

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22年度 総括・分担研究報告書

研究代表者 室井 正志

平成23（2011）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	13
棚元 憲一	
(資料) 添付資料 1	
2. 微生物の迅速検出法の確立	27
山口 進康	
3. 日本版「無菌操作法指針」の改正	34
佐々木 次雄	
(資料 1) 無菌操作法による無菌医薬品の製造に関する指針	
III. 研究成果の刊行に関する一覧表	124

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）の室間再現性を検討し、薬局方指定菌株5種につき再現性のある特徴的なピークの存在を見出した。また、95%以上の16S rRNA 遺伝子配列相同性を有する菌株を用いて、本法による識別能について検討し、本法は遺伝子配列解析で理論的に分類不可能な近縁菌種でも識別する能力を有し、さらには同菌種に属する菌株をも識別できる可能性を示した。また、非無菌医薬品の微生物管理における細菌数測定プロトコール作成のために、水溶性および不溶性の賦形剤に対する蛍光染色法を検討し、水溶性賦形剤では前処理をすること無く高精度な検出が可能であったが、不溶性賦形剤では前処理法の十分な検討が必要であることを確認した。さらに、“無菌操作法による無菌医薬品の製造指針”の改正作業を終了し、監視指導・麻薬対策課に提出した。

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

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。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

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。

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。

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載の予定である。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。また、近縁菌株を用いた MALDI-TOFMS による識別能の検討では、9 株の *E. coli* (NBRC 3301, NBRC 3972, NBRC 12713, NBRC 12734, NBRC 13168, NBRC 13891, NBRC 13893, NBRC 14237, NBRC 102203)、*E. blattae* (NBRC 105725)、*E. fergusonii* (NBRC 102419)、および *E. hermanii* (NBRC 105704)を用い、A 研究室で解析を行った。これらを 5 ml の SCD 液体培地 (日本製薬) で 30°C、16 時間培養後、集菌し、滅菌蒸留水で 2 回洗浄した (分析まで保存する場合は -20°C にて保存)。

2) MALDI-TOFMS 試料溶液の調整

A, B, C 研究室では以下のようにして試料溶液を調整した。上記の菌懸濁液 10 μ l にトリフルオロ酢酸 40 μ l を加え、時々軽く振盪しながら室温で 30 分間処理した。これに超純水 0.45 ml を加え攪拌し、必要であれば 0.2 μ m のフィルターでろ過後、これを試料溶液とした。D 研究室では、試験菌株を SCD 寒天培地にて培養し、得られた 1 コロニーを 300 μ l の滅菌精製水に懸濁した。これに 900 μ l のエタノールを加えて攪拌した後、遠心し、上清を除いた。残渣に 70% 醋酸 50 μ l を加えて攪拌し、さらにアセトニトリル

50 μ l 加えて攪拌した。遠心後、上清を試料溶液とした。

3) MALDI-TOFMS の測定

A, B, C 研究室では試料溶液 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て風乾して各ウェルにつき 3 回ずつ、1 菌株につき合計、9 回の測定を行った。D 研究室では試料溶液 1 μ l を、サンプルプレートに滴下して風乾し、これにマトリクス溶液 (α -CHCA saturated solution, 2.5% trifluoroacetic acid, 50% acetonitrile) 1 μ l を滴下し風乾して測定した。

MALDI-TOFMS の測定は加速電圧 20 kV、リニアモード、遅延引き出しの条件で検出した。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。MALDI-TOFMS 機器は島津製作所製 KRATOS レーザーイオン化飛行時間型質量分析装置 AXIMA-TOF² (A 研究室)、アプライドバイオシステムズ社製 Voyager DERP (B 研究室)、Bruker Daltonics 社製 UltrafleXtreme (C 研究室) および ABI 社製 4700 Proteomics Analyzer (D 研究室) を用いた。

マススペクトルのクラスター解析は single link agglomerative clustering algorithm を利用した AnagnosTec SARAMIS ソフトウェア (Spectral Archiving and Microbial Identification System, Anagnostec GmbH, Germany) を用いて行った。

4) 16S rRNA 遺伝子配列解析

菌株の 16S rRNA 遺伝子配列は独立行政法人製品評価技術基盤機構のデータ (1467 塩基) をもとに、Clustal W 法により相同性解析を行った。

5) 蛍光染色用試料

標準菌株試料として、日本薬局方の微生物限度試験の生菌数試験に用いられている指標細菌 *Pseudomonas aeruginosa* NBRC 13275、*Bacillus subtilis* NBRC 3134、*Staphylococcus aureus subsp.* NBRC 13276 に加えて、*Escherichia coli* NBRC 3972 を用いた。賦形剤として、乳糖およびタルクを用いた。試料溶液は各賦形剤 1 g を 9 mL のろ過滅菌水に溶解あるいは懸濁した。SCD 液体培地を用いて指標菌を 30°C で一晚培養した。菌液をマイクロチューブにとり、遠心分離により菌体を分離した後、ろ過滅菌水で洗浄した。適当な菌濃度になるようにろ過滅菌水に懸濁したものを、菌懸濁液とした。この菌懸濁液を前述の試料溶液に添加し、回収率を求めることにより、蛍光染色法による生菌数測定の妥当性を評価した。

6) 蛍光染色

CFDA-DAPI 二重染色法は局方収載の方法により行い、蛍光顕微鏡を用いて生菌数を測定した。試料を前処理した後、細菌をポリカーボネートフィルター (直径 25 mm、孔径 0.2 μ m) 上に捕集し、蛍光染色剤を添加後、約 3 分間染色を行った。蛍光顕微鏡の紫外線励起光および青色励起光下で細菌数を測定した。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 視野以上の場合には、ろ過量を増やして試

料を再調製した。

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 6 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きた。平成 21 年度に 3 回、平成 22 年度に 4 回の計 7 回の班会議を開催した。またパブコメを日薬連品質委員会に求め、日薬連傘下団体から 250 を超える有意義なコメントをいただいた。コメントの多くを反映させ、最終案とし、監麻課に提出した。

(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

MALDI-TOFMS スペクトルの室間再現性を検討するため、日本薬局方指定菌株である *E. coli* (NBRC 3972)、*B. subtilis* (NBRC 3134)、*P. aeruginosa* (NBRC 13275)、*S. aureus* (NBRC 13276) および *S. enterica*: (NBRC 100797) の 5 株につき、4 箇所の研究施設で MALDI-TOFMS スペクトルを測定した。

A, B, C 研究所では同一の試料作成法を用いて 1 菌株につき 9 回の測定を行った。D 研究所では上記試料作成法ではスペクトルピークが観察されなかったため、異なる菌体抽出、および、MALDI-TOFMS 試料作成法を用いて、1 菌株につき 2 回ずつの測定を行った。

E. coli および他の菌株につき、A, B, C 研究所では 9 回の測定に一環して観察されたピーク、D 研究所では 2 回の測定に共通して観察されたピークのリストを表 1 から表 5 に示す。いずれの菌株でも一研究施設に固有のピークが観察されるものの、A, B, C 研究施設に共通して見られるピークの存在を認めた。*E. coli* では m/z 4364, 6254 および 9060 付近のピーク (表 1)、*B. subtilis* では m/z 4307, 5255, 5901, 6599, 6699 および 9215 付近のピーク (表 2)、*P. aeruginosa* では m/z 4435, 5209, 6045, 6673, 7232, 7889 および 8352 付近のピーク (表 3)、*S. aureus* では m/z 5032, 5524 および 6887 付近のピーク (表 4)、*S. enterica* では m/z 4365, 6254 および 7158 付近のピーク (表 5) が共通して見られた。

一方で、D 研究所で得られたマススペクトルプロファイルはいずれの菌株でも他の研究施設と異なるプロファイルが得られた。

次に、95%以上の 16S rRNA 遺伝子配列相同性を有する *E. coli* 9 株 (NBRC 3301, NBRC 3972, NBRC 12713, NBRC 12734, NBRC 13168, NBRC 13891, NBRC 13893, NBRC 14237, NBRC 102203)、*E. blattae* 1 株 (NBRC 105725)、*E. fergusonii* 1 株 (NBRC 102419)、および *E. hermannii* 1 株 (NBRC 105704) を用いた MALDI-TOFMS による識別能についての検討を行った。これらの菌

株の 16S rRNA 遺伝子配列相同性につき系統樹解析を行うと、*E. coli* 9株と *E. fergusonii* の相同性は高く、*E. blattae* と *E. hermanii* は他の菌株とは明らかに異なっていた。ただし各菌株間の相同性を数字で見ると、*E. coli* 9株間の相同性は 99-100%、*E. coli* と *E. fergusonii* の相同性は 98.9-99.7%であり、*E. blattae* および *E. hermanii* は他の菌株間と 95.8-97.5%と高い相同性を示した。

上記の菌株につき MALDI-TOFMS 解析を行った。これらのスペクトルパターンは一見ただけでは差が明らかではなかった。そこで、これらのスペクトルにつきクラスター解析を行うと、*E. coli* 9株間で 78-92%、*E. coli* と *E. fergusonii* 間で 74%の相同性を示し、*E. blattae* および *E. hermanii* の他の菌株間との相同性はわずか 32%であり、16S rRNA 遺伝子配列解析に比べ高い識別能を示した。

それぞれの菌株の 2 回の MALDI-TOFMS スペクトルのクラスター解析を行ったところ、それぞれ 2 回の測定は概ね個々のクラスターとして他の菌株から分離でき、MALDI-TOFMS による解析は 16S rRNA 遺伝子配列解析で理論的に分類不可能な近縁菌種でも識別する能力を有し、さらには同菌種に属する菌株をも識別できる可能性を示した。

2) 微生物の迅速検出法の確立に関する研究

水に溶解可能な賦形剤として乳糖を選び、蛍光活性染色法による生菌数測定方法を検討した。まず、大腸菌を用いて回収率を求めた。乳糖をろ過滅菌水に溶解し、大腸菌を加えた後、フィルター上に細菌を捕集し、DAPI 染色後に蛍光顕微鏡で計測した。同時

に菌懸濁液のみをフィルターろ過し、接種菌量を求めた。その結果 98%の良好な回収率を得た。

次に、通常の微生物限度試験の指標菌 (*Pseudomonas aeruginosa* NBRC 13275、*Bacillus subtilis* NBRC 3134、*Staphylococcus aureus* subsp. NBRC 13276) および大腸菌を乳糖に添加し、CFDA-DAPI 二重染色法によりエステラーゼ活性を有する細菌の回収率を求めた。その結果、いずれも 100%以上の良好な結果を得た。バックグラウンドも上がらず、試験が可能であることがわかった。

以上の結果から、乳糖は 10 g を 90 mL のろ過滅菌水に溶解して試料溶液を調製し、蛍光活性染色法を行うことにより、生菌数が測定可能であるとわかった。

次に、水に不溶な賦形剤であるタルクを用いて、蛍光活性染色法による生菌数測定方法を検討した。鉱物であるタルクには微生物が付着していることもあり、微生物汚染の問題を起こすことが多い。また、タルクは水のみならず、グリセリン、アルコール、酸やアルカリなどにも溶解しない脂質感に富んだ微粉末である。蛍光活性染色法によりタルクの生菌数を計測するためには、フローサイトメトリーや蛍光量を測定するなどの方法もあるが、フィルター上に菌を捕集できることが望ましい。このため、タルクから細菌を回収する方法を検討した。指標菌として大腸菌を用い、検討した。

1 g のタルクを 9 mL のろ過滅菌水に懸濁して試料溶液を調製し、5 μm 、3 μm 、および 1 μm の孔径のセルロース混合エステル製フィルターを用いて試料をプレろ過した。プレろ過した溶液に菌を接種し、蛍光染色

法により回収率を測定したところ、5 µm 孔径のフィルターではタルク由来のバックグラウンドが高く菌の検出が困難であった。一方、3 µm および 1 µm 孔径のフィルターでは 100%以上の良好な回収率が認められた。このため、3 µm および 1 µm 孔径のフィルターによるプレろ過を行うことにより、生菌数を測定できる可能性が認められた。

次に、1 g のタルクを 9 mL のろ過滅菌水に懸濁した溶液に菌を添加し、1 µm 孔径のフィルターを用いて試料をプレろ過し、さらにろ過滅菌水 10 mL で 3 回洗浄した全ろ液を蛍光染色法により染色した。菌の回収率を求めたところ、0.02%以下と低い値を示した。

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 (2010)、EU-GMP Annex 1 (2009)、FDA 無菌操作法ガイダンス (2004)、PIC/S Annex 1(2009)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、それら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。最終案をまとめ上げ、監視指導・麻薬対策課に提出した。

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 *E. coli* (NBRC 3972)、*B. subtilis* (NBRC 3134)、*P. aeruginosa* (NBRC 13275)、*S. aureus* (NBRC 13276) および *S. enterica* (NBRC 100797) を用いて、MALDI-TOFMS スペクトルの室間再現性を検討し、同一の試料調整法であれば異なる研究施設および機器でもそれぞれの菌株で再現性のある特徴的なピークが得られ、それぞれの菌株が識別可能であることを確認した。*E. coli* と *S. enterica* ではどちらも m/z 4364 と 6254 付近にピークを認めるが、*E. coli* では m/z 9060、*S. enterica* では m/z 7158 付近に固有のピークを認め、両者は識別可能であった。

D 研究所では異なる調整法でマスペクトル解析を行い、他の研究所と明らかに異

なるマスパターンが得られた。しかし m/z を詳細に見てみると、多くのピークが他の研究所で見られたピークに比べ、 m/z にして約 20-30 低質量側の値となっている。例えば *P. aeruginosa* で A, B, C 研究所で得られた m/z 4435, 5209, 6045, 6673 および 7232 のピークに対応するものとして D 研究所では m/z 4415.8, 5186.9, 6021.3, 6646.3, 7198.0 という値が得られている

(表 3)。これは他の菌株でも同様であった。我々は異なる試料調整法でも多くの場合、同様な m/z 値が得られることを確認しており (データは示していない)、今回 A, B, C 研究所と D 研究所で得られたマス値の差はキャリブレーション法の差など、試料調整法とは異なる要因に由来するものかも知れない。

今回の検討で、同一の試料調整法を用いることで高い室内再現性が得られることが明らかになったが、今回用いた A, B, C 研究所の調整法では MALDI-TOFMS の機器により、シグナル対ノイズ比が低い場合や、ピークが得られないケースがあったことから、今後はより高いシグナル対ノイズ比が得られる試料調整法を検討する必要があるものと思われる。

近年、16S rRNA 遺伝子配列解析は菌種の同定に繁用されているが、これによる菌種の識別には限界がある。例えば、通常 99% 以上の相同性を示す場合は同じ菌種と見なされるが、今回検討した *E. coli* 9 株のうち、8 株が *E. fergusonii* と 99% 以上の相同性を示している (表 6)。一方で、MALDI-TOFMS による解析では両者を明瞭に区別でき、遺伝的近縁の菌種の識別に MALDI-TOFMS が有用であることを確認した。

MALDI-TOFMS による解析は同種に属するある種の菌株間の識別も可能であることが報告されている。今回我々は *E. coli* 9 株のマススペクトルのクラスター解析を行い、繰り返し測定による再現性が菌株間の相同性を上回る結果を得た。このことは MALDI-TOFMS による解析は菌株間の識別にも利用できる可能性を示しており、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。

水溶性賦形剤に対する蛍光染色法を検討では、水に溶解可能な賦形剤として乳糖を選び、通常の微生物限度試験に用いられる細菌を指標菌として添加回収試験を行い、おおむね良好な結果を得た。しかし、指標菌として *P. aeruginosa* NBRC 13275 を用いた場合、長桿菌であるために計測が困難であった。接種菌量を下げることにより計測可能であるが、測定誤差が大きくなると思われるため、この検出系における添加回収実験には不向きだと考えた。

不溶性賦形剤に対する蛍光染色法を検討では、水に不溶な賦形剤であるタルクを用いて大腸菌の添加回収試験を行ったが低い回収率しか得られなかった。タルクは表面が滑らかで微細な粒子であるが、水を含みこの粒子が集まると粘性を示す。このため、プレろ過時のケーキに付着した菌体を回収できていないものと考えられる。そこで、洗浄液に 0.05% のポリソルベート 80 を加えて洗浄を行ったところ 0.04% と回収率は少し上昇した。また、同様に 3 μm 孔径のフィルターを用いてプレろ過し、洗浄液に 0.05% のポリソルベート 80 を加えて洗浄を行ったところ、0.06% と回収率はさらに少

し上昇した。しかしながら、いずれも回収率の向上に大きな効果は認められなかった。

洗浄液に1%までのポリソルベートを加えることは認められている。しかしながら、ポリソルベート 80 は細菌捕集用の黒色フィルターを脱色するため、バックグラウンドを上昇させ蛍光の検出を困難にする可能性がある。今後、さらに細かな前処理法の検討を加え、回収率の上昇を試みる予定である。

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年間の研究班活動の第1年度～2年度で「無菌操作法指針」の見直し、第2年度～3年度で「最終滅菌法指針」を見直す予定である。「無菌操作法指針」は監麻課からの発出後、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。また、英訳版の作成も行う。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見直しを図ってきた。

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、*E. coli* (NBRC3972)、*B. subtilis* (NBRC3134)、*P. aeruginosa* (NBRC13275)、*S. aureus subsp. aureus* (NBRC13276)、*S. enterica subsp. enterica* (NBRC100797)のマススペクトルの室間再現性を検討し、それぞれの菌株につき再現性のある特徴的なピークの存在を見出した。また、95%以上の16S rRNA 遺伝子配列相同性を有する *Escherichia* 菌株を用いて、本法による識別能について検討し、本法は遺伝子配列解析で理論的に分類不可能な近縁菌種でも識別する能力を有し、さらには同菌種に属する菌株をも識別できる可能性を示した。

微生物の迅速検出法の確立の研究では、水に溶解可能な賦形剤として乳糖、水に不溶性賦形剤としてタルクを選び、混入した細菌を蛍光活性染色法(CFDA-DAPI二重染色法)により検出するためのプロトコルを検討し、水溶性の賦形剤では前処理をすること無く高精度な検出が可能であったが、不溶性の賦形剤では前処理法の十分な検討が必要であることを確認した。

日本版“無菌操作法による無菌医薬品の

製造指針”の改正作業を終了し、監視指導・麻薬対策課に提出した。

F. 健康危険情報

特になし。

G. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Muroi M., Shima K., Nakagawa Y., and Tanamoto K.: Application of matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry for discrimination of *Escherichia* strains possessing highly conserved ribosomal RNA gene sequences. *Biol. Pharm. Bull.*, **34**, 430-432 (2011)
- 2) Yoshida, T., Yoshioka, Y., Fujimura, M., Kayamuro, H., Yamashita, K., Higashisaka, K., Nakanishi, R., Morishita, Y., Nabeshi, H., Yamashita, T., Muroi, M., Tanamoto, K., Nagano, K., Abe, Y., Kamada, H., Kawai, Y., Mayumi, T., Itoh, N., Yoshikawa, T., Tsunoda, S., Tsutsumi, Y.: Urban aerosols induce pro-inflammatory cytokine production in macrophages and cause airway inflammation *in vivo*. *Biol. Pharm. Bull.*, **33**, 780-783 (2010)
- 3) 秋山卓美、佐々木亮、山崎壮、棚元憲一、山形一雄、河村葉子 SDS-PAGEによる既存添加物酵素のたんぱく質分離パターン *日本食品化学学会誌*, **17**, 88-95 (2010)
- 4) Akiyama T, Hayashi A, Yamazaki T, Tada A, Sugimoto N, Yun YS, Kunugi A, Tanamoto K, Kawamura Y. Identification methods of terpenoid gum bases using TLC and GC/MS, *食品衛生学雑誌*, **51**, 264-72 (2010)
- 5) Akiyama T, Yamazaki T, Tanamoto K. Analysis of thickening polysaccharides by the improved diethylthioacetal derivatization method. *J. Food. Hyg. Soc. Japan.* **52**, 40-6 (2011)
- 6) Tanamoto K., Muroi M., Igarashi M., Shima K., Nakagawa Y., Fujiwake H.: 日本薬局方指定菌株の特性と保存管理法に関する研究 III、*医薬品医療機器レギュラトリーサイエンス*, **41**, 890-894 (2010)
- 7) 山口進康、那須正夫：蛍光染色による細菌数の迅速測定法. *じほう*, 102-105、日本薬局方 技術情報 2010 (財団法人日本公定書協会 編) (2010)
- 8) 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)
- 9) Tomoaki Ichijo, Yoko Izumi, Nobuyasu Yamaguchi and Masao Nasu.: Rapid enumeration of respiratory active mycobacteria with fluorescent double staining. *J. Microbiol. Methods*, **82**: 327-329 (2010)

2. 学会発表

- 1) Masashi Muroi and Ken-ichi Tanamoto: Stimulation of Toll-like receptors leads to proteasome-dependent downregulation of TRAF6 through interaction with IRAK-1.

- Annual Meeting of The Society for Leukocyte Biology & The International Endotoxin and Innate Immunity Society (2010, 10)
- 2) 室井 正志、棚元 憲一：IRAK-1 による TRAF6 の分解を介した TLR シグナリングの抑制的調節、第 16 回日本エンドトキシン・自然免疫研究会 (2010, 11)
 - 3) 室井 正志、島 圭介、中川 恭好、棚元 憲一：マトリックス支援レーザー脱離イオン化質量分析法による遺伝的近縁菌株の識別解析、日本薬学会第 131 年会 (2011, 3)
 - 4) 杉浦 友香、廣野 泰亮、室井 正志、棚元 憲一：光散乱エンドトキシン測定法における攪拌回転速度の検討、日本薬学会第 131 年会 (2011, 3)
 - 5) N. Yamaguchi, Y. Uebayashi, M. Torii and M. Nasu: Rapid enumeration of *Legionella pneumophila* in aquatic environment by using a microfluidic device, ASM 2010 General Meeting (2010, 5)
 - 6) T. Baba, K. Tani, N. Yamaguchi and M. Nasu: Inactivation of bacteria in aquatic environment by momentary decompression following high pressurization, ASM 2010 General Meeting (2010, 5)
 - 7) T. Ichijo, Y. Izumi, N. Yamaguchi and M. Nasu: Rapid detection of respiratory active *Mycobacteria* by multicolor imaging, ASM 2010 General Meeting (2010, 5)
 - 8) T. Ichijo, Y. Izumi, N. Yamaguchi and Masao Nasu: Rapid enumeration of respiratory active *Mycobacteria* with fluorescent double staining, ISME-13 (2010, 8)
 - 9) T. Ichijo, T. Baba, N. Yamaguchi and M. Nasu: Estimation of abundance of bacteria on Asian dust by quantitative PCR, ISME-13 (2010, 8)
 - 10) N. Yamaguchi, Y. Uebayashi, M. Torii and M. Nasu: Rapid monitoring of *Legionella pneumophila* in aquatic environment by using a microfluidic device, ISME-13 (2010, 8)
 - 11) 一條 知昭, 和泉 陽子, 中本 小百合, 山口 進康, 那須 正夫: Auramine O-CTC 二重染色法の呼吸活性をもつ MAC (*Mycobacterium avium complex*) の迅速検出への応用、フォーラム 2010: 衛生薬学・環境トキシコロジー (2010, 9)
 - 12) 一條 知昭, 馬場 貴志, 山口 進康, 那須 正夫: 黄砂とともに飛来する細菌の現存量、フォーラム 2010: 衛生薬学・環境トキシコロジー (2010, 9)
 - 13) 山口 進康, 石原 理絵, 大野 愛子, 那須 正夫: 粘着集菌シートを用いた国際宇宙ステーション日本実験棟「きぼう」における細菌モニタリング、フォーラム 2010: 衛生薬学・環境トキシコロジー (2010, 9)
 - 14) 馬場 貴志, 谷 佳津治, 山口 進康, 那須 正夫: 連続的な加圧・減圧処理による細菌の不活化、日本温泉科学会第 63 回大会 (2010, 9)
 - 15) 馬場 貴志, 谷 佳津治, 山口 進康, 那須 正夫: 連続的な加圧・減圧処理

- による細菌の不活化、第 100 回 日本食品衛生学会学術講演会 (2010、9)
- 16) 山口 進康, 那須 正夫: 細菌迅速検出法の現状と課題、日本防菌防黴学会第 37 回年次大会 (2010、9)
- 17) 馬場 貴志, 谷 佳津治, 山口 進康, 那須 正夫: 連続的な加圧・減圧処理による細菌の不活化、日本防菌防黴学会第 37 回年次大会 (2010、9)
- 18) N. Yamaguchi, T. Ichijo, Y. Himesawa, K. Enoki, M. Saraya, T. Baba and M. Nasu: Abundance and population structure of bacteria on Asian dust determined by PCR-based approaches, 4th International Symposium on Environment of Rim of the Japan/East Sea (2010, 10)
- 19) 山口 進康, 松川 周平, 新留 洋子, 那須 正夫: マイクロチップ電気泳動を用いた水環境中の細菌群集プロファイリング、日本微生物生態学会第 26 回大会 (2010、11)
- 20) 馬場 貴志, 一條 知昭, 更家 信, 榎木 香奈美, 山口 進康, 那須 正夫: 黄砂とともに飛来する細菌の多様性、日本微生物生態学会第 26 回大会 (2010、11)
- 21) 一條 知昭, 馬場 貴志, 姫澤 由佳, 山口 進康, 那須 正夫: 黄砂とともに飛来する細菌の現存量、日本微生物生態学会第 26 回大会 (2010、11)
- 22) 山口進康, 稗田はつき, 一條知昭, 那須正夫: 国際宇宙ステーションから回収した機器における細菌の現存量、第 27 回宇宙利用シンポジウム (2011、1)
- 23) N. Yamaguchi, T. Ichijo and M. Nasu : A new sampling device, “microbe-collecting adhesive sheet”, for sampling microbial cells on solid dry surfaces, *Geobiology in Space Exploration* (2011, 2)
- 24) 高木 達也, 川下 理日人, 白国優子, 平井 啓, 服部 千鶴子, 岡本 晃典, 藤原 拓也、山口 進康, 那須 正夫: サリドマイド安全使用のための薬剤管理に関する調査 一その 2一、日本薬学会第 131 年会 (2011、3)
- 25) 白國 優子, 藤原 拓也, 須磨 一夫, 平井 啓, 服部 千鶴子, 岡本 晃典, 川下 理日人, 山口 進康, 那須 正夫, 高木 達也: 要管理医薬品の回収・指導に関する調査、日本薬学会第 131 年会 (2011、3)
- 26) 山口 進康, 石原 理絵, 大野 愛子, 那須 正夫: 粘着集菌シートを用いた国際宇宙ステーション「きぼう」の細菌モニタリング、日本薬学会第 131 年会 (2011、3)
- 27) 山口 進康, 井口 洋平, 那須 正夫: マイクロ流路システムを用いた水環境中の細菌の迅速モニタリング、日本薬学会第 131 年会 (2011、3)
- 28) 山口 進康, 稗田 はつき, 一條 知昭, 那須 正夫: 国際宇宙ステーション内で使用されていた画像変換システム内部における細菌現存量、日本薬学会第 131 年会 (2011、3)
- 29) 一條 知昭, 和泉 陽子, 中本 小百合, 山口 進康, 那須 正夫: 住環境における非結核性抗酸菌の動態解明、日本薬学会第 131 年会 (2011、3)
- 30) 馬場 貴志, 姫澤 由佳, 一條 知昭, 山口 進康, 那須 正夫: レーザー顕

微鏡を用いた黄砂粒子に付着している微生物の可視化、日本薬学会第 131 年会 (2011、3)

- 31) 一條 知昭, 馬場 貴志, 迫谷 有希子, 谷 佳津治, 山口 進康, 那須 正夫: 黄砂現象に伴って移動する細菌の現存量、日本薬学会第 131 年会 (2011、3)
- 32) 馬場 貴志, 更家 信, 一條 知昭, 山口 進康, 那須 正夫: 黄砂現象に伴って移動する細菌の多様性、日本薬学会第 131 年会 (2011、3)
- 33) 馬場 貴志, 榎木 香奈実, 一條 知昭, 山口 進康, 那須 正夫: 増殖活性にも

とついた黄砂現象に伴って移動する細菌の系統解析、日本薬学会第 131 年会 (2011、3)

- 34) 藤村 真徳, 吉岡 靖雄, 山下 浩平, 東阪 和馬, 森下 裕貴, 藩 慧燕, 小椋 健正, 鍋師 裕美, 吉川 友章, 伊藤 徳夫, 馬場 貴志, 山口 進康, 那須 正夫, 堤 康央: 黄砂の健康リスク評価を目指した免疫毒性学的解析、日本薬学会第 131 年会 (2011、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

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
	藤分秀司	株式会社島津製作所分析計測事業部応用技術部
	島圭介	株式会社島津製作所分析計測事業部応用技術部
	田中将太	アステラス製薬株式会社製剤研究所
	宮部孝彦	アステラス製薬株式会社製剤研究所
	三村尚志	アステラス製薬株式会社製剤研究所
	森 充生	エーザイ・プロダクトクリエーション・システムズ、 ファーマシューティカル・サイエンス&テクノロジー 機能ユニット
	蟹和宏顕	エーザイ・プロダクトクリエーション・システムズ、 ファーマシューティカル・サイエンス&テクノロジー 機能ユニット
	河邊圭吾	大日本住友製薬株式会社技術研究本部
	佐藤貴之	大日本住友製薬株式会社技術研究本部
	奥西薫子	大日本住友製薬株式会社技術研究本部

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、前年度に確立した条件を用い、室間再現性を検討するため、*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4研究室で測定し、それぞれの菌株につき再現性のある特徴的なピークの存在を見出した。また、95%以上の16S rRNA 遺伝子配列相同性を有する *Escherichia* 菌株を用いて、本法による識別能について検討し、本法は遺伝子配列解析で理論的に分類不可能な近縁菌種でも識別する能力を有し、さらには同菌種に属する菌株をも識別できる可能性を示した。

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、日局指定標準菌株を加えた種々の菌株の MALDI-TOFMS スペクトルを前年度に設定した条件で測定し、これらの室間再現性を検討する。さらに、95%以上の 16S rRNA 遺伝子配列相同性を有する近縁菌株を用いて、MALDI-TOFMS による識別能について検討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。また、近縁菌株を用いた MALDI-TOFMS による識別能の検討では、9株の *E. coli* (NBRC 3301, NBRC 3972, NBRC 12713, NBRC 12734, NBRC 13168, NBRC 13891, NBRC 13893, NBRC 14237, NBRC 102203), *E. blattae* (NBRC 105725), *E. fergusonii* (NBRC

102419), および *E. hermannii* (NBRC 105704) を用い、A 研究室で解析を行った。これらを 5 ml の SCD 液体培地 (日本製薬) で 30°C、16 時間培養後、集菌し、滅菌蒸留水で 2 回洗浄した (分析まで保存する場合は -20°C にて保存)。

2) MALDI-TOFMS 試料溶液の調整

A, B, C 研究室では以下のようにして試料溶液を調整した。上記の菌懸濁液 10 μ l にトリフルオロ酢酸 40 μ l を加え、時々軽く振盪しながら室温で 30 分間処理した。これに超純水 0.45 ml を加え攪拌し、必要であれば 0.2 μ m のフィルターでろ過後、これを試料溶液とした。D 研究室では、試験菌株を SCD 寒天培地にて培養し、得られた 1 コロニーを 300 μ l の滅菌精製水に懸濁した。これに 900 μ l のエタノールを加えて攪拌した後、遠心し、上清を除いた。残渣に 70% ギ酸 50 μ l を加えて攪拌し、さらにアセトニトリル 50 μ l を加えて攪拌した。遠心後、上清を試料溶液とした。

3) MALDI-TOFMS の測定

A, B, C 研究室では試料溶液 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て風乾して各ウェルにつき 3 回ずつ、1 菌株につき合計、9 回の測定を行った。D 研究室では試料溶液 1 μ l を、サンプルプレートに滴下して風乾し、これにマトリクス溶液 (α -CHCA saturated solution, 2.5% trifluoroacetic acid, 50% acetonitrile) 1 μ l を滴下し風乾して測定した。

MALDI-TOFMS の測定は加速電圧 20 kV、リニアモード、遅延引き出しの条件で検出した。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。MALDI-TOFMS 機器は島津製作所製 KRATOS レーザーイオン化飛行時間型質量分析装置 AXIMA-TOF² (A 研究室)、アプライドバイオシステムズ社製 Voyager DERP (B 研究室)、Bruker Daltonics 社製 UltrafleXtreme (C 研究室) および ABI 社製 4700 Proteomics Analyzer (D 研究室) を用いた。

マススペクトルのクラスター解析は single link agglomerative clustering algorithm を利用した Anagnostec SARAMIS ソフトウェア (Spectral Archiving and Microbial Identification System, Anagnostec GmbH, Germany)を用いて行った。

4) 16S rRNA 遺伝子配列解析

菌株の 16S rRNA 遺伝子配列は独立行政法人製品評価技術基盤機構のデータ (1467 塩基) をもとに、Clustal W 法により相同性解析を行った。

C. 研究結果

MALDI-TOFMS スペクトルの室間再現性を検討するため、日本薬局方指定菌株である *E. coli* (NBRC 3972)、*B. subtilis* (NBRC 3134)、*P. aeruginosa* (NBRC 13275)、*S. aureus* (NBRC 13276) および *S. enterica* (NBRC 100797) の 5 株につき、4 箇所の研究施設で MALDI-TOFMS スペクトルを測定した。A, B, C 研究所では同一の試料作成法を用いて 1 菌株につき 9 回の測定を行った。D 研究所では上記試料作成法ではスペクトルピークが観察されなかったため、異なる菌体抽出、および、MALDI-TOFMS 試料作成法を用いて、1 菌株につき 2 回ずつの測定を行った。*E. coli* から得られた典型的なマススペクトルプロファイルを図 1 に示す。A, B, C 研究所のプロファイルでは 3 研究施設で共通した

ピークが確認できた。一方、試料作成法が異なる D 研究所では他の研究施設で得られたピークに共通するものは見出せなかった。

E. coli および他の菌株につき、A, B, C 研究所では 9 回の測定に一環して観察されたピーク、D 研究所では 2 回の測定に共通して観察されたピークのリストを表 1 から表 5 に示す。いずれの菌株でも一研究施設に固有のピークが観察されるものの、A, B, C 研究施設に共通して見られるピークが存在を認めた。*E. coli* では m/z 4364, 6254 および 9060 付近のピーク (表 1)、*B. subtilis* では m/z 4307, 5255, 5901, 6599, 6699 および 9215 付近のピーク (表 2)、*P. aeruginosa* では m/z 4435, 5209, 6045, 6673, 7232, 7889 および 8352 付近のピーク (表 3)、*S. aureus* では m/z 5032, 5524 および 6887 付近のピーク (表 4)、*S. enterica* では m/z 4365, 6254 および 7158 付近のピーク (表 5) が共通して見られた。

一方で、D 研究所で得られたマススペクトルプロファイルはいずれの菌株でも他の研究施設と異なるプロファイルが得られた。

次に、95%以上の 16S rRNA 遺伝子配列相同性を有する *E. coli* 9 株 (NBRC 3301, NBRC 3972, NBRC 12713, NBRC 12734, NBRC 13168, NBRC 13891, NBRC 13893, NBRC 14237, NBRC 102203)、*E. blattae* 1 株 (NBRC 105725)、*E. fergusonii* 1 株 (NBRC 102419)、および *E. hermanii* 1 株 (NBRC 105704) を用いた MALDI-TOFMS による識別能についての検討を行った。これらの菌株の 16S rRNA 遺伝子配列相同性につき系統樹解析を行った結果を図 2 に示す。*E. coli* 9 株と *E. fergusonii* の相同性は高く、*E. blattae* と *E. hermanii* は他の菌株とは明らかに異なっていた。ただし各菌株間の相同性を数字で見ると、*E. coli* 9 株間の相同性は 99-100%、

E. coli と *E. fergusonii* の相同性は 98.9-99.7% であり、*E. blattae* および *E. hermannii* は他の菌株間と 95.8-97.5% と高い相同性を示した (表 6)。

上記の菌株につき MALDI-TOFMS 解析を行った結果を図 3 に示す。これらのスペクトルパターンは一見ただけでは差が明らかではなかった。そこで、これらのスペクトルにつきクラスター解析を行った (図 4)。その結果、*E. coli* 9 株間で 78-92%、*E. coli* と *E. fergusonii* 間で 74% の相同性を示し、*E. blattae* および *E. hermannii* の他の菌株間との相同性はわずか 32% であり、16S rRNA 遺伝子配列解析に比べ高い識別能を示した。

それぞれの菌株の 2 回の MALDI-TOFMS スペクトルのクラスター解析を行ったところ (図 4)、それぞれ 2 回の測定は概ね個々のクラスターとして他の菌株から分離でき、MALDI-TOFMS による解析は 16S rRNA 遺伝子配列解析で理論的に分類不可能な近縁菌種でも識別する能力を有し、さらには同菌種に属する菌株をも識別できる可能性を示した。

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 *E. coli* (NBRC 3972)、*B. subtilis* (NBRC 3134)、*P. aeruginosa* (NBRC 13275)、*S. aureus* (NBRC 13276) および *S. enterica* (NBRC 100797) を用いて、MALDI-TOFMS スペクトルの室間再現性を検討し、同一の試料調整法であれば異なる研究施設および機器でもそれぞれの菌株で再現性のある特徴的なピークが得られ、それぞれの菌株が識別可能あることを確認した。*E. coli* と *S. enterica* ではどちらも m/z 4364 と 6254 付近にピークを認めるが、*E. coli* では m/z 9060、*S. enterica* では m/z 7158 付近に固有のピークを認め、両者は識別可能であった。

D 研究所では異なる調整法でマスマスペクトル解析を行い、他の研究所と明らかに異なるマスマパターンが得られた。しかし m/z を詳細に見てみると、多くのピークが他の研究所で見られたピークに比べ、 m/z にして約 20-30 低質量側の値となっている。例えば *P. aeruginosa* で A, B, C 研究所で得られた m/z 4435, 5209, 6045, 6673 および 7232 のピークに対応するものとして D 研究所では m/z 4415.8, 5186.9, 6021.3, 6646.3, 7198.0 という値が得られている (表 3)。これは他の菌株でも同様であった。我々は異なる試料調整法でも多くの場合、同様な m/z 値が

得られることを確認しており（データは示していない）、今回 A, B, C 研究所と D 研究所で得られたマス値の差はキャリブレーション法の差など、試料調整法とは異なる要因に由来するものかも知れない。

今回の検討で、同一の試料調整法を用いることで高い室内再現性が得られることが明らかになったが、今回用いた A, B, C 研究所の調整法では MALDI-TOFMS の機器により、シグナル対ノイズ比が低い場合や、ピークが得られないケースがあったことから、今後はより高いシグナル対ノイズ比が得られる試料調整法を検討する必要があるものと思われる。

近年、16S rRNA 遺伝子配列解析は菌種の同定に繁用されているが、これによる菌種の識別には限界がある。例えば、通常 99%以上の相同性を示す場合は同じ菌種と見なされるが、今回検討した *E. coli* 9 株のうち、8 株が *E. fergusonii* と 99%以上の相同性を示している（表 6）。一方で、MALDI-TOFMS による解析では両者を明瞭に区別でき、遺伝的近縁の菌種の識別に MALDI-TOFMS が有用であることを確認した。

MALDI-TOFMS による解析は同種に属するある種の菌株間の識別も可能であることが報告されている。今回我々は *E. coli* 9 株のマススペクトルのクラスター解析を行い、繰り返し測定による再現性が菌株間の相同性を上回る結果を得た。このことは MALDI-TOFMS による解析は菌株間の識別にも利用できる可能性を示しており、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。

E. 結論

MALDI-TOFMS を利用した微生物の迅速同定法の確立を目的に、*E. coli* (NBRC3972)、*B.*

subtilis (NBRC3134)、*P. aeruginosa* (NBRC13275)、*S. aureus subsp. aureus* (NBRC13276)、*S. enterica subsp. enterica* (NBRC100797) のマススペクトルの室内再現性を検討し、それぞれの菌株につき再現性のある特徴的なピークの存在を見出した。また、95%以上の 16S rRNA 遺伝子配列相同性を有する *Escherichia* 菌株を用いて、本法による識別能について検討し、本法は遺伝子配列解析で理論的に分類不可能な近縁菌種でも識別する能力を有し、さらには同菌種に属する菌株をも識別できる可能性を示した。

F. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Muroi M., Shima K., Nakagawa Y., and Tanamoto K.,: Application of matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry for discrimination of *Escherichia* strains possessing highly conserved ribosomal RNA gene sequences. *Biol. Pharm. Bull.*, **34**, 430-432 (2011)
- 2) Yoshida, T., Yoshioka, Y., Fujimura, M., Kayamuro, H., Yamashita, K., Higashisaka, K., Nakanishi, R., Morishita, Y., Nabeshi, H., Yamashita, T., Muroi, M., Tanamoto, K., Nagano, K., Abe, Y., Kamada, H., Kawai, Y., Mayumi, T., Itoh, N., Yoshikawa, T., Tsunoda, S., Tsutsumi, Y.: Urban aerosols induce pro-inflammatory cytokine production in macrophages and cause airway inflammation *in vivo*. *Biol. Pharm. Bull.*, **33**, 780-783 (2010)
- 3) 秋山卓美、佐々木亮、山崎壮、棚元憲一、山形一雄、河村葉子 SDS-PAGE による既存添加物酵素のたんぱく質分離パターン 日本食品化学学会誌, **17**, 88-95 (2010)

- 4) Akiyama T, Hayashi A, Yamazaki T, Tada A, Sugimoto N, Yun YS, Kunugi A, Tanamoto K, Kawamura Y. Identification methods of terpenoid gum bases using TLC and GC/MS, 食品衛生学雑誌, **51**, 264-72 (2010)
- 5) Akiyama T, Yamazaki T, Tanamoto K. Analysis of thickening polysaccharides by the improved diethylthioacetal derivatization method. J. Food. Hyg. Soc. Japan. **52**, 40-6 (2011)
- 6) Tanamoto K., Muroi M., Igarashi M., Shima K., Nakagawa Y., Fujiwake H.: 日本薬局方指定菌株の特性と保存管理法に関する研究 III、医薬品医療機器レギュラトリーサイエンス、**41**, 890-894 (2010)

F. 知的財産権の出願・登録状況
なし

2. 学会発表

- 1) Masashi Muroi and Ken-ichi Tanamoto: Stimulation of Toll-like receptors leads to proteasome-dependent downregulation of TRAF6 through interaction with IRAK-1. Annual Meeting of The Society for Leukocyte Biology & The International Endotoxin and Innate Immunity Society (2010, 10)
- 2) 室井 正志、棚元 憲一: IRAK-1 による TRAF6 の分解を介した TLR シグナリングの抑制的調節、第 16 回日本エンドトキシン・自然免疫研究会 (2010, 11)
- 3) 室井 正志、島 圭介、中川 恭好、棚元 憲一: マトリックス支援レーザー脱離イオン化質量分析法による遺伝的近縁菌株の識別解析、日本薬学会第 131 年会 (2011, 3)
- 4) 杉浦 友香、廣野 泰亮、室井 正志、棚元 憲一: 光散乱エンドトキシン測定法における攪拌回転速度の検討、日本薬学会第 131 年会 (2011, 3)