

(様式11)

論文審査の要旨（課程博士）

生物システム応用科学府長 殿

審査委員 主査 田中 剛 ⑩

副査 田中秀幸 ⑩

副査 田中あかね ⑩

副査 竹山春子 ⑩

副査 吉野知子 ⑩

学位申請者	平成_23_年度入学 学籍番号 <u>11702103</u> 氏名 五明 秀之
申請学位	博士 (生命科学)
論文題目	化粧品の Good manufacturing practice (GMP) に向けた微生物センサの開発

論文審査要旨 (2,000 字程度)

化粧品の生産において、品質の高い製品をつくり出すために、化粧品 GMP (Good Manufacturing Practices、製造管理・品質管理の基準) が各メーカーにて実施されている。GMP の中でも微生物制御は最も重要な項目であり、①混入微生物の検出、②検出された場合、混入微生物の種判別、更には③混入微生物に有効な抗菌剤の選出・適切な使用量の決定、といった衛生管理が徹底して行われている。しかし、これら 3 項目に対して実施される微生物試験は、いずれも培養を要するため数日の時間がかかり、しかも操作が煩雑という課題をかかえていた。本論文では、化粧品 GMP を遂行する上で必要となる微生物試験において、前出の 3 項目に着目し、これらの微生物試験の代替となる簡便で迅速な試験法を開発することを目的とした。具体的には①混入微生物の高感度検出技術 (第 3 章)、②検出された場合、混入微生物の種を判別する技術 (第 4 章)、③防腐材・抗菌剤の抗菌活性を迅速に評価する技術 (第 2 章) の開発に取り組んだ。本論文の研究により得られた成果を各章ごとにまとめる。

第 2 章では、微生物センサを利用して、電気化学的手法により防腐剤の抗菌性を評価する手法を確立し、従来の培養法により決定した最小発育阻止濃度 (Minimum Inhibitory Concentration、MIC) との相関性について評価した。化粧品への混入を検査する特定微生物である *Candida albicans* または *Staphylococcus aureus* を固定化し、これらの微生物の呼吸活性を酸素電極で測定するセンサを構築した。この微生物センサを呼吸阻害剤である KCN 溶液に浸漬したところ、電流値の上昇が確認された。これは KCN により微生物呼吸が阻害され、酸素消費が減少したため、酸素電極に到達する酸素が増加したためであると考えられ、原理どおりセンサが作動することを確認した。次いで、実際に代表的な 3 種の防腐剤に対し菌体の呼吸活性の評価を行い、寒天平板希釈法による MIC との比較を行ったところ、Methylparaben は終濃度: 0.75~2.5 mg/mL、2-Phenoxyethanol は終濃度: 2.5~10 mg/mL、Chlorphenesin は終濃度: 0.75~3 mg/mL の範囲で防腐剤溶液濃度に依存した電流値の増加が確認された。従来法により決定された MIC が測定可能範囲内であったことから、本センサを用いて、MIC 付近の濃度の防腐剤の抗菌活性を測定できることが示唆された。さらに、微細加工流路と組み合わせたフロー式オンチップ型微生物センサを構築し、複数の防腐剤サンプルに対する電流値変化を連続的に測定できることを示した。さらに実際の化粧品サンプル中においても測定を行うことができた。このことから、抗菌活性試験の大幅な迅速化・ハイスループット化が可能であることが示唆された。

第3章では、化粧品からの微量な微生物 DNA 回収・検出を可能とすることを目的に、Convergent 法による簡便なアミンデンドリマー修飾磁性ナノ粒子作製法の確立と、それを用いた微生物 DNA 回収方法の検討を行った。アミノシランカップリング剤である AEEA を修飾した磁性ナノ粒子をコアとして、架橋剤を用いてデンドロンを粒子上に修飾することにより、短時間でアミンデンドリマー修飾磁性ナノ粒子 (d-MNPs) を作製した。次いで、作成した d-MNPs を用いた DNA 回収方法、および dNTP を用いた DNA の粒子からの脱離方法を検討することで、 10^2 cells レベルの微生物からの DNA 回収及び PCR による遺伝子増幅統合プロセスの構築に成功した従来、化粧品工場での微生物試験で PCR 法や LAMP 法を用いる場合、前培養時間に 2 日間程度を要していたところを、前培養を要さず、微量 DNA を濃縮して PCR を行う本法では大幅に迅速化できることが示唆された。

第4章では、化粧品製造工程における微生物試験を大幅に簡便、迅速化することを目的として、オンチップ型 DNA マイクロアレイを用いた化粧品工場の汚染細菌の菌種判定技術の開発を行った。化粧品工場から分離された 12 株の細菌に対し 16S rDNA のシーケンス及びマルチプルアラインメントを行い、12 株の内 8 菌種が識別可能な菌種特異的配列が得られた。次に、菌種特異的配列に相補の DNA プローブを設計し、DNA マイクロアレイを作製した。菌種特異的部位の増幅用 PCR プライマーを設計し、DNA プローブの特異性評価を行った。その結果、8 菌種全ての検出プローブにおいて特異的な蛍光が確認された。さらにオンチップ型 DNA マイクロアレイを用いて生菌からの全自動検出試験を行ったところ、対象 8 菌種のうちの KK1 株 1×10^7 cells/mL からの特異的なマイクロアレイ検出が可能であることが示唆された。また、第3章で構築した DNA 濃縮方法を組み合わせることで検出限界を向上させることにも成功した。

以上のように、化粧品製造における微生物制御のために重要な、微生物検出・菌種判定・抗菌剤活性評価を、前培養を行うことなく達成することのできるセンシング技術の開発に成功した。化粧品工場の GMP 活動の中で行われるこれらの試験を迅速化することで、市場での微生物クレーム発生の可能性を、早期に予見できる。これは、品質保証面の向上に有効であり、微生物汚染対策を遅延することなく適時適切に実施することが可能になると期待される。また、汚染菌の菌種同定も迅速、簡便化することで微生物汚染の原因解明だけでなく、それ以降の生産品での微生物汚染の拡散防止にも貢献することが期待できる。これらのことから、本研究の工学的な意義も大きい。そのため、博士論文最終試験の審査基準を満たし、合格と判断した。