

## 1 遺伝子解析による微生物の迅速同定法〈G4-7-190〉

### 3 次のように改める。

4 本法は、医薬品の製造工程管理試験や出荷判定試験において  
5 検出される微生物(細菌及び真菌)を遺伝子解析によって種又は  
6 属レベルで同定又は推定する手法を示す。無菌試験や無菌製造  
7 工程で検出された汚染微生物の同定は、汚染原因の究明に役立  
8 つ。また、医薬品製造区域や医薬品原料等から検出される微生物  
9 の種類についての知見は、微生物学的に安全な医薬品を製造  
10 する上で重要である。微生物の同定には、微生物固有の形態や  
11 生理・生化学性状、菌体成分の解析等を組み合わせて、分類階  
12 級の上位から下位に進めていく表現形質解析法が広く用いら  
13 てきた。表現形質による微生物同定用システムも数多く市販さ  
14 れているが、医薬品製造原料や環境から検出される微生物の中  
15 には、同定できないものも多い。また、表現形質による同定法  
16 は、一般に専門知識が必要な上、結果の判定が客観性に欠ける  
17 おそれがある。微生物の進化の歴史はリボソームRNA(rRNA)  
18 に記録されており、近年の微生物分類学ではこの記録をもとに、  
19 系統発生的に区分する手法が採用されている。本法は、細菌に  
20 ついては、16S rRNAの高度可変領域の全部又は一部、真菌に  
21 ついては18S rRNAと26S/28S rRNA間のスペーサー領域  
22 (ITS1-5.8S rRNA-ITS2)又は26S/28S rRNAのD1/D2領域の遺  
23 伝子配列を解析し、データベースと照合することによって微生物  
24 を迅速に同定又は推定する手法を示す。なお、本法は他の同  
25 定法に取って代わるものではなく、厳密な同定のためには他の  
26 手法も併せて考慮する必要がある。また、本法に示した方法は、  
27 用いる装置や材料、実施者の経験などによって変更可能である。  
28 また、本法に示した以外の遺伝子領域も合理性があれば使用可  
29 能である。

### 30 1. 装置

#### 31 (i) DNA自動解析装置

32 DNAの塩基配列を読み取る(シーケンスする)装置で、キャ  
33 ピラリー法など、種々の機種がある。

#### 34 (ii) DNA増幅装置

35 被検菌の標的DNAの増幅(PCR)に用いる。また、PCR産物  
36 をシーケンス試薬で標識するためにも用いる。

### 37 2. 操作法

38 以下、操作法の一例を示す。

#### 39 2.1. 鋳型DNAの調製

40 同定対象とする細菌又は真菌は純培養されていることが重要  
41 である。被検菌が集落の場合は、1.5 mLマイクロチューブに  
42 被検菌処理液を0.3 mL入れ、これに滅菌ループなどで集落の  
43 一部(かびの場合は、ごく少量)をとり懸濁させる。被検菌が液  
44 体培養物の場合は、1.5 mLマイクロチューブに培養物を適量  
45 (0.5 mL程度)とり、遠心分離(10000 ~ 15000×g, 2 ~ 3分)後、  
46 上清を除去し、残留物に被検菌処理液を0.3 mL入れて懸濁さ  
47 せる。ヒーターを用いて懸濁液を100℃で10分間加熱する。細菌  
48 菌、酵母類は一般に、加熱処理物でもPCRは進行するが、か  
49 びの中には集落を用いるとPCRを阻害するものもある。その  
50 場合には、液体培養物からDNA抽出を行った方がよい。また、  
51 市販のゲノムDNA抽出キットを用いてもよい。

#### 52 2.2. PCR

53 加熱処理した菌液の上清又はDNA抽出物を2 µL程度用い、  
54 細菌の場合は10F(又は27F)/1492R(又は1525R)プライマーセ  
55 ット、真菌の場合はITS1F(又はITS5F)/NL4Rプライマーセ  
56 ットを添加して、用いるPCR酵素に最適な条件でPCRを行う。  
57 細菌の場合は約1200 bp、真菌の場合は菌種により、約1000 ~  
58 1400 bpのDNA断片が増幅生成する。PCRを行う際には、陰性  
59 対照(菌液の代わりに被検菌処理液)を置く。なお、PCRの代わ  
60 りに他の核酸増幅法を用いてもよい。

61 また、合理性があれば他のプライマーセットも使用可能であ  
62 る。

#### 63 2.3. PCR産物の精製

64 未反応物(dNTPやプライマーなど)を除去するため、市販の  
65 キット等を使用してPCR産物を精製する。なお、目的の塩基  
66 長と異なるPCR産物(非特異的増幅産物)の生成が疑われる場合  
67 は、アガロースゲル電気泳動等、適切な方法により、目的の塩  
68 基長のPCR産物を精製する。

#### 69 2.4. 精製DNAの定量

70 必要に応じて、精製DNA量を適切な方法により測定する。  
71 分光光度計で測定する場合には、1 OD<sub>260nm</sub> = 50 µg/mLで換算  
72 する。

#### 73 2.5. 塩基配列の解析

74 用いるDNA解析装置に適したシーケンス試薬を使用し、  
75 適切なプライマーを用いて試料の塩基配列を読み取る。得られ  
76 た確度の高い(Quality valueが20以上)塩基配列をBLAST<sup>®1)</sup>検  
77 索によりデータベース(rRNA/ITS databases もしくは  
78 Standard databases)と照合する。なお、陰性対象では試料と  
79 同じ塩基配列が読み取れないことを確認する。また、非特異的  
80 増幅産物の混入が疑われる場合は、2.2で用いたプライマー以  
81 外のプライマーを用いてシーケンスすると正しく読める場合  
82 が多い。

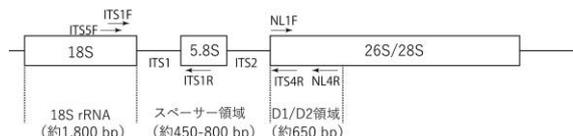
### 83 3. 判定

84 一般に、得られた塩基配列とデータベース<sup>2-4)</sup>とが97%以上  
85 合致した場合、以下のように判定できる。なお、一致度が97%  
86 を下回る場合、又は複数の属が上位の一致率で検索された場合  
87 は他の同定法を考える。

88 (i) 細菌の場合は、16S rRNAの5'側500塩基程度、又は必要  
89 に応じて全長の塩基配列を適切なプライマーを用いて読み取り、  
90 得られた塩基配列をBLAST<sup>®</sup>を用いて検索し、上位にランクさ  
91 れた菌種を被検菌と同一種又は近縁種と判定する。

92 (ii) 真菌の場合は、rRNA遺伝子のスペーサー領域(ITS1-  
93 5.8S rRNA-ITS2)やD1/D2領域を適切なプライマー(スペーサ  
94 ー領域はITS5FやITS4R, D1/D2領域はNL1FやNL4Rなど、  
95 図1)で読み取った塩基配列をBLAST<sup>®</sup>を用いて検索し、上位に  
96 ランクされた菌種を被検菌と同一種又は近縁種と判定する。

97 (iii) データベース検索の結果、ヒトの健康に影響を与える懸  
98 念のある微生物が上位に検索された際は、再試験や、PCR産  
99 物の全長を解析する、あるいは、本同定法とは原理の異なるマ  
100 トリックス支援レーザー脱離イオン化飛行時間質量分析法や微  
101 生物迅速試験法〈G4-6-190〉に示す方法等の他の同定法を試み  
102 るなどの対応が必要である。



104 図1 真菌のスペーサー領域 (ITS1-5.8S rRNA-ITS2), D1/D2  
105 領域およびプライマーの位置  
106

#### 107 4. 試薬・試液

- 108 (i) エチレンジアミン四酢酸二水素二ナトリウム試液, 0.5  
109 mol/L : エチレンジアミン四酢酸二水素二ナトリウム二水和物  
110 18.6 g を水に溶かし, 100 mL とする.
- 111 (ii) トリス緩衝液, 1 mol/L, pH 8.0 : 2-アミノ-2-ヒド  
112 ロキシメチル-1,3-プロパンジオール 24.2 g を水に溶かし,  
113 0.2 mol/L 塩酸試液を加えて pH 8.0 に調整した後, 水を加えて  
114 200 mL とする.
- 115 (iii) TE 緩衝液 : pH 8.0 の 1 mol/L トリス緩衝液 1.0 mL に 0.5  
116 mol/L エチレンジアミン四酢酸二水素二ナトリウム試液 0.2 mL  
117 を加えた後, 水を加えて 100 mL とする.
- 118 (iv) 被検菌処理液 : 適切な濃度の界面活性剤を含む溶液 (例え  
119 ばポリオキシエチレン(10)オクチルフェニルエーテルを 1 vol%  
120 含む TE 緩衝液) を小分けし, 凍結保存する.
- 121 (v) PCR 及びシーケンス用プライマー (例) :

微生物	プライマー	塩基配列
細菌	10F <sup>5)</sup>	5'-GTTTGATCCTGGCTCA-3'
	27F <sup>6)</sup>	5'-AGAGTTTGATCCTGGCTCAG-3'
	519R <sup>6)</sup>	5'-GTATTACCGCGGCTGCTG-3'
	800R <sup>5)</sup>	5'-TACCAGGTATCTAATCC-3'
	800F <sup>5)</sup>	5'-GGATTAGATACCCTGGTA-3'
	1492R <sup>7)</sup>	5'-GGTTACCTTGTTACGACTT-3'
	1525R <sup>6)</sup>	5'-AAGGAGGTGATCCARCC-3'
真菌	ITS1F <sup>5)</sup>	5'-GTAACAAGGTYTCCGT-3'
	ITS5F <sup>8)</sup>	5'-GGAAGTAAAAGTCGTAACAAGG-3'
	ITS4R <sup>8)</sup>	5'-TCCTCCGCTTATTGATATGC-3'
	NL1F <sup>9)</sup>	5'-GCATATCAATAAGCGGAGGAAAAG-3'
	NL4R <sup>9)</sup>	5'-GGTCCGTGTTCAAGACGG-3'

R: A 又は G, Y: C 又は T

- 122 (vi) ポリオキシエチレン(10)オクチルフェニルエーテル : 本  
123 品は微黄色の粘性の液体である.

#### 124 5. 参考資料

- 125 1) BLAST<sup>®</sup>, Basic Local Alignment Search Tool, National  
126 Library of Medicine, National Center for Biotechnology  
127 Information, <https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>.  
128 (Accessed Nov 21, 2023)
- 129 2) M. Kim, et al., Int. J. Syst. Evol. Microbiol. 64, 346-351  
130 (2014).
- 131 3) S.W. Peterson and C.P. Kurtzman, System. Appl.  
132 Microbiol. 14, 124-129 (1991).
- 133 4) H.A. Raja, et al., J. Nat. Prod. 80, 756-770 (2017).
- 134 5) T. Sasaki, et al., PDA J. Pharm. Sci. Technol. 51, 242-247  
135 (1997).
- 136 6) D.J. Lane, Nucleic acid techniques in bacterial  
137 systematics. E. Stackebrandt, and M. Goodfellow, eds.,  
138 John Wiley and Sons, New York, NY, pp. 115-175.
- 139 7) S. Turner, et al., J. Euk. Microbiol. 46, 327-338 (1999).
- 140 8) T.J. White, et al., "PCR Protocols: A Guide to Methods  
141 and Applications", M.A. Innis, D.H. Gelfand, J.J. Sninsky,

- 142 and T.J. White, eds., Academic Press, New York, 1990, pp.  
143 315-322.
- 144 9) K. O'Donell, In: "The Fungal Holomorph: Mitotic, Meiotic  
145 and Pleomorphic Speciation in Fungal Systematics", D.R.  
146 Reynolds, and J.W. Taylor, eds., CAB International,  
147 Wallingford, 1993, pp. 225-233.

148  
149