

## 科学研究費助成事業（学術研究助成基金助成金）研究成果報告書

平成25年04月25日現在

機関番号：17102

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2011～2012

課題番号：23659331

研究課題名（和文） 核酸分解可能な気相滅菌技術の開発

研究課題名（英文） Development of gas phase sterilization technology for nucleolytic degradation

## 研究代表者

岡崎 利彦 (OKAZAKI TOSHIHIKO)

九州大学病院・ARO 次世代医療センター・特任准教授

研究者番号：90529968

## 研究成果の概要（和文）：

我々は新たに開発したガス発生装置を応用し滅菌器機としての効能が期待される自己触媒反応型滅菌ガス発生装置の吸排気系改良を行い、より安定した庫内ガス濃度発生(ガス濃度のモニター)を行うことが可能となり、小型ガス滅菌評価機器(Biovector® (整理番号 12T13SX01)として商標登録を行った)並びに小型チャンバー実験環境を整備した。(特許出願済み;特願2012-062880) この試験環境のなか、指標菌ならびに核酸分子(DNA,RNA)に対する滅菌・分解能の効能評価を行った。37~50°C、60分間の暴露時間では全ての対象菌に於いて $10^6$ の菌量で完全な無菌化が認められた。Bioanalyzerを用いた核酸分解能評価においても dsDNA 並びに ssDNA に対し、湿性、乾性のどちらの条件下においても30分の暴露時間で10bp以下の完全分解効果が確認された。この核酸分解能は、温度依存性であることも明らかになった(50>45>37°C)。real time-PCR法を用いた検討では、RNA, ssDNAともに37°C、15分の暴露時間にて完全分解効果が確認できた。マイコプラズマ菌に対しても一定の有効性が確認出来た。以上のことから本研究期間に於いて、新規ガス滅菌技術により従来では達成できなかった核酸分解能を有する滅菌器機の応用が可能となったことから、今後腐食性・残留性を含めた生物学的安全性評価を行い医療機器への応用を検討する。

## 研究成果の概要（英文）：

We have improved air intake and exhaust system of gas generating apparatus equipped with autocatalytic reaction components, resulting in capable of generating stable concentration of sterilization gas in a warehouse (also capable of monitoring gas concentration), and developing down-sizing system of apparatus, and also developing small chamber system for evaluating each experimental parameters. (Patent application number: 2012-062880, registered as a trademark as Biovector®: reference number 12T13SX01) By use of this small chamber of sterilization system, we have evaluated the effect of sterilization of biological indicators and resolution of nucleic acid molecules (DNA, RNA). By the sterilization gas exposure for 60 minutes under the temperature of 37 to 50 °C, the complete eradication effect in all the objective bacilli applied in the amount of bacilli of  $10^6$  has been achieved. Also in the evaluation of nucleolytic degradation ability using Bioanalyzer, the complete degradation effect in both of double strand DNA (dsDNA) and single strand DNA (ssDNA) into 10 or less

base pairs was elucidated by the time of exposure for 30 minutes of sterilization gas under the condition of both of moist and dry. It also revealed that nucleolytic degradation ability of Biovector® is temperature dependent (50>45>37 °C).

In the examination using the real time-PCR method, the complete degradation effect in both of RNA and ssDNA have been achieved by the time of exposure for 15 minutes of sterilization gas. In evaluation by the mycoplasma bacillus, certain validity also has been show, and still need to be elucidated. Taken together, in this study, newly developed gaseous sterilization system revealed its nucleolytic degradation ability, which could not be attained in the conventional method. For the next step, we endeavor to develop this innovative sterilization technology into the application to medical device by way of biosafety evaluation including corrosiveness and persistence as well as biological toxicity.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
交付決定額	2,900,000	870,000	3,770,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：社会医学・衛生学

キーワード：産業衛生

#### 1. 研究開始当初の背景

九州大学病院は平成20年12月より文部科学省「橋渡し研究(TR)支援推進プログラム:革新的バイオ医薬医工学の医療技術開発拠点」として活動中であり、最先端医療分野で国内をリードする大型研究プロジェクトを展開し産学連携による共同研究においても多くの実績をあげてきている。特に再生医療や遺伝子治療に用いる治験薬製造において、自施設内にGMP準拠の分子・細胞調整センター(KU-MCPC)(総面積400m<sup>2</sup>、細胞調整ユニット2室、遺伝子ベクター調整ユニット1室、アイソレーターユニット1室、細胞保存室、他)を有している。さらに大学施設では国内でも類を見ない品質試験を独立して行うグレード10,000の無菌検査室を有している。これによりGMP準拠治験薬の製造から品質検査迄を自施設内で一貫して行える運営体制に取り組んできた。しかし、定期清掃をはじめとする無菌室の滅菌管理は容易ではなく、特にマイコプラズマの滅菌ならびにウイルスベクターの除染に関しては、未だ決め手となる方法が見つからない。また無菌室細胞培養行程で必要とされる精密機器類に対する滅菌対策も急務である。特に治験薬開発の段階においては様々な精密機器の使用を伴い、その滅菌、

除染は従来法においては腐食や浸透性また莫大な運営コストの点を含めて様々な問題がありその解決が急務である。

#### 2. 研究の目的

再生医療ならびに遺伝子治療の開発が次世代の新規治療戦略として世界的に大きな潮流となっている。それにより安全な細胞製剤技術、いわゆるGMP(Good Manufacturing Practice)レベル細胞製剤の需要が臨床領域に広く根付きつつあり、無菌的製造施設の環境整備の充実が急務となってきた。しかし従来法においてはその腐食性、残留性、有効性の点で人体および環境、精密機器への悪影響の問題が残り、無菌室における有効な滅菌方法が開発されておらず、マイコプラズマ菌に対しては効能および利便性において決め手となる滅菌・殺菌方法が未だ見出せていない。さらにウイルスベクターを用いた遺伝子治療治験薬の製造開発が加速する中で、無菌室での気相式滅菌方法で核酸を残留性なく、効果的に分解する方法はこれまでに報告されていない。本研究は、我々がこれまで開発に取り組んできたメタノールを原料としたラジカルガス滅菌システムによるマイコプラズマ菌の滅菌効果ならびに核酸の除染効果についての検証を行うことを目的とする。

### 3. 研究の方法

ラジカルガス発生滅菌システムを組み込んだ小型ブース型の試験環境を整備する。さらに温度・湿度などのパラメーター設定により効能評価を計画する。試験対象となる滅菌対象菌としては一般細菌:B. Subtilis (過酸化水素耐性菌), B. atrophaeus (EOG 滅菌指標菌), Geobacillus stearothermophilus, Cheatomium cladosporioides, を、またマイコプラズマ:M. Orale (ATCC 23714)を用い、核酸物として二本鎖 DNA (dsDNA: genomic DNA, PCR product), 一本鎖 DNA (ssDNA: complementary DNA), RNA (extracted from HeLa) を調整し、それぞれ 96-well プレート底に対象菌ならびに核酸を調整した[固相]および[液相]系を用いて、ラジカルガス発生装置により生成したメタノールラジカルガスを恒温槽をベースにした閉鎖空間チャンバー内でプレートに暴露させる。日本薬局方無菌試験に準拠、または Bioanalyze, PCR 法にて滅菌・分解能評価を温度および暴露時間のパラメーターによる条件を定めた効能を達成する条件検証を行い、再現性の確認を行う。

### 4. 研究成果

- (1) 図1に示す仕様で小型ガス滅菌評価機器並びに小型チャンバー実験環境を整備した。
  - (2) 指標菌を用いた滅菌効能評価では、図2に示されるように、60分間の暴露時間では全ての対象菌に於いて  $10^6$  の菌量で完全な無菌化が認められた。
  - (3) Bioanalyzer を用いた核酸分解能評価のいは dsDNA 並びに ssDNA 共に、湿性、乾性のどちらの条件下においても 600~30,000ng の核酸試料に対し 30 分の暴露時間で 10bp 以下の完全分解効果が確認された。この核酸分解能は、温度依存性であることも明らかになった ( $50 > 45 > 37^\circ\text{C}$ )。real time-PCR 法を用いた検討では、RNA, ssDNA とともに  $37^\circ\text{C}$ 、15 分の暴露時間にて完全分解効果が確認できた。
- (図3) マイコプラズマ菌を用いた本機の効能試験を real time-PCR 法による検討を行った結果、特異的増幅を認めず一定の有効性が確認されたが、反応阻害物質の存在・影響が示唆された。

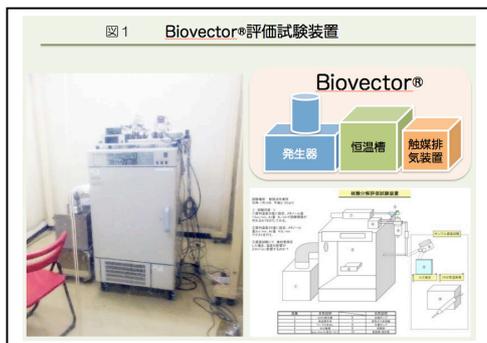
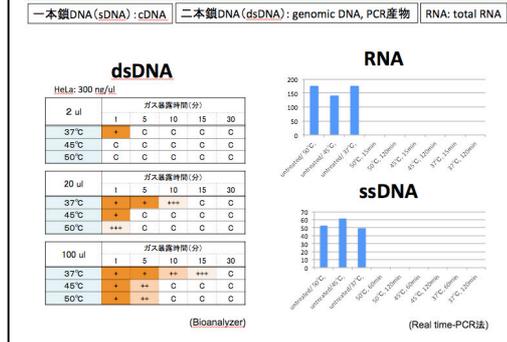


図2 指標菌を用いた滅菌効能評価

菌種	備考	菌数	殺菌時間
<i>Bacillus atrophaeus</i>	EtOG/乾熱滅菌用	$10^6$	15分以下
<i>B. subtilis</i> var <i>globigii</i>	過酸化水素耐性菌、枯草菌芽胞	$10^7$	60分以下
<i>Geobacillus stearothermophilus</i>	高温蒸気滅菌用、過酸化水素ガス滅菌用	$10^6$	25分以下
<i>Cheatomium globosum</i>	過酢酸耐性菌	$10^6$	60分以下
<i>Cladosporium cladosporioides</i>	酵母	$10^6$	60分以下

図3 Biovector®による核酸分解能



### 5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計4件)

1. Coxsackievirus B3 is an **oncolytic** virus with immunostimulatory properties that is active against lung adenocarcinoma. Miyamoto S, Inoue H, Nakamura T, Yamada M, Sakamoto C, Urata Y, Okazaki T, Marumoto T, Takahashi A, Takayama K, Nakanishi Y, Shimizu H, Tani K. Cancer Res. 2012 May 15;72(10):2609-21
2. Contribution of higher risk genes and European admixture to Crohn's disease in African Americans. Wang MH, Okazaki T, Kugathasan S, Cho JH, Isaacs KL, Lewis JD, Smoot DT, Valentine JF, Kader HA, Ford JG, Harris ML, Oliva-Hemker M, Cuffari C, Torbenson MS, Duerr RH, Silverberg MS, Rioux JD, Taylor KD, Nguyen GC, Wu Y, Datta LW, Hooker S, Dassopoulos T, Kittles RA, Kao LW, Brant SR. Inflamm Bowel Dis. 2012 Dec;18(12):2277-87
3. 6-Mercaptopurine transport in human lymphocytes: correlation with drug-induced cytotoxicity. Conklin LS, Cuffari C, Okazaki T, Miao Y, Saatian B, Chen TE, Tse M, Brant SR, Li X. J Dig Dis. 2012 Feb;13(2):82-93

4. Development of novel immune therapies for solid tumors: phase I clinical trials in a single institute. Hijikata Y, Murahashi-Iga M, Okazaki T, Tanaka Y, Odaira K, Okano S, Hisano T, Takahashi A, Marumoto T, Inoue H, **Tani K**. Rinsho Ketsueki. 2012 May;53(5):487-92

[学会発表] (計2件)

①講演:「細胞調製施設-運営・管理の課題と対策」岡崎利彦

文部科学省橋渡し研究加速ネットワークプログラム構築事業-細胞調製の基礎と最近の話題-(2013.03.21, 横浜)

②講演:「新規気相式核酸分解・滅菌装置を用いた災害現場に於ける衛生環境形成への応用」岡崎利彦

生体医工学研究会・東日本大震災に対する復興支援研究会・未来のバイオメディカルデザイン研究会・次世代内視鏡研究会 (2012.12.12, 横浜)

[図書] (計0件)

[産業財産権]

○出願状況 (計 1件)

名称:核酸分解処理装置

発明者:岡崎利彦, 鈴木康士, 川又克彦, 飯尾元治, 高田和匡

権利者:同上

種類:特許

番号:特願 2012-062880

出願年月日:平成 24 年 03 月 19 日

国内外の別:国内

○取得状況 (計 0件)

名称:

発明者:

権利者:

種類:

番号:

取得年月日:

国内外の別:

[その他]

Biovector® (整理番号 12T13SX01)として商標登録

## 6. 研究組織

### (1)研究代表者

岡崎 利彦 (OKAZAKI TOSHIHIKO)

九州大学病院・ARO 次世代医療センター・特任准教授

研究者番号:90529968

(2)研究分担者 ( )

研究者番号:

(3)連携研究者 ( )

研究者番号: