの動向を聞く, Pharm Tech Japan 20: 1999-2000, 2004.
 47. 上寺祐之, 重松宏, 馬場善三, 熊田直人, 佐々木次雄, 滅菌バリデーションのポイント, Infection Control 231-235, 2004.
 48. Araya R., Tani K., Takagi T., Yamaguchi N. and Nasu M.: Bacterial activity and community composition in stream water and biofilm from an urban river determined by fluorescent in situ hybridization and DGGE analysis. FEMS Microbiol. Ecol., 2003, 43: 111-119.
 49. Araya, R., Yamaguchi, N., Tani, K. and Nasu, M.: Change in the bacterial community of natural river biofilm during biodegradation of aniline-derived compounds determined by denaturing gradient gel electrophoresis. J. Health Sci., 2003, 49: 379-385
 50. 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
 51. Fujihara M, Muroi M, Tanamoto K, Suzuki T, Azuma H, Ikeda H. Molecular mechanisms of macrophage activation and deactivation by lipopolysaccharide: roles of the receptor complex.

- Pharmacol Ther. 100(2):171-194, 2003.
52. Maruyama, F., Kenzaka, T., Yamaguchi, N., Tani, K. and Nasu, M.: Detection of bacteria carrying the *stx2* gene by in situ loop-mediated isothermal amplification. *Appl. Environ. Microbiol.*, 2003, 69: 5023-5028
 53. Muroi M., Ohnishi T. & Tanamoto K. Lipopolysaccharide-mimetic activities of Toll-like-receptor 2-stimulatory substance(s) contained in *Escherichia coli* lipopolysaccharide preparations. *Infect.Immun.*71,3221-3226,2003
 54. Ogawa M., Tani K., Yamaguchi N. and Nasu M.: Development of multicolor digital image analysis system to enumerate actively respiring bacteria in natural river water *J. Appl. Microbiol.*, 2003, 95: 120-128
 55. Ohnishi, T. Muroi M., & Tanamoto K. N-linked glycosylation critical to the Toll-like receptor 4 function require the presence of MD-2. *Clin, Diagn. Lab. Immunol.* 10,405-410,2003
 56. Yamaguchi N., Ishidoshiro A., Yoshida Y., Saika T., Senda S. and Nasu M.: Development of an adhesive sheet for direct counting of bacteria on solid surfaces. *J. Microbiol. Methods*, 2003, 53: 405-410.
 57. Yamaguchi N., Sasada M., Yamanaka M. and Nasu M.: Rapid detection of respiring *Escherichia coli* O157:H7 in apple juice, milk and ground beef by flow cytometry. *Cytometry*, 2003, 54A: 27-35
 58. 見坂武彦、那須正夫：環境中の細菌を迅速に検出する。ファルマシア、39: 137-141、2003.
 59. 棚元憲一 局方微生物試験法の現状、国際調和と将来展望－第14改正日本薬局方を中心として－*Bokin Bobai* 31, 19-25, 2003

2. 学会発表

1. 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.
2. 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.
3. 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.
4. 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 回日本エンドトキシン研究会
5. 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)
6. 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)
7. 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)
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.
 10. 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)
 11. 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)
 12. 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.
 13. 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)
 14. Hatao F., Muroi M., Hiki N., Ogawa T., Mimura Y., Kaminishi M, Tanamoto K.: Prolonged Toll-like receptor stimulation leads to down-regulation of IRAK-4 protein. 8th Biennial Conference of the International Endotoxin Society, Kyoto (2004, 11)
 15. 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.
 16. Muroi M., Tanamoto K.: A region of human MD-2 required for the antagonistic activity of lipid IVA. 8th Biennial Conference of the International Endotoxin Society, Kyoto (2004, 11)
 17. Ohnishi T., Muroi M., Tanamoto K.: Serum factor other than LBP is necessary for soluble MD-2 to gain its function as part of the LPS receptor. 8th Biennial Conference of the International Endotoxin Society, Kyoto (2004, 11)
 18. Sugiyama K., Muroi M., Tanamoto K.: Differential regulation of human and murine iNOS expression in response to lipopolysaccharide. 8th Biennial Conference of the International Endotoxin Society, Kyoto (2004, 11)
 19. 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.
 20. Yukphan, P., Taweesak, M., Takahashi, M., Potachoen, W., Busabun, T., Tanasupawat, S., Nakagawa, Y., Tantichoen, 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.
 21. 志水美文, 室井正志, 棚元憲一: 内毒素によるマクロファージの一酸化窒素産生を抑制する 2 種の外因性内分泌かく乱化学物質の作用機序、第 77 回日本細菌学会総会、大阪 (2004, 4)

22. 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 77 回日本細菌学会総会、大阪（2004, 4）
23. 杉山圭一、室井正志、棚元憲一：ヒトとマウスの誘導型 NO 合成酵素遺伝子のエンドトキシン応答性の解析、第 77 回日本細菌学会総会、大阪（2004, 4）
24. 大西貴弘、室井正志、棚元憲一：Toll-like receptor 4 の情報伝達における可溶性 MD-2 の性状解析、第 77 回日本細菌学会総会、大阪（2004, 4）
25. 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。
26. 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.
27. 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.
28. 佐々木次雄：無菌医薬品の無菌製造法ガイドラインの現状と運用について、日本防菌防黴学会主催「第 19 回 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」、平成 16 年 3 月 5 日、東京
29. 川村邦夫：バイオを含む医薬品の開発、品質管理の国際動向、日本防菌防黴学会主催「第 19 回 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」、平成 16 年 3 月 5 日、東京
30. 棚元憲一：局方収載微生物試験法－最近の国内及び国際的動向を中心として－、日本防菌防黴学会主催「第 19 回 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」、平成 16 年 3 月 5 日、東京
31. 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

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

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

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. 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- κ B activation. *J. Biol. Chem.* 2006
3. 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
4. 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.
5. Iso T., Sugimoto N., Sato K., Yamazaki T., Ishibashi K., Shiomi S. & Tanamoto K. Identification Test of Aloe extract from *Aloe arborescens*, a natural thickening stabilizer. *Jpn. J. Food Hyg. Chem.*, 12(1), 23-27, 2005
6. 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
7. 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
8. 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
9. 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.
10. 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.
11. 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.
12. 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.
13. 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.
14. Nakajima, K., 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)
15. 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.
16. 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.
17. 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.
18. Shimomura-Shimizu M., Sugiyama K., Muroi M. & Tanamoto K. Alachlor and Carbaryl suppress lipopolysaccharide-induced iNOS expression by inhibiting NH- κ B activation. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 332, 793-799, 2005
19. 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
20. 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
21. Yamaguchi, N., C. Sakamoto, M. Nasu. Rapid and simple quantification of bacterial cells using a microfluidic device. *Appl. Environ. Microbiol.*, 71: 1117-1121 (2005)
22. 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.
23. 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).

24. 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.
25. Hatao H., Muroi M., Hiki N., Ogawa T., Mimura Y., Kaminishi M & Tanamoto K. Prolonged Toll-like receptor stimulation leads to down-regulation of IRAK-4 protein. *L. Leukocyte Biol.* 2004
26. Hong C-C., Shimizu M., Muroi M. & Tanamoto K. Effects of endocrine disrupting chemicals on lipopolysaccharide-induced tumor necrosis factor- and nitric oxide production by mouse macrophages. *Biol. Pharm. Bull.* 27(7), 1136-1139, 2004
27. Kawai, M., J. Yamagishi, N. Yamaguchi, K. Tani and M. Nasu. Bacterial population dynamics and community structure in a pharmaceutical manufacturing water supply system determined by real- time PCR and PCR-denaturing gradient gel electrophoresis. *J. Appl. Microbiol.*, 97: 1123-1131 (2004)
28. Kawamura K: A Novel Approach to the Statistical Evaluation of Media Fill Tests by the Difference from No Contamination Data, *PDA Journal of Pharmaceutical Science and Technology*, Vol.58,No.6,Nov-Dec.2004
29. Kenri T., Seto S., Horino A., Sasaki Y, Sasaki T. and Miyata M.: Use of fluorescent-protein tagging to determine the subcellular localization of *Mycoplasma pneumoniae* proteins encoded by the cytoadherence regulatory locus. *J. Bacteriol.*, 2004; 186 (20): 6944-6955.
30. Maruyama F, Yamaguchi N, Kenzaka T, Tani K and Nasu M. Simplified sample preparation using frame spotting method for direct counting of total bacteria by fluorescence microscopy. *J. Microbiol. Methods*, 59: 427-431 (2004)
31. Matsuoka M. and Sasaki T.: Inactivation of macrolides by producers and pathogens. *Current Drug Targets-Infectious Disorders*, 2004; 4 (3): 217-240.
32. Matsuoka M., Narita M., Okazaki N., Ohya H., Yamazaki T., Ouchi K., Suzuki I., Andoh T., Kenri T., Sasaki Y., Horino A., Shintani M., Arakawa A. and Sasaki T.: Characterization and molecular analysis of macrolide-resistant *Mycoplasma pneumoniae* clinical isolates obtained in Japan. *Antimicrob. Agents Chemother.* 2004; 48 (12): 4624-4630.
33. 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).
34. Yamaguchi O, Ichijo T, Ogawa M, Tani K and Nasu M. Automated digital image analysis software 'BACS II', for direct counting of bacteria by fluorescent microscopy with multiple excitation. *Bioimages*, 12: 1-7 (2004)
35. 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).
36. 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).
37. 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).
38. 荒賀昌幸, 山口進康, 那須正夫, 蛍光活性染色法による注射用水製造工程の衛生微生物学的評価。防菌防黴, 印刷中。
39. 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）
40. 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
41. 佐々木次雄, 那須正夫, 坂根健, 城野久美子, 松原正利, 田中憲志, 梶原庸生, 棚元憲一：製薬用水中の微生物評価培地“R2A 培地”に関する研究, *医薬品研究*, 35 (12): 638-652, 2004.
42. 佐々木次雄：製薬用水の国際調和, 今後の展開について, *Pharm Tech Japan* 20: 2505-2510, 2004.
43. 佐々木次雄：第14改正日本薬局方非無菌医薬品の微生物学的品質特性とその要件, p.65-81, 技術情報協会編, 2004.
44. 佐々木次雄：第14改正日本薬局方無菌試験法, p.149-162, 技術情報協会編, 2004.
45. 佐々木次雄：日本薬局方15局へ向けての新しい考え方, *PDA Journal of GMP and Validation in Japan*, 6(1): 38-45, 2004.
46. 佐々木次雄：滅菌技術, パラメトリックリリースの動向を聞く, *Pharm Tech Japan* 20: 1999-2000, 2004.
47. 上寺祐之, 重松宏, 馬場善三, 熊田直人, 佐々木次雄, 滅菌バリデーションのポイント, *Infection Control* 231-235, 2004.
48. Araya R., Tani K., Takagi T., Yamaguchi N. and Nasu M.: Bacterial activity and community composition in stream water and biofilm from an urban river determined by fluorescent in situ hybridization and DGGE analysis. *FEMS Microbiol. Ecol.*, 2003, 43: 111-119.
49. Araya, R., Yamaguchi, N., Tani, K. and Nasu, M.: Change in the bacterial community of natural river biofilm during biodegradation of aniline-derived compounds determined by denaturing gradient gel electrophoresis. *J. Health Sci.*, 2003, 49: 379-385

50. 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
51. Fujihara M, Muroi M, Tanamoto K, Suzuki T, Azuma H, Ikeda H. Molecular mechanisms of macrophage activation and deactivation by lipopolysaccharide: roles of the receptor complex. *Pharmacol Ther.* 100(2):171-194, 2003.
52. Maruyama, F., Kenzaka, T., Yamaguchi, N., Tani, K. and Nasu, M.: Detection of bacteria carrying the *stx2* gene by in situ loop-mediated isothermal amplification. *Appl. Environ. Microbiol.*, 2003, 69: 5023-5028
53. Muroi M., Ohnishi T. & Tanamoto K. Lipopolysaccharide-mimetic activities of Toll-like-receptor 2-stimulatory substance(s) contained in *Escherichia coli* lipopolysaccharide preparations. *Infect.Immun.*71,3221-3226,2003
54. Ogawa M., Tani K., Yamaguchi N. and Nasu M.: Development of multicolor digital image analysis system to enumerate actively respiring bacteria in natural river water *J. Appl. Microbiol.*, 2003, 95: 120-128
55. Ohnishi, T. Muroi M., & Tanamoto K. N-linked glycosylation critical to the Toll-like receptor 4 function require the presence of MD-2. *Clin, Diagn. Lab. Immunol.* 10,405-410,2003
56. Yamaguchi N., Ishidoshiro A., Yoshida Y., Saika T., Senda S. and Nasu M.: Development of an adhesive sheet for direct counting of bacteria on solid surfaces. *J. Microbiol. Methods*, 2003, 53: 405-410.
57. Yamaguchi N., Sasada M., Yamanaka M. and Nasu M.: Rapid detection of respiring *Escherichia coli* O157:H7 in apple juice, milk and ground beef by flow cytometry. *Cytometry*, 2003, 54A: 27-35
58. 見坂武彦、那須正夫：環境中の細菌を迅速に検出する。ファルマシア、39: 137-141、2003.
59. 棚元憲一 局方微生物試験法の現状、国際調和と将来展望－第14改正日本薬局方を中心として－*Bokin Bobai* 31, 19-25, 2003