

201132006B

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～平成23年度 総合研究報告書

研究代表者 室井 正志

平成24（2012）年 4月

目 次

I. 総合研究報告	
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	
(添付資料1) 図表	22
(添付資料2) 無菌操作法による無菌医薬品の製造に関する指針	44
(添付資料3) 最終滅菌法による無菌医薬品の製造に関する指針(案)	131
II. 研究成果の刊行に関する一覧表	182

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。

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検討では、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、室内および質感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。これを用いることで、遺伝子配列解析で理論的に分類不可能な近縁菌種または同菌種に属する菌株、さらには 1 剤あるいは多剤薬剤耐性菌を識別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。

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（CFDA-DAPI 二重染色法）について検討を行い標準的なプロトコールを作成した。

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）の改正作業を行い、「無菌操作法による無菌医薬品の製造指針」を完成させ、監視指導・麻薬対策課より地方庁に事務連絡として発出された。また、「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。

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
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。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。これらを SCD 寒天培地 (日本製薬) 上で 30℃、24 時間培養し、培養後 4℃ (*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。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)を用いた。薬剤耐性菌は *E. coli* NIHJ 株、*E. coli* K-12

株および *S. aureus* Smith 株を用いて、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。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℃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℃にて保存した。

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 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

環境水試料は市販のナチュラルミネラルウォーターを、賦形剤としては乳糖およびタルクを、滑沢剤としてはタルクおよびステアリン酸マグネシウムを用いた。

標準菌株試料として、*Escherichia coli* K12、*E. 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 SCD 液体培地を用いて 30℃ で一晩培養した。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。賦形剤の検討では、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、SCD 液体培地を用いて指標菌を 30℃ で一晩培養した。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

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。

7) 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。

8) 日本版「無菌操作法指針」の改正作業
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。

(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)。

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 6 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. 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 7 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. hermanii* 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 8 に示す。これらのスペクトルパターンは一見し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 9)。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. 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 (図 9)、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。

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 7)。*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 10)。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 11A)。

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 11B)。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 12)。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) 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 (図 13)。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 (図 14)。

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。

次に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、表 8 に示したとおり、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 (表 9)。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。しかしながら、指標菌として *Pseudomonas 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。

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。

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（表 10）。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（表 11）。

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。

不溶性かつ非脂溶性の医薬品添加物として、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

加えたる過滅菌水 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 12 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 15 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 13）。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 13 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 14）。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) 日本版無菌医薬品の製造に関する指針の改正

無菌操作法指針の改正作業では、研究協力者が、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名で構成された。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、「無菌操作法による無菌医薬品の製造指針」として監視指導・麻薬対策課より地方庁に事務連絡として発出された(添付資料2)。

最終滅菌法に関する指針改正では、研究協力者が、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名で構成された。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(添付資料3)。

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き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。

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。

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* ではどちらとも 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つ

た。

D 研究所では異なる調整法でマス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。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。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。

最近、MALDI-TOF MS による 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。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しれない。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しれない。

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。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しれない。

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、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 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。

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 μ m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。

今回の研究では、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検討では、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、室内および質感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。これを用いることで、遺伝子配列解析で理論的に分類不可能な近縁菌種または同菌種に属する菌株、さらには1剤あるいは多剤薬剤耐性

菌を識別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。

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（CFDA-DAPI 二重染色法）について検討を行い標準的なプロトコールを作成した。

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）の改正作業を行い、「無菌操作法による無菌医薬品の製造指針」を完成させ、監視指導・麻薬対策課より地方庁に事務連絡として発出された。また、「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) 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)
- 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
- 23) 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)
- 24) 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)
- 25) 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)
- 26) 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)
- 27) Akiyama T, Yamazaki T, Tanamoto K. Analysis of thickening polysaccharides by the improved diethyldithioacetal derivatization method. *J. Food. Hyg. Soc. Japan.* **52**, 40-6 (2011)
- 28) 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)
- 29) 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)
- 30) 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)
- 31) 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)
- 32) 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)

- 33) Sasaki T.: Compedial requirements for detection of mycoplasma contamination in cell cultures. PDA J. GMP & Validation, 11, 49-55 (2010)
- 34) 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)
- 35) 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)
- 36) 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)
- 37) 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)
- 38) 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) 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)
- 6) 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)
- 7) 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)
- 8) 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