

201132006A

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23年度 総括・分担研究報告書

研究代表者 室井 正志

平成24(2012)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	
(資料) 添付資料 1	11
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	16
棚元 憲一	
(資料) 添付資料 2	20
2. 微生物の迅速検出法の確立	24
山口 進康	
3. 日本版「無菌操作法指針」の改正	29
佐々木 次雄	
(資料) 添付資料 3	33
III. 研究成果の刊行に関する一覧表	84

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）
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、実験室レベルで作成した1剤あるいは多剤薬剤耐性細菌株の識別能を検討した。コンピューターソフトを利用したクラスター解析を用いることでMALDI-TOFMSはこれらの薬剤耐性菌を識別できる能力を有するだけでなく、ある種の薬剤に対する異なるレベルの耐性を獲得した菌株の識別もできる可能性を見出した。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、不溶性かつ非脂溶性の医薬品添加物として、滑沢剤であるタルクおよびステアリン酸マグネシウムを選び、これらに対する染色法を検討し、混入した細菌数を蛍光活性染色法（CFDA-DAPI二重染色法）により迅速に測定するためのプロトコールを決定した。さらに、“最終滅菌法による無菌医薬品の製造に関する指針”の研究班としての最終版をまとめ上げた。

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
山口進康	大阪大学大学院薬学研究科	准教授

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掲載されているが、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掲載の予定である。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) 薬剤耐性菌株とその培養

今回使用した菌株とその薬剤耐性能を表 1 に示した。これらの薬剤耐性菌はそれぞれの薬剤存在下で継続的に継代する方法により作成した。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

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。

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 をサンプルプレートに滴下し風乾後、測定した。

MALDI-TOF MS 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-TOF MS 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) 蛍光染色用試料

滑沢剤として、タルクおよびステアリン酸マグネシウムを用いた。各滑沢剤をろ過滅菌水に懸濁した。

標準菌株として、*Escherichia coli* NBRC 3972 に加えて、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 を用いた。各菌株を SCD 液体培地を用いて 30℃ 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回収した後、ろ過滅菌水で洗浄した。適当な菌量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滑沢剤懸濁液に添加し、試料とした。後述の前処理を行った後、蛍光染色法により添加した細菌の検出率を求め、各前処理法の有用性を評価した。

5) 蛍光染色

CFDA-DAPI 二重染色は局方収載の方法により行い、蛍光顕微鏡を用いて細菌数を測定した。試料を今回検討した各条件で前処理した後、細菌をポリカーボネートフィルター (黒色、直径 25 mm、孔径 0.2 μm) 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下で DAPI により染色された細菌数、青色励起光下で CFDA により染色された細菌数を測定した。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。

6) 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、民間企業から 15 名で構成されている。民間企業関係者 15 名中、3 名は ISO/TC 198 (ヘルスケア製品の滅菌及び無菌性保証) に関する国際規格作成 (乾熱滅菌、照射滅菌、バイオロジカルインジケータ) の日本代表委員であり、6 名は輸液製剤メーカーからの代表委員である。また 3 名と PMDA 職員 6 名は、平成 23 年 4 月 20 日に監麻課より事務連絡として発出された「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 22 年 11 月 19 日に第 1 回班会議を開催し、平成 23 年 12 月 9 日の第 6 回班会議まで計 6 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 185 の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、研究班としての最終案とした。

(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-TOF MS の薬剤耐性菌株の識別能を検討するため、*Escherichia coli* NIHJ 株、*Escherichia coli* K-12 株および

Staphylococcus aureus Smith 株から 14 株の 1 剤または多剤薬剤耐性菌を作成した (表 1)。*S. aureus* については異なる濃度の novobiocin 耐性株を作成した。

まず、*E. coli* 株について MALDI-TOF MS を測定すると、これらの菌株は、スペクトルパターンより、明らかに NIHJ 由来と K-12 由来のグループに分類可能であった (図 1)。しかし、NIHJ 由来株間または K-12 由来株間の識別は目視レベルでは困難であった。

そこで次に、それぞれの菌株につき triplicate で測定し、コンピューターソフトウェアを用いたクラスター解析を行った。NIHJ 由来菌株の系統樹を見ると、各 triplicate 間の相動性が 88-97%と、各菌株間の相同性より高く、各 triplicate のデータがグループとして分類された (図 2A)。K-12 由来の菌株についても同様な解析を行ったところ、いくつかの例外はあるものの、概して各 triplicate のデータがグループとして分類された (図 2B)。このことは、MALDI-TOF MS が耐性菌株を識別する能力を有することを示している。

同薬剤に対して異なるレベルの耐性を獲得した *S. aureus* についてもクラスター解析を行ったところ、耐性の程度が高くなるにつれて野生型との相同性が低くなることが明らかになった (図 3)。このことは、MALDI-TOF MS が、ある種の薬剤に対して異なるレベルの耐性を有する菌株間を識別できる可能性を示している。

2) 微生物の迅速検出法の確立に関する研究

不溶性かつ非脂溶性の医薬品添加物として、まずタルクに対する蛍光活性染色法

(CFDA-DAPI 二重染色法) のプロトコールを検討した。タルクは鉱物であるため、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。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。そこで、プレろ過と洗浄による前処理法を検討した。

日本薬局方の微生物限度試験では、試料調製の初期量として試料 10 g を 100 mL の溶解・希釈液に加え、その 10 mL を試験に用いることが記されている。このため、1 g のタルクを 10 mL のろ過滅菌水に懸濁して試料液とした。しかしながら、タルクは脂質感に富む微粉末であるため、水に対してぬれが悪かった。タルクと親和性が高く菌体に影響を及ぼさない溶剤として、グリセロールやジメチルスルホキシド (DMSO) が挙げられる。そこで、1% DMSO を用いてタルクの懸濁性を向上させた。すなわち、タルク 1 g を量りとり、0.1 mL の DMSO を加えたらろ過滅菌水 10 mL に懸濁した。懸濁液に菌液を加えて、孔径 1 μm のセルロース混合フィルターでプレろ過し、そのろ液およびフィルターの洗浄液を無菌的に回収した。洗浄は 10 mL の 1% DMSO を用いて 3 回行った。回収液 (ろ液+フィルターの洗浄液) 全量中の細菌数を DNA 結合性の蛍光染色剤 DAPI を用いた蛍光染色法により測定した。大腸菌を指標として検討した結果、表 2 に示した通り検出率は約 8% となった。また、洗浄液の組成を変えても検出率の向上は見られなかった。

そこで次に、試料を 1/10 濃度にして (タルク 0.1 g をろ過滅菌水 10 mL に懸濁)、検討を行った。本検討にあたり、DMSO は大

腸菌に対する CFDA の染色性には影響を与えないが、枯草菌やブドウ球菌に対しては CFDA の染色性を下げる傾向が認められたため、DMSO は使わないこととした。タルク 0.1 g を量りとり、ろ過滅菌水 10 mL に懸濁した後、大腸菌の菌液を加え、孔径 1 μm のセルロース混合フィルターでプレろ過し、そのろ液および洗浄液を無菌的に回収した。回収液全量中の細菌数を蛍光染色剤 DAPI を用いて測定した。洗浄液として、水、1% DMSO、0.1%ポリソルベート 80、0.1%ポリソルベート 20 を選び、その効果を評価した。なお、ポリソルベートは黒色ポリカーボネートフィルターの色素を落とすため、濃度を 0.1%で検討することとした。その結果、図 4 に示したように、0.1%ポリソルベート 20 を用いて 3 回洗浄することにより、添加した大腸菌に対して 85%以上の良好な検出率が得られた。

次に、洗浄液としてポリソルベート 20 の濃度を決定するため、大腸菌を指標菌とし、CFDA-DAPI 二重染色法により細菌数の測定を行った (表 3)。前述のとおり、ポリソルベート 20 は黒色ポリカーボネートフィルターの色素を溶かすため、蛍光顕微鏡での観察時にバックグラウンドが高くなる。このため、ろ過に用いたフィルターをスライドガラス上に置く際に、新しい黒色フィルターを下に重ねて置くことで、顕微鏡観察時のバックグラウンドを抑えることができた。この方法を用いて、フィルターの洗浄液におけるポリソルベート 20 の濃度を 0.01%、0.05%、0.1%として CFDA-DAPI 二重染色による検出率を求めたところ、表 2 に示したとおり 0.05%で良好な検出率が得られた。

この結果から、蛍光活性染色法によるタルク中の生菌数測定法を以下のように決定した：「タルク 1 g をろ過滅菌水 100 mL に懸濁し、その 10 mL を 1 μm のセルロース混合フィルターを用いてろ過し、フィルター上に残存するタルクを 10 mL の 0.05%ポリソルベート 20 で 3 回洗浄する。回収したろ液および洗浄液について、蛍光顕微鏡下で細菌数を測定する。」

次に、日本薬局方の微生物限度試験法に記載されている指標菌 3 種を用いて、決定した方法での指標菌の検出率を求めた (表 4)。その結果、いずれの細菌においても 86%以上の良好な検出率が得られた。さらに、他の不溶性かつ非脂溶性の医薬品添加物であるステアリン酸マグネシウムについても検討したところ、同様のプロトコールにより、混入した細菌数を測定可能であることがわかった。

また、軟膏基剤である白色ワセリンについても検討したところ、ミリスチン酸イソプロピルの添加により、ろ過が可能となることがわかった。

3) 日本版「無菌操作法指針」の改正

監麻課より平成 19 年 6 月 4 日付けで事務連絡として発出された初版「最終滅菌法による無菌医薬品の製造指針」は、本体 11 章に付属資料として、放射線滅菌と高周波滅菌があったが、今回の改正版では本体 12 章に参考資料として、パラメトリックリリース、低 Fo 最終滅菌製剤の無菌性保証、バイオバーデン試験、滅菌条件設計法を組み入れた。特に「低 Fo 最終滅菌製剤の無菌性保証」は、121°Cで滅菌のできない輸液製剤の滅菌及び無菌性保証を示しており、欧米の規制とは異なるため、多くの議論がなされ

た。欧米では、 $F_0 < 8$ の滅菌を認めていないが、日本では 80% の輸液製剤が $F_0 < 2$ で製造されている。日本の PIC/S 加盟申請もあり、 $F_0 < 2$ の滅菌条件についての議論に多くの時間を費やした。その結果、製造環境の清浄度及びバイオーバーデン管理を厳しくすることができた。

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-TOF MS 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。この方法を用いた MRSA の臨床分離株の識別も報告されてい

るが、臨床分離株であるがために、これらの識別は単に株間の違いを反映するもので、耐性かどうかの差を見ているものではないとする意見もある。 β -lactam 系抗生物質に対する耐性菌を、菌株培養液中の β -lactam の分解を MALDI-TOF MS により測定して識別する方法も報告されているが、この方法は耐性菌が耐性薬剤に対する分解酵素誘導能を獲得した菌株のみの識別しかできない欠点がある。そこで今回、我々は、由来のはっきりとした菌株を用いて、実験室レベルで耐性菌を作成し、MALDI-TOF MS によるこれらの識別能について検討し、クラスター解析によりこれら 1 剤または多剤耐性菌株を識別できる可能性を見出した。

今回の 1 剤耐性菌株の解析では、N2 (streptothricinn 耐性)、N2 (streptomycin 耐性)、N5 (kanamycin 耐性) 菌株間の相動性がこれらと N3 (tetracycline 耐性) 間の相動性より低かった (図 2A)。これは、streptothricinn、streptomycin、kanamycin はいずれもアミノグリコシド系抗生物質に属し、同種の抗菌作用機序を有するのに対し、tetracycline の機序は異なることに由来しているのかも知れない。抗生物質の中でも streptomycin、erythromycin、spectinomycin などの抗生物質に対する耐性菌は、リボゾーム蛋白に変異が起きていることが知られている。我々の MALDI-TOF MS サンプルの調整法では得られる MS ピークの 50% がリボゾーム蛋白由来であることが報告されていることから、今回のクラスター解析によるこれらの耐性菌株間の差は変異したリボゾーム蛋白由来のピークを検出しているのかも知れない。

今回の我々の解析では異なるレベルの

novobiocin 耐性を獲得した菌株間の識別も可能である可能性を示した (図 3)。Novobiocin に対する耐性レベルが高くなるにつれて、*gyrB* または *parE* 遺伝子に変異が増えていくことが報告されている。これらの遺伝子産物の分子量は 72-75 kD と大きく、我々の MALDI-TOF MS の測定範囲外であることから、これらの変異を検出することで耐性菌株間を識別しているとは考えにくい。しかし、我々のサンプル調整では菌体を trifluoroacetic acid で処理しており、この処理は蛋白のフラグメント化を誘導することが報告されていることから、変異した *gyrB* または *parE* 遺伝子産物のフラグメント蛋白を検出しているのかも知れない。

今回我々は実際に性状の変化した菌株を用いて、これらの MALDI-TOF MS による識別能について検討した。その結果、MALDI-TOF MS は 1 剤または多剤耐性菌株を識別できる能力を有することを見出し、MALDI-TOF MS を利用することで、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が可能になることが大いに期待される。

微生物の迅速検出法の確立に関する研究では、十六改正日本薬局方に参考情報「蛍光染色による細菌数の迅速測定法」として収載された手法のうち、蛍光活性染色法について、検討を行った。本研究で検討した前処理法は、蛍光活性染色法だけではなく、マイクロコロニー法にも応用可能であると考えられる。

本研究の成果をもとに、今後、同様の検討を様々な医薬品原料や原薬、医薬品添加物、製剤に対して行うことにより、医薬品

に対する迅速かつ高精度な生菌数測定が可能になり、ヨーロッパ薬局方、米国薬局方に対して、日本からの新たな微生物試験法に関する情報発信を行うことが可能になるものと考えられる。

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」の見直しを行った。「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のホームページに英訳版と併せて掲載している。研究班活動が終了した平成24年度に入ってから、監麻課からの指導により、「低 Fo 最終滅菌製剤の無菌性保証」の業界合意のための作業を続けている。平成24年4月より3～6ヶ月間で業界意見を取り纏め、再度、日薬連品質委員会を通じ、日薬連傘下団体の意見を伺った上で、監麻課に提出予定である。

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

MALDI-TOF MS を利用した微生物の迅速同定法の確立を目的に、実験室レベルで作成した 1 剤あるいは多剤耐性菌株の識別

能を検討した。その結果、MALDI-TOF MS はこれらの薬剤耐性菌を識別できる能力を有するだけでなく、ある種の薬剤に対する異なるレベルの耐性を獲得した菌株の識別も可能である可能性を見出し、この手法が日本薬局方標準菌株の品質管理に有用な方法であることを示した。

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、不溶性かつ非脂溶性の医薬品添加物（滑沢剤）に対する染色法を検討し、混入した細菌数を蛍光活性染色法（CFDA-DAPI 二重染色法）により迅速に測定するためのプロトコールを決定した。

“最終滅菌法による無菌医薬品の製造に関する指針”の研究班としての最終版をまとめ上げた。

F. 健康危険情報

特になし。

G. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Muroi M, Tanamoto K.:
IRAK-1-mediated negative regulation of Toll-like receptor signaling through proteasome-dependent downregulation of TRAF6. *Biochim. Biophys. Acta*, **1823**, 255-263 (2012)
- 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、エンドトキシン・自然免疫研究 **14**、pp7-10、医学図書出版 (2011)
- 3) Nakamura K, Ohtsuki T, Mori, Hoshino H, Hoque A, Oue A, Kano F, Sakagami H, Tanamoto K, Ushijima H, Kawasaki N, Akiyama H, Ogawa H. Novel anti-HIV-1 activity produced by conjugating unsulfated dextran with polyL-lysine. *Antiviral Res.* **94**, 89-97 (2012)
- 4) Nobuyasu Yamaguchi, Masashi Torii, Yuko Uebayashi, and Masao Nasu.:
Rapid, semiautomated quantification of bacterial cells in freshwater by using a microfluidic device for on-chip staining and counting. *Appl. Environ. Microbiol.*, **77**: 1536-1539 (2011)
- 5) Nobuyasu Yamaguchi, Kouichi Tanaka, Takashi Baba, Norihide Amano and Masao Nasu.: Rapid enumeration of low numbers of moulds in tea based drinks using an automated system. *Int. J. Food Microbiol.*, **145**: 365-369 (2011)
- 6) Nobuyasu Yamaguchi, Takashi Baba, Katsuji Tani, and Masao Nasu.:
Inactivation of bacteria in freshwater by momentary decompression following high pressurization. *Microbes and Environments*, **26**: 92-94 (2011)
- 7) 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 発表論文集, 221-223 (2011)
- 8) 山口進康，那須正夫：微生物迅速検出法の現状と応用（総説）、ソフト・ドリンク技術資料, **165**: 19-36 (2011)
- 9) Shigeo Kojima, Satoshi Okada, Tsuguo Sasaki, Tetsuya Oba, Akihiko Fujise, Kumiko Kusuyama: Reliability Study for

- Membrane-Processed Water for Injection (WFI). PDA J. of GMP and Validation in Japan, 13, 47-55 (2011)
- 10) 佐々木次雄: 第3節ワクチン製造所における微生物管理試験、ワクチンの市場動向と開発・製造実務集、pp1-32、技術情報協会 (2012)
 - 11) 佐々木次雄: 第4節ワクチン製造所へのGMP査察、ワクチンの市場動向と開発・製造実務集、pp1-25、技術情報協会 (2012)
2. 学会発表
- 1) 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分析法バリデーション、日本防菌防黴学会第38回年次大会 (2011, 8)
 - 2) 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、日本防菌防黴学会第38回年次大会 (2011, 8)
 - 3) Masashi Muroi and Ken-ichi Tanamoto: IRAK-1-mediated negative regulation of Toll-like receptor signaling. Int. Union of Microbiol. Soc. 2011 Congress (2011, 9)
 - 4) Sugiyama, K., Kinoshita, M., Minai, Y., Muroi, M., Tanamoto, K. and Sugita-Konishi, Y: Trichothecene mycotoxins inhibit MyD88-independent pathways of Toll-like receptors, 9th Joint Meeting of ICS-ISICR (2011, 10)
 - 5) 北島孝明, 室井正志, 山下直美, 棚元憲一: ダニアレルゲンの自然免疫応答に及ぼす影響、第85回日本細菌学会総会 (2012, 3)
 - 6) 林原 紀明、田村 直樹、渡辺 恵、室井 正志、畑尾史彦 瀬戸泰之 棚元 憲一: ミクログリア細胞における Toll-like receptor の発現及び炎症性応答、第85回日本細菌学会総会 (2012, 3)
 - 7) N. Yamaguchi, T. Yamazaki and M. Nasu: Microbe-II: Monitoring of bacterial cells in “KIBO”, the Japanese experiment module of the ISS. 7th International Microbial Space Workshop (France) (2011.05.17)
 - 8) N. Yamaguchi and M. Nasu: Rapid monitoring of bacterial cells in freshwater by using a microfluidic system. 7th International Microbial Space Workshop (France) (2011.05.19)
 - 9) Yamaguchi, Y. Iguchii, T. Inui, F. Banno and M. Nasu: Rapid enumeration of Legionella pneumophila in cooling tower water by using a microfluidic system. ASM 2011 General Meeting (New Orleans) (2011.05.23)
 - 10) N. Yamaguchi, H. Hieda, T. Ichijo and M. Nasu: Bacterial monitoring in the Japanese experiment module “Kibo”, a part of the International Space Station. SKO symposium (Seoul) (2011.06.03)
 - 11) N. Yamaguchi, Y. Uebayashi, M. Torii and M. Nasu: Automated staining and counting of bacterial cells in freshwater environments by using a microfluidic device. Water Convention 2011 (Singapore) (2011.07.05)
 - 12) N. Yamaguchi, Y. Iguchii, T. Inui, F. Banno and M. Nasu: Abundance of

Legionella pneumophila in cooling tower water determined by using a microfluidic device. Int. Union of Microbiol. Soc. 2011 Congress (2011, 9)

- 13) 山口 進康, 阪野 文哉, 乾 智博, 那須 正夫: マイクロ流路システムによる水環境中の細菌の迅速モニタリング、日本宇宙生物科学会第 25 回大会 (横浜) (2011.09.30)
- 14) 山口 進康, 稗田 はつき, 馬場 貴志, 一條 知昭, 那須 正夫: 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、日本宇宙生物科学会第 25 回大会 (横浜) (2011.09.30)
- 15) 山口 進康, 阪野 文哉, 乾 智博, 那須 正夫: マイクロ流路システムによる水環境中の Legionella pneumophila の迅速検出、日本微生物生態学会第 27 回大会 (京都) (2011.10.09)
- 16) 山口 進康, 阪野 文哉, 乾 智博, 那須 正夫: 冷却塔水中のレジオネラのマイクロ流路システムによる迅速モニタリング、第 61 回日本薬学会近畿支部大会 (神戸学院大) (2011.10.22)
- 17) 山口 進康, ○乾 智博, 阪野 文哉, 那須 正夫: 冷却塔水中の Legionella pneumophila のマイクロ流路システムによるモニタリング、フォーラム 2011: 衛生薬学・環境トキシコロジー (金沢) (2011.10.28)
- 18) 山口進康, 石原理絵, 稗田はつき, 一條知昭, 那須正夫: 粘着集菌シートを用いた宇宙居住環境中の細菌モニタリング、第 28 回宇宙利用シンポジウム (東京) (2012.01.24)
- 19) 山口 進康, 阪野 文哉, 那須 正夫:

冷却塔水中のレジオネラのマイクロ流路システムによる on-site モニタリング、第 85 回日本細菌学会総会 (長崎) (発表日: 2012.03.29)

- 20) 山口 進康, 稗田 はつき, 馬場 貴志, 一條 知昭, 那須 正夫: 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、日本薬学会第 132 年会 (札幌) (発表日: 2012.03.31)
- 21) 山口 進康, ○阪野 文哉, 那須 正夫: 冷却塔水中の Legionella pneumophila のマイクロ流路システムによる迅速モニタリング、日本薬学会第 132 年会 (札幌) (発表日: 2012.03.31)

H. 知的財産権の出願・登録状況

なし

添付資料 1

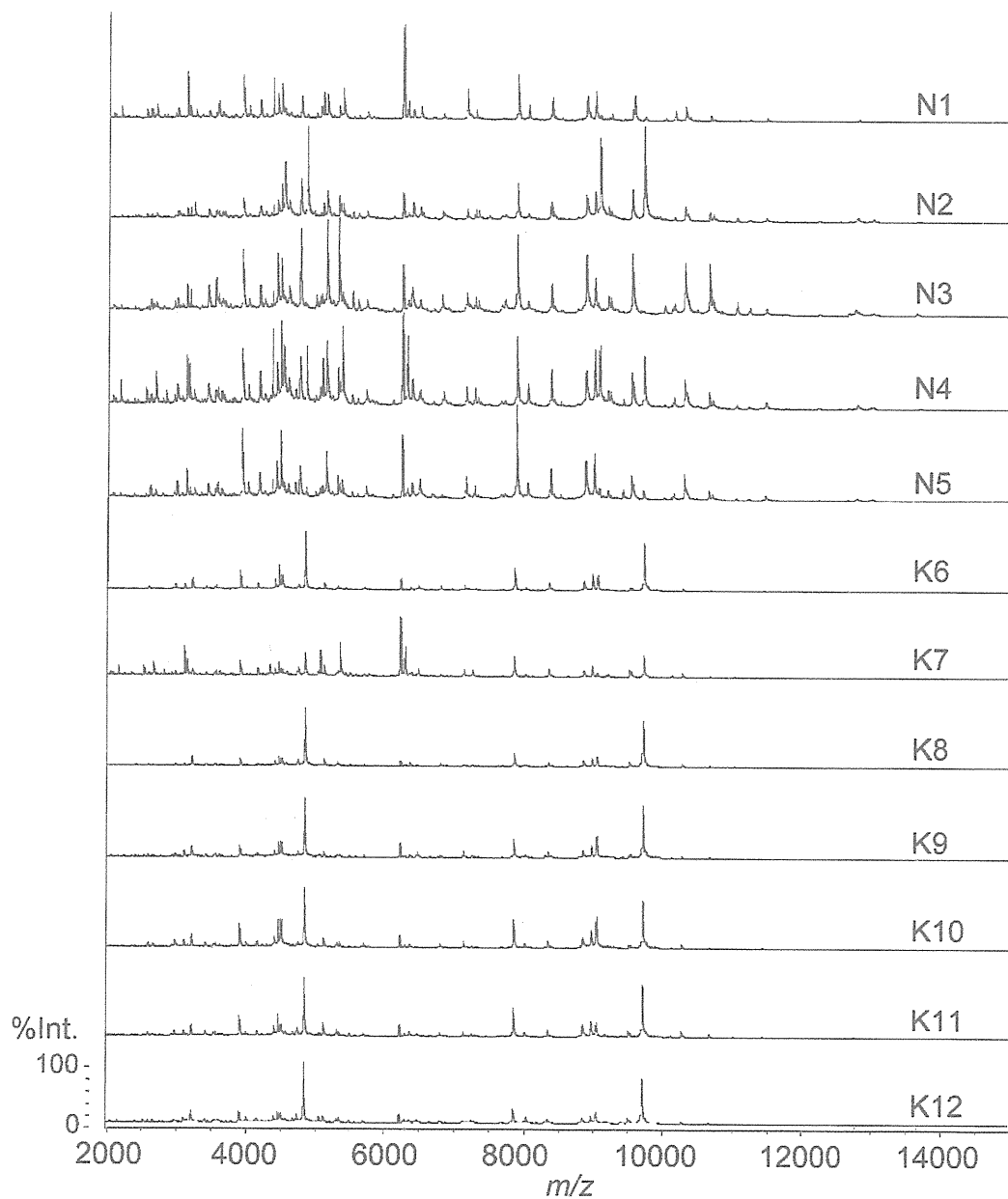


図1 *Escherichia coli* NIHJ 株 (N1) またはこれから作成した薬剤耐性株 (N2-N5) および *Escherichia coli* K-12 株 (K6) またはこれから作成した薬剤耐性株 (K7-K12) から得られた MALDI spectra。

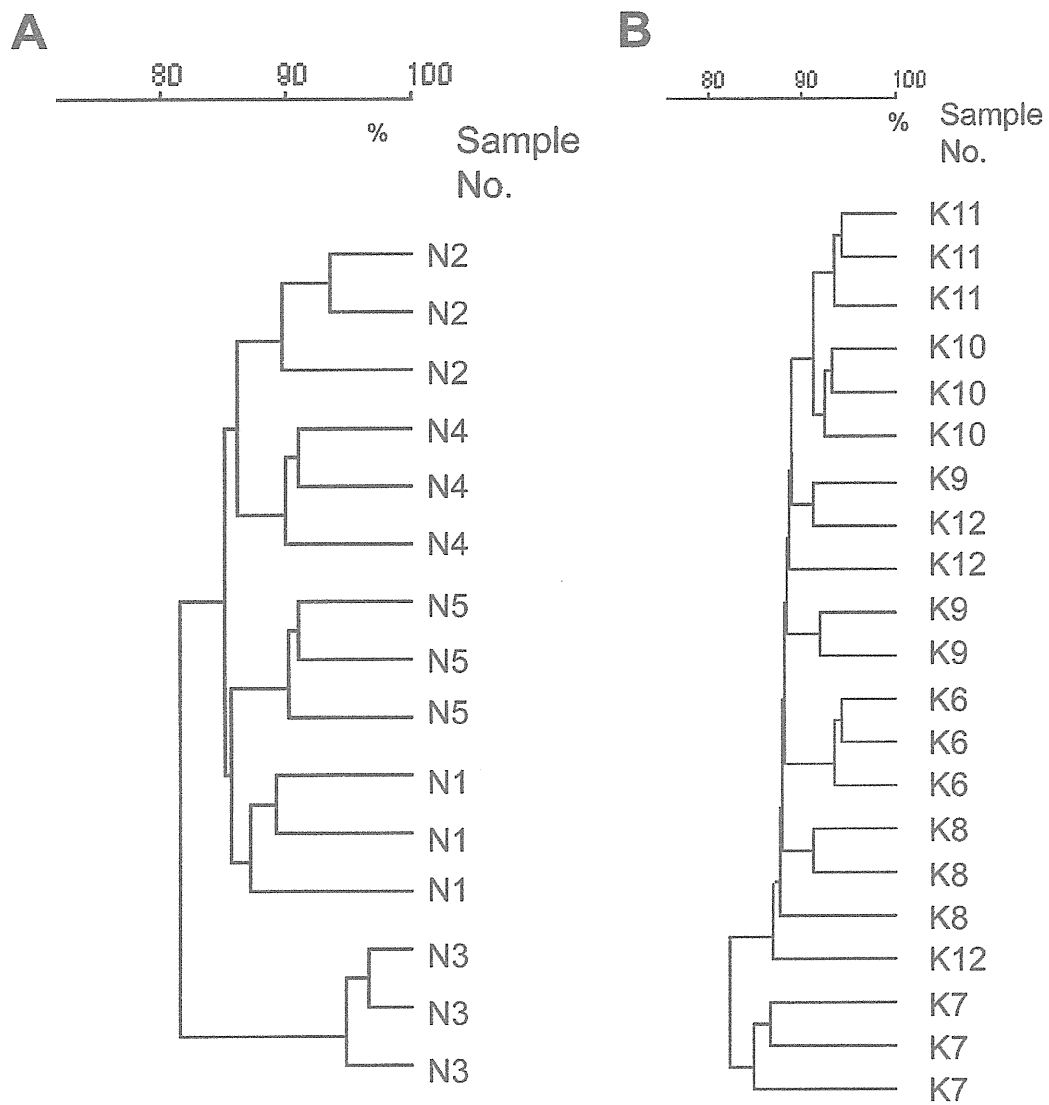


図2 *Escherichia coli* NIHJ 株 (N1) またはこれから作成した薬剤耐性株 (N2-N5) および *Escherichia coli* K-12 株 (K6) またはこれから作成した薬剤耐性株 (K7-K12) から得られた MALDI spectra の系統樹解析。

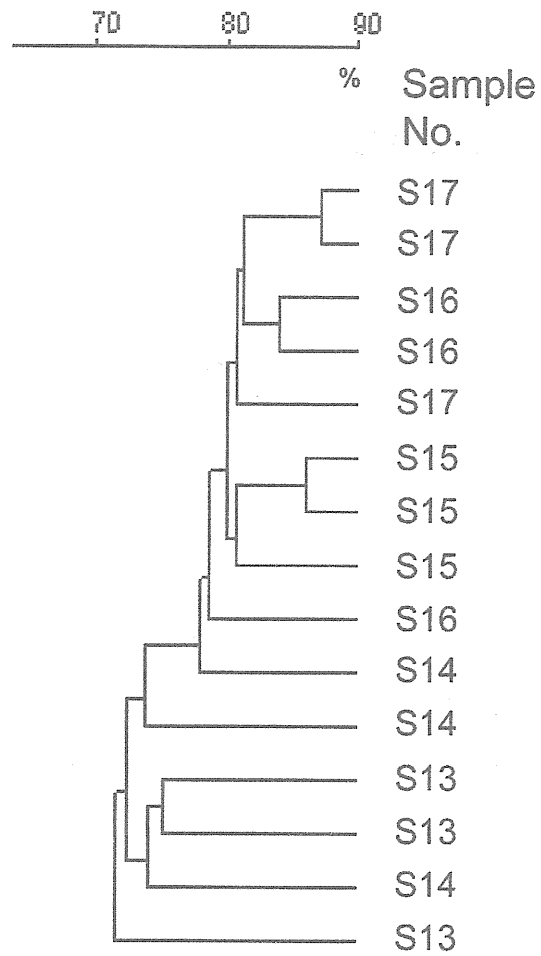


図3 *Staphylococcus aureus* Smith 株 (S13) またはこれから作成した薬剤耐性株 (S14-S17) から得られた MALDI spectra の系統樹解析。

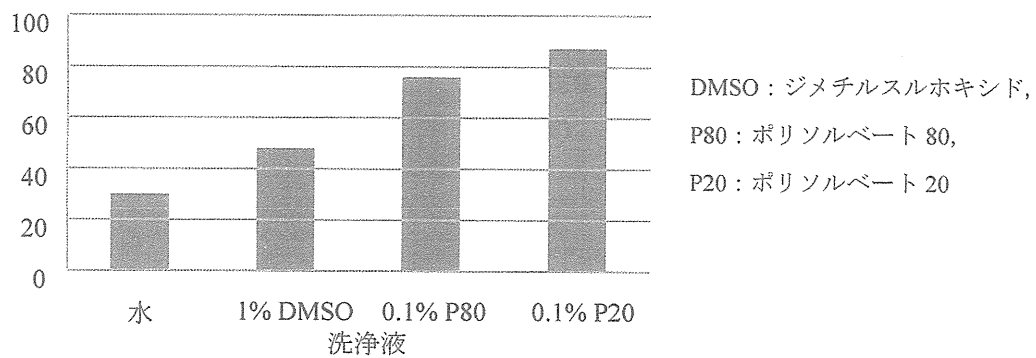


図4 洗浄液の検討

表 1

Table 1 Antibiotic-resistant bacterial strains used in this study

Straine No.	Bacteria	Original Strain	Resistance
N1	<i>E. coli</i>	NIHJ	
N2	<i>E. coli</i>	NIHJ	Streptothricin
N3	<i>E. coli</i>	NIHJ	Tetracycline
N4	<i>E. coli</i>	NIHJ	Streptomycin
N5	<i>E. coli</i>	NIHJ	Kanamycin
K6	<i>E. coli</i>	K-12	
K7	<i>E. coli</i>	K-12	Nalidixic acid
K8	<i>E. coli</i>	K-12	Nalidixic acid , SM,KM,NM,SA
K9	<i>E. coli</i>	K-12	CP,TC,SM,KM,SA
K10	<i>E. coli</i>	K-12	Nalidixic acid , CP,SM,KM,NM,SA
K11	<i>E. coli</i>	K-12	Kanamycin
K12	<i>E. coli</i>	K-12	Trimethoprim
S13	<i>S. aureus</i>	Smith	
S14	<i>S. aureus</i>	Smith	Novobiocin 3.12 µg/ml
S15	<i>S. aureus</i>	Smith	Novobiocin 12.5 µg/ml
S16	<i>S. aureus</i>	Smith	Novobiocin 25 µg/ml
S17	<i>S. aureus</i>	Smith	Novobiocin 50 µg/ml

SM: Streptomycin, KM: Kanamycin, NM: Neomycin, SA: sulfa drug, CP: Chloramphenicol, TC: Tetracycline
 *NBRC: NITE Biological Resource Center; MCRF: Microbial Chemistry Research Foundation

表 2

1% DMSO を用いた前処理法の効果

接種菌数 (cells)	検出菌数 (cells)	検出率 (%)
1.1×10^5	8.4×10^3	7.6

表 3

ポリソルベート 20 を用いた前処理法の効果 (指標菌: 大腸菌)

ポリソル ベート 20 の濃度(%)	接種菌数 (cells)	検出菌数 (cells)	検出率 (%)
0.01	1.2×10^6	6.5×10^5	54
0.05	1.2×10^6	1.3×10^6	108
0.1	1.2×10^6	8.6×10^5	72

表 4

0.05%ポリソルベート 20 を用いた前処理法の効果（指標菌：日本薬局方の微生物限度試験法に記載されている標準株）

指標菌	接種菌数 (cells)	検出菌数 (cells)	検出率 (%)
黄色ブドウ球菌	1.4×10^6	1.2×10^6	86
緑膿菌	2.1×10^5	2.5×10^5	119
枯草菌	9.8×10^5	8.6×10^5	88

厚生労働科学研究費補助金（医薬品・医療機器レギュ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
	五十嵐雅之	財団法人微生物化学研究会

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-TOF MS）を利用した微生物の迅速同定法の確立を目的に、実験室レベルで作成した 1 剤あるいは多剤薬剤耐性細菌株の識別能を検討した。コンピューターソフトを利用したクラスター解析を用いることで MALDI-TOF MS はこれらの薬剤耐性菌を識別できる能力を有するだけでなく、ある種の薬剤に対する異なるレベルの耐性を獲得した菌株の識別もできる可能性を見出し、この手法が日本薬局方標準菌株の品質管理に有用な方法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収載されているが、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-TOF MS）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-TOF MS 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。

最終年度は、MALDI-TOF MS が実験室レベルで性状に変化を与えた菌株をどの程度識別できるのかを検討するため、性状の明らかな菌株から薬剤耐性菌を作成し、これらの MALDI-TOF MS スペクトルを測定した。

B. 研究方法

1) 薬剤耐性菌株とその培養

今回使用した菌株とその薬剤耐性能を表 1 に示した。これらの薬剤耐性菌はそれぞれの薬剤存在下で継続的に継代する方法により作成した。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-TOF MS 試料溶液の調整

上記の菌懸濁液 10 µl にトリフルオロ酢酸 40 µl 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 µm のフィルターでろ過後、これを試料溶液とした。

3) MALDI-TOF MS の測定

試料溶液 5 µl とマトリクス溶液（sinapinic acid 10 mg/ml, 0.1% trifluoroacetic acid, 50% acetonitrile）5 µl を混合した。この混合液 1 µl をサンプルプレートに滴下し風乾後、測定した。

MALDI-TOF MS 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-TOF MS 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。

C. 研究結果

MALDI-TOF MS の薬剤耐性菌株の識別能を検討するため、*Escherichia coli* NIHJ 株、*Escherichia coli* K-12 株および *Staphylococcus aureus* Smith 株から 14 株の 1 剤または多剤薬剤耐性菌を作成した (表 1)。*S. aureus* につい

ては異なる濃度の novobiocin 耐性株を作成した。

まず、*E. coli* 株について MALDI-TOF MS を測定すると、これらの菌株は、スペクトルパターンより、明らかに NIHJ 由来と K-12 由来のグループに分類可能であった (図 1)。しかし、NIHJ 由来株間または K-12 由来株間の識別は目視レベルでは困難であった。

そこで次に、それぞれの菌株につき triplicate で測定し、コンピューターソフトウェアを用いたクラスター解析を行った。NIHJ 由来菌株の系統樹を見ると、各 triplicate 間の相動性が 88-97% と、各菌株間の相同性より高く、各 triplicate のデータがグループとして分類された (図 2A)。K-12 由来の菌株についても同様な解析を行ったところ、いくつかの例外はあるものの、概して各 triplicate のデータがグループとして分類された (図 2B)。このことは、MALDI-TOF MS が耐性菌株を識別する能力を有することを示している。

同薬剤に対して異なるレベルの耐性を獲得した *S. aureus* についてもクラスター解析を行ったところ、耐性の程度が高くなるにつれて野生型との相同性が低くなることが明らかになった (図 3)。このことは、MALDI-TOF MS が、ある種の薬剤に対して異なるレベルの耐性を有する菌株間を識別できる可能性を示している。

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-TOF MS 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。この方法を用いた MRSA の臨床分離株の識別も報告されているが、臨床分離株であるがために、これらの識別は単に株間の違いを反映するもので、耐性かどうかの差を見ているものではないとする意見もある。 β -lactam 系抗生物質に対する耐性菌を、菌株培養液中の β -lactam の分解を MALDI-TOF MS により測定して識別する方法も報告されているが、この方法は耐性菌が耐性薬剤に対する分解酵素誘導能を獲得した菌株のみの識別しかできない欠点がある。そこで今回、我々は、由来のはっきりとした菌株を用いて、実験室レベルで耐性菌を作成し、MALDI-TOF MS によるこれらの識別能について検討し、クラスター解析によりこれら 1 剤または多剤耐性菌株を識別できる可能性を見出した。

今回の 1 剤耐性菌株の解析では、N2 (streptothricin 耐性)、N2 (streptomycin 耐性)、N5 (kanamycin 耐性) 菌株間の相動性がこれらと N3 (tetracycline 耐性) 間の相動性より低かつ

た (図 2A)。これは、streptothricin、streptomycin、kanamycin はいずれもアミノグリコシド系抗生物質に属し、同種の抗菌作用機序を有するのに対し、tetracycline の機序は異なることに由来しているのかも知れない。抗生物質の中でも streptomycin、erythromycin、spectinomycin などの抗生物質に対する耐性菌は、リボゾーム蛋白に変異が起きていることが知られている。我々の MALDI-TOF MS サンプルの調整法では得られる MS ピークの 50% がリボゾーム蛋白由来であることが報告されていることから、今回のクラスター解析によるこれらの耐性菌株間の差は変異したリボゾーム蛋白由来のピークを検出しているのかも知れない。

今回の我々の解析では異なるレベルの novobiocin 耐性を獲得した菌株間の識別も可能である可能性を示した (図 3)。Novobiocin に対する耐性レベルが高くなるにつれて、*gyrB* または *parE* 遺伝子に変異が増えていくことが報告されている。これらの遺伝子産物の分子量は 72-75 kD と大きく、我々の MALDI-TOF MS の測定範囲外であることから、これらの変異を検出することで耐性菌株間を識別しているとは考えにくい。しかし、我々のサンプル調整では菌体を trifluoroacetic acid で処理しており、この処理は蛋白のフラグメント化を誘導することが報告されていることから、変異した *gyrB* または *parE* 遺伝子産物のフラグメント蛋白を検出しているのかも知れない。

今回我々は実際に性状の変化した菌株を用いて、これらの MALDI-TOF MS による識別能について検討した。その結果、MALDI-TOF MS は 1 剤または多剤耐性菌株を識別できる能力を有することを見出し、MALDI-TOF MS を利用することで、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が可能になること