

滅菌研究センターのご紹介

2021年10月21日
株式会社コーガアイソトープ
滅菌研究センター
武川 哲也



目次

- 当社のご紹介
- 滅菌研究センターのサービス
- 滅菌研究センターの設備
- 微生物迅速同定受託について



当社の紹介



沿革

1981年10月	滋賀県甲賀市甲賀町に 株式会社甲賀ラジオアイソトープ研究所を設立
1987年01月	コバルト - 60放射線照射施設 - 1号機を竣工
1997年11月	長年の安全実績を評価され 科学技術庁長官賞受賞
2006年08月	コバルト - 60放射線照射施設 - 2号機を竣工
2009年06月	社団法人日本アイソトープ協会から同協会甲賀 研究所の事業を譲受 - 3号機を譲受 同時に微生物試験事業も譲受し、「滅菌研究セ ンター」となる

所在地：滋賀県甲賀（こうか）市



信楽焼



忍術屋敷



水口宿



許可・認証

放射性同位元素使用	(本社工場) 許可番号 使第3892号 (第二工場) 許可番号 使第5639号
医薬品製造業	許可番号 25AZ200011
医療機器製造業	登録番号 25BZ000066
化粧品製造業	許可番号 25CZ200029
再生医療等製品製造業	許可番号 25FZ110002
ISO9001	認証番号 1210025874TMS
ISO13485,11137-1	認証番号 Q4N170456184007
ISO14001	認証番号 JQA-EM5984

滅菌研究センターのサービス



滅菌研究センターで行っているサービス

微生物試験受託サービス

- ◆ 菌数（バイオーバーデン）測定試験
- ◆ 無菌性の試験
- ◆ 微生物同定試験（MALDI TOF-MS、遺伝子同定）



菌数測定・無菌性の試験



迅速
低価格
豊富な
当社実績

MALDI TOF-MS



高精度の同定
信頼性

遺伝子同定

菌数（バイオバーデン）測定試験

主として、医療機器等の製品に存在する菌数の測定を行っています。

よくバイオバーデン測定とも言いますが、バイオバーデンとは、以下のような概念です。

規格（ISO11737-1:2018）の定義

「製品及び/又は無菌バリアシステムの上又は内部に存在する生育可能な微生物群」

菌数（バイオバーデン）測定

バイオバーデン測定の主たる目的

1. ガンマ線滅菌の滅菌線量を設定するためにバイオバーデンを測定する
2. ガンマ線滅菌製品の滅菌保証を維持するために、定期的にバイオバーデンを測定する
3. 製品の製造環境・工程の管理のためにバイオバーデンを測定する ➡ **動態管理**など

無菌性の試験

製品に生育可能な菌の存在の有無を判定するための試験です。

以下のような目的で実施します。

1. 滅菌線量設定や滅菌バリデーションの一部として実施する（この場合は無菌性の試験と言います）
2. 滅菌処理した製品の無菌を確認するために実施する（この場合は無菌試験と言います）

微生物の同定試験

検出された菌の属や種を判定するための試験です。以下の2つの方法で実施しています。なお、それぞれの方法については後でご紹介いたします。

1. **プロテオーム法**：微生物のタンパク質をMALDI-TOF MSで分析し同定 信頼性も高く迅速かつ安価
2. **遺伝子同定法**：リボソーム遺伝子のDNA塩基配列を解析することで同定。現在の系統分類の基礎となっている同定法

滅菌研究センターの 設備のご紹介



微生物試験の設備



無菌性の試験の実施中の作業状況

クリーンベンチ

クラス100（日本薬局方：グレードA）

試験前後に清浄度の確認を行っています

微生物試験の設備



恒温槽（インキュベーター）

各種培養温度（20～25℃、28～32℃、30～35℃）に対応しています
庫内の温度は自動温度記録計にて連続的に監視しています

微生物試験の設備



大型超音波洗浄機



ストマッカー

バイオバーデン回収用装置

製品からのバイオバーデンを回収するための装置として、超音波洗浄機、ストマッカー、振とう機、ボルテックスミキサー等があります。製品の性状により使い分けます。

微生物試験の設備



オートクレーブ滅菌器

培地／試薬の滅菌を行います



乾熱滅菌器

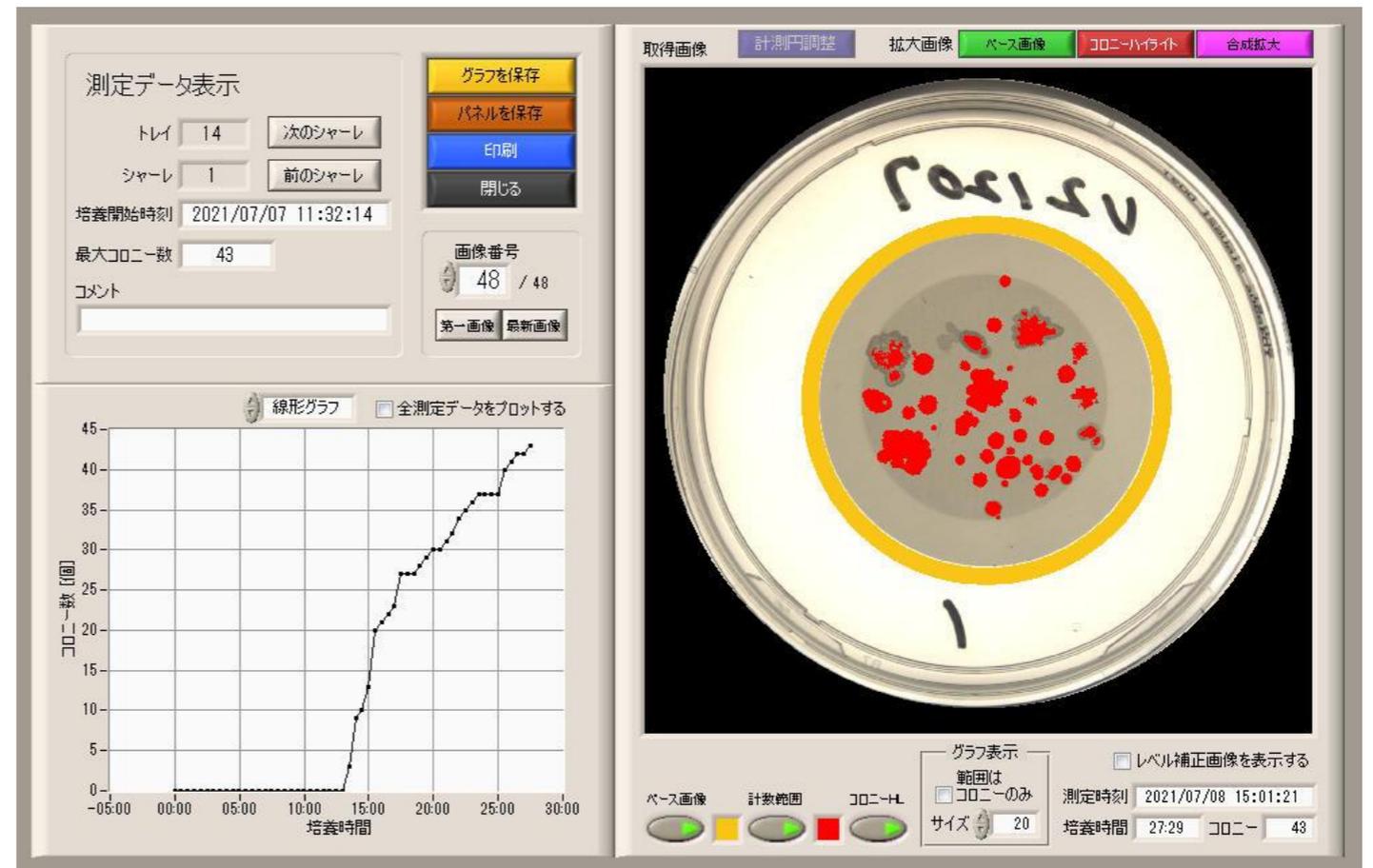
通常の滅菌条件（160～170℃）だけではなくエンドトキシンの不活化（250℃）まで対応します

金属／ガラス器具の滅菌を行います

微生物試験の設備



シャーレ設置用のトレイ

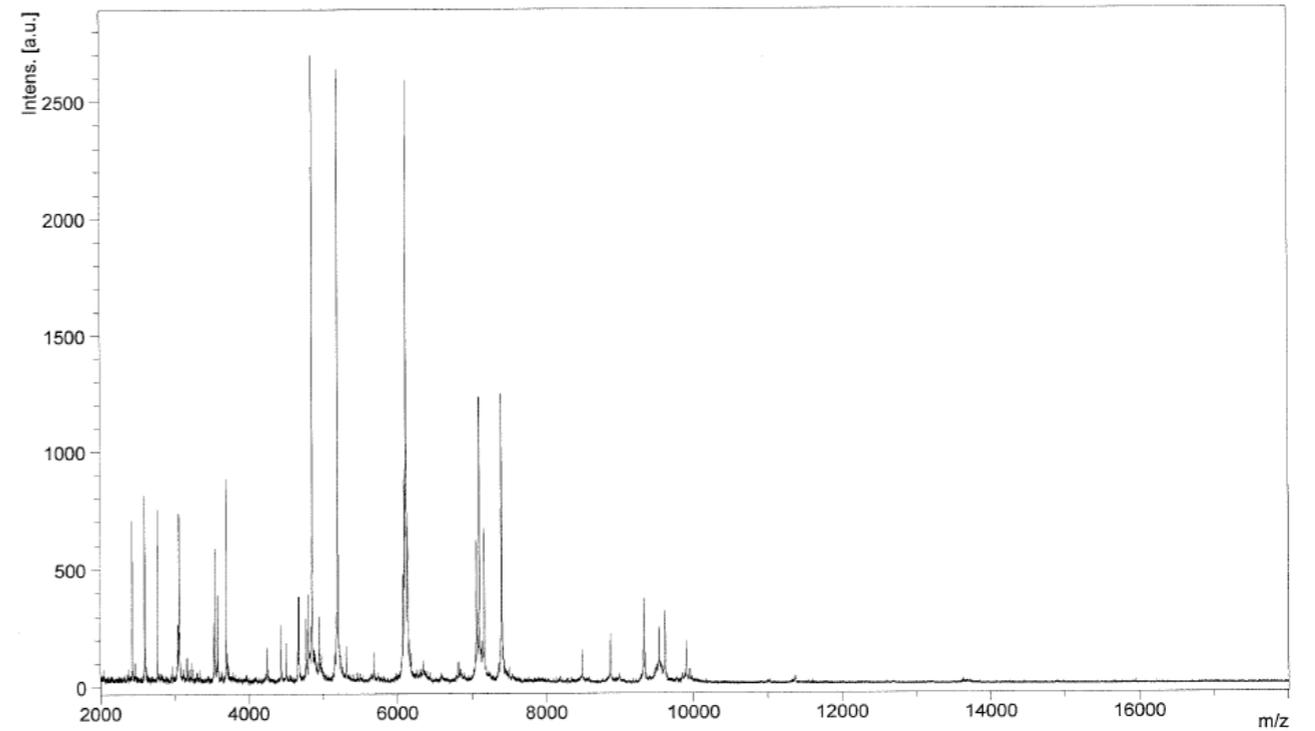


コロニー測定データ

コロニー数のトレンドグラフ
カウントされたコロニー画像

μ3D オートスキャナー
シャーレで培養した菌のコロニーを自動的に判定し、カウントします
30分毎にシャーレを撮影し、画像として記録します

微生物同定試験の設備



MALDI-TOF MAS 出力データ
微生物固有のタンパク質パターンをライブラリのパターンとマッチングすることで同定しています

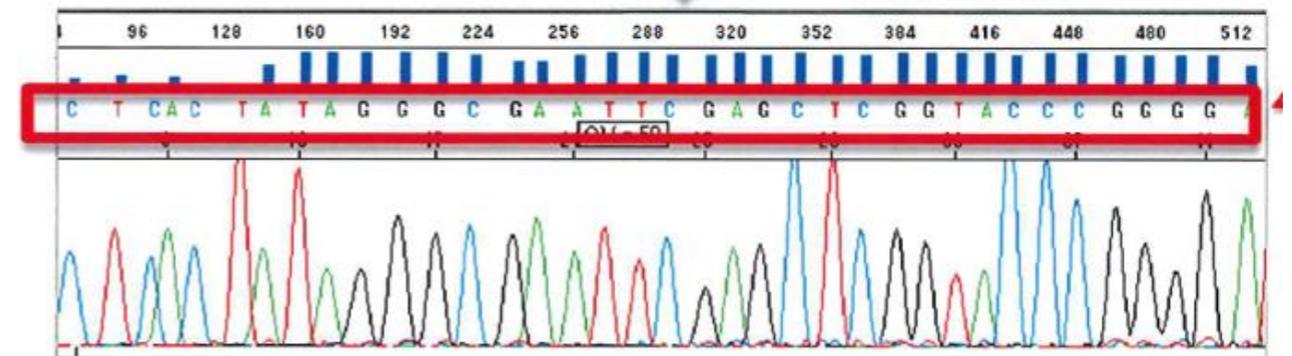
MALDI Biotyper

MALDI-TOF MAS (マトリックス支援レーザー脱離イオン化 - 飛行時間型質量分析置)

当社はMALDI Biotyper LTとMALDI Biotyper smart の2台を保有しています



微生物同定試験の設備



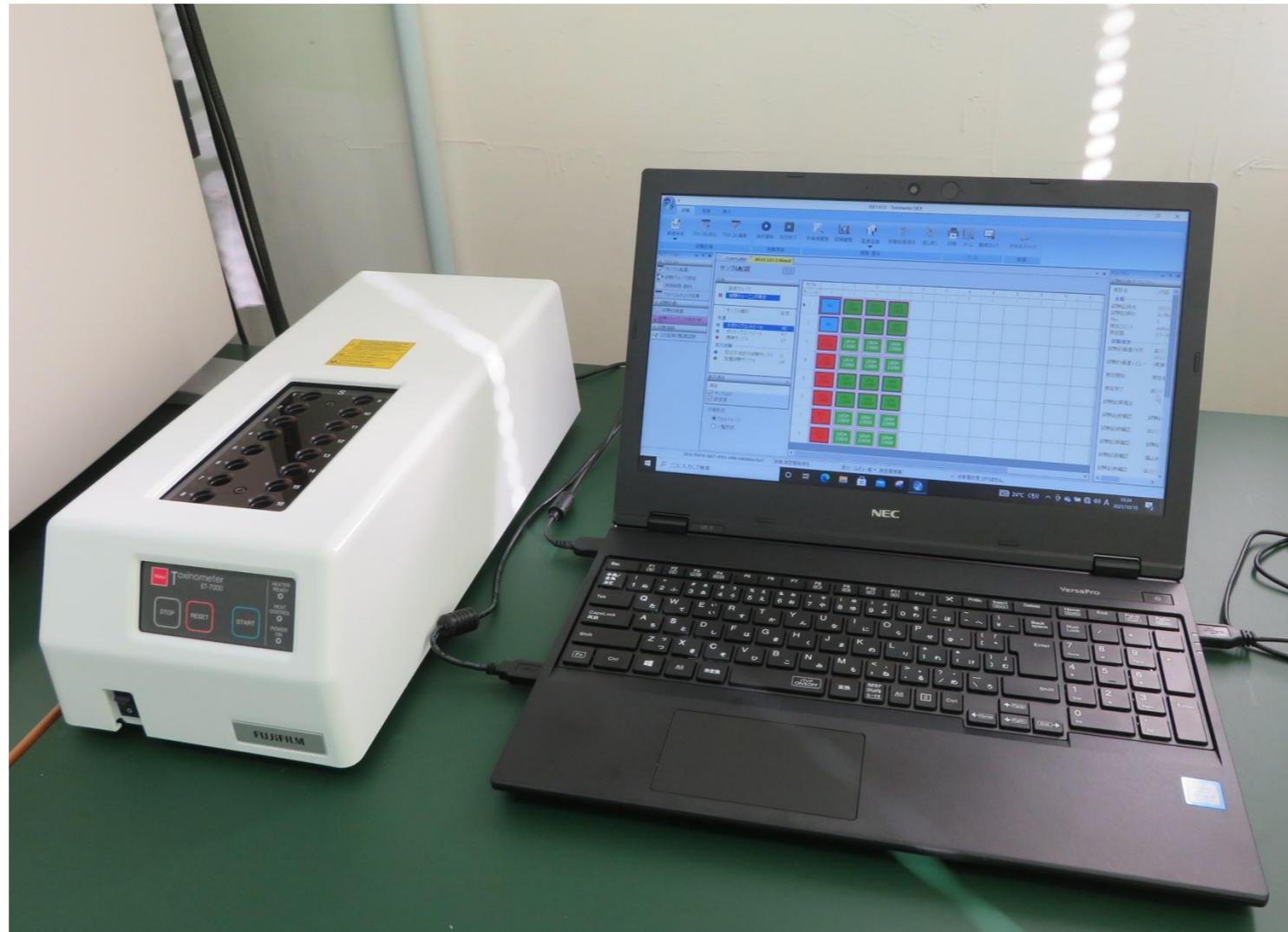
塩基配列データ

リボソームRNA遺伝子の塩基配列を解析し、データベースと照合することで菌を同定します

遺伝子同定装置

DNAシーケンサ（DNAの塩基配列を読み取る装置）及びサーマルサイクラー（被検菌の標的DNAの増幅（PCR）に用いる装置）

エンドトキシン測定装置



トキシノメータ ET-7000

現在、エンドトキシン試験受託のための準備を進めています（2022年1月受託開始予定）

微生物迅速同定法について



当社が受託している微生物迅速同定法

	測定時間	対象	特徴
遺伝子型分析 	8~10時間	細菌 カビ 酵母	同定精度は最も高いが、専門的知識が必要
DNAシーケンサ プロテオーム法 	10~30分間	細菌 酵母	測定時間は非常に速いが、装置が高額（数千万円）
MALDI TOF/MS			

プロテオーム法 (MALDI-TOF MSによる方法)



プロテオーム法

日本薬局方 参考情報 G4. 微生物関連
微生物迅速試験法には以下のように記載



質量分析法

「菌体成分を質量分析計により測定し、データベースと照合して解析する」

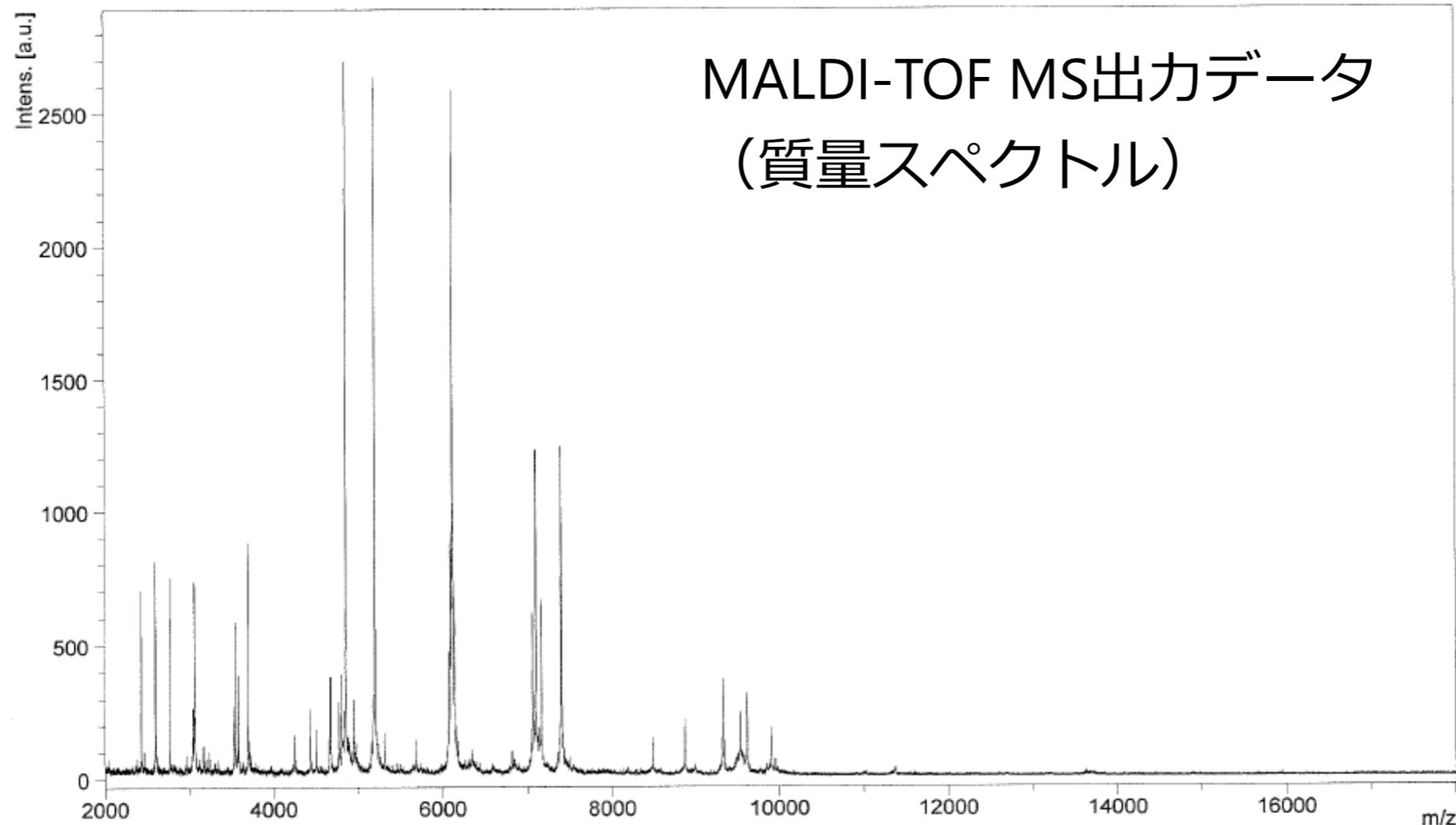
プロテオーム (*Proteome*) とは、ある生物学的な系において存在しているタンパク質の総体で、タンパク質を意味する Protein と「全体」を意味する -ome から作られた言葉です。

MALDI法は田中耕一氏が実現した高分子の微量同定を可能とした質量分析法で、ここでは特に微生物に含まれるメジャーなタンパク質のピークパターンをパターンマッチングすることで、微生物の同定を行います。



判定

微生物固有のタンパク質パターンをライブラリのパターンとマッチングすることで同定します



マッチング解析の結果は評価値で示される

評価値

2.00~3.00	信頼性が高い同定結果
1.70~1.99	信頼性が低い同定結果
0.00~1.69	同定不能

当社のMALDI-TOF MS 同定システム

ブルカー・コーポレーション製微生物同定システム

臨床検査を含めて国内の200施設で微生物同定装置として導入・使用されています

遺伝子同定法や生化学的性状による同定と比較して、格段に迅速に菌名が得られます

- 微生物を種レベルで同定
- 16S rRNAシーケンシングの結果と高い一致
- コロニから数分で同定



遺伝子型分析



遺伝子型分析

日本薬局方 参考情報 G4. 微生物関連
遺伝子解析による微生物の迅速同定法

検出された微生物（細菌及び真菌）を遺伝子解析法によって種又は属レベルで同定又は推定する手法

近年の分類学では、微生物の進化の歴史が記録されたリボソームRNAの記録をもとに、系統発生的に区分する方法が採用されている

特定の領域の遺伝子配列を解析し、データベースと照合することで微生物を同定する手法

判定

一般に、得られた塩基配列を***BLAST**を用いて、データベース上の塩基配列とを比較する。

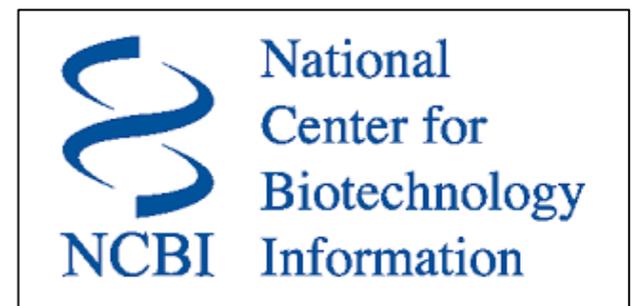
90%以上合致した場合、以下のように判定できる
「上位にランクされた菌種を被検菌と**同一種**または**近縁種**と判定する」

*BLAST (Basic Local Alignment Search Tool)

主なデータベース

NCBI (アメリカ) に属するGenBank

NIG (日本) に属するDDBJ



当社の遺伝子同定システム

Thermo Fisher SCIENTIFIC社製

微生物同定システム

医薬品製造分野において、世界各国で採用されている
グローバルスタンダードな製品

- 核酸抽出キット
- PCRキット/シーケンスキット
- 解析ソフトウェア
- MicroSEQライブラリ



操作のキット化とバリデートされた独自のライブラリ
を用いた同定が可能

当社の同定試験フロー



〇〇〇〇株式会社 御中

滋賀県甲賀市甲賀町鳥居野
株式会社 コーガアイソトープ



報告書例

MALDI 報告書例

MALDI同定の結果が同定
不能となった場合には、
お客さまのご要望により
遺伝子同定に移行します

質量分析法 (MALDI-TOF MS) を用いた微生物同定試験報告書

ご依頼いただきました微生物同定試験について、下記の通り試験結果を得ましたのでご報告いたします。
記

申込年月日	2021年月日
貴注文番号	-
試料名	AAAAA
測定年月日	2021年月日
使用機器	BrukerDaltonics社製 microflex LT/SH smart MALDI Biotyper
使用データベース	V9.0.0.0_7854-8468

MALDI Biotyperによる測定結果

菌名	評価値	NCBI Identifier
<i>Bacillus halosaccharovorans</i>	2.52	1386

高い相同性が得られた上位10菌種

菌名	評価値	NCBI Identifier
Bacillus halosaccharovorans CICC 23978 CICC	2.52	1386
Bacillus halosaccharovorans DSM 25387T DSM	2.28	1386
Brevibacillus laterosporus DSM 8787 DSM	1.43	1465
Lactobacillus plantarum DSM 2601 DSM	1.36	1590
Bacillus megaterium DSM 32T DSM	1.30	1404
Bacillus pumilus DSM 27T DSM	1.29	1408
Lactobacillus plantarum DSM 13273 DSM	1.28	1590
Pseudomonas marginalis DSM 13124T HAM	1.27	298
Falsibacillus pallidus DSM 25281T DSM	1.27	186817
Glutamicibacter arilaitensis DSM 16368T DSM	1.26	256701

評価値

2.00~3.00	信頼性が高い同定結果
1.70~1.99	信頼性が低い同定結果
0.00~1.69	同定不能

備考欄

<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/Taxonomy/Browser/wwwtax.cgi?mode=info&id=>

上記のURLの最後に、NCBI Identifier のナンバーを入れることで、菌の情報を調べることが出来ます。

本試験結果は、弊社装置及びデータベースを用いた結果であり、本結果の取り扱いにより生じる問題について、免責されるものといたします。

お問い合わせ先 株式会社コーガアイソトープ 滅菌研究センター

TEL : 0748-88-3121 E-mail : SRC@koga-isotope.co.jp



遺伝子 報告書例

遺伝子同定の結果が同定不能となった場合には、**GenBank※のデータベース**を用いた解析を実施し、別紙として報告します。殆どの場合はこれで同定結果が得られます。

※米国NCBI (National Center for Biotechnology Information) が運営するDNAデータベース。欧州、日本の各DNAデータベースとコラボした世界最大の国際塩基配列データベースを構成する。

報告書番号： VM 210XXX
2021年 月 日

〇〇〇〇株式会社 御中

滋賀県甲賀市甲賀町鳥居野上1-2-1
株式会社 コーガアイソトープ



報告書例

遺伝子の塩基配列を用いた微生物同定試験報告書

ご依頼いただきました微生物同定試験について、下記の通り試験結果を得ましたのでご報告いたします。
記

申込年月日 2021年 月 日
貴注文番号 YYYYY
試料名 AAAAA
測定年月日 2021年 月 日
使用機器 Thermo Fisher SCIENTIFIC 社 製 SeqStudio Genetic Analyzer
使用データベース MicroSEQ ID AB_Bacterial500Lib_2013及びSupplemental_Library_v1

高い相同性 (% Match) が得られた上位10菌種

菌名	% Match
Bacillus idriensis (NCBI=FR682742)	100.00
Bacillus pumilus (ATCC=7061)	97.65
Bacillus safensis (DSM=19292)	97.65
Bacillus altitudinis (DSM=21631)	97.18
Bacillus aerophilus (^NCBI=AJ831844)	97.18
Bacillus cibi (DSM=16189)	95.96
Bacillus indicus (^NCBI=AJ583158)	95.96
Salirhabdus euzeybyi (^NCBI=AM292417)	95.08
Bacillus benzoevorans (DSM=5391)	94.62
Bacillus circulans (ATCC=4513)	94.21

% Matchの評価

99.00%以上かつ2位との差が0.20%以上	表示菌と属、種が一致している
97.00%以上	表示菌と属が一致している
97%未満	同定不能

備考欄

本試験結果は、弊社装置及びデータベースを用いた結果であり、本結果の取り扱いにより生じる問題について、免責されるものといたします。

お問い合わせ先 株式会社コーガアイソトープ 滅菌研究センター

TEL : 0748-88-3121 E-mail : SRC@koga-isotope.co.jp

R5.1.1-3-7-1 (19-03)



同定菌の参考情報 例

同定報告書速報と同時に
弊社のデータベースに記載のある菌については、
以下の情報を参考として
送付いたします。

- 菌の情報
- 菌名の日本読み
- 放射線抵抗性 (D 値)
- BSL (日本細菌学会のバイオ
セーフティレベル)

同定菌の参考情報

<p><i>Acinetobacter baylyi</i> (アシネトバクター・バイリイ) D値：— kGy , BSL分類：記載なし 大きさ1.0~1.5×1.5~2.5μmの球桿菌で、発育に酸素を必要とし、運動性はない。カタラーゼ試験陽性、オキシダーゼ試験陰性で、ブドウ糖非発酵型のグラム陰性菌である。</p>
<p><i>Staphylococcus epidermidis</i> (スタフィロкокカス・エピデルミディス) D値：— kGy , BSL分類：BSL1* グラム陽性の球菌でコアグラールゼ陰性のブドウ球菌である。人間の皮膚表面、鼻腔などの最も普遍的な常在菌であり、表皮ブドウ球菌と言われる。通常は非病原性であり、他の病原菌から表皮を守るバリアとしての役割が知られるが、体内に侵入すると病原性を発することもある。酸素のあるところでも酸素のないところでも増殖できる通性嫌気性菌である。比較的乾燥に強い菌である。空中浮遊菌としても検出される。</p>
<p><i>Stenotrophomonas maltophilia</i> (ステノトロホモナス・マルトフィリア) D値：— kGy , BSL分類：BSL1* 本菌は、土壌、水、植物などのさまざまな環境で見られる好気性のグラム陰性菌でブドウ糖非発酵型でもある。鞭毛を有するため運動性がある。また、病院環境でも発生し、血流感染症、呼吸器感染症、尿路感染症、手術部位感染症を引き起こす可能性がある。細胞の大きさは、幅1.5μmで長さ1.5~2.5μmである。一般的な栄養寒天培地でのコロニーの色調は、淡い黄色である。カタラーゼ及びオキシダーゼ試験は陽性である。生育温度は20~42℃で、最適温度は30~35℃である。pHは5~9で最適pHは6~7である。</p>
<p><i>Bacillus horneckiae</i> (バチルス・ホルネキアエ) D値：— kGy , BSL分類：記載なし 本菌はケネディ宇宙センターのクリーンルームより分離された<i>Bacillus</i>属の芽胞形成菌である。好気性のグラム陽性桿菌(幅が1~1.5μm、長さが4~6μm)で、運動性がある。細胞の末端に横円形の芽胞を形成する。生育温度は5~40℃で、最適温度は30℃であり、pHは7~10で、最適pHは7であった。NaCl塩濃度は10%の存在下でも生育できた。ソイビーンカゼインダイジェスト寒天培地で32℃で24時間培養後のコロニーは、黄色がかった無地で、直径は3mmで、コロニーの縁は不規則な形であった。芽胞は紫外線に対して抵抗性であった。芽胞は熱、紫外線、放射線、化学薬品に対して抵抗性を示す。</p>
<p><i>Bacillus horikoshii</i> (バチルス・ホリコシイ) D値：— kGy , BSL分類：記載なし 本菌は、土壌より分離された好アルカリ性菌で、<i>Bacillus</i>属の芽胞形成菌である。好気性の桿菌(幅が2~0.7μm、長さが0.7~4μm)でグラム陽性菌である。細胞の準末端に横円形の芽胞を形成する。芽胞形成期細胞は幾分膨化する。生育温度は10~40℃であり、pHは7~8で、最適pHは8であった。NaCl塩濃度は2~9%の存在下で生育できた。コロニーは小さい円形で、縁全体が光沢のある表面で、色調は光沢のある白色である。芽胞は熱、紫外線、放射線、化学薬品に対して抵抗性を示す。</p>

無断で本資料の一部を複製して使用しないでください。
BSL分類は「BSL1*」以上の菌種を記載しています。「BSL1*」は日和見病原体を意味します。
本資料は、当社の知見、WEB資料、保有する文献・データを参考に作成しています。
本資料の取り扱いにより生じた不利益については、当社は責任を負いません。
参考資料としてご利用ください。



まとめ

MALDIは非常に迅速（サンプル到着のその日中に速報を提出）に結果が得られ、遺伝子同定よりも格安である上、遺伝子同定に遜色ない信頼性をもちます。

一方、MALDIで同定結果が得られない場合は、当社ではそのまま遺伝子同定を実施可能です。

遺伝子同定は、特急で3日以内に速報を提出いたします。

本セミナー聴講者様に限り、同定試験初回限定無料サービスを実施いたします。

