

201235053A

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  
高度試験法導入に関する研究

平成24年度 総括・分担研究報告書

研究代表者 棚元 憲一

平成25(2013)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高度試験法導入に関する研究 .....	1
棚元 憲一	
II. 分担研究報告	
1. 遺伝子組換え体を用いた新規エンドトキシン試験法の開発 .....	9
棚元 憲一	
(資料) 添付資料 1	
2. 微生物の迅速検出法の確立 .....	14
山口 進康	
3. 無菌医薬品品質確保のための製造と管理の技術に関する研究 .....	20
片山 博仁	
(資料) 添付資料 2	
添付資料 3	
添付資料 4	
III. 研究成果の刊行に関する一覧表 .....	37

医薬品の微生物学的品質確保のための高度試験法導入に関する研究

研究代表者 棚元憲一 武蔵野大学薬学部教授

研究要旨：日本薬局方には医薬品の微生物学的品質確保のためいくつかの微生物試験法が規定されているが、これらの試験法は随時科学の進歩、国際的な変化に歩調を合わせて改善もしくは新規試験法の導入を図らなければならない。そのような観点から本研究では、

1. 遺伝子組換え体を用いた新規エンドトキシン測定用試薬の開発、
2. 細菌数迅速測定法のバリデーションにかかる基盤データの構築、
3. 無菌医薬品品質確保のための製造と管理の技術に関する研究を行った。

本年度はリムルス試薬の酵素因子 3 種類（C 因子、B 因子、凝固酵素前駆体）の組換えタンパク質を生産し、これらを用いたエンドトキシン定量性能が天然リムルス試薬と比べても遜色のない性能を示すことを確認した。また、細菌数迅速測定法である蛍光活性染色法のプロトコールを改良し、この改良した染色法を用いることで日本薬局方微生物関連試験（微生物限度試験および無菌試験）に用いる溶解剤や中和剤が供試菌株の染色性に影響を与えることなく測定できることを見出した。さらに、日局参考情報の「無菌医薬品製造管理区域の環境モニタリング」と「滅菌および滅菌指標体」について、無菌医薬品の製造と管理の技術に関する最新の情報および PIC/S との整合性もよく考慮し、意見公募を経て、これら改定案を作成し、日局第 16 改正案に反映された。

研究分担者

山口進康	大阪大学大学院薬学研究科 准教授
片山博仁	バイエル薬品株式会社 本部長

は、①遺伝子組換え体を用いた新規エンドトキシン測定用試薬の開発、②細菌数迅速測定法のバリデーションにかかる基盤データの構築、③無菌医薬品品質確保のための製造と管理の技術に関する研究、の 3 研究を行う。

A. 研究目的

日本薬局方には医薬品の微生物学的品質確保のためいくつかの微生物試験法が規定されているが、これらの試験法は随時科学の進歩、国際的な変化に歩調を合わせて改善もしくは新規試験法の導入を図らなければならない。そのような観点から本研究で

エンドトキシン試験法の必須資源であるカプトガニの資源確保が危惧されることから、①では、遺伝子組換えにより作成したエンドトキシン活性化経路 3 因子のカスケード反応を用いた高感度・高精度なエンドトキシン測定試薬の開発を行うが、この手法では単に天然因子を人工的に構築するだ

けではなく、遺伝子の一部を改変することにより、エンドトキシンに対する感度や熱安定性、自己分解抵抗性の向上させることができるという利点がある。また酵素反応を競合的に阻害する不純物を含まないこと、さらにゲル形成による不均一な濁度上昇も生じないことから、測定感度および精度の向上が期待される。世界をリードする研究である。

医薬品の微生物管理のために高精度な迅速法が期待されており、FDA や PDA でも積極的な動きがある。このような世界的な動向をふまえて、日局においても新手法導入に向けて必要な課題の解決を図る必要がある。重要な課題の一つにバリデーション法の構築がある。現在広く用いられている培養法は微生物の増殖が指標であるのに対し、新手法では核酸含量や酵素活性など生物学的な特徴を指標とするため、培養法と同じ値は得られない。従って様々な検体について培養法と比較し、新手法の基準値を考察する必要がある。②では、まず種々の試料につき培養法と新手法で微生物数を比較し、培養法でのバリデーション条件（菌種、添加量等）をもとに、新手法のバリデーション法を考察するための基盤的データを得る。

「無菌医薬品製造区域における環境モニタリング法」は、関連する欧米のガイダンスと比較すると基準の一部にギャップがあり、日本の業界が実際に行っているモニタリングの実績も考えた上で、グローバルに齟齬のない基準に改定する必要がある。また、ISO14644 の改定の反映や、ICHQ9 で導入されたリスクベースの考え方の導入、進化する新しい技術の導入も重要と考えられる。また「滅菌法および滅菌指標体」の項

では、現在記述されている高圧蒸気滅菌法は従来型の一部の装置の記述でしかないため、現在使用されている各種派生技術をも包括できる内容に改定することが有用と考えられる。また滅菌指標体の使用者と製造者に関する情報もグローバルな視点で日本での情報が不足とならないように整備する必要がある。③ではこれらの無菌医薬品関連の参考情報の充実と再構築を目指すものである。

## B. 研究方法

### 1) 組換え酵素因子の作製（ウイルス法）

C 因子、B 因子、凝固酵素前駆体の 3 種類の各遺伝子配列を、登録データベースを参考に合成後、ウイルストランスファーベクターにサブクロニングした。バキュロウイルスゲノムとの相同組換えを利用して、各酵素因子の遺伝子をもつ 3 種類の組換えバキュロウイルスを作製した。3 種類の組換えバキュロウイルスは個別に昆虫細胞 (Sf9) に感染させ、感染後 48、72、96 時間で経時的に回収、遠心分離とろ過 ( $0.22 \mu\text{m}$ ) により、培養上清を調製した。培養上清に含まれる組換え酵素因子は、各因子に対する特異抗体によるウエスタンブロット法、活性測定により確認、評価した。

### 2) 組換え酵素因子の作製（安定発現細胞法）

C 因子、B 因子、凝固酵素前駆体の 3 種類の遺伝子配列を、登録データベースを参考に合成後、安定発現細胞用ベクターにサブクロニングした。Sf9 細胞ゲノムとの相同組換えを利用して、各因子の遺伝子をゲノムに組込んだ 3 種類の Sf9 安定発現細胞株を作製した。3 種の Sf9 安定発現細胞株は

個別に浮遊培養をおこない、対数増殖期後期で経時的に回収、遠心分離とろ過（0.22  $\mu\text{m}$ ）により、培養上清を調製した。培養上清に含まれる組換え酵素因子は、各因子に対する特異抗体によるウエスタンブロット法、活性測定により確認、評価した。

### 3) カスケード反応の再構成

局方エンドトキシン（米国薬局方-Reference Standard Endotoxin）の希釈系列を含む検体溶液 50  $\mu\text{L}$  をマイクロタイタープレートに分注した。組換え酵素因子を含む 3 種類の培養上清、発色合成基質（Boc-Leu-Gly-Arg-pNA）、及び緩衝液（pH8.0）等を事前に混合し、検体の入ったマイクロタイタープレートに各ウェル 50  $\mu\text{L}$  となるように添加して総体積 100  $\mu\text{L}$  とした。プレートを 37°C で加温し、凝固酵素による切断で合成基質から遊離した pNA の量を吸光度（405 nm）測定し、単位時間あたりの吸光度の変化率を解析した。

### 4) 蛍光染色用試料

試料溶液としては、日本薬局方微生物関連試験（微生物限度試験および無菌試験）に記載されている以下の溶解剤や中和剤を用い、最も高い濃度の溶液とした：①ジメチルスルホキシド（DMSO）、②グリシン、③ポリソルベート 20、④ポリソルベート 80、⑤チオ硫酸ナトリウム、⑥ミリスチン酸イソプロピル、⑦レシチン。

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 *Bacillus subtilis* NBRC 3134 および *Staphylococcus aureus* subsp. NBRC 13276 を用いた。各菌株を SCD 液体培地を用いて 30°C 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。この菌懸濁液に前述の溶解剤や中和剤を添加し、試料とした。微生物試験の操作時間を 30 分間と考え、室温で 30 分間試料溶液と反応させた後、CFDA-DAPI 二重染色法により染色し、蛍光顕微鏡下で細菌数を測定した。ろ過滅菌水中に懸濁した細菌試料の測定値と比較することにより、各溶解剤や中和剤が蛍光活性染色に与える影響を評価した。

### 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  $\mu\text{m}$ ）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) 日局参考情報改定案の作成

本研究では、まず日本 PDA 製薬学会無菌製品 GMP 委員会において医薬品製造工場の情報収集、海外の製造所情報、海外のレギュレーション情報を収集し、分析した結果をもとに、日局参考情報の改定案を作成した。

情報収集は、日本 PDA 製薬学会の会員から無菌医薬品製造に関する業界のエキスパ

ートを募集し、ワーキングチームを結成し、関連する入手可能な海外の局方、ガイドライン、論文、出版物などの収集をおこなった。続いてこれを情報分析して課題整理をおこなった。次に PMDA が主催した無菌関連情報 WG において、PMDA および大学関係者を交えた検討を行って必要な改定案を作成した。平成 24 年 4 月 9 日に第 1 回の合同班会議を第 10 回無菌製剤関連情報 WG の中において開催し、平成 25 年 2 月 7 日の第 6 回合同班会議まで計 6 回の合同班会議を開催した。

改定案は日局微生物試験法委員会の審議を経て、PMDA よりパブコメを行って、広く意見を集め、(1) は 44 件、(2) も 44 件の有意義なコメントをいただいた。これを反映させた最終案を作成した。

(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) 遺伝子組換え体を用いた新規エンドトキシン試験法の開発

組換えリムルス試薬を開発するために、カスケード反応に必要な 3 つの酵素因子(C 因子、B 因子、凝固酵素前駆体)を遺伝子組換え技術を利用し、組換え酵素因子として作製した。

酵素因子の遺伝子を組込んだバキュロウイルスを培養昆虫細胞株である Sf9 に感染させる方法(以下、ウイルス法)を利用した場合、感染 48 時間後の培養上清に含まれる C 因子はウエスタンブロットによる確認

で分解されていなかった。その後の培養継続(72、96 時間)に伴い、経時的に C 因子が分解されることが確認された。この分解は各種プロテアーゼ阻害剤を共存させて培養をおこなっても完全には抑えられなかった。同様の傾向は、他の 2 因子(B 因子、凝固酵素前駆体)においても確認された。

一方、バキュロウイルスを使わず、Sf9 細胞株のゲノム DNA に目的遺伝子を直接組込む方法(以下、安定発現細胞法)では、ウイルス法と異なり培養時間の経過による C 因子の分解はみられなかった。さらには、ウイルス法(感染後 48 時間)よりも組換え C 因子の培養上清への回収量が増加することが確認された。同様の傾向は他の 2 因子(B 因子、凝固酵素前駆体)でも確認された。

以上の結果より、安定発現細胞法を利用すると 3 つの酵素因子が組換えタンパク質として安定に回収できることが示された。

続いて、得られた組換え酵素の 3 因子を材料として、組換えリムルス試薬の再構成を試みた。中性付近の緩衝液存在下で、発色合成基質と組換え 3 因子を 37°C で加温すると、エンドトキシンの共存量に依存して 3 因子が順次活性化され、合成基質の切断に伴う吸光度の上昇が確認された。横軸にエンドトキシン濃度(EU/mL)、縦軸に吸光度変化率(mAbs/min)をプロットして、再構成した組換えリムルス試薬の性能を評価した。その結果、30 分測定において、エンドトキシン濃度が 0.001-0.1EU/mL の範囲で、直線性の良好な(相関係数 0.997)定量結果が得られた。

### 2) 細菌数迅速測定法のバリデーション法に関する研究

微生物関連性試験において用いられている溶解剤や中和剤について、高濃度の溶液を調製し試料溶液としたところ、0.1%レシチン溶液では溶解できずに懸濁状態となった。このため、洗浄溶液には適さないと考えられた。そこで、調製した試料溶液（①1%ジメチルスルホキシド、②0.5%グリシン、③1%ポリソルベート 20、④1%ポリソルベート 80、⑤1%チオ硫酸ナトリウム、⑥ミリスチン酸イソプロピル原液）と菌体を30分間反応させた後に、CFDA-DAPI 二重染色を行い、ろ過滅菌水での測定値を100とした場合の検出率を求めた。

各指標菌に対する DAPI の染色性を検討したところ、*S. aureus*、*B. subtilis* および *E. coli* のいずれにおいても、80%以上の検出率を示した。以上のことから、それぞれの溶解剤や中和剤は DAPI の染色性に影響を与えないことがわかった。

次に各溶解剤や中和剤が CFDA の染色性に与える影響を評価した。1%ジメチルスルホキシド、0.5%グリシン、1%ポリソルベート 20、1%チオ硫酸ナトリウムおよびミリスチン酸イソプロピル原液については *S. aureus*、*B. subtilis* および *E. coli* の全ての供試菌株において良好な検出率が得られ、これらの試料は CFDA の染色性に影響を与えないことがわかった。しかしながら、1%ポリソルベート 80 は、*B. subtilis* に対してのみ平均約 30%の検出率を示し、CFDA の染色性に影響を与えることが分かった。

### 3) 無菌医薬品品質確保のための製造と管理の技術に関する研究

「無菌医薬品製造管理区域の環境モニタリング」では、多様化する設備や新技術に対応しやすくするため、リスクベースアプ

ローチをコンセプトとして取り入れ、自由度を高めた。また新しい環境モニタリングの手法として迅速法が利用できるように新たな項を追加した。空中浮遊微粒子の基準値には  $0.5\mu\text{m}$  に加えて  $5\mu\text{m}$  の基準を追加した。空気の清浄度を確認する目的としては  $0.5\mu\text{m}$  のみでよいと考えられるが、微生物の存在しやすい大きな粒子の連続的な監視などを意識する PIC/S の基準を参考にした。同様に、連続的なモニタリングの利点を意識し、落下菌の基準値も追加された。また、グレード A における手指、着衣の微生物管理参考基準を、ゼロと明記するのか、その他の器物表面付着菌の中に入れてしまうのかが議論になり、この際に測定値に関しては平均値で取り扱うか、最大値で取り扱うかの議論が重要な鍵になった。結論として、微生物のモニタリング測定値を平均値で扱うとする PIC/S の考え方を尊重し、パブコメにおける強い要望と意見も反映させ、グレード A 着衣の微生物管理基準の記載はなくし、また微生物の測定値は平均値で扱う考え方が取り入れられた。本研究は日局参考情報「無菌医薬品製造管理区域の環境モニタリング」の改正案に反映され、日局第 16 改正第一追補に収載、平成 24 年 9 月 27 日に告示され 10 月 1 日より施行された。

「滅菌および滅菌指標体」は、これまで日局内に分散していた「最終滅菌法及び滅菌指標体」「最終滅菌医薬品の無菌性保証」「滅菌法及び無菌操作法」などの再構築を行った。平成 24 年 11 月 9 日事務連絡「最終滅菌法による無菌医薬品の製造に関する指針」にある日本で定義される最終滅菌の考え方を基調に、技術情報を整理した。通

常多用される湿熱滅菌、乾熱滅菌に加えて、高周波滅菌、電子線滅菌、過酸化水素滅菌なども取り入れた。技術において専門知識が不足したものは、設備の設計者や使用者を訪問して内容を充実させた。滅菌指標体は、ISO、USP との関係も考慮して、国内で使用しやすい記述とした。最終案はパブコメを経て意見の反映を終え、第二追補に収載予定の日局参考情報「滅菌および滅菌指標体」に反映された。

#### D. 考 察

組換えリムルス試薬の作製に必要な3つの酵素因子を組換えタンパク質として作製する際に、ウイルス法と安定発現細胞法という、2つの異なる方法を検討した。培養時間の経過に伴い、生産した組換え酵素因子が、前者では分解を受け、後者では安定に存在することが確認された。分解を受けた因子の活性を確認すると、エンドトキシンに依存しない活性化がみられ、組換えリムルス試薬としては使用できない性能であった。

現在、天然カプトガニの血球を原材料としたリムルス試薬は複数の会社から製造販売されている。試薬により差があるが、測定範囲0.001-10や0.005-50 EU/mL、測定時間30-100分が平均的な性能である。今回の組換えリムルス試薬は、30分測定という短い測定時間で、天然カプトガニ由来のリムルス試薬と同等に低エンドトキシン濃度を測定できる可能性を示した。現状での課題として、天然リムルス試薬と比べ ①エンドトキシンを含まない検体に対するブランク値が高い ②測定範囲が狭い、といった点があげられる。こうした課題は、試薬

への添加物の検討により克服できる可能性を見い出しており、今後の開発課題と考えている。

蛍光染色法において1%ポリソルベート80が*B. subtilis* に対するCFDAの染色性に与える影響を緩和するため、Glutaraldehyde (GA) を用いたCFDA-DAPI二重染色法を検討した。なおGAは細胞膜架橋形成を行うため、細胞内で産生された蛍光物質carboxyfluoresceinの細胞外への漏出を防ぐことにより、CFDAの染色性を高めると報告されている。結果として、GAを染色液に添加することにより*B. subtilis*のCFDA染色における輝度は上がったが、検出菌数の顕著な増加は認められなかった。このため、CFDA染色性の低下の原因は、細胞膜の損傷によるcarboxyfluoresceinの細胞外への漏出以外の原因によるものが大きいと考えられた。ポリソルベート80は非イオン性の界面活性剤でポリソルベート20に比べて疎水性が高い。1%ポリソルベート80は培養法による生菌数測定に用いられており、菌の増殖には影響を与えないと考えられるため、エステラーゼの失活なども考えられた。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。

「無菌医薬品製造区域の環境モニタリング」「滅菌及び滅菌指標体」はともに無菌医薬品製造技術の変化に合ったものに改正してゆく必要がある。今回の改定案においてはいくつかの新しい概念と技術



の取り入れを達成しており、また使いやすくなりやすいものと考えられる。これら医薬品の微生物学的品質確保のための高度試験法導入に関する研究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

組換えリムルス試薬の酵素因子 3 種類 (C 因子、B 因子、凝固酵素前駆体) を生産して、これらを利用したエンドトキシン定量性能評価を行い、本研究で作製した組換えリムルス試薬は低濃度エンドトキシンを定量でき、天然リムルス試薬と比べても遜色のない性能を示すことを見出した。

日本薬局方微生物関連試験 (微生物限度試験および無菌試験) に用いる溶解剤や中和剤が蛍光染色に与える影響を検討し、検討したほとんどの溶解剤や中和剤は、蛍光活性染色において供試菌株の染色性に影響を与えないことを明らかにした。

国内の無菌医薬品製造において必要な情報の再整理を、最新の情報を取り入れ、PIC/S との整合性もよく考慮して 2 編の参考情報の改定案を作成した。

## 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., Igarashi M.,

Nakagawa Y., and Tanamoto K.: Application of matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry for discrimination of laboratory-derived antibiotic-resistant bacteria. *Biol. Pharm. Bull.*, **35**, 1841-1845 (2012)

- 2) 室井正志、杉浦友香、廣野泰亮、棚元憲一：エンドトキシン試験法の代替法の開発に関する研究、*医薬品医療機器レギュラトリーサイエンス*、**44**, 177-182 (2013)
- 3) 杉浦友香、廣野泰亮、室井正志、棚元憲一：分析法バリデーションによる光散乱エンドトキシン測定法の評価、*日本防菌防黴学会誌*、**41**, 187-196 (2013)
- 4) Rong Zhang, Tomoaki Ichijo, Yan-Yan Hu, Hong-Wei Zhou, Nobuyasu Yamaguchi, Masao Nasu, Gong-Xiang Chen.: A ten years (2000-2009) surveillance of resistant *Enterobacteriaceae* in Zhejiang Province, China. *Microb. Ecol. Health Dis.*, **23**, 11609-11618 (2012)
- 5) Nobuyasu Yamaguchi, Akiko Kitaguchi, Masao Nasu.: Selective enumeration of viable *Enterobacteriaceae* and active *Pseudomonas* spp. in milk within 7 h by multicolor fluorescence in situ hybridization following microcolony formation. *J. Biosci. Bioeng.*, **113**, 746-750 (2012)
- 6) Rong Zhang, Tomoaki Ichijo, Yong-Lu Huang, Jia-Chang Cai, Hong-Wei Zhou, Nobuyasu Yamaguchi, Masao Nasu, Gong-Xiang Chen.: High prevalence of

qnr and aac(6)-Ib-cr genes in both water-borne environmental bacteria and clinical isolates of *Citrobacter freundii* in China. *Microbes Environ.*, **27**, 158-163 (2012)

- 7) Nobuyasu Yamaguchi, Akiko Sakotani, Tomoaki Ichijo, Takehiko Kenzaka, Katsuji Tani, Takashi Baba, Masao Nasu.: Break down of Asian dust particle on wet surface and their possibilities of cause of respiratory health effects. *Biol. Pharm. Bull.*, **35**, 1187-1190 (2012)
- 8) Nobuyasu Yamaguchi, Tomoaki Ichijo, Akiko Sakotani, Takashi Baba, Masao Nasu.: Global dispersion of bacterial cells on Asian dust. *Scientific Reports*, **2**, 525-510 (2012)
- 9) Takashi Baba, Naoko Inoue, Nobuyasu Yamaguchi, Masao Nasu.: Rapid enumeration of active *Legionella pneumophila* in freshwater environments by the microcolony method combined with direct fluorescent antibody staining. *Microbes Environ.*, **27**, 324-326 (2012)

## 2. 学会発表

- 1) 小倉紀彦、杉浦由香、室井正志、棚元憲一：Lipid A 類縁体による Toll-like receptor 4 の MyD88 依存的・非依存的経路の活性化比較、日本薬学会第 133 年会 (2013, 3)
- 2) 山口 進康、藤本 開、那須 正夫：グルタルアルデヒドを用いた蛍光活性染色法による生菌数の迅速測定、第 24 回微生物シンポジウム (2012, 9)
- 3) 山口 進康、藤本 開、那須 正夫：蛍光活性染色による生菌数の迅速測定における蛍光増強法の検討、第 62 回日本薬学会近畿支部総会・大会 (2012, 12)
- 4) 佐野 彩香、山口 進康、川井 真好：蛍光染色を用いた細菌数測定法の多様な医薬品への応用、日本薬学会第 133 年会 (2013, 3)

## H. 知的財産権の出願・登録状況

- 1) 杉山圭一、棚元憲一、室井正志：新規ペプチド、これを用いたエンドトキシン由来疾患治療剤およびこの治療剤の探索方法 平成 24 年 7 月 27 日 特許第 5044765 号

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

遺伝子組換え体を用いた新規エンドトキシン試験法の開発

分担研究者	棚元憲一	武蔵野大学薬学部教授
協力研究者	室井正志	武蔵野大学薬学部
	水村 光	生化学工業株式会社 LAL 研究開発 G
	小田俊男	生化学工業株式会社 LAL 研究開発 G
	明田川純	生化学工業株式会社 LAL 営業 G
	小倉紀彦	生化学工業株式会社 LAL 研究開発 G

研究要旨：日本薬局方では、非経口医薬品中の発熱性物質を、天然資源であるカプトガニの血球抽出成分の凝固反応によるエンドトキシン試験法（リムルス試験）で定量することと規定している。この凝固メカニズムは、3種のセリンプロテアーゼとゲル化蛋白質が関与するカスケード反応であることが解明されている。

今回我々は、3種のプロテアーゼ前駆体の組換え酵素と発色合成基質からカスケード反応を再構成し、天然カプトガニに依らない組換えエンドトキシン比色試薬を開発した。この組換え試薬は、カプトガニ由来の既存試薬と比べ、局方エンドキシン標準品に対して同等の反応性を有することを確認した。

#### A. 研究目的

エンドトキシンはグラム陰性菌由来の細胞外壁成分で、発熱性物質の主要成分として知られる。日本薬局方では、非経口医薬品中の発熱性物質をエンドトキシン試験法（リムルス試験）で定量することと規定している。本試験で使用するリムルス試薬は、カプトガニ由来の血球成分を原料としているが、資源の安定確保、さらには生態系および環境保護上の問題を包含しており、近い将来における試薬の供給停止が懸念されている。また、カプトガニの捕獲時期や地域により、リムルス試薬の原料となる血球成分の状態にばらつきがみられ、製品の品質が一定しない問題も指摘されている。

リムルス試薬中で反応に関与する3種類の酵

素因子とその反応機構は、日本の研究者を中心とした基礎研究で解明、報告されている（図1）。これら3つの酵素因子を遺伝子組換え技術を利用して生産し、試験管内で反応を再構成できれば、カプトガニ原料に依存しない組換えリムルス試薬が開発できる。更に本試薬は天然リムルス試薬に比べ、品質も安定化することが期待される。

本年度は、遺伝子組換え技術を使い、反応に関与する3因子（C因子、B因子、凝固酵素前駆体）を生産する細胞の作製と、同細胞の培養で得られた3因子を利用したカスケード反応の再構成による組換えリムルス試薬の性能評価を目標とした。

## B. 研究方法

### 1) 組換え酵素因子の作製 (ウイルス法)

C 因子、B 因子、凝固酵素前駆体の 3 種類の各遺伝子配列を、登録データベースを参考に合成後、ウイルストランスファーベクターにサブクローニングした。バキュロウイルスゲノムとの相同組換えを利用して、各酵素因子の遺伝子をもつ 3 種類の組換えバキュロウイルスを作製した。3 種類の組換えバキュロウイルスは個別に昆虫細胞(Sf9)に感染させ、感染後 48、72、96 時間で経時的に回収、遠心分離とろ過 (0.22  $\mu$  m) により、培養上清を調製した。培養上清に含まれる組換え酵素因子は、各因子に対する特異抗体によるウエスタンブロット法、活性測定により確認、評価した。

### 2) 組換え酵素因子の作製 (安定発現細胞法)

C 因子、B 因子、凝固酵素前駆体の 3 種類の遺伝子配列を、登録データベースを参考に合成後、安定発現細胞用ベクターにサブクローニングした。Sf9 細胞ゲノムとの相同組換えを利用して、各因子の遺伝子をゲノムに組込んだ 3 種類の Sf9 安定発現細胞株を作製した。3 種の Sf9 安定発現細胞株は個別に浮遊培養をおこない、対数増殖期後期で経時的に回収、遠心分離とろ過 (0.22  $\mu$  m) により、培養上清を調製した。培養上清に含まれる組換え酵素因子は、各因子に対する特異抗体によるウエスタンブロット法、活性測定により確認、評価した。

### 3) カスケード反応の再構成

局方エンドトキシン (米国薬局方-Reference Standard Endotoxin) の希釈系列を含む検体溶液 50  $\mu$  L をマイクロタイタープレートに分注した。組換え酵素因子を含む 3 種類の培養上清、発色合成基質 (Boc-Leu-Gly-Arg-pNA)、及び緩衝液 (pH8.0) 等を事前に混合し、検体の入ったマイクロタイタープレートに各ウェル 50  $\mu$  L となる

ように添加して総体積 100  $\mu$  L とした。プレートを 37°C で加温し、凝固酵素による切断で合成基質から遊離した pNA の量を吸光度 (405nm) 測定し、単位時間あたりの吸光度の変化率を解析した。

## C. 研究結果

組換えリムルス試薬を開発するために、カスケード反応に必要な 3 つの酵素因子 (C 因子、B 因子、凝固酵素前駆体) を遺伝子組換え技術を利用して、組換え酵素因子として作製した。

酵素因子の遺伝子を組込んだバキュロウイルスを培養昆虫細胞株である Sf9 に感染させる方法 (以下、ウイルス法) を利用した場合、感染 48 時間後の培養上清に含まれる C 因子はウエスタンブロットによる確認で分解されていなかった。その後の培養継続 (72、96 時間) に伴い、経時的に C 因子が分解されることが確認された。この分解は各種プロテアーゼ阻害剤を共存させて培養をおこなっても完全には抑えられなかった (図 2)。同様の傾向は、他の 2 因子 (B 因子、凝固酵素前駆体) においても確認された (データ示さず)。

一方、バキュロウイルスを使わず、Sf9 細胞株のゲノム DNA に目的遺伝子を直接組込む方法 (以下、安定発現細胞法) では、ウイルス法と異なり培養時間の経過による C 因子の分解はみられなかった。さらには、ウイルス法 (感染後 48 時間) よりも組換え C 因子の培養上清への回収量が増加することが確認された (図 3)。同様の傾向は他の 2 因子 (B 因子、凝固酵素前駆体) でも確認された (データ示さず)。

以上の結果より、安定発現細胞法を利用すると 3 つの酵素因子が組換えタンパク質として安定に回収できることが示された。

続いて、得られた組換え酵素の 3 因子を材料

として、組換えリムルス試薬の再構成を試みた。中性付近の緩衝液存在下で、発色合成基質と組換え3因子を37°Cで加温すると、エンドトキシンの共存量に依存して3因子が順次活性化され、合成基質の切断に伴う吸光度の上昇が確認された。横軸にエンドトキシン濃度 (EU/mL)、縦軸に吸光度変化率 (mAbs/min) をプロットして、再構成した組換えリムルス試薬の性能を評価した。その結果、30分測定において、エンドトキシン濃度が0.001-0.1EU/mLの範囲で、直線性の良好な(相関係数 0.997) 定量結果が得られた(図4)。

#### D. 考察

組換えリムルス試薬の作製に必要な3つの酵素因子を組換えタンパク質として作製する際に、ウイルス法と安定発現細胞法という、2つの異なる方法を検討した。培養時間の経過に伴い、生産した組換え酵素因子が、前者では分解を受け、後者では安定に存在することが確認された。分解を受けた因子の活性を確認すると、エンドトキシンの依存しない活性化がみられ、組換えリムルス試薬としては使用できない性能であった(データ示さず)。

現在、天然カプトガニの血球を原材料としたリムルス試薬は複数の会社から製造販売されている。試薬により差があるが、測定範囲0.001-10や0.005-50 EU/mL、測定時間30-100分が平均的な性能である。今回の組換えリムル

ス試薬は、30分測定という短い測定時間で、天然カプトガニ由来のリムルス試薬と同等に低エンドトキシン濃度を測定できる可能性を示した。現状での課題として、天然リムルス試薬と比べ①エンドトキシンを含まない検体に対するブランク値が高い ②測定範囲が狭い といった点があげられる。こうした課題は、試薬への添加物の検討により克服できる可能性を見い出しており、今後の開発課題と考えている。

#### E. 結論

本年度は組換えリムルス試薬の開発を目的に、①酵素因子3種類(C因子、B因子、凝固酵素前駆体)の組換えタンパク質の生産 ②組換え酵素因子を利用したエンドトキシン定量性能評価をおこなった。本研究で作製した組換えリムルス試薬は低濃度のエンドトキシンを定量でき、天然リムルス試薬と比べても遜色のない性能を示した。

#### F. 研究発表

1. 論文発表  
なし
2. 学会発表  
なし

#### G. 知的財産権の出願・登録状況

なし

添付資料 1

測定試料に含まれるエンドトキシン

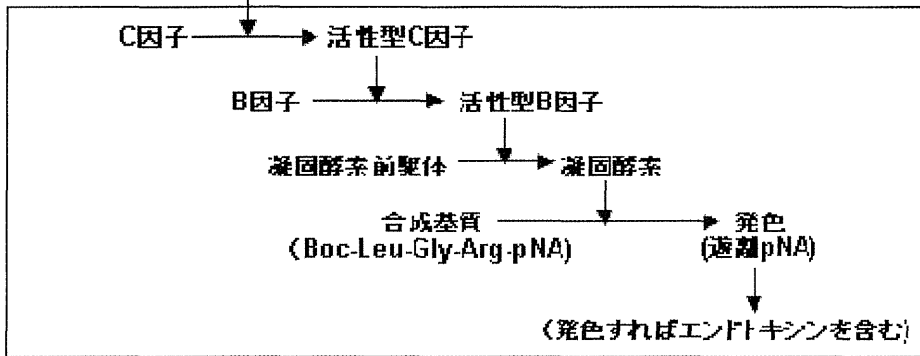


図1 エンドトキシン測定において、リムルス試薬内で起こる反応を模式的に示す。測定試料に含まれるエンドトキシンがC因子を活性化し、活性化C因子はB因子を、活性化B因子は凝固酵素前駆体を順次切断、活性化し、最終的には発色合成基質であるBoc-Leu-Gly-Arg-pNAが切断され、遊離のpNAが発色する。

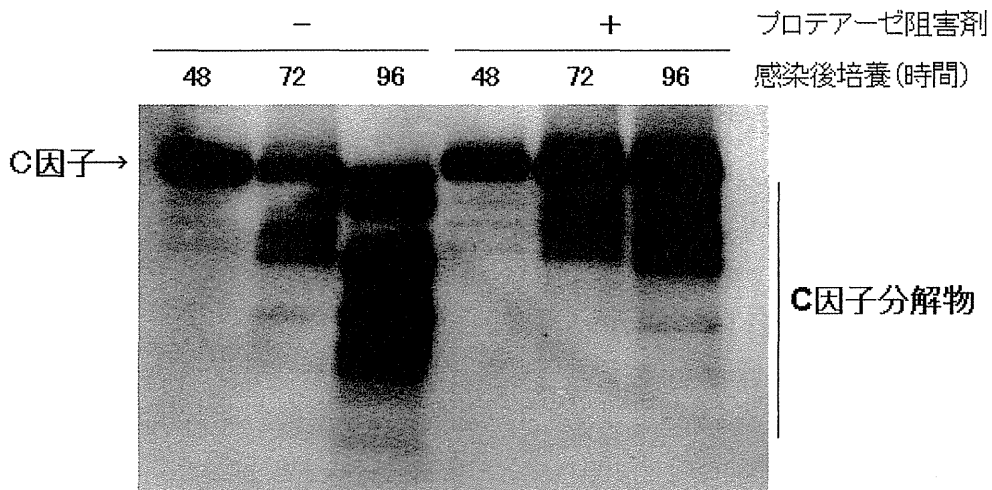


図2 ウイルス法で作製した組換えC因子を含む培養上清に対する、抗C因子特異的抗体によるウエスタンブロッティング。

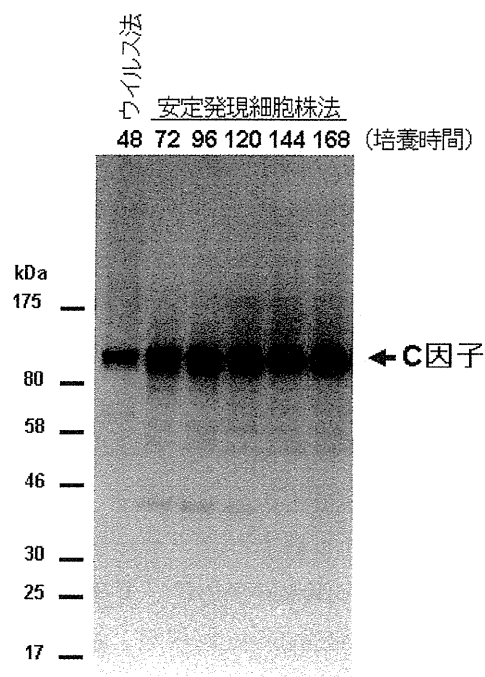


図3 安定発現細胞法で作製した組換え C 因子を含む培養上清に対する、抗 C 因子特異的抗体によるウエスタンブロッティング。

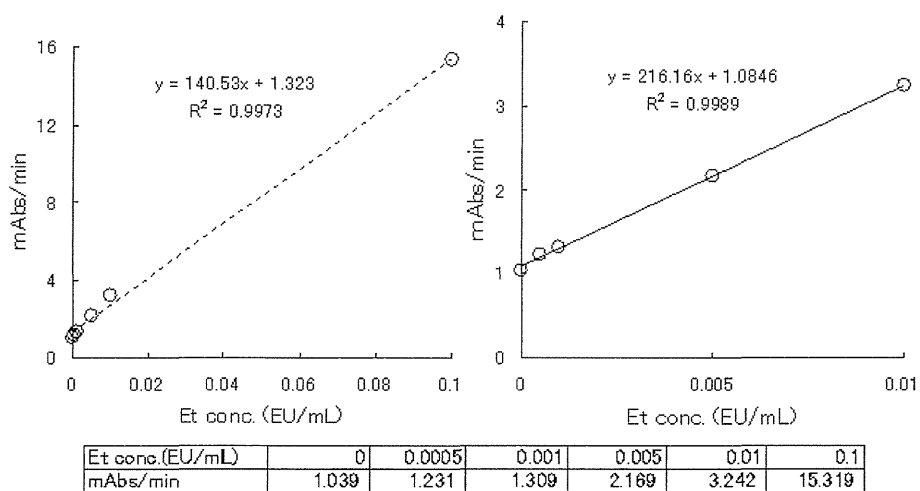


図4 安定発現細胞法で作製した組換えリムルス試薬によるエンドトキシン定量。左：エンドトキシン濃度 0-0.1 EU/mL、右：エンドトキシン濃度 0-0.01 EU/mL の範囲での結果をそれぞれプロットした。吸光度変化率 (mAbs/min) は 2 回測定の平均値であらわした。

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

－微生物の迅速検出法の確立－

分担研究者 山口進康 大阪大学大学院薬学研究科（衛生・微生物学）

協力研究者 川井真好 姫路獨協大学薬学部（衛生・微生物学）

研究要旨：第十六改正日本薬局方に参考情報として収載された蛍光活性染色法およびマイクロコロニー法を、医薬品の微生物学的品質保証に活用するためには、原料、原薬、医薬品添加物、製剤などに対するプロトコルの確立が重要となる。そこで、非無菌医薬品の微生物管理における生菌数迅速測定プロトコルの作成のために、日本薬局方微生物関連試験（微生物限度試験および無菌試験）に用いる溶解剤や中和剤が、蛍光染色に与える影響を検討した。

A. 研究目的

環境微生物学分野における多くの研究により、自然環境中の微生物の大部分は通常の方法では培養困難であることが、明らかとなってきている。これにともない、微生物を培養することなく、迅速・簡便、さらには高精度に定量するための手法が検討されている<sup>1,2)</sup>。医薬品製造用水や生薬等においても培養困難な細菌の存在が報告されてきており<sup>3-6)</sup>、このような細菌の計数においては、個々の細菌を蛍光試薬で染色し、直接観察する方法が有効である<sup>7,8)</sup>。

培養に依存しない細菌数測定法のうち、蛍光活性染色法は微生物細胞内のエステラーゼ活性を指標として、生菌数を測定できる方法である。また、マイクロコロニー法は、フィルター上に捕集した細菌を培地上で短時間培養し、マイクロコロニーを形成させることにより、増殖能をもつ細菌数を測定する方法である。

これらの方法の利点としては、操作が比較的容易であり、かつ短時間で結果を得ることができる点が挙げられる。蛍光活性染色法の染色時間は数分から約 30 分である。またコロニー形成の初期段階で蛍光染色し、測定するマイクロコロニー法であっても、24 時間以内に測定結果を得ることができる。したがって、細菌の検出に数日を要する培養法と比較して、短時間のうちに結果を得ることができる。

このような特長から、蛍光活性染色法およびマイクロコロニー法が第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、その活用が期待されている。

非無菌医薬品の微生物管理として、原料、原薬、医薬品添加物、製剤などの細菌数測定および製造環境モニタリングが重要である。医薬品原料や医薬品添加物等に対しては、適切な前処理を行うことにより、蛍光



活性染色法やマイクロコロニー法による生菌数測定が可能となる。

前年度は、非脂溶性かつ不溶性の医薬品添加物である滑沢剤に混入した細菌数を迅速測定するためのプロトコルを検討した。今年度は前年度の成果をふまえ、日本薬局方微生物関連試験（微生物限度試験および無菌試験）に用いる溶解剤や中和剤が蛍光染色に与える影響を検討した。

## B. 研究方法

### 1) 試料

試料溶液としては、日本薬局方微生物関連試験（微生物限度試験および無菌試験）に記載されている以下の溶解剤や中和剤を用い、最も高い濃度の溶液とした：①ジメチルスルホキシド（DMSO）、②グリシン、③ポリソルベート 20、④ポリソルベート 80、⑤チオ硫酸ナトリウム、⑥ミリスチン酸イソプロピル、⑦レシチン。

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 *Bacillus subtilis* NBRC 3134 および *Staphylococcus aureus* subsp. NBRC 13276 を用いた。各菌株を SCD 液体培地を用いて 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。この菌懸濁液に前述の溶解剤や中和剤を添加し、試料とした。微生物試験の操作時間を 30 分間と考え、室温で 30 分間試料溶液と反応させた後、CFDA-DAPI 二重染色法により染色し、蛍光顕微鏡下で細菌数を測定した。ろ過滅菌水中に懸濁した細菌試料の測定値と比較する

ことにより、各溶解剤や中和剤が蛍光活性染色に与える影響を評価した。

### 2) 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。

## C. 研究結果および考察

微生物関連性試験において用いられている溶解剤や中和剤について、高濃度の溶液を調製し試料溶液としたところ、0.1%レシチン溶液では溶解できずに懸濁状態となった。このため、洗浄溶液には適さないと考えられた。

そこで、調製した試料溶液（①1%ジメチルスルホキシド、②0.5%グリシン、③1%ポリソルベート 20、④1%ポリソルベート 80、⑤1%チオ硫酸ナトリウム、⑥ミリスチン酸イソプロピル原液）と菌体を 30 分間反応させた後に、CFDA-DAPI 二重染色を行い、ろ過滅菌水での測定値を 100 とした場合の検出率を求めた。

各指標菌に対する DAPI の染色性を検討したところ、図 1 に示した通り、*S. aureus*、*B. subtilis* および *E. coli* のいずれにおいても、80%以上の検出率を示した。以上のこ

とから、それぞれの溶解剤や中和剤は DAPI の染色性に影響を与えないことがわかった。

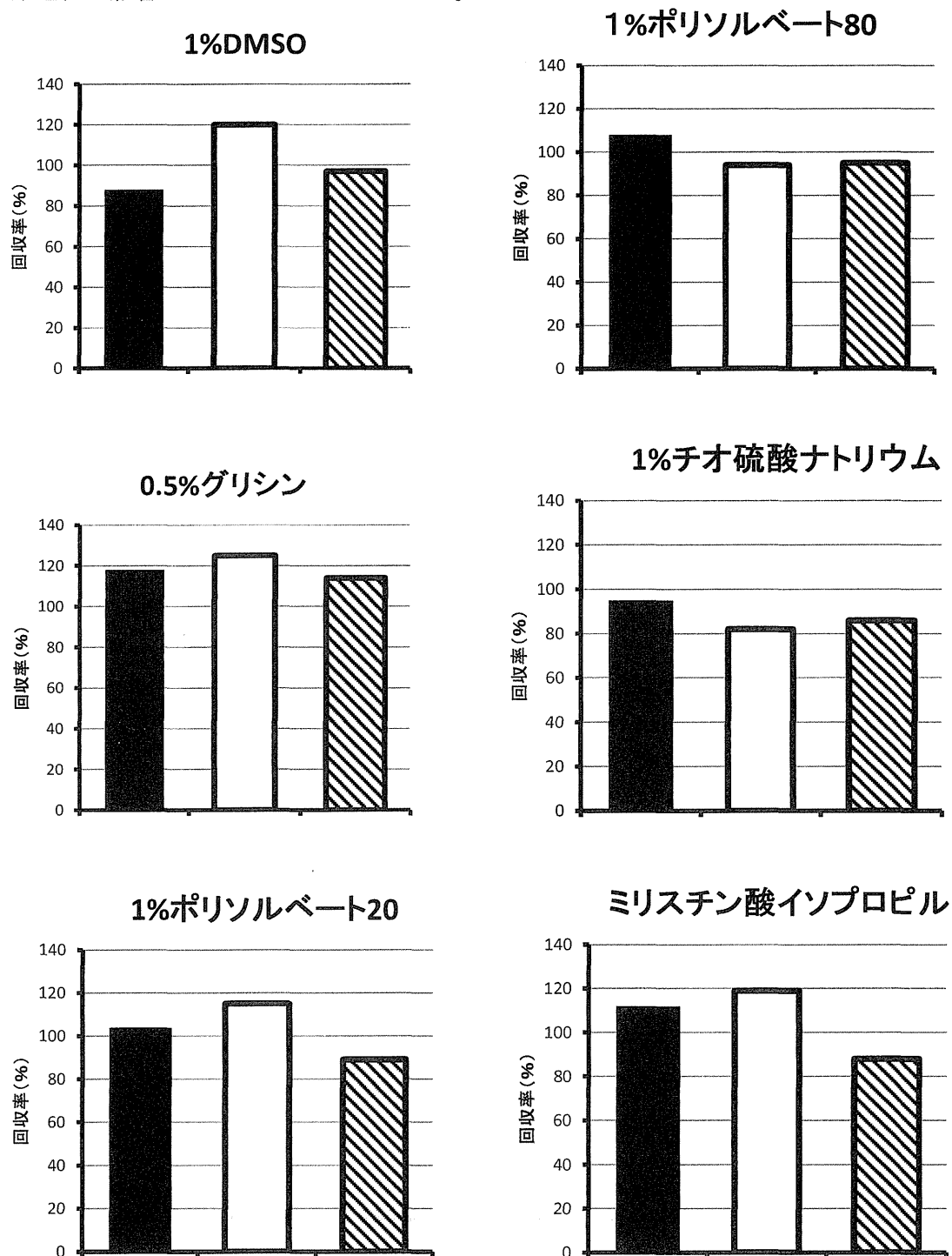


図1. 各溶解剤や中和剤の蛍光染色剤 DAPI の染色性への影響

■ *S. aureus*    □ *B. subtilis*    ▨ *E. coli*

同様に各溶解剤や中和剤が CFDA の染色性に与える影響を評価した結果を図 2 に示した。

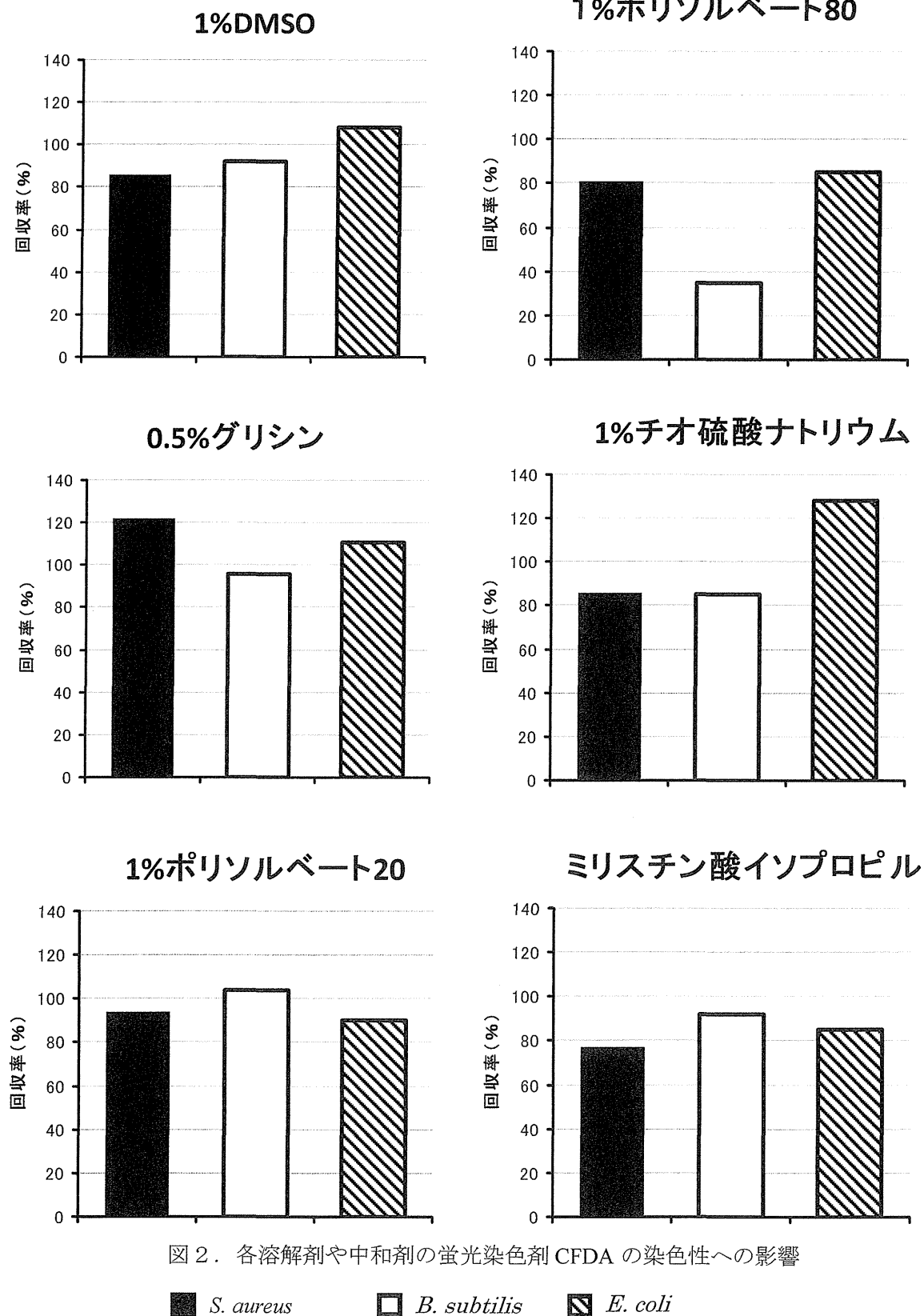


図 2. 各溶解剤や中和剤の蛍光染色剤 CFDA の染色性への影響

■ *S. aureus*    □ *B. subtilis*    ▨ *E. coli*

1%ジメチルスルホキシド、0.5%グリシン、1%ポリソルベート 20、1%チオ硫酸ナトリウムおよびミリスチン酸イソプロピル原液については *S. aureus*、*B. subtilis* および *E. coli* の全ての供試菌株において良好な検出率が得られ、これらの試料は CFDA の染色性に影響を与えないことがわかった。しかしながら、1%ポリソルベート 80 は、*B. subtilis* に対してのみ平均約30%の検出率を示し、CFDA の染色性に影響を与えることが分かった。

1%ポリソルベート 80 が *B. subtilis* に対する CFDA の染色性に与える影響を緩和するため、Glutaraldehyde (GA) を用いた CFDA-DAPI 二重染色法を検討した。なお GA は細胞膜架橋形成を行うため、細胞内で産生された蛍光物質 carboxyfluorescein の細胞外への漏出を防ぐことにより、CFDA の染色性を高めると報告されている<sup>9)</sup>。結果として、GA を染色液に添加することにより *B. subtilis* の CFDA 染色における輝度は上がったが、検出菌数の顕著な増加は認められなかった。このため、CFDA 染色性の低下の原因は、細胞膜の損傷による carboxyfluorescein の細胞外への漏出以外の原因によるものが大きいと考えられた。ポリソルベート 80 は非イオン性の界面活性剤でポリソルベート 20 に比べて疎水性が高い。1%ポリソルベート 80 は培養法による生菌数測定に用いられており、菌の増殖には影響を与えないと考えられるため、エステラーゼの失活なども考えられた。

#### D. 結論

今回の研究では、日本薬局方微生物関連試験（微生物限度試験および無菌試験）に

用いる溶解剤や中和剤として、①ジメチルスルホキシド、②グリシン、③ポリソルベート 20、④ポリソルベート 80、⑤チオ硫酸ナトリウム、⑥ミリスチン酸イソプロピルを選び、各溶解剤や中和剤が蛍光染色に与える影響を検討した。その結果、検討したほとんどの溶解剤や中和剤は、蛍光活性染色において供試菌株の染色性に影響を与えないことが明らかとなった。また、ポリソルベート 80 に関しては、使用濃度を下げることにより、染色性が改良できるものと考えられる。

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。

#### E. 参考論文

1. 谷佳津治、山口進康、那須正夫：蛍光染色によるシングルセルレベルでの細菌の検出. *衛生化学*, **43**: 145-154 (1997)
2. Yamaguchi, N. and M. Nasu. Flow cytometric analysis of bacterial respiratory and enzymatic activity in the natural aquatic environment. *J. Appl. Microbiol.*, **83**: 43-52 (1997)
3. Kawai, M., N. Yamaguchi and M. Nasu. Rapid enumeration of physiologically active bacteria in purified water used in the pharmaceutical manufacturing process. *J. Appl. Microbiol.*, **86**: 496-504