

表 3 TSE 病原体汚染除去に関する推奨方法

方法	適用
<p>1. オートクレーブ処理</p> <p>Gravity displacement 型または porous load 型オートクレーブ*を使用する。温度は 134℃ (134℃/30 psi または 203 kPa) に設定する。同温度での保持時間は少なくとも 18 分間の 1 回のサイクル、または 6 回に分けた 3 分間ずつのサイクルでなければならない。処理しようとする器具などを装置に導入する際は、蒸気が汚染された表面すべてに触れるように配慮する。</p>	<p>本法は、この温度/圧力でのオートクレーブ処理に耐えられる全ての器具に対して適用できる。破損などの問題が起こり得る場合は他の方法を考慮しなければならない。</p> <p>*gravity displacement 型オートクレーブは porous load 型オートクレーブより効果が低いと言われている。</p> <p>同温度での保持時間を少なくとも 1 時間にするか、またはオートクレーブ処理前に 3%ドデシル硫酸ナトリウム (SDS) 溶液に浸すよう推奨しているものもある。</p>

<p>2. 1M 水酸化ナトリウム溶液処理</p> <p><u>器具:</u> 器具を 1M NaOH (40g-NaOH/L) に室温で少なくとも 1 時間浸す。この際、器具を溶液中に完全に沈めることに留意する。余分な組織/血液を取り除くため、器具を NaOH 溶液中で物理的にこする。また、器具を洗浄するために用いた全てのものについて、十分に汚染除去を施したか確認する。</p> <p><u>表面:</u> 表面を NaOH 溶液で浸し、少なくとも 1 時間放置する。液体を吸い取る際は紙タオルを用いる。使用済みの紙タオルは直接プラスチック容器に入れ、安全に密封し、焼却または他の適切な処理方法で処分する。</p> <p><u>臨床標本 (例えば CSF) および液体の廃棄物:</u> 最終濃度が 1M になるように十分な水酸化ナトリウムペレットと混合する。</p>	<p>本法は方法 1 で規定されたオートクレーブ処理を適応できない器具に適している。</p> <p>注: アルミニウムなど、腐食するため、適さない器具がいくつかある。</p> <p>NaOH は溶解時に発熱する。眼および粘膜との接触を避ける。</p> <p>汚染された表面 (例: 血液や CSF が飛散した床やベンチ) の洗浄のために、1-2M NaOH が使用される。</p>
--	--

<p>3. 次亜塩素酸ナトリウム処理</p> <p>有効塩素濃度が少なくとも 20,000ppm の濃度の次亜塩素酸溶液を新たに調製する（または同濃度に調製された市販製品を使用直前に開封する）。器具または表面を少なくとも同溶液に1時間浸した後、紙タオルで表面を拭き上げる、使用済みの紙タオルは上述の方法に従って焼却処分する。</p> <p>臨床標本（例えば CSF）及び液体の廃棄物は未希釈の次亜塩素酸ナトリウム溶液を、少なくとも5倍量混合する。</p>	<p>本法は廃棄前の器具および幾つかの臨床試料の処理に適している。</p> <p>本法は、腐食が起こった表面に用いた場合、1-2M NaOH 処理より効果が少ない。</p> <p>金属の中には、本法を繰り返し使用すると腐食を起こすものがある。</p>
<p>4. ギ酸処理</p> <p>96%ギ酸処理は組織病理学分野において特に有用である。組織の小塊を4%ホルムアルデヒド溶液で固定した後、フェノールに曝していない限り、ギ酸溶液(>96%)に1時間浸す。この場合、汚染除去していない組織と同様に取り扱う必要がある。次いで、組織の小塊を少なくとも1時間ホルマリンに浸した後、アルコール溶液に移す。</p> <p>以前に汚染除去していない組織塊からのパラフィン切片は、脱ロウ後、96%ギ酸溶液に5分間浸さなければならない。</p>	<p>組織学／病理学研究室に適している。他の通常用いられる固定液は、感染性を不活化しない。従って、切片作成の間、研究室の職員に対する危険性がある。</p> <p>注： ギ酸は皮膚、眼等に接触した場合危険である。</p>
<p>5. 焼却処理*</p> <p>汚染物を直ちに適当な容器、例えば、国際的なバイオハザードマークまたは「医療廃棄物」というラベルを付けた感染性廃棄物用袋に入れ、通常感染性廃棄物処理の手順に従い、できるだけ早く焼却する。</p> <p>針、刃およびその他の鋭利なものは、焼却の前に容器に入れなければならない。</p>	<p>病院などにおいて発生する以下のような廃棄物処理に適している；スワブ、創傷包帯、針、カテーテルチューブ、外科的／その他の処置により発生した Disposable 型器具。</p> <p>汚染された器官および組織切片の処理にも適している。</p>
<p>6. 洗浄方法の組み合わせ</p> <p>上述の方法に従い、NaOH 溶液で洗浄後、NaOH 溶液に浸し、次いでオートクレーブ処理する。</p>	<p>CJD の危険性がある非神経学的組織で汚染された器具の洗浄に適している。幾つかの施設では、神経学的組</p>

	織に汚染された器具の洗浄に対して選択されることがあるが、焼却できない場合に限る。
7. NaOH 中での煮沸	上述のとおり

より処理しなければならない。血液や体液が用具上で乾燥し、除去が困難になることを防ぐため、用具は使用後できるだけ早く洗浄する。また、使用済みの用具は、洗浄前に殺菌剤に浸けてはならない。洗浄およびその後の器具や装置の処理を行うスタッフは、感染性物質への暴露を避けるため、標準の基本的な予防措置をとらなければならない（例えば、手袋やエプロンの着用）。

3) 洗浄装置の汚染除去

器具の処理の後、超音波槽および自動洗浄機／殺菌機は空運転しなければならない。固形の廃棄物／組織はいかなるものでも焼却処分する。自動洗浄機および超音波槽からの液体廃棄物は、回収後、不活化し、安全に処理しなければならない。ブラシのような洗浄用補助器具を使用した場合、それらの器具は焼却処分する。

4) オートクレーブ

洗浄後、用具は、porous load 型の高圧蒸気滅菌器で、以下のサイクルの一つを用いて処理する。ここに規定した条件以外の処理サイクルは推奨されない。また、Downward 或いは upward displacement オートクレーブは使用しないよう推奨されている。滅菌装置は性能を確認し、日常的に検査する。

- ・ 134-137℃の一回サイクルで最低の保持時間が 18 分間
- ・ 134-137℃の六回連続するサイクルで、毎回の最低の保持時間が 3 分間。

オートクレーブ処理では TSE 病原体を完全には不活化できない可能性があるが、汚染レベルの実質的な減少には十分であると考えられる。すなわち、伝達可能な病原体自体やそれを含んでいる可能性がある体液や組織の大部分を除去するための二段階の洗浄工程と、その後のオートクレーブ処理により、汚染レベルは十分減少するものと思われる。また、最近の研究では、オートクレーブ処理と化学薬品処理を組み合わせた汚染除去法が効果的であると示唆されている。

5) 液体化学薬品による器具の処理

器具がオートクレーブ処理に対して耐久性がない場合、液体化学薬品処理を考慮

する。TSE 病原体に対して最も有効であると確認されている化学薬品および接触時間は以下のとおりである。但し、ここで規定した濃度および接触時間での化学薬品処理は、臨床器具および装置に有害な影響を及ぼす可能性があるため、用具がこれらの侵食性の処理に耐久性を持つことを事前に確認しなければならない。

- ・有効塩素濃度 20,000ppm の次亜塩素酸ナトリウムで 1 時間
- ・ 2M 水酸化ナトリウムで 1 時間

有効塩素濃度 10,000ppm の次亜塩素酸は TSE 病原体の不活化には無効である。また、ジクロロイソシアヌル酸ナトリウムも効果がないことが確認されている。

6) 表面の汚染除去および流出・飛散の管理

表面の汚染除去には上記の化学薬品を使用する。汚染除去のためにこれらの化学薬品を使用する場合、処理の間、汚染除去しようとする表面を化学薬品で繰り返し湿らせることが必要である。この際、使用される次亜塩素酸ナトリウムの濃度は、通常用いられている幾つかの表面仕上剤に対して侵食性を示す可能性があるため、感染性物質を取り扱う作業は、耐薬品加工処理を施した作業台、またはビニールで裏打ちした吸着性のディスプレイカバーで覆った作業台で行う。汚染を最小限にするために、ほうろう製、熱安定性プラスチック製またはディスプレイトレイを使用することが推奨されている。使用后、これらはオートクレーブ処理を施す必要があり、また、ディスプレイカバー用具は焼却しなければならない。微量の流出・飛散に対しても汚染された表面を上述のように処理する。多量の液体の流出に対しては流出物を回収するため吸着性物質を使用する。汚染された表面は同様に処理しなければならない。発生した全ての廃棄物は医療廃棄物として焼却処分する。

7) 試料の不活化

組織学的検査に用いた全ての組織は、フェノールに曝されていない限り、日常的な固定の後、96%ギ酸に 1 時間浸さなければならない。試料がフェノールに曝されていた場合は、その後にギ酸処理を施しても安全であるとは見なされない。従って、そのような試料は汚染除去されていない組織として取り扱わなければならない。汚染除去されていない組織塊からのパラフィン切片は、脱ろう後、96%ギ酸に 5 分間浸さなければならない。また、臨床試料、例えば CSF などは、焼却により最終処分する前に、オートクレーブ処理を施すか、遊離塩素濃度 20,000ppm の次亜塩素酸ナトリウム溶液に 1 時間浸さなければならない。

8) 安全キャビネットの汚染除去

TSE 病原体を扱う作業のために使用される安全キャビネットは、その汚染除去の困難さから、HEPA フィルター一式を一括除去できるタイプのを推奨する。他の感染性病原体を除去するため、キャビネット内をガス状ホルムアルデヒドで薫蒸後（但し、TSE 病原体には無効）、フィルターを取り外す前にヘアスプレー類を噴霧すると粒子物が落脱するのを制限することができると思われる。メインの HEPA フィルターが作業表面の直下に接する型式の安全キャビネットでは、フィルターを取り外す前にフィルター表面を密封するため液体ラテックスを使用するとよい。プレフィルターは通常容易に取り外せ、埃の拡散を抑制するため上記の化学薬品処理を行った後、焼却またはオートクレーブ処理を行うまでの安全な運搬を確保するため厳重に密封する。キャビネット内の作業表面上の汚染を最小限にするため、浅いトレイやビニールで裏打ちされた使い捨ての吸着紙を使用するとよい。カバーは定期的に張り替え、使用済みの吸着紙は焼却しなければならない。

9) 廃棄物処理

医療廃棄物として分類される全ての物質は、正式に認可された施設において焼却処分しなければならない。医療廃棄物の安全な取り扱いのため、安全な漏出防止容器、例えば二重袋などを用いる。また、容器の外部の汚染を避けなければならない。

(4) アンケート調査結果

日本の医療施設におけるプリオン汚染物（TSE 廃棄物）の取り扱い状況を把握するため、主な医療施設（大学病院 116 施設・中核病院 223 施設・中規模病院 200 施設：総計 539 施設）を対象としたアンケート調査を実施し、139 施設から有効回答を得ることができた（有効回答率：25.8%）。アンケート調査結果の詳細は平成 11 年度研究報告書資料編「新課題医療廃棄物についてのアンケート」・「Ⅲ. 異常プリオン蛋白汚染廃棄物処理に関するアンケート結果」の項を参照して頂きたい。

4. おわりに

現在のところ、多くの疫学的証拠から、TSE 患者との通常の社会的若しくは臨床的接触は、保健医療作業員、親類および地域社会に対する危険性を示さないことが示唆されている。それ故、TSE を保有する患者の隔離は必要でないと思われ、通例の病室内での看護が可能であり、他の全ての患者に対して用いられている日常的な感染制御以上の特別な予防処置は取らなくて良いとされている。注射による投薬および血液の採取は、日常的に使用される予防処置を取ればよく、鋭利なものによる損傷やその他の種類の非経口的な曝露を避け、鋭利なものや汚染された廃棄物を

焼却により安全に処理する。使用済み、または体液や排泄物で汚れたベッドリネンは、ベッドから取り外し、通常の方法により洗濯・乾燥してもよく、取扱や処理加工に関する追加要件は必要ないとされている。しかし、高リスク組織である脳、脊髄（脊髄液を含む）、眼に対して侵入性の処置を行う場合は TSE 病原体に曝露される恐れがあるため、適切な制御手段を取る必要がある。また、TSE 患者が出産した場合、出産により発生した廃棄物も TSE 病原体に感染していると思われ、適切に処理する必要があるとされている。

TSE 患者群は、その危険性のレベルから、1) TSE 患者、2) 疑わしい患者、3) 危険性がある患者の 3 群に分類されている。TSE 患者とは TSE 疾患であることが確定した患者を意味し、疑わしい患者とは、TSE を保有する疑いがある患者であり、臨床症状では TSE の疑いがあるが、診断が確定していない患者を意味する。危険性がある患者とは、TSE を保有している可能性がある明らかに健康な人を意味し、ヒト下垂体由来ホルモン剤のレシピエント、不正ルートにより入手したヒト硬膜を移植したレシピエント、TSE を保有する家族の一員などがこれに該当する。WHO のガイダンス（ドラフト）や英国の海綿状脳症諮問委員会および危険病原体に関する諮問委員会が配布したガイダンスでは、基本的姿勢として、TSE 患者および疑わしい患者の診断・治療に使用した全ての器具、危険性がある患者の脳・脊髄・眼に使用した器具を適切な方法により廃棄処分するよう推奨している。但し、高価な器具に関しては、事例に応じて適切な洗浄および不活化処理を施した後、再利用出来るものとしている。これに対し、CDC の研究グループは、1) 脳神経外科器具を介した医原性 CJD は少数であること（1950 - 1977 年にかけて 6 名）、2) ここ 20 年の間、脳神経外科器具を介した医原性 CJD が発生していないこと（脳神経外科器具を介した医原性 CJD 患者の発症期間は 6 例とも 2 年以下）、3) 脳神経外科領域の技術進歩および器具の再加工（洗浄・不活化）技術の向上などから、安価な DISPOSABLE 器具は別として、TSE 患者の診断および治療に使用した高価な器具を含む様々な脳神経外科器具を全て廃棄する必要はないと提唱している。

TSE 患者の取扱や TSE 病原体の不活化方法に関しては、若干の相違があるものの、各種ガイダンスにおいて共通性が認められる。一方、上記のように使用済み器具の取扱に関しては、極度に安全性を重視したガイダンスと疫学的知見および脳神経外科領域における技術の進歩を根拠とした実務的なガイダンスが共存しているのが現状である。TSE 患者由来廃棄物に関しては、TSE 病原体の体内分布が明らかになりつつあり、血液を含めた多くの組織および体液の危険度も検討されていることから、これらの知見を利用して適切に処分すれば良いものと思われる。すなわち、脳、脊髄（脊髄液を含む）および眼を中心とした高リスク組織（病理標本を含む）の取扱には厳重な注意を要するが、血液を含む他の組織・体液・排泄物については、

他の患者由来の廃棄物と同様に取り扱いが良いものと考えられる。また、現在までに廃棄物に由来する TSE 患者の発症事例が一例も報告されていないことから、医療廃棄物処理分野においては現行以上の特別な処置を必要としないと言えるものと思われる。但し、現在のところ nvCJD に関しては不明な部分が多く、各種研究の進展に従って TSE 患者由来廃棄物や使用済み器具の取扱方法を変更する必要性が生じる可能性があることも事実である。

TSE 病原体および TSE 廃棄物は非常に強力なハザードであるが、それによりヒトへの感染が引き起こされるリスクは極めて低い。実際の医療現場と同様、医療廃棄物処理においても、潜在的な危険性に関する感情的な問題と実質的な危険性を明確に分ける必要がある。各種の公的なガイダンスに従った場合、高リスク廃棄物であっても焼却処理を施すのであれば現行と同じ方法により各種の TSE 廃棄物を取り扱って差し支えない。また、焼却が適用できない場合でも、適切な方法で洗浄および中間処理を行うことを除けば、通常の医療廃棄物を取り扱う以上の特別な処置は必要としない。

日本国内の各種病院における TSE 廃棄物の処理方法に関する調査の結果、発生した同廃棄物を医療施設内で中間処理することなく、直接、関連業者に処理を委託しているケースが多数見られた。日本における処理業者は、感染性廃棄物の処理方法として焼却の他にオートクレーブ処理（通常条件）、乾熱処理、高周波処理（検討中）などを採用している業者もあり、最終的に埋立処分する前に、必ずしも TSE 病原体を適正に不活化処理できるとは限らない。このように、医療施設内で中間処理が行われず、直接、関連業者に処理を委託する場合は、TSE 廃棄物を必ず焼却処理できるように配慮する必要がある。病院内で行われる中間処理については、1) TSE 病原体に対して効果のない方法により処理を行っている、2) 感染性が無いまたは極めて低いと思われる器具および患者由来廃棄物までも廃棄または特別な方法により処理しているケースがあるなど、改善されるべき幾つかの問題点があることも明らかになっている。回答が得られた各医療施設における TSE 疾患に対する認識、対策法、実際の対処方法のレベルは様々であった。これらの原因としては、1) 医療現場における TSE 疾患の理解不足、2) 統一されたガイダンスの欠如などが考えられる。アンケート調査結果の詳細およびコメントに関しては、平成 11 年度研究報告書資料編「新課題医療廃棄物についてのアンケート」・「Ⅲ. 異常プリオン蛋白汚染廃棄物処理に関するアンケート結果」の項を参照して頂きたい。また、表 3 に示した焼却以外の TSE 廃棄物の処理法は医療施設内で十分実施可能であるが（医療施設内における焼却処理は環境問題のため急速に減少している）、それらに勝る簡易な処理法または処理装置が開発された場合、積極的に代替えして行くことも重要であると思われる。昨年度、医療施設における簡易且つ安全な TSE 廃棄物処理システムを構

築する目的で処理装置の検索を行い、加圧型アルカリ加水分解装置（WR²）がその第一候補として挙げられた。現在、Institute for Animal Health（英国）の David Taylor 博士らのグループとの共同研究により、同装置の TSE 病原体に対する不活化効率を *in vitro* および *in vivo* 試験により検討する実験が進行中であり、その結果が期待される。

第 四 章

「PCR廃棄物の化学的分解法に関する研究」

分担研究者　：　保　科　定　頼

東京慈恵会医科大学医学部臨床検査医学教室

1 研究要旨

全国の医療機関に新課題医療廃棄物（PCR 廃棄物）に関するアンケート調査を行い、多種類の遺伝子を標的とした臨床検査や研究が行われていることが明らかになった。その結果、定期的に遺伝子操作で加工された DNA が廃棄され、その種類と量が概ね把握された。遺伝子操作産物の中でも DNA を増幅させたものはその物性が極めて安定な物質であり分解されにくいので大量に医療廃棄物中に存在することになる。この PCR 廃棄物に関しての意識調査ではその汚染が問題にされ、一部では生体への影響も意識されていた。しかし PCR 廃棄物の封じ込め方法が十分行われていないことが明らかとなった。

遺伝子増幅廃棄物は遺伝子増幅操作時に増幅 DNA、合成オリゴマー DNA、ペプチド核酸（PNA）など同じ塩基配列のものが多量に廃棄された場合、細胞内に取り込まれ問題となるもので、生体に対して閾値はみられないが有害作用が考えられるものをいう。このような DNA 汚染を防ぐ方法としては操作を無菌フード内で行い専用のマイクロピペットとフィルター付きのチップを用いることが必要である。また、次亜塩素酸ナトリウムによる拭き取りによって増幅 DNA を不活化することが可能であり、使用後は直ちに SD ボックスへ廃棄する必要があると示唆された。

実験室内汚染の調査は、2種の 16S リボソームユニバーサルプライマーを使用し細菌 DNA の存在を検出しバンドを確認した。塵埃、無機汚泥、有機汚泥、スミアテストを行いこれらの物質に含まれるポリメラーゼ阻害物質の除去に関する方法を確立した。

2 研究目的

日本の死因別死亡率の 87% は体細胞遺伝子を中心とする疾患となりそのうち感染症疾患は 13% になっている。それだけに多くの医科大学、総合病院で遺伝子診断に関する遺伝子操作を実施していると推定されている。また、遺伝子診断はすでに感染症に関しての日常検査項目として行う施設がある。これらの施設からは定期的に遺伝子操作で DNA が廃棄され、その種類と量に関して正確に把握されていない状況がある。その中で DNA を増幅させたものは、物性から分解されにくい状態で大量に医療廃棄物中に存在している。こうした点から PCR 廃棄物に関する実態調査と実験室内汚染について疫学的調査と実験研究を行う。

第1部 PCR 廃棄物の実態調査アンケート

1 序論

1999年の時点では87大学医学部、医科大学、66総合病院が遺伝子診断に関わる遺伝子操作を実施していると推定される。また、すでに感染症に関する結核菌、クラミジア、ウイルスの遺伝子診断は日常診療検査項目として行う施設があり、総合すると上記の施設では約380種類について遺伝子操作を行っていると思われる。今回119大学病院、201中規模病院、224総合病院に新課題医療廃棄物についてのアンケート（PCR 廃棄物処理）調査を行い（厚生科学研究 新課題医療廃棄物研究 平成10年度の分担研究）、45大学病院（37.8%）、54中規模病院（26.9%）、68総合病院（30.4%）から結果が回収されたので、これら医療 DNA 廃棄物の種類と量、廃棄方法について実態を報告する。

2 方法

設定病院

新課題医療廃棄物アンケートの配布先病院は全国の大学病院119カ所、総合病院224カ所、中規模病院201カ所のDNA診断が行われている施設を中心に郵送した。それらの病床数は大学病院の中央値が401～600床、総合病院が201～400床、中規模病院が1～200床となった。これらについて外来患者数を調べると大学病院の中央値が月間あたり10001～20000人、総合病院が20001～30000人、中規模病院が1～10000人の規模となった。標榜診療科目は内科、神経内科、呼吸器内科、消化器内科、循環器内科、精神神経科、小児科、外科、整形外科、形成外科、リハビリテーション科、脳神経外科、小児外科、皮膚科、泌尿器科、産婦人科、眼科、耳鼻咽喉科、放射線科、麻酔科、口腔外科を認めた。特に中規模病院では内科系、外科、整形外科を除き各標榜科の設置数が5割以下で、特に精神神経科、形成外科、小児外科、口腔外科はほとんど設置されていなかった。

3 研究結果

(1) アンケートの回収状況（全国の病院での遺伝子操作の実態）

アンケートの回収状況は大学病院が45施設（45/119：37.8%）、総合病院が68施設（68/224：30.4%）、中規模病院が54施設（54/201：26.9%）で、合計すると167施設（167/544：30.7%）であった。

その中で、PCR 廃棄物に関して回答が得られた施設、つまり、遺伝子操作を実施していると考えられる施設は大学病院では 33 施設、総合病院では 20 施設、中規模病院では 3 施設となった（表 1）。

この中には、検査センターに外注検査でだけ遺伝子検査を行っている施設が大学病院では 0 施設、総合病院では 2 施設、中規模病院では 2 施設と推定されたが、アンケートに各施設のお考えを回答していただいたものもあったので集計に加えた。

表 1 遺伝子操作方法の実施項目

	大学病院	中規模病院	総合病院
PCR	32	3	20
TMA	5	—	3
NASBA	4	—	—
LCR	3	1	—
SDA	1	—	—
PNA	1	—	—
その他	—	1	2
無回答	12	51	46

(2) 標的遺伝子の調査結果

大学病院、総合病院、中規模病院における遺伝子操作標的遺伝子の調査を行った（表 2）。これによると中規模病院では主に肝炎ウイルス、結核菌、メチシリン耐性黄色ブドウ球菌といった現行の医療保険制度に認められた検査項目を行っている施設がみられた。総合病院でもそれらの項目の件数が多いこと、それに加え白血病遺伝子の異常の検査があり、保険に関わる項目を中心に遺伝子操作が行われていることが認められた。大学病院では現行の保険医療制度で認められているものに限らず、多項目にわたり遺伝子検査室と実験研究室を用いて、高度な遺伝子操作を行っていた。

（表 1,2,3）特に NASBA(nucleic acid strand base amplification), LCR(ligation chain reaction), SDA(strand displacement amplification), PNA(peptide nucleic acid)などの新しい遺伝子操作技術を実施している施設もみられた。また、大学病院における遺伝子操作の標的遺伝子は表 2 に挙げたように少なく大別して 19 種類にも及んでいた。

表2 標的遺伝子の種類

	大学病院	中規模病院	総合病院
発癌遺伝子	13	—	2
癌抑制遺伝子	16	—	2
代謝遺伝子	11	—	—
膜輸送、イオンチャンネル系遺伝子	9	—	—
内分泌遺伝子	10	—	—
血液、及び造血組織遺伝子	15	—	2
循環器遺伝子	9	—	—
消化器、肝臓遺伝子	8	—	—
皮膚、腎泌尿器遺伝子	7	—	—
神経、筋遺伝子	7	—	1
中枢神経遺伝子	5	—	—
ミトコンドリア遺伝子	7	—	1
分化発達遺伝子	8	—	—
性決定遺伝子	3	—	—
免疫遺伝子	15	1	—
眼、耳遺伝子	5	—	—
ウィルス遺伝子	26	1	8
細菌遺伝子	25	2	15
原虫遺伝子	2	—	—
その他	6	1	4

表3 DNA操作手技の実施項目

	大学病院	中規模病院	総合病院
PCR SSCP	20	1	4
in situ PCR	11	—	—
RT-PCR	28	1	8
DNA*	24	—	2
DNA sequencing	22	—	3
DNA chipping	4	—	—
DNA finger printing	7	—	1
その他	1	2	2
無回答	14	52	57

* : DNA restriction, DNA ligation, DNA cloning, DNA synthesis

(3) 遺伝操作法に関する調査

総合病院、中規模病院では表 1、3 から PCR 技術を有していた。特に総合病院ではその応用技術(PCR-SSCP: single strand conformation polymorphism, RT-PCR: reverse transcriptase, DNA sequencing)も行われていた。また、現行では最も進んだ技術と考えられる DNA chip を使用している施設が 4 箇所あった。

(4) PCR 廃棄物汚染に関する調査

以上の調査結果より遺伝子検査室、実験研究室での遺伝子操作後の廃棄物処理に対しての意識調査を行った。調査は PCR 廃棄物の概念が希薄であると想定し、具体的な遺伝子増幅 DNA による試料検体への汚染について質問した(表 4)。表 1 から廃棄 DNA 処理が必要と考えられる PCR, LCR, SDA のうち、PCR を実施する施設が最も多く、例外を除きほとんどの施設で DNA 汚染への意識が確認された。また、具体的な想定できる予防対策について質問し、オートクレーブによる滅菌の代わりにガス滅菌を行い、DNA を不活化させる作業を行う施設が少ないが、多くの施設で具体的な予防策がとられていた(表 5)。

これら増幅された多量の DNA の生体への影響について意識を質問した結果、大学病院では半数で影響を懸念している結果が得られた。総合病院では 8/21 : 38% の施設で影響を懸念していた(表 6)。さらに影響の具体的な問題点の質問については、大学病院からは、ウイルス変異体の出現、培養細胞への組み換え、作業員での組み換え細胞の出現の可能性を挙げる回答がほぼ均等に得られた。総合病院では特に培養細胞を扱うことが少ないと考えられており、影響を与えるとは考えられていなかった。しかしキットによるウイルス DNA の扱いからその影響を問題にする施設がみられた(表 7)。さらに具体的な汚染経路に質問すると直接 DNA に接触することを問題にするものが多くみられた。エアロゾルによる汚染経路についてはオートクレーブによるものと、その他で内訳からエアゾル吸入、エアゾル自然感染、前処理での吸引などが回答されていた(表 8)。

表 4 キャリーオーバーコンタミネーション(増幅 DNA による汚染)の防止策

	大学病院	中規模病院	総合病院
はい	32	2	21
いいえ	1	4	—
無回答	12	48	47

表5 予防対策項目

	大学病院	中規模病院	総合病院
フィルター付	30	2	19
ガス滅菌	12	—	2
クリーンベンチ内で	25	2	15
オートクレーブはしない	11	—	8
次亜塩素酸ソーダ・紫外線照射	26	2	17
区域分け	24	—	13
無回答	—	—	1

表6 生体への影響

	大学病院	中規模病院	総合病院
はい	17	—	8
いいえ	16	5	13
無回答	12	49	47

表7 どのような影響

	大学病院 (17)	中規模病院(0)	総合病院(8)
培養細胞へのPCR廃棄物の組み換え体を生じる	10	—	—
ウィルス変異体が生じる	13	—	2
自分の細胞のDNAと組み換え体を生じる	9	—	3
その他	2	—	3

表8 汚染ルート

	大学病院(17)	中規模病院(0)	総合病院(8)
手の微細な傷	14	—	3
オートクレーブ等による吸引	5	—	—
経口	15	—	2
その他	5	—	2

(5) PCR 廃棄物の処理についての調査

処理方法について生体への影響を意識して選択し行っているかを質問した。大学病院で遺伝子操作を行っている 33 施設のうち遺伝子検査室、実験研究室内で感染性廃棄物容器に封じ込める施設が 19 施設みられた。他に次亜塩素酸で処理後医療廃棄物と回答のあった施設がみられた。しかし、一方で次亜塩素酸で処理後排水と

か可燃物、不燃物として一般廃棄物とする施設や DNA 分解の無効なオートクレーブ処理後に可燃物、不燃物として一般廃棄物として扱う施設があり、廃棄段階で直ちに封じ込めを行わない施設が 14 施設みられた。

総合病院で遺伝子操作を行っている 21 施設のうち遺伝子検査室、実験研究室内で感染性廃棄物容器に封じ込める施設が 10 施設みられ。また、処理作業時の手袋装着が不十分な施設がみられた (表 9)。

そこで封じ込めに必要な廃棄物容器に関する質問を行った。表 10 では認定容器の使用状況であるが遺伝子操作を行う約半数に及ぶ施設が (財) 日本産業廃棄物処理振興センターが登録認定する容器を使用していた。また容器の材質は認定の有無にかかわらず封じ込めがより確実な合成樹脂、紙製の物を使用していた。

その他自家製の堅牢な容器を用いる施設がみられた。ビニール、オートクレーブ用ビニールなど封じ込めに不適な包装具を用いる施設はわずかであった (表 11)。

そのほか保管、中間処理、最終処分の方法とか頻度について質問を行ったが、アンケート配布、回収時点およびその後の法律改正によって中間処理の問題が明らかなので推計結果をまとめなかった。

表 9 処理方法

	大学病院	中規模病院	総合病院
実験現場・検査室	20	1	7
感染性廃棄物容器	19	1	10
排水処理施設	3	1	—
可燃物	7	—	1
不燃物	6	—	2
手袋	22	—	13
その他	11	—	2
無回答	12	52	47

表 10 認定廃棄物容器

	大学病院	中規模病院	総合病院
はい	10	—	6
いいえ	23	2	15
無回答	12	52	47

表 11 容器の材質

	大学病院	中規模病院	総合病院
合成樹脂	24	3	13
紙	8	—	4
その他	11	—	4
無回答	13	51	48

4 考察

このアンケートは製薬会社の研究施設などの民間の遺伝子操作技術の実施状況と国立研究機関の状況は把握しておらず、病院施設として遺伝子検査室、実験研究室が付属した病院での遺伝子操作技術の実施状況が得られたと考えられる。この調査はいわゆる未規制医療廃棄物の一般的な内容が含まれていたことから、回収は無作為に得られたと考える。全国 119 大学病院の中から 45 施設 (37.8%) の回答が得られ、そのうち遺伝子操作を行っていた施設が 33 施設 (73.3%) であったので全国では 87 施設で遺伝子操作技術が使われていると推計された。また、総合病院では 224 施設の中から 68 施設 (30.4%) の回答が得られ、そのうち操作を行っていた施設が 20 施設 (29.4%) であったので全国では 64 施設で使われていると推計された。

これらの遺伝子操作の技術的背景は PCR (polymerase chain reaction) による DNA 増幅法と TMA (transcription mediated amplification) による RNA 増幅法である (表 1,2)。しかし、表 3 から保険以外の項目の遺伝子操作技術が総合病院で実施されており、回答を頂いた施設では規模によらず遺伝子検査室か実験研究室を用いて増幅遺伝子増幅法よりも高度な遺伝子操作を行っていると考えられた (表 3)。また、新しい遺伝子操作技術を実施している施設もありその PCR 廃棄物がどのように処理されているか問題といえる。一方で、大学病院における遺伝子操作の標的遺伝子は多岐におよんでおり、感染症診断よりも体細胞遺伝子診断の件数が多いことが推計された。これらの PCR 廃棄物が体細胞遺伝子の情報を担ったものであることが注目される。

遺伝子操作方法に関する調査では総合病院の場合 PCR の応用技術とされる (PCR-SSCP:single strand conformation polymorphism, RT-PCR:reverse transcriptase,DNA sequencing) も行われている。逆に PCR 以外の従来からの遺伝子操作は行われていないか極めてわずかの実施と思われた。これは、総合病院、中規模病院では PCR の技術がキット化されて遺伝子操作が行われやすくなったと考えられ遺伝子検出方法で発色法-吸光度測定法の実施回答が多くみられた (表 11,12)。同時に面倒なゲ

ル電気泳動法を行う施設が半数以上あり PCR を応用し遺伝子を扱うことに抵抗がなくなってきたと思われた (表 12)。

PCR 廃棄物汚染に関しては、大学病院では半数で影響を懸念している結果を得られたが、中規模、総合病院での意識の低さがみられた。これは、検査キットによる作業が多いため比較的安全な機械的作業の範囲であることや操作 DNA の種類が少ないなどが考えられる (表 2,11,12)。

また、PCR 廃棄物処理に関しては、廃棄段階で直ちに封じこめを行わない施設が 14 施設あり、生体への意識している 17 施設が封じこめを行っているのだろうかという疑問が残った。このほかに総合病院 (21 施設) では約半数は廃棄段階で直ちに封じこめを行わない施設のあることが伺われた。

表 12 遺伝子検出方法の実施項目

	大学病院	中規模病院	総合病院
ゲル電気泳動法	29	1	11
サザンブロット法	21	—	2
ノーザンブロット法	19	—	1
吸光度測定	31	1	16
無回答	12	52	48

第2部 環境由来 PCR 阻害物質の除去方法の検討

1 序論

遺伝子増幅法(polymerase chain reaction: PCR, ligation chain reaction: LCR, transcription mediated amplification: TMA, nucleic acid strand base amplification: NASBA, strand displacement amplification: SDA) はDNAやRNAの目的とする一部分のみを大幅に増幅させる方法で 1983 年に開発された PCR が最初である。TMA, NASBA 法ではRNA増幅を行う。PCR 法では試料とするDNA中の目的とするDNA部分の、初めの方に対応するプライマーDNAと、終わりの方の相補鎖に対応するプライマーDNAとをDNA合成機で化学的に合成する (オリゴマーDNA)。試料のDNAにこの2つのプライマーを過剰に加えて高温でそれぞれが1本鎖になるようにする。温度を下げた試料DNAの目的とする部分にプライマーをハイブリダイズさせて結合させる。少し温度を上げて Taq ポリメラーゼ (好熱性細菌 *Thermus aquaticus* より精製したDNA複製酵素, 高温で極めて安定である) を加えて, まず各々のプライマーからDNA複製をさせる。次に温度を上げて, できた2本鎖DNAを1本

鎖に解離させる。この操作で目的とするDNA部分は2倍になっている。これを繰り返すことにより、2つのプライマーの間のDNAを大量に増幅複製することができる。この操作は単に温度の上下だけであるので自動化が容易であり、短時間に数十サイクルの増幅を行うことが可能である。1983年にこの考え方が出て実験が行われていたが、1986年に高温で非常に安定な *Taq* ポリメラーゼを使用する方法が開発され、一挙に実用化が進み、現在、ロシュ社の自動機器が市販されている。

計算上、30サイクルで目的とするDNAの鎖の数は約10億倍になる。最速の *light cycler* を用いると20-30分で増幅が可能である。増幅可能なDNAの長さは通常、数百塩基対であるが、最近の技術では数十万塩基対まで複製が可能となった。この方法はバイオテクノロジーで非常に利用されるようになっている。こういった同一塩基配列を呈する短いDNAが大量の複製物として生成され利用されるが、ほとんど廃棄物として処分されることになる。

環境由来 PCR 阻害物質の除去方法を検討することにより DNA による実験室内および遺伝子検査室などの増幅遺伝子による汚染の状況を把握する。

2 方法

検討に際し、以下の試料と試薬を使用した。

1. 試料

有機汚泥(アオコ汚染湖水)

無機汚泥(浄水場汚泥)

2. 試薬

TaKaRa EXtaqTM(10xPCR 緩衝液、dNTP mixture)

H. pylori プライマー-1(5'-GCG CAA TCA GCG TCA GGT AAT G)

H. pylori プライマー-2(5'-GCT AAG AGA TCA GCC TAT GTC C)

PCR用反応液:EXtaq0.3 μ l、プライマー(各)1.5 μ l、dNTPs2.4 μ l、X10PCR 緩衝液3 μ l、試料~5 μ l、水(PW)を加えて30 μ lとした。

この中で、本来環境中に存在しないと考えられる *H. pylori* を中心に検討を行った。

3. *H. pylori* のDNA抽出

300 μ lのプロテインK 緩衝液に平板培地1枚分の *H. pylori* を浮遊させ、20 mg/mlのプロテインKを3 μ l加え(終濃度0.2mg/ml)、56 $^{\circ}$ Cで一晩反応させた。

フェール/コロラム(1:1)溶液を300 μ lを加え、よく混和した後12000rpm、10分間遠心分離し、水層を採取した(2回繰り返し行った)。次にコロラムを300 μ lを加え、よく混和した後12000rpm、10分間遠心分離し、水層を採取した。

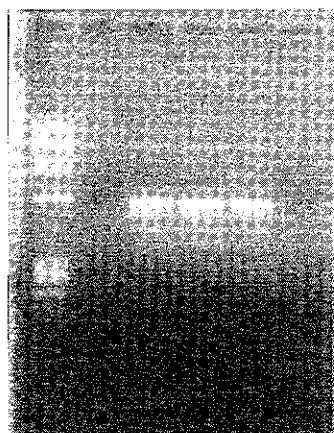
エタノールを使用して、エタノール沈殿を行い、70%エタノールでリンスした後クリーンベンチ内で風乾させ、30 μ lのPWで溶解した。

抽出したDNAをPWで希釈系列を作製し、PCRを行った。

3 結果

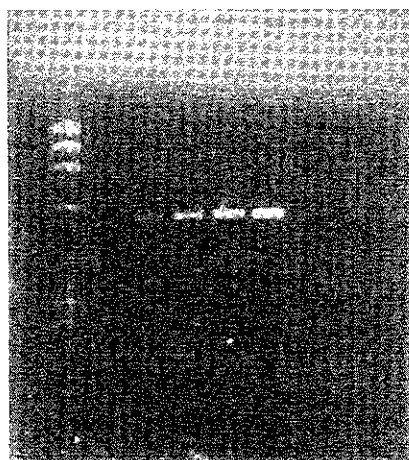
1. *H. pylori* DNA抽出

原液でPCRを行うとDNA量が多すぎるためかバンドが検出されなかった。2倍以上の希釈、 10^5 倍の希釈まではバンドが確認できた。(10^6 倍希釈では安定してバンドが検出されなかった。)



左レーンより

マーカー4
NC (-)
 10^2 倍希釈(+)
10倍希釈(+)
2倍希釈(+)
原液 (-)
(アガロースゲル)



左レーンより

マーカー4
NC (-)
 10^5 倍希釈(+)
 10^4 倍希釈(+)
 10^3 倍希釈(+)
 10^2 倍希釈(+)
(アガロースゲル)