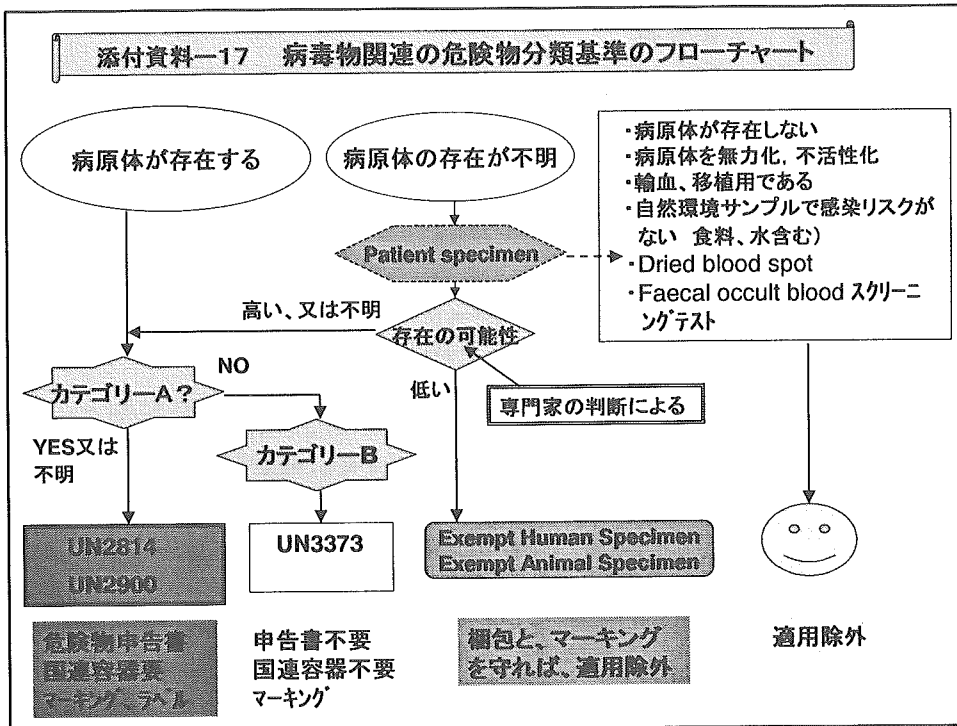


添付資料-17 病毒物関連の危険物分類基準のフローチャート



添付資料-18 カテゴリーA と Bの取扱い要件の比較(概要)

| | カテゴリーA | カテゴリーB |
|--------------|---------------------------------------------------------------------------------------------------|------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| 国連番号と正式輸送品目名 | UN2814 (Infectious substance, affecting human) UN2900 (Infectious substance, affecting animal) | UN3373 Diagnostic specimens 又は, Clinical specimens 又は, Biological substance, Category B (2007年からはこの品目に一本化) |
| 書類作成 | 危険物申告書作成要 | 危険物申告書作成は不要 AWB(運送状)上に"UN3373"と正式品目名を記載すれば良い |
| 包装要件 | PI602を適用 3重梱包 | PI650を適用 3重梱包 |
| 容器 | 国連規格容器 (落下試験 9m 鋼鉄棒貫通試験等) | 国連規格容器の使用は免除 自主試験 (落下試験1.2m) 95Kpaの内圧差に耐えること |
| 危険性ラベル | 区分6.2の病毒物ラベル | 区分6.2の危険性ラベル不要 UN3373ラベルで良い |
| 1包装の許容量 | 旅客機 50mL 又は 50g 貨物機 4L 又は 4kg | 旅客機、貨物機共に、4L 又は4kg |

添付資料-19 包装要件

カテゴリーA ⇨ 包装基準602 (UN2814,UN2900)

国連規格容器でなければならない。

(a) 内装容器

- 防漏型第1容器
- 防漏型第2容器
- 固体を除き、第1容器と第2容器の間には、内容物をすべて吸収でき
吸収材を入れること。
- 内容物の品目リストを第2容器と外装容器の間に封入すること。
病原体が判明しない場合、“Suspected Category A
Infectious substance”と品目リストに追記すること。
- -40℃～+55℃で、95kPaの差圧を生じる内圧に漏洩を生じないこと。

(b) 外装容器

量、重量および使用目的に合致した強度を有し、頑丈であること。

追加要件

- 関係のない品物と同梱してはならない。
- ドライアイスを入れる場合、第2容器の外側に収納するか、またはオーバー
バックすること。炭酸ガスが外に漏れるようにすること。

その他詳細は包装基準602を参照

例えば、液体チツソの使用や凍結乾燥物質の場合

添付資料-20

カテゴリーB ⇨ 包装基準650 (UN3373)

国連規格容器の使用は免除される。が、包装基準602の要件とほぼ同じ。

容器が3重梱包であること。(第1容器、第2容器、外装容器)

緩衝材、吸収剤の使用義務

落下試験 1.2m以上

第1容器、第2容器は、-40℃～+55℃の範囲で、95kPaの内圧差で漏洩
しないこと。

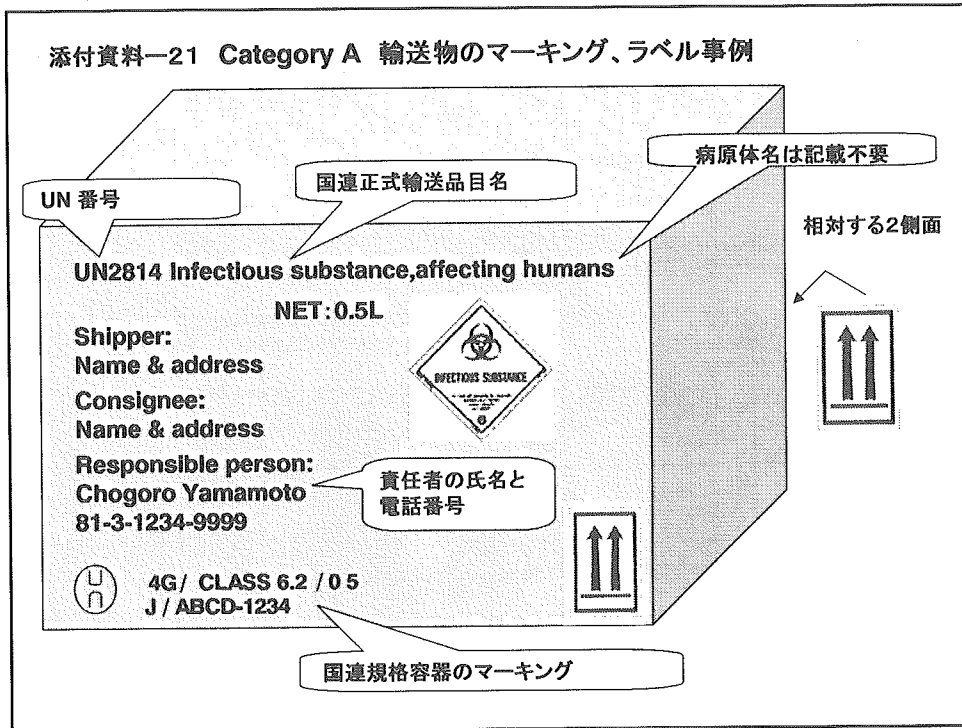
(a) 液体 : 第1容器 / 1L以下 1包装物 / 4L以下

(b) 固体 : 1包装物 / 4Kg以下

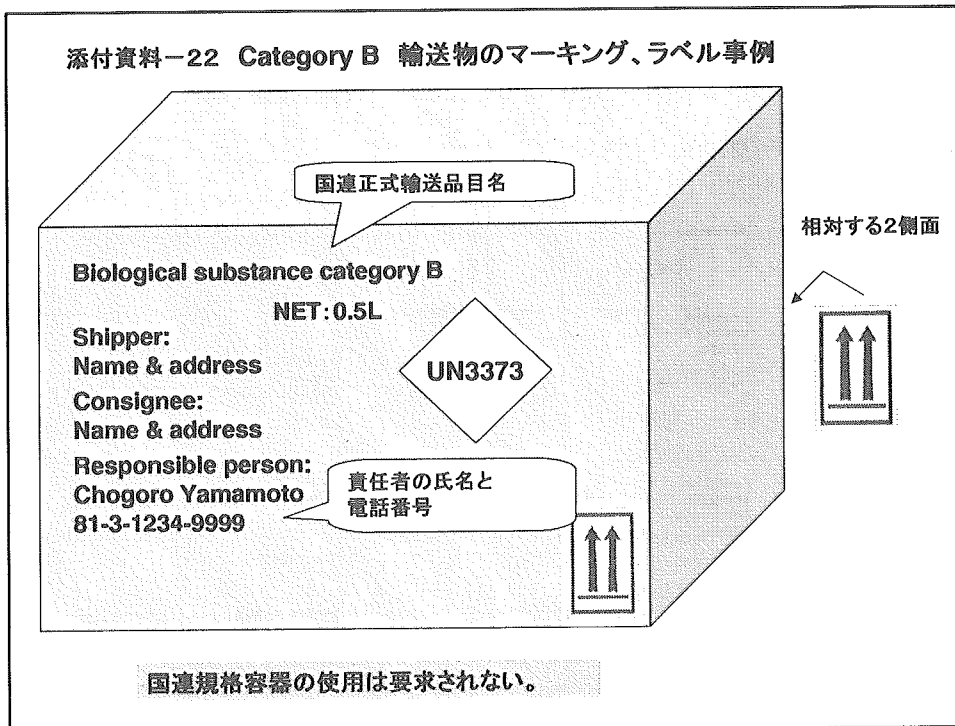
氷、ドライアイス、液体窒素使用時の要件あり。

他の危険物と同梱は許されないが、物質の生育の維持、安定または質の
劣化の防止のためのものは、30ml以下の分類3,8,9は、第1容器に入れる
ことができる。

添付資料-21 Category A 輸送物のマーキング、ラベル事例



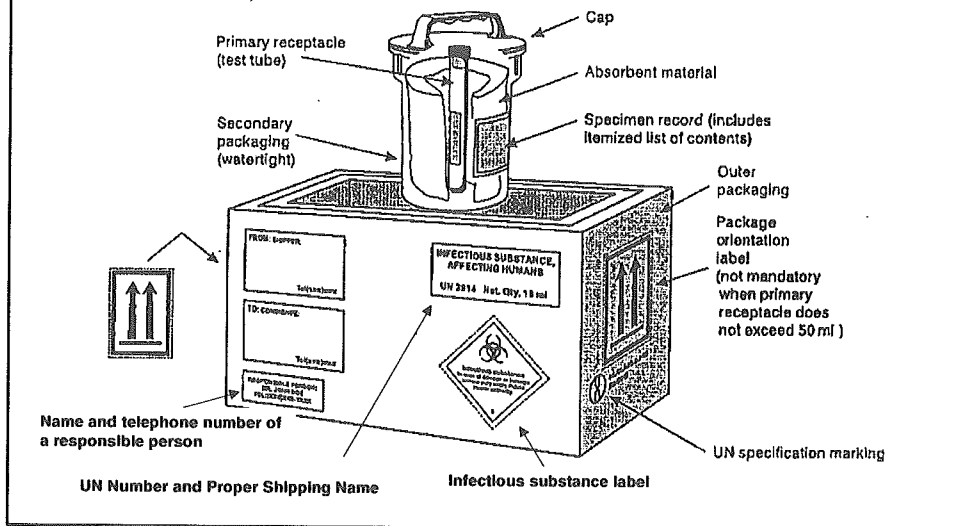
添付資料-22 Category B 輸送物のマーキング、ラベル事例



添付資料—23

Category A package (for UN2814 or UN2900) : UN specification packaging
(IATA資料より)

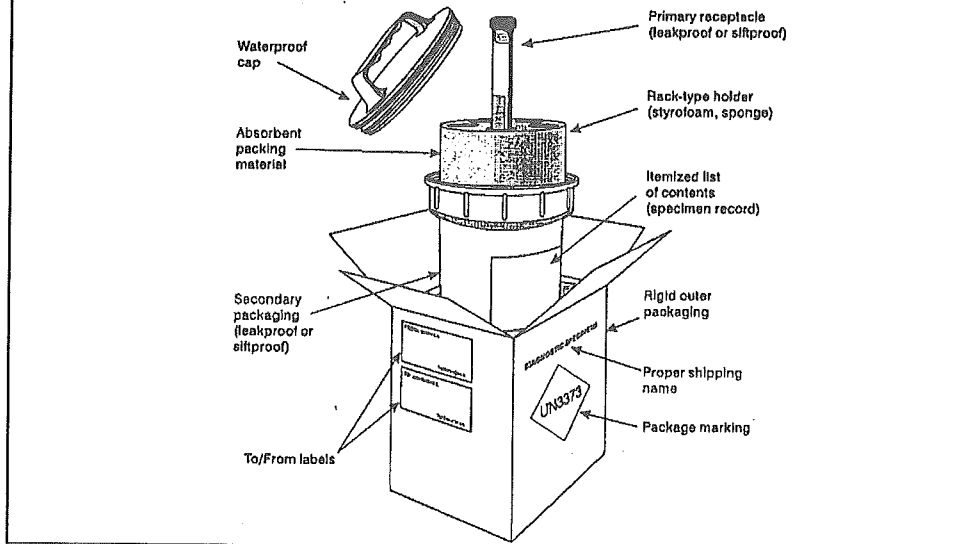
Packing and labelling of Category A infectious substances



添付資料—24

Category B Package (for UN3373) : Non-UN specification Packaging
(IATA資料より)

Packing and labelling of Category B infectious substances



添付資料-25

危険物申告書
記入例

| SHIPPER'S DECLARATION FOR DANGEROUS GOODS | | | | | | | |
|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|------------------------------|--------------------------------|-----------------------|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|---------------------------------|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|---------------|
| Shipper The full name and address of the shipper | | | | Air Waybill No. 131-1234567 Page 1 of 1 Pages Shipper's Reference Number XXXXXX | | | |
| Consignee The full name and address of the consignee The name and telephone number of a responsible person for contact in any emergency For completion and signed copies of this declaration must be handed to the operator | | | | WARNING Failure to comply in all respects with the applicable Dangerous Goods Regulations may be in breach of the applicable law, subject to legal penalties. This Declaration must not, in any circumstances, be completed and/or signed by a consignor, a forwarder or an IATA cargo agent. | | | |
| TRANSPORT DETAILS The aircraft to which this shipment is destined for (passenger or cargo) PASSENGER <input type="checkbox"/> CARGO <input checked="" type="checkbox"/> AND CARGO <input type="checkbox"/> AIRCRAFT <input type="checkbox"/> <input type="checkbox"/> | | Airport of Departure Narita | | Airport of Destination: New York | | | |
| NATURE AND QUANTITY OF DANGEROUS GOODS (see sub-section 8.1 of IATA Dangerous Goods Regulations) | | | | Shipment type (circle non-applicable) <input checked="" type="checkbox"/> NON-FLAMMABLE <input type="checkbox"/> FLAMMABLE | | | |
| Dangerous Goods Identification | | | | | | | |
| Proper Shipping Name | Class or Divi- sion | UN or ID No. | Pack- ing Group | Code letter | Quantity and type of packing | Packing inst. | Authorization |
| Infectious substance, affecting humans (Mycobacterium tuberculosis) | 6.2 | LN2814 | | | 1 Rtrboard box X 30cm | 602 | |
| Name of pathogen | | Number of package | | Type of outer packaging | | Net quantity per package | |
| Additional Handling Information | | | | | | | |
| I hereby declare that the contents of this consignment are fully and accurately described above by the proper shipping name, and are classified, packaged, marked and labeled in accordance, and are in full respect to proper condition for transport according to applicable international and national governmental regulations. I declare that all of the applicable air transport requirements have been met. | | | | | | Name/Title of Signatory Z. Shimizu / Medical technician Place and Date Tokyo 01 September, 2005 Signature (see marking 400-1) Z. S Shimizu | |

添付資料-26 国連規格容器の性能試験機関

国の当局(国土交通省)の定める方式およびICAO規則にしたがって試験することとなっている。

試験は、国の認定機関で行われなくてはならない。

試験は、当局の定める間隔で生産された容器に対し、繰り返し行うこと。

試験は、設計、材質、構造仕様に変更があった場合は、その都度行うこと。

わが国の容器試験機関:

認定機関 : (財)日本舶用品検定協会(略称:HK)

昭和62年(1987年)当時の運輸大臣より認定された。

病毒物の容器は、2005年1月より可能となった。

試験 : 試験機関((社)日本品質管理協会 製品安全評価センター)に持ち込むか、試験機関の試験官が試験設備のあるところに立会うかのいずれかによる。

添付資料-27 国連規格容器(カテゴリーA)の試験基準

試験基準

内圧基準: 液体を収納する容器は、漏れを生ずることなく95Kpa以上の圧力差を生ずる内圧に耐えること。

落下試験: 容器サンプルは、一時間当たり50mmの模擬雨に曝した後、9mの高さからの自由落下
(箱型:5つの面 ドラム型:3つの箇所)

破裂試験: 鋼鉄棒(重量7kg、直径38mm)を、容器表面1mの高さから落下させる。2回目は、容器を垂直に変更して行う。

添付資料-28 旅客の手荷物の危険物規則

危険物は、手荷物としては受託手荷物であろうと、機内持ち込みであろうと認められない。



例外: 限られた危険物の物品のみが、例外的に手荷物として認められている。

(例) ドライアイス : 1人 2kg
放射性物質でない医薬品: 1人合計正味量 2kg
(品目当たりは、0.5kg)

詳細はIATA航空危険物規則書を参照のこと。

Exempt patient specimen も手荷物可能である。(ただし、包装、表示要件を遵守)

参考: 深冷液化窒素を含む断熱容器
(Insulating packagingまたはDry Shipperという)

多孔質物質に深冷液化窒素を完全に吸収させたもので、非危険物を輸送することを目的とした断熱容器は危険物規則の適用を受けない。

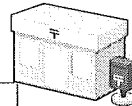
(容器内で圧力の蓄積が起こらないように、かつ容器の天地がどの方向になっても漏れないように設計されていること。)

⇒ 非危険物扱いなので、手荷物は可能。

但し、航空会社に事前に確認のこと。



添付資料—29 郵便の危険物規則



郵便の危険物輸送規則は、ICAOで規定しているのではなく、UPU(万国郵便連合条約)の規定をそのまま取り込んでいる。

UPU
規則

UPU規則は、その国の郵政当局の規定を条件として、郵便で認められる危険物は以下のみとしている。

1. 病毒物。危険物申告書が必要である。
尚、病毒物を冷却するドライアイスも認められる。
2. 微量放射性物質の許容放射能の1/10以下のレベル。

(問題点: UN3373の取り扱いが未だ不明確である)

わが国
郵便法

我が国の郵便法(危険物に関する部分):

国際郵便は、2001年にUPU規則に整合させた。

国内郵便は、UPU規則に未だ不整合。

(わが国の郵便法には、危険物という定義はなく、“郵便禁制品”という言い方となっている。)

添付資料—30 わが国の郵便法

郵便禁制品 (第14条)

1. 爆発性、発火性その他の危険性のある物で総務大臣の指定するもの。
2. 毒薬、劇薬及び劇物(官公署、医師、歯科医師、獣医師、薬剤師又は毒劇物営業者が差し出すものを除く)
3. 生きた病原体及び生きた病原体を含有し、又は生きた病原体が付着していると認められる物(官公署、細菌研究所、医師又は獣医師が差し出すものを除く)
4. 法令に基づき移動又は頒布を禁止された物。

国際郵便として引き受け出来ない危険物(郵便のホームページより)

危険物の定義を明記し、その定義は、IATA危険物規則の定義と整合している。

尚、伝染性の物質についても、以下のとおりUPU条約と整合している。

“関係国の郵政当局の規定及びIATA危険物規則に従い、「IATA発送人危険物申告書」が付されていることを条件に発送できる。ドライアイスも伝染性物質の冷却剤として発送できる”としている。

国内郵便 : 危険物の定義はなく、第14条の禁制品しか根拠がない。

添付資料-31 病毒物関連(感染性材料)の関係輸送規則の相関表

| 項目 | 国連勧告 | ICAO、IATA規則 | 航空法 (危険物輸送) | | UPU (万国郵便連合条約) | 我が国の郵便法 | | 国内の他法令 (輸送に関する) |
|--------|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|---------------------------------------|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|---------------------------------------|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|--------------------------------------------------------------------------|--------------------|
| | | | 航空法 (危険物輸送) | | | 国際郵便 | 国内郵便 | |
| 病毒物の分類 | ① カテゴリーA ⇒ UN2814(人および動物)、UN2900(動物) ② カテゴリーB ⇒ UN3373(Diagnostic specimens)または、 (Biological substance, category B) ⇒ 航空のみ先行導入 (注: 2007年から、全輸送モード、後者品名に統一) ③ Patient specimens ⇒ UN2814 or UN2900 or UN3373 又は Exempt specimens ④ 医療、臨床廃棄物 1) カテゴリーAを含むもの ⇒ UN2814またはUN2900 2) カテゴリーBを含むもの ⇒ UN3291(Medical waste) | | カテゴリーAのみ規定 (Aの冷却用としての ドラフアイスは可) | 郵便禁制品を規定(法第14条) 病原体は禁制品であるが、 官公署、研究所、医師等からは 例外的に差出しが認められている。 (注: 病原体の定義は明確化され ていない。) (郵便は、郵政公社がどの航空会社 で輸送するかを一方的に決める) 約款では、人に危害を与える恐れのある 動物は禁制品となっている。 (学校、試験所からの場合は除く) | カテゴリーAのみ規定 (Aの冷却用としての ドラフアイスは可) | 郵便禁制品を規定(法第14条) 病原体は禁制品であるが、 官公署、研究所、医師等からは 例外的に差出しが認められている。 (注: 病原体の定義は明確化され ていない。) (郵便は、郵政公社がどの航空会社 で輸送するかを一方的に決める) 約款では、人に危害を与える恐れのある 動物は禁制品となっている。 (学校、試験所からの場合は除く) | 病原体の主管官庁 他関係官庁は 経済産業省 環境省 厚生労働省 農水省 国土交通省 総務省等 ? | |
| 輸送モード | 空、海、陸の 全輸送モード に共通 | 航 空 | 空、海、陸共通 | (禁止?) | 空、海、陸共通 | 空、海、陸共通 | ? | |
| 書類 | | ① カテゴリーA: 危険物申告書要 (IATA7フォーム) ② カテゴリーB: 危険物申告書は不要 ③ UN3291(廃棄物): 危険物申告書要 | 同左 (追認している) | カテゴリーAについて 危険物申告書要 | 同左 | 内容品および性質 を申告 | ? | |
| 容器 | | CAT-AとUN3291(廃棄物)は、国連規格容器要 それ以外は、国連規格容器の使用は免除 全てについて具体的な要件が定められている。 注: Patient specimensが、非危険物であっても 最低限度の包装要件が定められている。 | 同左 | カテゴリーAのみ同左 | 同左 | 堅固な容器 30kg以下 | ? | |
| 包装要件 | | 注: Patient specimensが、非危険物であっても 最低限度の包装要件が定められている。 | 同左 | カテゴリーAのみ同左 | 同左 | 密封、漏洩防止 | ? | |
| マーキング | | 全てについて具体的な要件が定められている。 (分類によって、マーキング項目は、一部異なる。 | 同左 | カテゴリーAのみ同左 | 同左 | 「危険品」 差出人の資格 | ? | |
| 教育訓練規定 | 有り | 有り | 航空会社のみ有り | ? | なし | なし | ? | |
| 保安規定 | 有り | 有り | 策定中 | ? | なし | なし | ? | |

上記に加え、政府例外規定、航空会社例外規定がある。

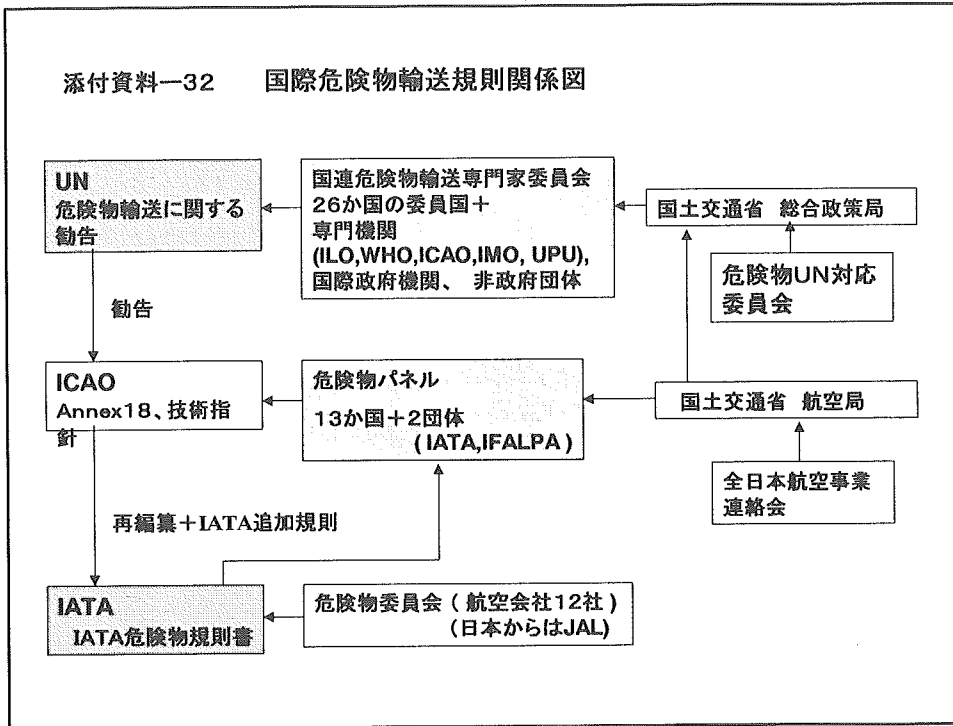
その他関連: 1. WHO関連

- 1) Infectious Substance Guidance Document (Darftあり、最終版作成中)
 - 2) WHO Laboratory Biosafety Manual (3rd Edition)
2. カルタヘナ議定書(2003年11月日本批准): LMOに関するバイオセーフティーの議定書
第18条 取扱い、輸送、包装および表示 ⇒ 締約国は、関係する国際規則及び基準を考慮し、安全な条件下で、取り扱われ、包装され、運搬されることを
わが国では、「遺伝子組み換え生物等規制法」(2004.2施行)
義務付ける措置をとる。

3. Guidance Document

- 1) WHO, ICAO, IATA作成中
- 2) 米国、カナダ、英国政府も作成
4. 欧州 (RID: 鉄道輸送危険物規則、ADR: 道路危険物輸送規則)

添付資料—32 国際危険物輸送規則関係図



添付資料—33 わが国の対応組織(放射性物質以外)

国連

国連危険物専門家委員会: 日本政府代表 / 八十川 欣勇 (日本海事検定協会顧問)

危険物UN対応部会

部会長: 上原陽一(横浜安全工学研究所)

官庁メンバー: 経済産業省、国土交通省、環境省、厚生労働省、総務省

民間メンバー: 24社および団体

ICAO

ICAO危険物パネル: 日本政府代表 / 国土交通省航空局技術部運航課

全日本航空事業連合会 航空危険品委員会: 航空局は下記にいずれも出席

第1専門部会(荷主グループ): 事務局 / 日本化学工業協会

第2専門部会(放射性物質): 事務局 / 航空局技術部運航課

第3専門部会(航空会社、フォワーダー): 事務局 / 日本貨物航空

8. 消毒用エタノールによるウイルス不活性化のリスクとその回避に関する研究及び *Bacillus* 芽胞の加熱不活性化に関する研究

分担研究者 高木 弘隆 国立感染症研究所バイオセーフティ管理室
協力研究者 齊藤 典子 国立感染症研究所 感染病理部（電顕室）

研究要旨

汎用消毒剤のひとつであるエタノールによるウイルス不活性化効果を実使用に即した条件下で検討した結果、ブタ伝染性胃腸炎ウイルス(TGEV, coronavirus serotype I) 及びヒトアデノウイルス 3 型では不活性化効果の再現性が低い、あるいは十分な効果が得られないことが示され、界面活性剤との合剤使用などによる対応が示唆された。

また炭疽菌芽胞 5 株と炭疽菌近縁 *Bacillus* 属菌芽胞 4 株をもちいて 100℃加熱処理による不活性化効果を検討したところ、供試菌株すべてにおいて 10 分以上の処理で 6log₁₀ CFU の減少が認められ、その有効性が確認された。

A. 研究目的

消毒用エタノール(局方で 80%前後)はもともと汎用で使用されている消毒薬のひとつであり、芽胞や一部の真菌・ウイルスを除き、様々な病原体に対して広い感受性スペクトルを有する。しかしながら実使用上は非常に短時間(~10 秒程度)で作用させるに留まり、多くの文献や参考書に示される消毒・不活性化効果と必ずしも一致しないこともまた事実である。そこで今回コロナウイルスとアデノウイルスを用いたエタノール感受性を検討することとした。

また炭疽菌(*Bacillus anthracis*)の加熱処理による不活性化及びゲノム DNA 抽出に関しては平成 13 年度厚生科学研究にて報告しているが、これは炭疽菌 2 株のみを対象としており、その他の炭疽菌株や *Bacillus* 属菌については未確認であった。そこで今回本研究所所有の炭疽菌野外株 3 株及び *Bacillus* 属菌 4 株の各芽胞を用いて、100℃加熱処理による不活性化効果について検討した。炭疽菌芽胞の不活性化に関する詳細な検討や情報はほとんど得られていない。そこで今回芽胞の不活性化に有効とされる消毒剤を用いて、炭疽菌芽胞に対する不活性化効果を検討した。

【試験材料及び試薬】

以下のものを試験検討に用いた。

(1) 供試ウイルス：

①ブタ伝染性胃腸炎ウイルス (以下 TGEV) h-5 弱毒株 ②ヒトアデノウイルス (HAdV)Type3 GB3(ATCC strain VR-847)③ヒトアデノウイルス Type3 臨床分離株(広島県保険環境センターより分与されたもの) 当所にて KB 細胞を用いて増殖したもの 4 株

(2) 供試 *Bacillus* 属芽胞

・ *B.anthraxis*

①Pastuer I 苗株(pOX1+, pOX2+)②34F2 株 (pOX1+, pOX2-)③士官(pOX1+, pOX2+)④盛岡(pOX1-, pOX2+)⑤#52-1(pOX+, pOX2+)

・ *B.cereus* および *B.thuringensis*

① *B.cereus* NBRC13494 ② *B.cereus* NBRC15305③*B.cereus* isolation NO.48(環境由来)④*B.thuringensis* NBRC3951

(3) トリプトソイ寒天培地：パ・ル7Rトリプトソイ寒天培地：栄研化学製 (以下 TSA)

(4) Buffered Peptone Water (BPW)

(5) 培養細胞

①ST 細胞(TGEV 用、ATCC CRL-1746)

②A549 細胞(HAdV 用、JCRB0076)

(6) 細胞培養培地

2~5%新生児ウシ血清含有 L-15 培地(sigma 製)

- (7) エタノール 99.5%
- (8) 滅菌精製水(JIS 3A grade)
- (9) ドライバス
- (10) 角型シャーレ：滅菌角シャーレ 2 号
栄研化学製

ものをドライバスにて 100℃、10、20 及び 30 分加熱し、各々アイスバスにて急冷した。これらを BPW にて 10 倍段階希釈して TSA/角型シャーレに 20 μ l/spot 接種し、37℃、18hr インキュベートしたものの生残コロニー数を測定した。

B. 研究方法

(1) 試験用炭疽芽胞浮遊液の調製

寒天培地を用いた好氣的培養法により芽胞を形成させ、これを回収し、洗浄・低温処理によりクリーンアップしたものを 60℃、1 時間加温し芽胞浮遊液とした。安定な芽胞であることは

- ① アルカリメチレン青染色し、鏡検による 90%以上の芽胞形成確認
 - ② 4℃保存 3 日間での生菌数(colony forming unit:CFU)低下が認められない
 - ③ 50%エタノール洗浄による生菌数(colony forming unit:CFU)低下が認められない
- をチェックしたものを実験に供している。

※なお培養法についての詳細な記述は情報として不適当と判断し、割愛した。

また炭疽菌以外の Bacillus 属菌については精製段階でデブリスの非常に少ないものを選定し供試した。

(2) エタノールによる各供試ウイルスの不活性化効果試験

エタノール溶液 0.225ml に各ウイルス培養上清 0.025ml を加え、炭疽菌芽胞浮遊液を 0.05ml 加え、ピペッティングにてよく攪拌する(9:1 で反応、以下これを反応液とする)。室温で 15 秒及び 60 秒(TGEV のみ)反応させ、細胞培養培地を 1ml 加えて反応を停止させた(反応停止液)。この反応停止液を細胞培養培地で 5 倍段階希釈したのち、各感受性細胞 96well-plate に接種した。感染力価算出は end-point(TGEV4 日間培養、HAdV37 日間培養)で Behrens-Karber 法により 50%感染価(TCID₅₀)を算出した。

(3) 加熱処理による芽胞不活性化試験

各芽胞懸濁液(2~5 \times 10⁵CFU/20 μ l)を 1.5ml マイクロチューブに 70 μ l ずつ分注した

(エタノール不活性化試験)

エタノール 0.225ml
ウイルス液 0.025ml

↓
混合、室温(22~24℃)

↓
15 ないし 60 秒
細胞培養培地 1.0ml

↓
混合・反応停止
5 倍段階希釈

↓
各希釈段階液 50 μl/well
培養細胞 96well-plate へ接種

↓
37℃, 5%CO₂
4~7 日培養

↓
ホルマリン固定・MB 染色
CPE/Normal を確認し、力価算出

(芽胞熱感受性試験)

1.5ml マイクロチューブ
← 各芽胞懸濁液 70 μl

↓
100℃ in dry-bath
incubate 10, 20, 30 分
氷冷

↓
10 倍段階希釈(BPW 使用)
TSA へ接種

C. 研究結果

(1) エタノールによるウイルスの不活性化効果について

①TGEV に対する不活性化効果

エタノール濃度を 0, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90%(v/v)として 15 秒および 60 秒作用させたところ、15 秒作用で 5log₁₀TCID₅₀ の減少が再現性よくみられたのが、90%のみであり、それ以下の濃度では濃度依存性・再現性ともにみられなかった。

一方 60 秒作用では 90~40%まで 6log₁₀TCID₅₀ の減少が再現性よくみられ、30%でも 4log₁₀TCID₅₀ 減少した(添付グラフ 1)。

②HAdV Type3 に対する不活性化効果

エタノール濃度を 0, 10, 30, 50, 60, 70%(v/v)として 60 秒間反応させたところ、各株において相異なる感受性を示したが、顕著な不活性化効果が現れるのが 60%以上であることは一致していた。また 70%濃度における感染価減少は 1.4~2.8log₁₀TCID₅₀ となった(添付グラフ 2)。

(2) 加熱処理による Bacillus 芽胞の不活性化効果について

①*B.anthraxis* 芽胞の不活性化効果

100℃加熱処理による *B.anthraxis* 芽胞の不活性化用いた 5 株全てにおいて初発菌数 10⁶~10⁷CFU/0.1ml のものが 10 分後にはほぼ検出されず、それ以降もすべて不検出であった。また芽胞調製における処理温度 60℃では、Pastuer I 苗株において 60 分処理後も生残菌数はほとんど変化しなかった(添付グラフ 3 及び 4)。

②他の Bacillus 属菌芽胞の不活性化効果

B.anthraxis の類似グループである他の 4 菌株については *B.anthraxis* 同様に初発菌数 10⁶CFU/0.1ml 以上のものが 10 分後にはほぼ不検出となり、以降はすべて不検出となった(添付グラフ 5)。

D. 考察

(1) 試験用の芽胞調製について

芽胞形成の段階としては添付の図に示すように、sporangium(芽胞を有する栄養細胞)から matured spore(成熟芽胞)となり脱殻した状態のものが見られる。今回 *B.anthraxis* 芽胞調製において、士官・盛岡・#52-1 といった保有株はすべて成熟芽胞となり、脱殻を起こした。しかし *B.cereus* 及び *B.thuringensis* の多くは培養後 autolysis の為に 5 日以上静置しても sporangium の状態にとどまっていた。懸濁状態及び菌数測定における再現性には問題なかったが、条件を合わせるためにこれらについて脱殻を試みた。

方法はリゾチーム、トリプシン及びパンクレアチンによる酵素処理と超音波処理(40kHz/25W)を実施した。リゾチーム処理により、*B.thuringensis* の脱殻は成功したが、*B.cereus* についてはどの酵素によっても脱殻は起こらなかった(後に *B.cereus* はほとんどがリゾチーム耐性であることが判明)。また超音波処理では脱殻はおこるものの、生菌数自体が減少してしまった(データは示さず)。これは超音波そのものが芽胞の生存に対して大きく影響した可能性が高い。

よって今回環境分離株を含めた *B.anthraxis* 以外の *Bacillus* 属菌で多くのデータ収集を試みようとしたが、脱殻の良好な 4 菌株での検討となった。今後 *B.anthraxis* の代用芽胞を考える上で、*B.cereus* などからの成熟芽胞調製も検討に入れるべきであろう。

(2) エタノールによる各消毒剤による不活性化効果について

① TGEV 及び類似ウイルスに関する不活性化について

TGEV は以前の検討より、各種消毒剤に対する感受性は SARS-CoV と非常によく類似している。今回エタノールによる不活性化効果が日常的にハンドリングで使われている濃度(70~80%)と作用時間(~15 秒)では、不活性化効果にばらつきが生じることが示唆されている。かつ実験室においてはスプレー方式で使用されることが非常に多いので、エタノールの初期濃度を確保することもまた困難であろう。とする

と除染におけるエタノール単独使用はリスクを伴う可能性がある。

添付グラフ 6 に示したが、TGEV に対しては Cation 系界面活性剤が非常に高い感受性を示し、塩化ベンザルコニウムが TGEV 及び SARS-CoV 両者に非常に高い感受性を有することはすでに確認している(添付グラフ 7)。またこれら Cation 系界面活性剤は優れた安定性を有すると共に、エタノールとの合剤使用も可能なので、高いリスクを伴う場合は Cation 系界面活性剤・エタノール合剤の使用(手指スクラビングや拭き取り)を強く推奨する。ただし Cation 系界面活性剤のウイルス感受性はウイルス種によって異なるため事前の確認が必要である。

② HAdV type3 の不活性化について

HAdV は Capsid virus の中でもエタノールに対する感受性は良いとされており、今回の試験においても 70%濃度で感染価低下が認められている。しかしながら実験汎用株である GB3 と他の臨床分離株では感受性がまちまちであり、すべての HAdV type3 の消毒・除染への適用は再考を要する。また当該ウイルスは院内感染の原因にも挙げられ、エタノールによる「妄信的」消毒もその要因となりうるかもしれない。これについては HAdV 株間における消毒剤感受性差も含め、引き続き検討中である。

(3) *Bacillus* 芽胞加熱不活性化について

今回 Pastuer I 苗株と 34F2 ワクチン株に加え、*B.anthraxis* 3 株および類似 *Bacillus* 属菌 4 株についての 100℃加熱処理による不活性化を検討したところ、全ての芽胞において 10 分以上の処理で 6log₁₀~7log₁₀ CFU の減少が確認された。また走査電顕による画像上も著大な形状変化が認められた(添付写真)。

よってすくなくとも *B.anthraxis* 芽胞に対する加熱処理は有効といえよう。これを利用して安全なゲノム DNA 及び病原性プラスミド DNA の抽出を行えると共に、こうした加熱不活性化芽胞による実習やシュミレーションも可能と考えられる。

ただし加熱処理による芽胞不活性化の確認はその都度必ず実施するものとする。

E. 結論

今年度の研究では、汎用の消毒用エタノールによるウイルス不活性化に関する問題提議をするとともに、そのリスクへの対処方法についても補足した。今後さらに汎用性を高めた方法を探査・検討する。

また炭疽菌芽胞 5 株と他の炭疽菌近縁 *Bacillus* 属菌芽胞 4 株についての加熱処理による不活性化を検討し、供試菌芽胞すべてにおいて、100℃加熱処理の有効性が確認された。今後この方法を利用したゲノム抽出方法やいわゆる「白い粉」としてのシュミレーションとそれによるリスク検討を進めたいと考える。

【謝辞】

Bacillus 属菌の分与に関して、本研究所 獣医科学部 藤田氏および寄生動物部 泉山氏に深謝する。

参考文献

- 1) 防菌防黴ハンドブック 日本防菌防黴学会編 技報堂出版
- 2) 消毒薬の使用指針 第三版 編集 日本病院薬剤師会 薬事日報社
- 3) 標準微生物学 第8版 医学書院
- 4) スポア実験マニュアル 近藤雅臣 渡辺一仁 編著 技報堂出版

F. 健康危険情報

特になし

G. 研究発表

1. 論文発表 なし
2. 学会発表

1) 高木弘隆、篠原克明、杉山和良 班用洗剤中の各種界面活性剤によるウイルス不活性化効果について 防菌防黴学会 第31回年次大会 2004年5月 東京

2) 高木弘隆、西藤岳彦、富田康浩、篠原克明、杉山和良 *Influenza virus* 株間における cation 系界面活性剤の感受性について 防菌防黴学会 第32回年次大会 2005年5月 大阪

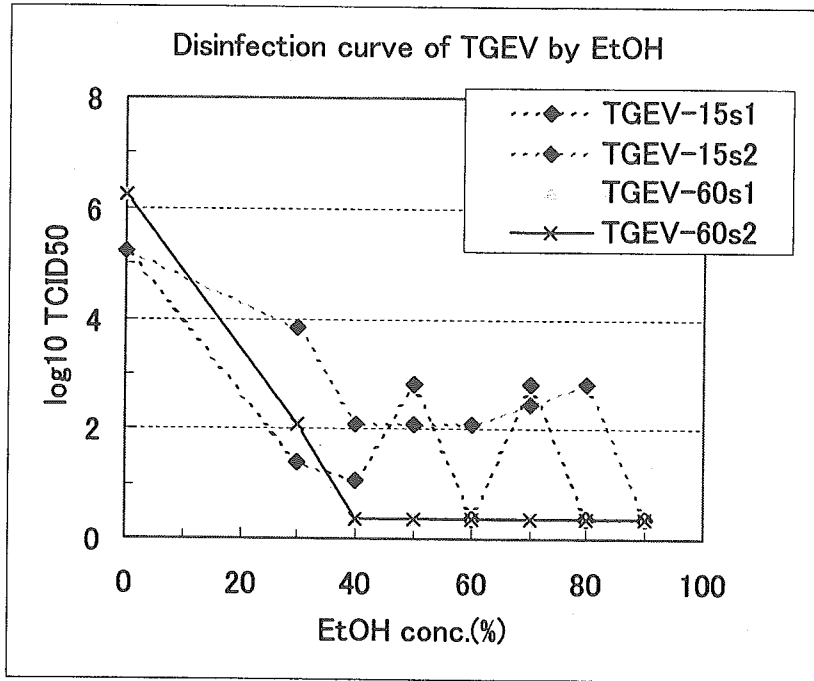
3) H Takagi, Y Tomita, K Shinohara, S Ando, K Sugiyama Decontamination by chemical disinfectants and safety method of genome isolation for *B.anthraxis* spores The 48th Annual Biological Safety Conference, Vancouver, BC Canada

H. 知的財産権の出願・登録状況(予定を含む)

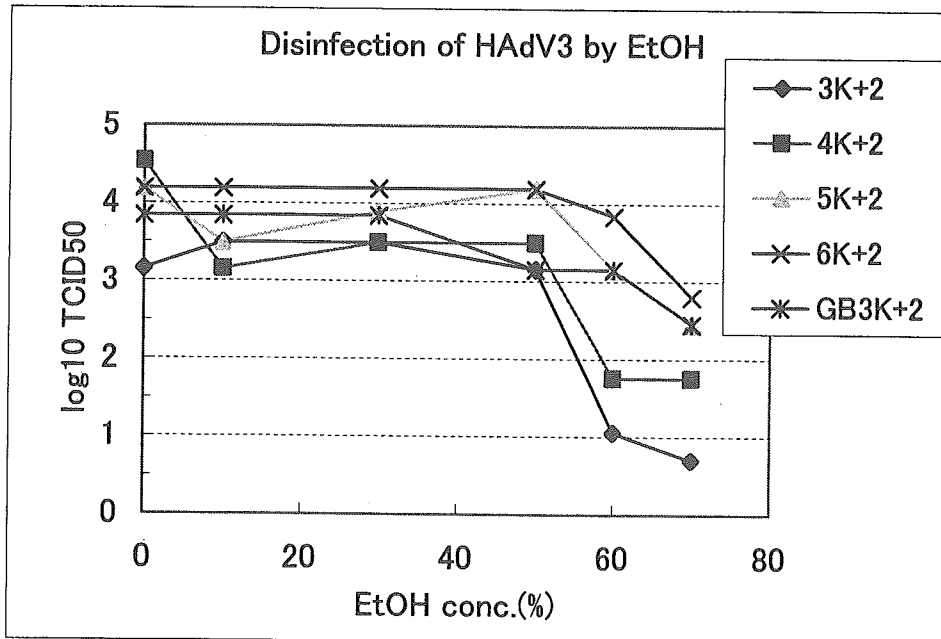
なし

添付資料

グラフ1. エタノールによる TGEV



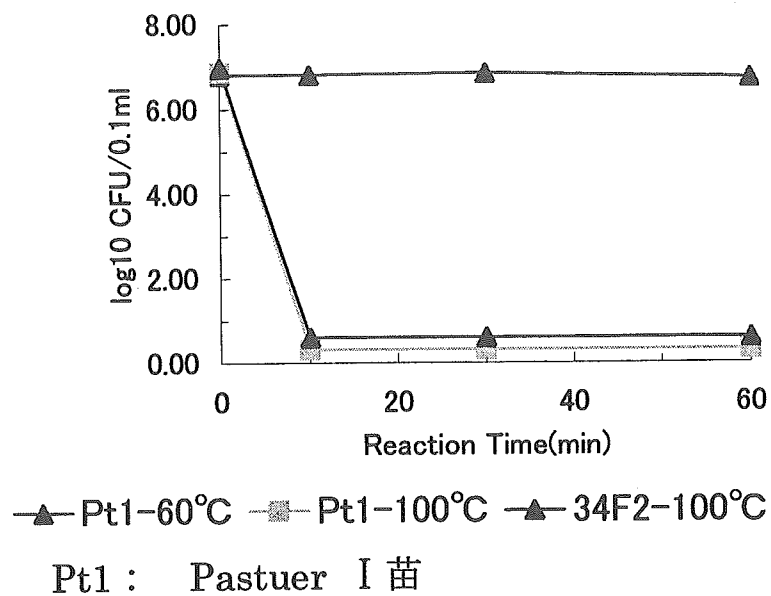
グラフ2. エタノールによるヒトアデノウイルス 3型の不活性化効果



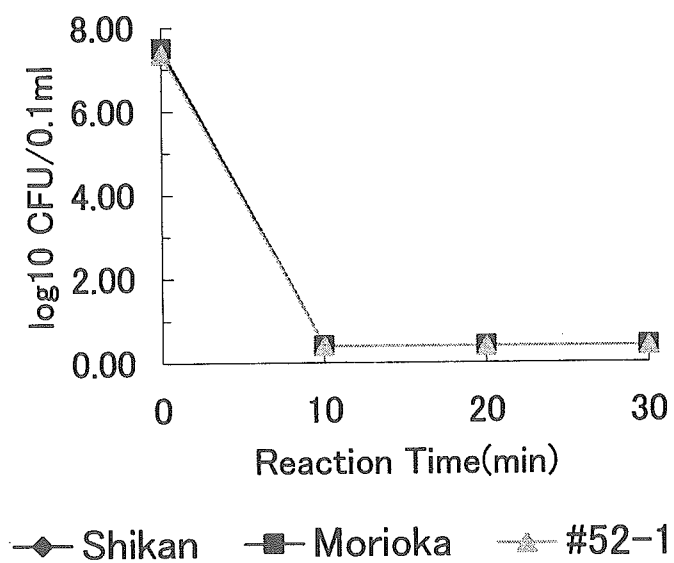
※3K+2～6K+2 は臨床分離株 code である。

添付資料

グラフ 3.

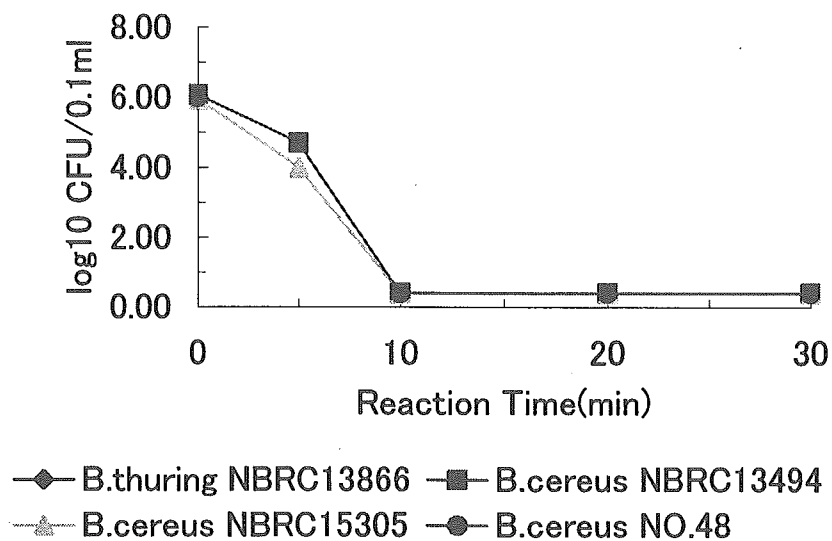


グラフ 4.

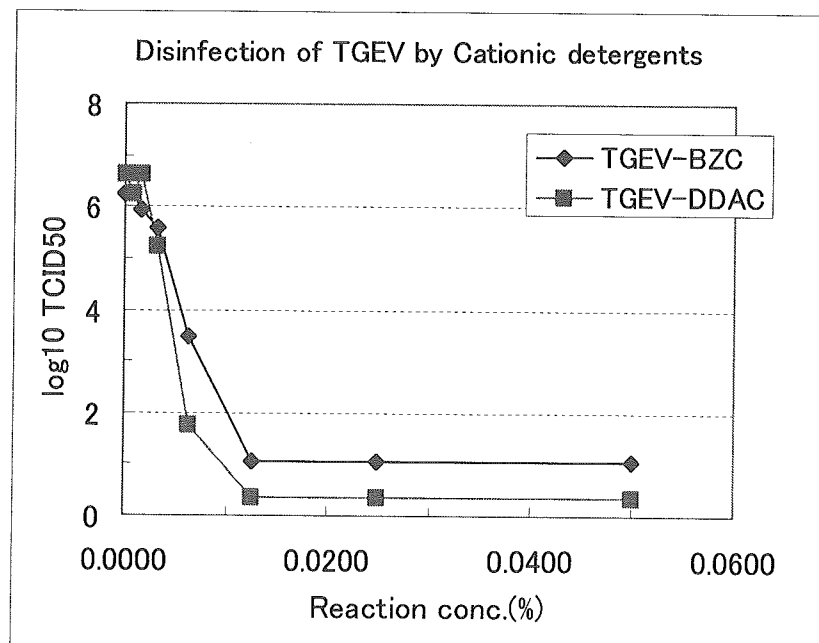


添付資料

グラフ 5.



グラフ 6.

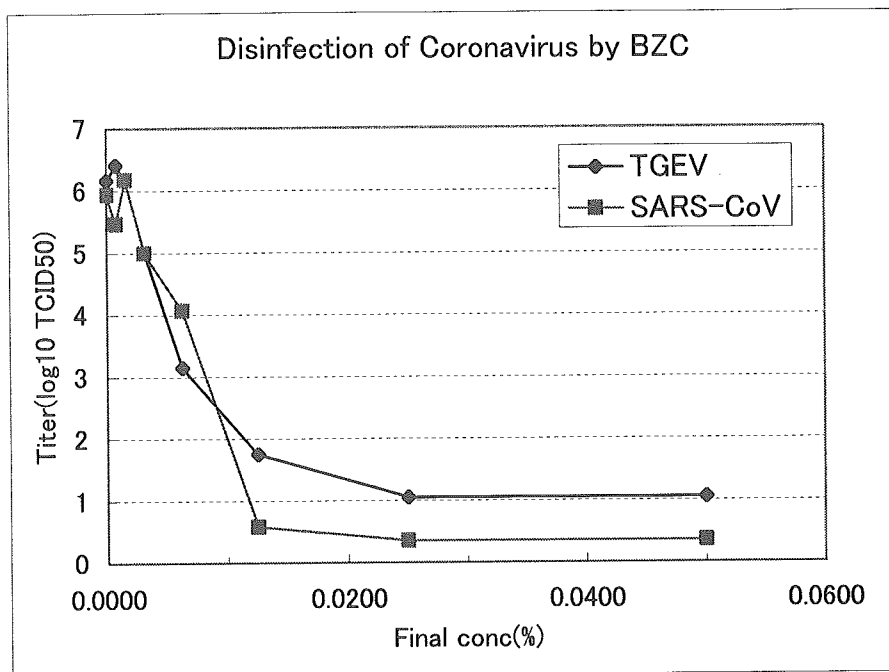


反応比率： virus: detergent=1:1、反応時間 2分

BZC：塩化ベンザルコニウム DDAC：塩化ジデシルジメチルアンモニウム

添付資料

グラフ7.



添付資料

図 Bacillus 属菌の生活環

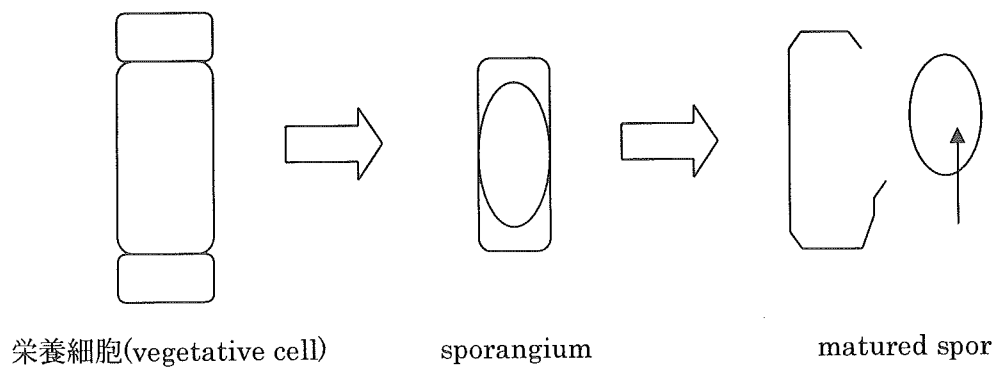
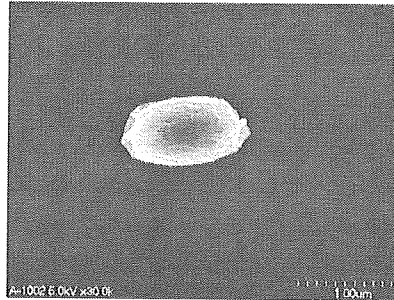
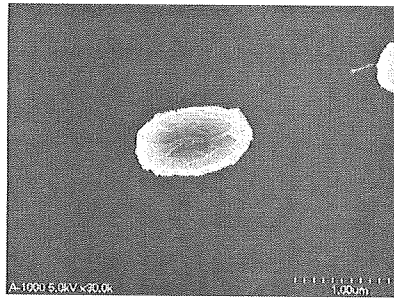
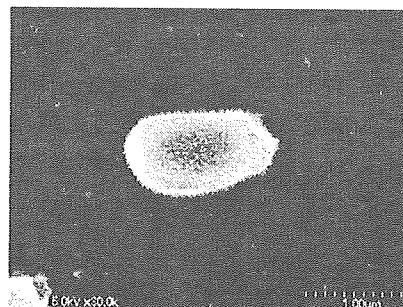
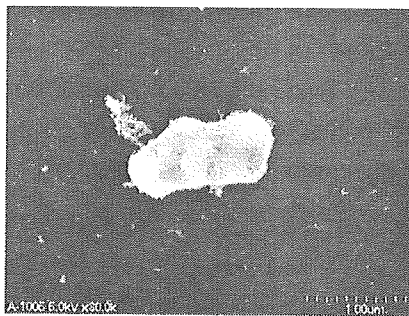


写真.

B.anthraxis Pastuer I 菌株

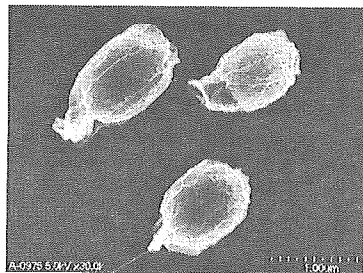


正常成熟芽胞

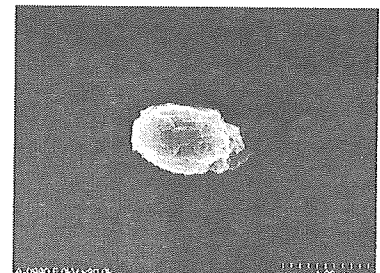
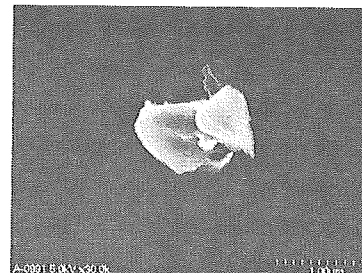


加熱処理芽胞

B.cereus NBRC15305



正常成熟芽胞



加熱処理芽胞

II-II. バイオセキュリティシステム構築小班