

200940054A

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

医薬品の微生物学的品質確保のための
新規試験法導入に関する研究

平成21年度 総括・分担研究報告書

研究代表者 室井 正志

平成22(2010)年 4月

目 次

I. 総括研究報告	
医薬品の微生物学的品質確保のための新規試験法導入に関する研究	1
室井 正志	
II. 分担研究報告	
1. 微生物の迅速同定法の確立に関する研究	10
棚元 憲一	
(資料) 添付資料 1	
2. 画像による簡便な細菌数測定法の検討	21
那須 正夫	
(資料) 添付資料 2	
3. 日本版「無菌操作法指針」の改正	28
佐々木次雄	
(資料 1) 第 7 章 無菌医薬品に係る製品の作業所	
(資料 2) 第 10 章 原料並びに容器及び栓の管理	
III. 研究成果の刊行に関する一覧表	53

厚生労働科学研究費補助金（医薬品・医療機器レギュレーションサイエンス総合研究事業）
総括研究報告書

医薬品の微生物学的品質確保のための新規試験法導入に関する研究

研究代表者 室井正志 武蔵野大学薬学部准教授

研究要旨：日本薬局方には医薬品の微生物学的な品質を確保するためにいくつかの微生物試験法が規定されているが、その信頼性を保証する諸条件が十分に整えられていない。これを整備すべく、本研究では、1)新技術を用いた微生物の迅速同定法の確立、2)医薬品からの微生物回収法や迅速検出法の開発、3)無菌医薬品の製造に関する指針（無菌操作法と最終滅菌法）の改正を行った。本年度はマトリックス支援レーザー脱離イオン化質量分析法（MALDI-TOFMS）の諸条件を確立し、薬局方指定菌株5種につき解析を行い、本手法が薬局方指定菌株の迅速同定に有用であることを示した。また、蛍光顕微鏡を用いない簡便な細菌モニタリング法（画像処理法）を検討し、標準菌を添加したイオン交換水等を試料としてこれまでに決定したプロトコールに従って蛍光染色を行い、通常の計数操作のように数十の視野を数えることなく、細菌数を把握できることがわかった。さらに、日本版「無菌操作法指針」の改正作業を行い「第7章／無菌医薬品に係る製品の作業所」、「第10章／原料並びに容器及び栓の管理」をまとめ上げた。

研究分担者

棚元憲一	武蔵野大学薬学部 教授
佐々木次雄	医薬品医療機器総合機構 GMP エキスパート
那須正夫	大阪大学大学院薬学研究科 教授

解析による方法が日局参考情報に記載されているが、これは菌のごく一部の情報しか与えないために、菌種間や属間が異なるにもかかわらず90%以上の相同性を示す場合があることが問題となっている。本研究ではこれを克服すべく簡便・迅速に菌を同定出来ることが期待されているMALDI-TOFMSを利用した新たな微生物迅速同定法を確立することを目的としている。この方法は微生物の同定法として期待されているばかりでなく、我々のこれまでの研究で、培養条件の違いによる菌の微細な変化をも捉えることが出来ることを見出しており、現在までまったく術のなかった日本

A. 研究目的

医薬品の微生物学的品質を確保するために、日本薬局方にはいくつかの微生物試験法が規定されているが、その信頼性を保証する諸条件が十分に整えられていない。

医薬品の製造・出荷時に検出される微生物の迅速同定法に関しては、現在、遺伝子

薬局方標準菌株の品質管理法への発展が大いに期待される。

医薬品中の微生物迅速検出法に関しては、細菌を培養することなく直接検出が可能な蛍光活性染色法およびマイクロコロニー法が日局参考情報に収録の予定である。しかし、これらの方法は迅速、簡単という利点がある反面、測定結果の個人差の発生、陽性・陰性判定の困難さ、液体以外の試料の前処理の必要性等の課題がある。そこで今回は、顕微鏡画像等から細菌数を把握する手法を検討する。また、判定基準を明確にすることにより個人差の解消を図る。さらに、これまでの研究成果をもとに、非無菌製剤に付着・混入している細菌数を測定するためのプロトコールを作成する。これらの検討は医薬品の微生物学的品質保証に必須であり、EP、USP に対して JP からの新たな微生物試験法に関する情報発信を行うためにも重要である。

無菌医薬品の製造指針に関しては、これまでに FDA 無菌操作法ガイダンスや EU-GMP Annex 1 並みの日本版無菌医薬品製造指針を作成してきた。今回はこれら第一世代の指針を全体的に見直し、国際的に遜色のない日本版指針とする。これにより研究班による改正及び記載整備は終了として所有権を PMDA に移管し、PMDA ホームページからの常時公開と必要に応じての改正も PMDA に任せることを視野に入れる。それにより、国内的には無菌医薬品に対する GMP 要件を一本化し、製薬企業・GMP 担当機関双方に便利な体制ができる。

B. 研究方法

1) 日本薬局方指定菌株とその培養

日本薬局方指定菌株は *Escherichia coli* (*E. coli*: NBRC 3972)、*Bacillus subtilis* (*B. subtilis*: NBRC 3134)、*Pseudomonas aeruginosa* (*P. aeruginosa*: NBRC 13275)、*Staphylococcus aureus* subsp. *aureus* (*S. aureus*: NBRC 13276) および *Salmonella enterica* subsp. *enterica* (*S. enterica*: NBRC 100797) を用いた。これらを SCD 寒天培地 (日本製薬) 上で 30°C、24 時間培養し、培養後 4°C (*P. aeruginosa* NBRC 13275 は室温) にて保存した。これを 1 週間ごとに新鮮培地上に移植して 5 世代まで継代した。凍結保存の影響を検討するため、各菌株の 1 世代目と 5 世代目をそれぞれ SCD 液体培地 (日本製薬) +12%グリセロール液、もしくは SCD 液体培地 +8% DMSO 液を用いて凍結保存した。各世代の菌体および凍結保存した菌体を SCD 液体培地あるいは Nutrient broth (Difco) 5 ml に接種し、30°C で 16 時間振とう培養し、集菌後、滅菌蒸留水で洗浄し、分析まで -20°C にて保存した。

2) MALDI-TOFMS 試料溶液の調整

BSL レベル 2 の菌を使用することを考慮し、菌体を以下のように前処理した。トリフルオロ酢酸 40 μ l に凍結保存してあった菌懸濁液 10 μ l を加え、時々軽く振盪しながら室温で 30 分間処理する。これに超純水 0.45 ml を加え、攪拌し、これを試料溶液とした。

3) MALDI-TOFMS の測定

試料溶液 5 μ l とマトリクス溶液 (sinapinic acid 10 mg/ml、0.1% trifluoroacetic acid、50% acetonitrile) 5 μ l を混合した。この混合液 1 μ l を、各試料溶液につき 3 ウェルずつサンプルプレートに滴下し風乾して測定を行った。

MALDI-TOFMS の測定は N₂ レーザー（波長 337.1 nm）を備えた KRATOS レーザーイオン化飛行時間型質量分析装置 AXIMA-TOF²（島津製作所）を用いて行った。加速電圧 20 kV、リニアモード、遅延引き出し（*m/z* 16952）の条件で検出した。マススペクトルの質量校正は apomyoglobin の [M+H]⁺ *m/z* 16952.55 と [M+H]²⁺ *m/z* 8476.78、ACTH18-39 の [M+H]⁺ *m/z* 2466.72 の 3 点を用いて外部標準法にて行った。

4) 蛍光染色用試料

標準菌株試料として、大腸菌 K12 を前培養した後、集菌、洗浄し、無菌水に添加した。その試料をさらに無菌水で様々な菌量となるように希釈した。環境水試料は、市販のナチュラルミネラルウォーターを用いた。

5) 蛍光染色

全細菌数の測定には DAPI（4'-6-diamidino-2-phenylindole; ナカライテスク社）を用いた。試料中の細菌をポリカーボネートフィルター（直径 25 mm、孔径 0.2 μm; アドバンテック東洋社）上に捕集し、DAPI 溶液（10 μg/mL 水溶液）を終濃度 1 μg/mL となるように添加し、約 3 分間染色を行った。観察にあたっては、蛍光顕微鏡（ECLIPSE-50i; ニコン社）の紫外線励起光下で全細菌を計数した。計数にあたっては、20 視野を計数し、細菌数の平均値が 2 以下、または細菌数の平均値が 0 となった視野数が 5 視野以上の場合に検出限界以下とした。

6) 蛍光顕微鏡画像の撮り込み

蛍光染色した細菌の蛍光顕微鏡像を、冷却 CCD（Penguin 150CL; ピクセラ社）を

用いて撮り込んだ。

7) 日本版「無菌操作法指針」の改正作業

研究協力者は、GMP 調査官である医薬品医療機器総合機構から 3 名、生物学的製剤の無菌性保証を担当している国立感染症研究所から 1 名、民間企業から 17 名で構成されている。21 名中 11 名は、平成 18 年版「無菌操作法による無菌医薬品の製造指針」作成にも従事した。平成 18 年版指針をベースに各章毎に見直し担当者を決め、更に見直し担当者を 4 グループに分けてグループ内で検討の上、コンセンサスの得られた改正案を班会議で検討することによって、作業の効率化を図っている。平成 21 年度には、3 回の班会議を開催した。

（倫理面への配慮）

本研究は臨床実験等を含まない。各分担研究者は、所属機関の倫理審査委員会規程を遵守し、機密守秘義務に抵触しないようにする。

C. 研究結果

1) 微生物の迅速同定法の確立に関する研究

B. subtilis (NBRC 3134)、*E. coli* (NBRC 3972)、*P. aeruginosa* (NBRC 13275)、*S. aureus* (NBRC 13276) および *S. enterica* (NBRC 100797) の凍結保存菌を解凍後、それぞれ継代初代の菌の MALDI-TOFMS スペクトルを測定し、それぞれのプロファイルが明らかに異なるパターンを示すことを確認した。

また、それぞれの菌株について 5 世代まで継代し、それぞれの MALDI-TOFMS スペクトルを測定したが、*B. subtilis* 以外は継代によるスペクトルプロファイルの違い

はほとんど見られなかった。*B. subtilis* については3世代目から m/z 13,660 付近(矢印)に新たなピークが出現した。

次に、*E. coli* および *B. subtilis* を6継代まで培養し、それぞれの世代のMALDI-TOFMS スペクトルを測定し、主なピークの測定値について繰り返しのばらつき、および、継代によるばらつきを検討すると、*E. coli* ではいずれのピークの m/z 値の標準偏差が1以下と、繰り返し、継代、共に良好な再現性を得た。一方、*B. subtilis* では m/z の大きなピークで *E. coli* よりも大きな標準偏差となったが、良好な再現性を得た。

次に、培養に用いる液体培地の影響について検討するため、各菌種の1世代目と5世代目をそれぞれSCD液体培地およびNutrient brothで16時間培養し比較検討した。その結果、これも *B. subtilis* 以外は培地の違いによるスペクトルプロファイルの違いはほとんど見られなかった。*B. subtilis* ではSCD液体培地で培養した際に、上に示したように m/z 13,660 付近に新たなピークが出現したが、Nutrient brothで培養した場合にはこのピークは見られなかった。しかし、 m/z 12,000-15,000 付近のスペクトルを強拡大してみると、1世代目をSCD液体培地で培養したもの、およびNutrient brothで培養したもの、さらに、5世代目をNutrient brothで培養したものについても m/z 13,660 付近にわずかながらピークが検出できることが明らかになった。

次に、凍結保存に用いる保護剤の影響について検討した。SCD液体培地+12% glycerol (G) または SCD液体培地+8% DMSO (D) で凍結保存した各菌種の1世代

目と5世代目の菌懸濁液を融解し、それぞれ0.1 mlを5 mlのSCD液体培地に接種し、16時間振とう培養し比較検討した。その結果、用いた保護剤がグリセロールであるかDMSOであるかにかかわらず、スペクトルプロファイルの違いはほとんど見られなかった。

2) 画像による簡便な細菌数測定法の検討

まず蛍光顕微鏡下での目視観察面積とCCDによる画像の撮影範囲を、接眼マイクロメーターおよび対物マイクロメーターを用いて確認した。その結果、菌数計測における接眼レンズの視野は $0.1 \times 0.1 \text{ mm}^2$ であるのに対し、画像面積は $0.07 \times 0.09 \text{ mm}^2$ (目視観察時の63%) であることがわかった。

目視による鏡検面積 0.01 mm^2 あたりの細菌数が約5、25、50、75、100、150となるように調整し、細菌数を目視により測定するとともに、平均的な画像を複数枚観察した。その結果、画像における細菌数と試料のろ過量をもとに、計数することなく、細菌数を大まかに把握できることがわかった。

環境中に生息する細菌は、培養した細菌より大きさも小さく、蛍光強度も弱い。そこで、ナチュラルミネラルウォーター中の細菌を対象として、画像により細菌数の大まかな把握が可能かを確認した。その結果、目視による鏡検面積 0.01 mm^2 あたりの細菌数が約10、30、50、75、100、150である試料について、計数することなく、細菌数を把握できることがわかった。例えば、蛍光画像1枚当たりの細菌数が20であり、試料のろ過量が100 mLである場合は、細菌数が $6 \times 10^3 \text{ cells/mL}$ であると推定できる。

3) 日本版「無菌操作法指針」の改正

現行指針の各項目について、国内基準としては省令 GMP 及び薬局等構造設備規則、国外基準としては ISO 13408-1 (2008)、WHO-GMP (2009 改正案)、EU-GMP Annex 1 (2009)、FDA 無菌操作法ガイダンス (2004) と比較し、これらと相違がある場合には追加もしくは修正案を提案していただき、それをベースにグループ内で検討した上で、班会議で議論した。最終的文言の整理は完了していないが、班会議に提出された改正案の一部 (第 7 章/無菌医薬品に係る製品の作業所、第 10 章/原料並びに容器及び栓の管理) をまとめ上げた。

D. 考 察

現在、日本薬局方ではさまざまな菌株を使用することが規定されており、標準菌の例として ATCC 株や NBRC 株などが記載されている。これらの菌株の同定は形態、表現形質、DNA 解析などによりなされている。最近では 16S rRNA の遺伝子配列の解析が進められ、第 15 改正日本薬局方でも参考情報で紹介されている。しかしこの解析ではまれに種レベルや属レベルで異なる菌間でも 99%以上の相同性を示す場合があるなど限界が指摘されている。また、培養条件や継代による菌株の変化が遺伝的な変異を伴うとも限らない。日本薬局方ではこれらを考慮し、マスターシードからの継代数が 5 回を超えないものを使用するなどの規定がなされている。しかし、5 回以内ならば菌株の品質が保たれているという保証はなく、さらにはマスターシードの品質をいかに確保していくのかという点についても不問となっている。

最近、MALDI-TOFMS による菌の迅速

識別が報告され、この手法では測定に要する菌体量がわずか μg オーダーで十分であることや、菌体そのものを分析に供することができ、迅速かつ簡便な同定が可能なものとして期待されている。

今回、この MALDI-TOFMS を用いて日本薬局方で用いられる代表的な 5 種の菌株 *B. subtilis* (NBRC 3134)、*E. coli* (NBRC 3972)、*P. aeruginosa* (NBRC 13275)、*S. aureus* (NBRC 13276) および *S. enterica* (NBRC 100797) の MALDI-TOFMS スペクトルを検討し、これらは全く異なるプロファイルを示すこと、*B. subtilis* 以外では繰り返し測定や継代数さらに培地や凍結法の違いによらず再現性のよいプロファイルを得られたことから、MALDI-TOFMS プロファイルを用いた菌株の識別は十分可能であると考えられる。

B. subtilis では継代により m/z 13, 660 付近に新たなピークが出現したが、このピークは、スペクトルを強拡大することにより、1 世代目でもわずかながらこのピークが存在すること、Nutrient broth で培養した場合には 5 世代目でもわずかしか見られないことが明らかとなり、このピークは継代による突然変異により出現したのではなく、SCD 液体培地で培養した場合にこのピーク物質が継代と共に増大したものと考えられる。

MALDI-TOFMS による測定では、他の菌株の混入、培養時間の違いによる菌株の変化、培養温度の違いによる菌株の変化を捉えることが可能であったと報告されている。今回の我々の解析でも *B. subtilis* において SCD 液体培地で培養した際に継代により増大する物質を検出した。従って、こ

の方法は培養条件や継代による菌株の変化を捉えるのに有用であると思われ、現在までまったく術のなかった日本薬局方標準菌株の品質管理法への発展が大いに期待される。

今回の研究では、蛍光顕微鏡画像を CCD で撮り込み、その画像について目視による観察・計数を行ったが、実際の適用にあたっては、画像を撮り込むことなく、ディスプレイ上での測定が可能である。また、蛍光顕微鏡よりも簡便かつ安価な蛍光粒子観察システムでの細菌モニタリングが可能となる。したがって、本方法は医薬品の細菌数の把握あるいは試料の希釈倍率の決定に有効である。医薬品製造用水の場合、約 200 mL をろ過して、5 画像程度を観察し、菌が検出されなければ、1 mL あたりの細菌数が 100 以下である可能性が高いと考えられる。今回検討を行った画像判断法（画像による大まかな細菌数の把握）は日常の微生物管理に役立つと考えられる。

無菌医薬品は、大別すると「無菌操作法」又は「最終滅菌法」と称する方法で製造される。3 年間の研究班活動でこれら 2 つの指針を見直す予定である。平成 21～22 年度は「無菌操作法」指針の改正を行い、改正ドラフトについてはパブコメを求めた後に公開したい。公開は英訳版を付けて監麻からの事務連絡の他に医薬品医療機器総合機構（品質管理部）のホームページにも掲載する予定である。本来、無菌医薬品の製造指針は世界共通であることが望ましいが、GMP に対する各国の考え方の違いや文化的背景の違い等により、要求事項の細部は必ずしも共通ではない。1993 年に培地充てん試験が

WHO に導入された頃は、1000 容器以上に充てんし 0.3% の汚染までは許容されていたが、現在では 5000 容器以上に充てんし、許容汚染はゼロである。このように時代とともに無菌医薬品に対する無菌性保証水準は高まり、現在では液剤、乾燥製剤の別を問わず、超高度な無菌性が求められている。そのため、本指針の改正作業においても高度な無菌性保証の観点から必要不可欠な作業である。

これら医薬品の微生物学的品質確保のための試験法の新規導入・改良作業および指針の作成はグローバル化している医薬品業界にとっては国際調和を伴った医薬品の安全性向上に必須の要件であり、より安全な無菌医薬品の供給を可能にするものであることから、国民の保健・医療・福祉の向上に大いに貢献するものである。

E. 結 論

マトリックス支援レーザー脱離イオン化質量分析法 (MALDI-TOFMS) を利用した微生物の迅速同定法の確立を目的に、BSL2 レベルの微生物でも安全かつ迅速に測定できる菌体の前処理法を確立し、再現性のよいマススペクトルプロファイルを得るための条件を設定した。これを用い *E. coli* (NBRC3972)、*B. subtilis* (NBRC3134)、*P. aeruginosa* (NBRC13275)、*S. aureus* subsp. *aureus* (NBRC13276)、*S. enterica* subsp. *enterica* (NBRC100797) のマススペクトルを測定しそれぞれ識別可能であることを示した。

蛍光顕微鏡を用いない簡便な細菌モニタリング法（画像処理法）を検討し、標準菌

を添加したイオン交換水等を試料としてこれまで決定したプロトコールに従って蛍光染色を行い、目視計数による細菌数の測定結果と画像処理法での測定結果を比較してその精度を確認した。

日本版「無菌操作法指針」の改正作業を行い、現在までに約2/3の見直しを完了した。

F. 健康危険情報

特になし。

G. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Ohnishi T., Muroi M., Tanamoto K.:
Inhibitory effects of soluble MD-2 and soluble CD14 on bacterial growth. *Microbiol. Immunol.*, **54**, 74-80 (2010)
- 2) Sugiyama K., Muroi M., Tanamoto K., Nishijima M., Sugita-Konishi Y.:
Deoxynivalenol and nivalenol inhibit lipopolysaccharide-induced nitric oxide production by mouse macrophage cells. *Toxicol Lett.*, **192**, 150-4 (2010)
- 3) Shioiri T., Muroi M., Hatao F., Nishida M., Ogawa T., Mimura Y., Seto Y., Kaminishi M., Tanamoto K.: Caspase-3 is activated and rapidly released from human umbilical vein endothelial cells in response to lipopolysaccharide. *Biochim. Biophys. Acta*, **1792**, 1011-1018 (2009)
- 4) Tanamoto K., Muroi M., Nakagawa Y., Shima K., Ichimura K.: 日本薬局方指定菌株の特性と保存管理法に関する研究、*Pharm. Regul. Sci.*, **40**, 520-524 (2009)
- 5) Kawasaki H, Furusho N, Tatebe C, Kubota H, Yanagi T, Yasukouchi Y, Mori Y, Yamashita Y, Iizuka T, Takahata K, Takahashi J, Sato K, Tanamoto K. Analysis of hexachlorobenzene in Food Red Nos. 104 (phloxine) and 105 (rose Bengal) by GC-ECD. *J. Food. Hyg. Soc. Japan*, **50**, 6-9 (2009)
- 6) Tada A, Sugimoto N, Sato K, Akiyama T, Asanoma M, Yun YS, Yamazaki T, Tanamoto K. Examination of original plant of Jamaica quassia extract, a natural bittering agent, based on composition of the constituents. *J. Food. Hyg. Soc. Japan*, **50**, 16-21 (2009)
- 7) Kawamura Y, Mutsuga M, Yamauchi T, Ueda S, Tanamoto K. Migration tests of cadmium and lead from paint film of baby toys. *J. Food. Hyg. Soc. Japan*, **50**, 93-96 (2009)
- 8) Ito Y., Sugimoto N., Akiyama T., Yamazaki T. & Tanamoto K. Cepaic acid, a novel xanthylum pigment from the dried outer scales of the yellow onion *Allium cepa*. *Tetrahedron Lett.*, **50**, 4084-4086 (2009)
- 9) 田原麻衣子、杉本直樹、末松孝子、有福和紀、斎藤剛、井原俊英、吉田雄一、多田敦子、久保田領志、清水久美子、山崎壮、棚元憲一、中澤裕之、西村哲治 qNMR に基づく有機リン系農薬イソキサチオンオキシソンの品質管理 *日本食品化学学会誌* **16**, 28-33 (2009)

- 10) 多田敦子、杉本直樹、古庄紀子、石附京子、佐藤恭子、山崎壮、棚元憲一 既存添加物オゾケライトの成分調査 日本食品化学学会誌 **16**, 92-96 (2009)
- 11) Tatebe C., Kawasaki H., Kubota H., Sato K., Tanamoto K. & Kawamura Y. Analysis of residual solvent in thickeners by headspace gas chromatography using a standard addition method. Jpn.J.Food Chem.Safety (JJFCS) **16**, 78-83 (2009)
- 12) Mutsuga M, Lee YK, Kawamura Y, Tanamoto K. Analysis of primary aromatic amines in paper products Shokuhin Eiseigaku Zasshi. **50**, 160-166 (2009)
- 13) 岡本晃典, 山口進康, 馬場貴志, 高木達也, 那須正夫. : 細菌数測定法における誤差分布の推定. 医薬品研究, 40: 1-8 (2009)
- 14) 山口進康, 一條知昭, 永瀬裕康, 馬場貴志, 那須正夫. : 閉鎖生態系生命維持システム (CELSS) における水の衛生微生物学的安全性評価システムの開発. Space Utiliz, Res., 25: 86-89 (2009)
- 15) Takashi Baba, Nobuyasu Yamaguchi, Rie Matsumoto and Masao Nasu.: Bacterial population dynamics in a reverse-osmosis water purification system determined by fluorescent staining and PCR-denaturing gradient gel electrophoresis., Microbes Environ., 24: 163-167 (2009)
- 16) Nobuyasu Yamaguchi, Yasuo Motoyama, Mami Matsumoto, Tomoaki Ichijo, Hideto, Nagumo, Noboru Kagami, Yoshihiko Tani, Masahiro Satake and Masao Nasu: *Staphylococcus epidermidis* forms floating micro-colonies in platelet concentrates at the early stage of contamination., J. Health Sci., 55: 726-731 (2009)
- 17) Nobuyasu Yamaguchi, Masafumi Ikeda and Masao Nasu: Rapid on-chip flow cytometric detection of *Listeria monocytogenes* in milk., J. Health Sci., 55: 851-856 (2009)
- 18) Nobuyasu Yamaguchi, Makoto Sasada and Masao Nasu.: Rapid detection of starved *Escherichia coli* with respiratory activity in potable water by signal-amplified in situ hybridization following formazan reduction. Microbes Environ., 24: 286-290 (2009)
- 19) Nobuyasu Yamaguchi, Hatsuki Hieda and Masao Nasu.: Simple and reliable swabbing procedure for monitoring microbes in the international space station. Eco-Engineering, 22: 27-30 (2010)
- 20) Horino A., Kenri T., Sasaki Y., Okamura N., and Sasaki T. Identification of a site-specific tyrosine recombinase that mediates promoter inversion of phase-variable *mpl* lipoprotein genes in *Mycoplasma penetrans*. Microbiology **155**, 1241-1249, 2009.
- 21) 神谷茂、蔵田訓、佐々木次雄、柳田修、跡見裕 : *Helicobacter pylori* とマイコプラズマの重複感染、*Helicobacter Research* **14**, 33-38, 2010.
- 22) 佐々木次雄 : 国際調和を踏まえた無菌試験法の改正、医薬品研究 **40**, 432-441, 2009

2. 学会発表

- 1) 森重智弘、吉岡靖雄、田辺綾、堤康央、室井正志、棚元憲一、河合裕一、眞弓忠範、向洋平、岡田直貴、中川晋作：非結晶性ナノシリカの自然免疫抑制作用に関する検討、第 36 回日本トキシコロジー学会 (2009, 7)
- 2) 水谷紀子、室井正志、五十嵐ありさ、菅野慎二、鎌田洋一、小西良子、棚元憲一：非病原性細菌による感染症に対する内分泌かく乱候補物質の影響評価、第 16 回日本免疫毒性学会学術大会 (2009, 8)
- 3) 杉山圭一、室井正志、棚元憲一、小西良子：TLR シグナルに対する deoxynivalenol の抑制機構、第 82 回日

本生化学会大会 (2009,10)

- 4) 室井正志、棚元憲一：TRAF6 は IRAK-1 と相互作用することにより proteasome 依存性に分解される、第 83 回日本細菌学会総会 (2010, 3)
- 5) 室井正志、棚元憲一：IRAK-1 により誘導される TRAF6 の proteasome 依存性の分解、日本薬学会第 130 年会 (2010, 3)

H. 知的財産権の出願・登録状況

なし

厚生労働科学研究費補助金（医薬品・医療機器イノベーションサイエンス総合研究事業）
分担研究報告書

微生物の迅速同定法の確立に関する研究

分担研究者	棚元憲一	武蔵野大学薬学部教授
協力研究者	中川恭好	独立行政法人製品評価技術基盤機構研究職員
	五十嵐雅之	財団法人微生物化学研究会生物資源探索ユニット長
	市村克彦	島津製作所株式会社ライフサイエンス研究所長
	藤分秀司	島津製作所株式会社分析計測事業部主幹技師
	島圭介	島津製作所株式会社ライフサイエンス研究所主任

研究要旨：マトリックス支援レーザー脱離イオン化質量分析法（MALDI-TOFMS）を利用した微生物の迅速同定法の確立に関しては、BSL2 レベルの微生物でも安全かつ迅速に測定できる菌体の前処理法を確立し、再現性のよいマススペクトルプロファイルを得るための条件を設定した。これを用い *E. coli* (NBRC3972)、*B. subtilis* (NBRC3134)、*P. aeruginosa* (NBRC13275)、*S. aureus* subsp. *aureus* (NBRC13276)、*S. enterica* subsp. *enterica* (NBRC100797) のマススペクトルを測定しそれぞれ識別可能であることを示した。

A. 研究目的

医薬品の微生物学的品質を確保するために、日本薬局方にはいくつかの微生物試験法が規定されているが、その信頼性を保証する諸条件が十分に整えられていない。医薬品の製造・出荷時に検出される微生物の迅速同定法に関しては、現在、遺伝子解析による方法が日局参考情報に記載されているが、これは菌のごく一部の情報しか与えないために、菌種間や属間が異なるにもかかわらず 90%以上の相同性を示す場合があることが問題となっている。

最近、マトリックス支援レーザー脱離イオン化質量分析法（MALDI-TOFMS）による菌の迅速識別が報告された。これは菌そのものを質量分析に供することが可能であり、迅速かつ簡便に同定が可能となること

が期待されている。本研究では MALDI-TOFMS を利用した新たな微生物迅速同定法を確立することを目的としている。この方法は微生物の同定法として期待されているばかりでなく、我々のこれまでの研究で、培養条件の違いによる菌の微細な変化をも捉えることが出来ることを見出しており、現在までまったく術のなかった日本薬局方標準菌株の品質管理法への発展が大いに期待される。

本年度は、BSL2 レベルの微生物でも安全かつ迅速に測定できる菌体の前処理法を検討し確立する。特に、測定に用いるマトリックス溶液、微生物の培養条件、継代、培地、凍結法等がマススペクトルプロファイルに与える影響を検討し、再現性のよいプロファイルを得るための条件設定を行うことを

目的とした。

B. 研究方法

1) 日本薬局方指定菌株とその培養

日本薬局方指定菌株は *Escherichia coli* (*E. coli*: NBRC 3972)、*Bacillus subtilis* (*B. subtilis*: NBRC 3134)、*Pseudomonas aeruginosa* (*P. aeruginosa*: NBRC 13275)、*Staphylococcus aureus* subsp. *aureus* (*S. aureus*: NBRC 13276) および *Salmonella enterica* subsp. *enterica* (*S. enterica*: NBRC 100797)を用いた。これらを SCD 寒天培地 (日本製薬) 上で 30°C、24 時間培養し、培養後 4°C (*P. aeruginosa* NBRC 13275 は室温) にて保存した。これを 1 週間ごとに新鮮培地上に移植して 5 世代まで継代した。凍結保存の影響を検討するため、各菌種の 1 世代目と 5 世代目をそれぞれ SCD 液体培地 (日本製薬) +12%グリセロール液、もしくは SCD 液体培地+8% DMSO 液を用いて凍結保存した。各世代の菌体および凍結保存した菌体を SCD 液体培地あるいは Nutrient broth (Difco) 5 ml に接種し、30°C で 16 時間振とう培養し、集菌後、滅菌蒸留水で洗浄し、分析まで -20°C にて保存した。

2) MALDI-TOFMS 試料溶液の調整

BSL レベル 2 の菌を使用することを考慮し、菌体を以下のように前処理した。トリフルオロ酢酸 40 μ l に凍結保存してあった菌懸濁液 10 μ l を加え、時々軽く振盪しながら室温で 30 分間処理する。これに超純水 0.45 ml を加え、攪拌し、これを試料溶液とした。

3) MALDI-TOFMS の測定

試料溶液 5 μ l とマトリクス溶液 (sinapinic acid 10 mg/ml、0.1%

trifluoroacetic acid、50% acetonitrile) 5 μ l を混合した。この混合液 1 μ l を、各試料溶液につき 3 ウェルずつサンプルプレートに滴下し風乾して測定を行った。

MALDI-TOFMS の測定は N₂ レーザー (波長 337.1 nm) を備えた KRATOS レーザーイオン化飛行時間型質量分析装置 AXIMA-TOF² (島津製作所) を用いて行った。加速電圧 20 kV、リニアモード、遅延引き出し (m/z 16952) の条件で検出した。マススペクトルの質量校正は apomyoglobin の [M+H]⁺ m/z 16952.55 と [M+H]²⁺ m/z 8476.78、ACTH18-39 の [M+H]⁺ m/z 2466.72 の 3 点を用いて外部標準法にて行った。

C. 研究結果

B. subtilis (NBRC 3134)、*E. coli* (NBRC 3972)、*P. aeruginosa* (NBRC 13275)、*S. aureus* (NBRC 13276) および *S. enterica* (NBRC 100797) の凍結保存菌を解凍後、それぞれ継代初代の菌の MALDI-TOFMS スペクトルを測定し比較した (図 1)。それぞれのプロファイルは明らかに異なるパターンを示した。いずれの菌株のスペクトルにも m/z 15,000 以上のピークはほとんど観察されなかった。

また、それぞれの菌株について 5 世代まで継代し、それぞれの MALDI-TOFMS スペクトルを測定したが、*B. subtilis* 以外は継代によるスペクトルプロファイルの違いはほとんど見られなかった (図 2)。*B. subtilis* については 3 世代目から m/z 13,660 付近 (矢印) に新たなピークが出現した。

次に、*E. coli* および *B. subtilis* を 6 継代

まで培養し、それぞれの世代の MALDI-TOFMS スペクトルを測定した。主なピークの測定値について繰り返しのばらつき、および、継代によるばらつきを検討すると、*E. coli* ではいずれのピークの m/z 値の標準偏差が 1 以下と、繰り返し、継代、共に良好な再現性を得た。一方、*B. subtilis* では m/z の大きなピークで *E. coli* よりも大きな標準偏差となったが、良好な再現性を得た (図 3)。

次に、培養に用いる液体培地の影響について検討するため、各菌種の 1 世代目と 5 世代目をそれぞれ SCD 液体培地および Nutrient broth で 16 時間培養し比較検討した。その結果、これも *B. subtilis* 以外は培地の違いによるスペクトルプロファイルの違いはほとんど見られなかった (図 4)。*B. subtilis* では SCD 液体培地で培養した際に、上に示したように m/z 13, 660 付近 (矢印) に新たなピークが出現したが、Nutrient broth で培養した場合にはこのピークは見られなかった。しかし、 m/z 12, 000-15, 000 付近のスペクトルを強拡大してみると (図 4 上段右)、1 世代目を SCD 液体培地で培養したもの (Ps1-S)、および Nutrient broth で培養したもの (Ps1-N)、さらに、5 世代目を Nutrient broth で培養したもの (Ps5-N) についても m/z 13, 660 付近 (矢印) にわずかながらピークが検出できることが明らかになった。

次に、凍結保存に用いる保護剤の影響について検討した。SCD 液体培地 + 12% glycerol (G) または SCD 液体培地 + 8% DMSO (D) で凍結保存した各菌種の 1 世代目と 5 世代目の菌懸濁液を融解し、それぞれ 0.1 ml を 5 ml の SCD 液体培地に接種し、

16 時間振とう培養し比較検討した。その結果、用いた保護剤がグリセロールであるか DMSO であるかにかかわらず、スペクトルプロファイルの違いはほとんど見られなかった (図 5)。

D. 考 察

現在、日本薬局方ではさまざまな菌株を使用することが規定されており、標準菌の例として ATCC 株や NBRC 株などが記載されている。これらの菌株の同定は形態、表現形質、DNA 解析などによりなされている。最近では 16S rRNA の遺伝子配列の解析が進められ、第 15 改正日本薬局方でも参考情報で紹介されている。しかしこの解析ではまれに種レベルや属レベルで異なる菌間でも 99% 以上の相同性を示す場合があるなど限界が指摘されている。また、培養条件や継代による菌株の変化が遺伝的な変異を伴うとも限らない。日本薬局方ではこれらを考慮し、マスターシードからの継代数が 5 回を超えないものを使用するなどの規定がなされている。しかし、5 回以内ならば菌株の品質が保たれているという保証はなく、さらにはマスターシードの品質をいかに確保していくのかという点についても不問となっている。

最近、MALDI-TOFMS による菌の迅速識別が報告され、この手法では測定に要する菌体量がわずか μg オーダーで十分であることや、菌体そのものを分析に供することができ、迅速かつ簡便な同定が可能なものとして期待されている。

今回、この MALDI-TOFMS を用いて日本薬局方で用いられる代表的な 5 種の菌株 *B. subtilis* (NBRC 3134)、*E. coli* (NBRC

3972)、*P. aeruginosa* (NBRC 13275)、*S. aureus* (NBRC 13276)および*S. enterica* (NBRC 100797)のMALDI-TOFMSスペクトルを検討し、これらは全く異なるプロファイルを示すこと、*B. subtilis*以外では繰り返し測定や継代数さらに培地や凍結法の違いによらず再現性のよいプロファイルを得られたことから、MALDI-TOFMSプロファイルを用いた菌株の識別は十分可能であると考えられる。

*B. subtilis*では継代により m/z 13, 660 付近に新たなピークが出現したが、このピークは、スペクトルを強拡大することにより、1世代目でもわずかながらこのピークが存在すること、Nutrient brothで培養した場合には5世代目でもわずかしは見られないことが明らかとなり、このピークは継代による突然変異により出現したのではなく、SCD液体培地で培養した場合にこのピーク物質が継代と共に増大したものと考えられる。

MALDI-TOFMSによる測定では、他の菌株の混入、培養時間の違いによる菌株の変化、培養温度の違いによる菌株の変化を捉えることが可能であったと報告されている。今回の我々の解析でも*B. subtilis*においてSCD液体培地で培養した際に継代により増大する物質を検出した。従って、この方法は培養条件や継代による菌株の変化を捉えるのに有用であると思われ、現在までまったく術のなかった日本薬局方標準菌株の品質管理法への発展が大いに期待される。

E. 結論

マトリックス支援レーザー脱離イオン化

質量分析法 (MALDI-TOFMS) を利用した微生物の迅速同定法の確立を目的に、BSL2レベルの微生物でも安全かつ迅速に測定できる菌体の前処理法を確立し、再現性のよいマススペクトルプロファイルを得るための条件を設定した。これを用い *E. coli* (NBRC3972)、*B. subtilis* (NBRC3134)、*P. aeruginosa* (NBRC13275)、*S. aureus* subsp. *aureus* (NBRC13276)、*S. enterica* subsp. *enterica* (NBRC100797)のマススペクトルを測定しそれぞれ識別可能であることを示した。

F. 研究発表

1. 論文発表

23) Ohnishi T., Muroi M., Tanamoto K.:

Inhibitory effects of soluble MD-2 and soluble CD14 on bacterial growth.

Microbiol. Immunol., **54**, 74-80 (2010)

24) Sugiyama K., Muroi M., Tanamoto K., Nishijima M., Sugita-Konishi Y.:

Deoxynivalenol and nivalenol inhibit lipopolysaccharide-induced nitric oxide production by mouse macrophage cells. Toxicol Lett., **192**, 150-4 (2010)

25) Shioiri T., Muroi M., Hatao F., Nishida M., Ogawa T., Mimura Y., Seto Y., Kaminishi M., Tanamoto K.: Caspase-3 is activated and rapidly released from human umbilical vein endothelial cells in response to lipopolysaccharide. Biochim. Biophys. Acta, **1792**, 1011-1018 (2009)

26) Tanamoto K., Muroi M., Nakagawa Y., Shima K., Ichimura K.: 日本薬局方指定菌株の特性と保存管理法に関する

- 研究、Pharm. Regul. Sci., **40**, 520-524 (2009)
- 27) Kawasaki H, Furusho N, Tatebe C, Kubota H, Yanagi T, Yasukouchi Y, Mori Y, Yamashita Y, Iizuka T, Takahata K, Takahashi J, Sato K, Tanamoto K. Analysis of hexachlorobenzene in Food Red Nos. 104 (phloxine) and 105 (rose Bengal) by GC-ECD. J. Food. Hyg. Soc. Japan, **50**, 6-9 (2009)
- 28) Tada A, Sugimoto N, Sato K, Akiyama T, Asanoma M, Yun YS, Yamazaki T, Tanamoto K. Examination of original plant of Jamaica quassia extract, a natural bittering agent, based on composition of the constituents. J. Food. Hyg. Soc. Japan, **50**, 16-21 (2009)
- 29) Kawamura Y, Mutsuga M, Yamauchi T, Ueda S, Tanamoto K. Migration tests of cadmium and lead from paint film of baby toys. J. Food. Hyg. Soc. Japan, **50**, 93-96 (2009)
- 30) Ito Y., Sugimoto N., Akiyama T., Yamazaki T. & Tanamoto K. Cepaic acid, a novel xanthylum pigment from the dried outer scales of the yellow onion *Allium cepa*. Tetrahedron Lett., **50**, 4084-4086 (2009)
- 31) 田原麻衣子、杉本直樹、末松孝子、有福和紀、斎藤剛、井原俊英、吉田雄一、多田敦子、久保田領志、清水久美子、山崎壯、棚元憲一、中澤裕之、西村哲治：qNMRに基づく有機リン系農薬イソキサチオンオキサソンの品質管理。日本食品化学学会誌 **16**, 28-33 (2009)
- 32) 多田敦子、杉本直樹、古庄紀子、石附京子、佐藤恭子、山崎壯、棚元憲一 既存添加物オゾケライトの成分調査。日本食品化学学会誌 **16**, 92-96 (2009)
- 33) Tatebe C., Kawasaki H., Kubota H., Sato K., Tanamoto K. & Kawamura Y. Analysis of residual solvent in thickeners by headspace gas chromatography using a standard addition method. Jpn.J.Food Chem.Safety (JJFCS) **16**, 78-83 (2009)
- 34) Mutsuga M, Lee YK, Kawamura Y, Tanamoto K. Analysis of primary aromatic amines in paper products Shokuhin Eiseigaku Zasshi. **50**, 160-166 (2009)
2. 学会発表
- 1) 森重智弘、吉岡靖雄、田辺綾、堤康央、室井正志、棚元憲一、河合裕一、眞弓忠範、向洋平、岡田直貴、中川晋作：非結晶性ナノシリカの自然免疫抑制作用に関する検討、第 36 回日本トキシコロジー学会 (2009, 7)
- 2) 水谷紀子、室井正志、五十嵐ありさ、菅野慎二、鎌田洋一、小西良子、棚元憲一：非病原性細菌による感染症に対する内分泌かく乱候補物質の影響評価、第 16 回日本免疫毒性学会学術大会 (2009, 8)
- 3) 杉山圭一、室井正志、棚元憲一、小西良子：TLR シグナルに対する deoxynivalenol の抑制機構、第 82 回日本生化学会大会 (2009, 10)
- 4) 室井正志、棚元憲一：TRAF6 は IRAK-1 と相互作用することにより proteasome 依存性に分解される、第 83 回日本細菌学会総会 (2010, 3)

- 5) 室井正志、棚元憲一：IRAK-1 により誘導される TRAF6 の proteasome 依存性の分解、日本薬学会第 130 年会 (2010, 3)

F. 知的財産権の出願・登録状況

なし

添付資料 1

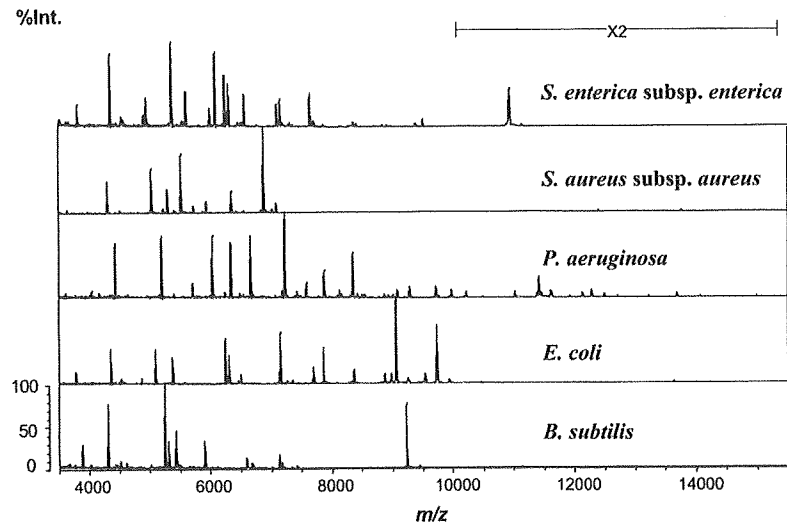


図1 *Bacillus subtilis* (*B. subtilis*: NBRC 3134)、*Escherichia coli* (*E. coli*: NBRC 3972)、*Pseudomonas aeruginosa* (*P. aeruginosa*: NBRC 13275)、*Staphylococcus aureus* subsp. *aureus* (*S. aureus*: NBRC 13276)、*Salmonella enterica* subsp. *enterica* (*S. enterica*: NBRC 100797)から得られた MALDI spectra

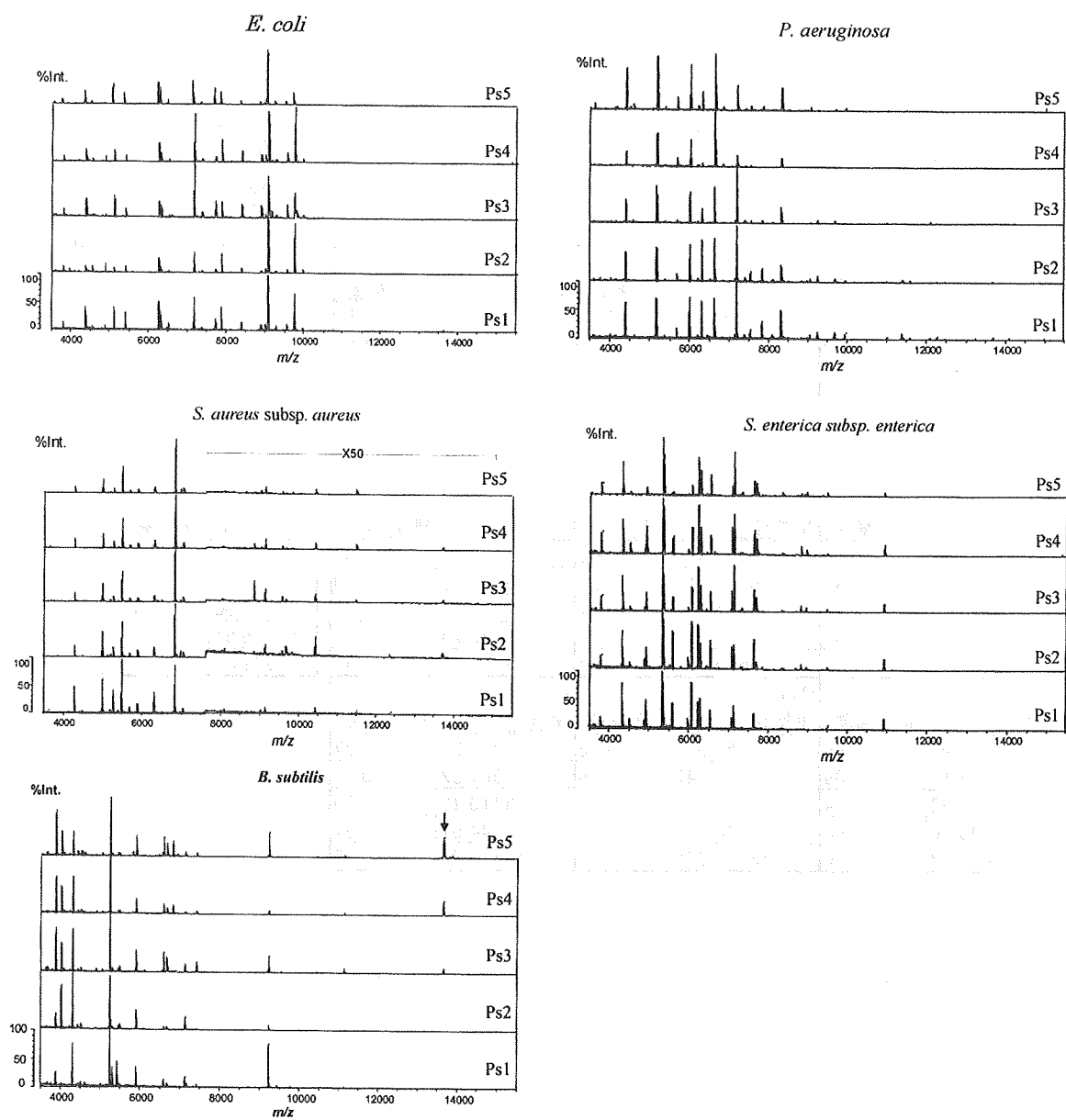


図2 MALDI spectra に与える継代 (Ps) の影響

E. coli

Ps1		Ps2		Ps3		Ps1-6	
平均値(m/z)	標準偏差	平均値(m/z)	標準偏差	平均値(m/z)	標準偏差	平均値(m/z)	標準偏差
6256.16	0.48	6256.95	0.34	6256.28	0.72	6256.33	0.34
7272.76	0.59	7274.12	0.58	7272.46	0.24	7272.86	0.64
8326.18	0.58	8327.16	0.42	8325.89	0.41	8326.18	0.52
9739.69	0.76	9740.93	0.66	9739.90	0.52	9739.94	0.49
11184.63	0.91	11186.30	1.13	11185.56	0.88	11185.20	0.64
Ps4		Ps5		Ps6			
平均値(m/z)	標準偏差	平均値(m/z)	標準偏差	平均値(m/z)	標準偏差		
6256.50	0.27	6256.03	0.59	6256.08	0.55		
7272.87	0.28	7272.46	0.33	7272.48	0.60		
8326.23	0.34	8325.78	0.41	8325.81	0.59		
9739.72	0.39	9739.77	0.43	9739.63	0.71		

B. subtilis

Ps1		Ps2		Ps3		Ps1-6	
平均値(m/z)	標準偏差	平均値(m/z)	標準偏差	平均値(m/z)	標準偏差	平均値(m/z)	標準偏差
5257.32	0.78	5257.89	0.60	5257.51	0.83	5257.57	0.28
6601.84	0.90	6602.11	0.54	6601.58	0.90	6601.75	0.35
9210.83	1.73	9211.47	0.71	9210.79	0.88	9211.00	0.45
11145.74	1.84	11146.57	0.71	11145.24	1.23	11145.61	0.77
-	-	13675.62	1.82	13671.70	1.57	13672.30	2.03
Ps4		Ps5		Ps6			
平均値(m/z)	標準偏差	平均値(m/z)	標準偏差	平均値(m/z)	標準偏差		
5257.90	0.86	5257.55	0.96	5257.25	0.37		
6602.13	1.06	6601.64	0.88	6601.22	0.31		
9211.62	1.44	9210.87	1.16	9210.42	0.39		
11146.36	1.98	11145.22	1.37	11144.51	0.57		
13672.62	2.76	13671.27	1.78	13670.30	0.75		

図3 *m/z* 値の繰り返し再現性および継代による再現性 (1-6 継代のサンプルをそれぞれ 9 回の測定を行った)