

Draft

2007/2/1

表 9 感染症危機管理に関する日本の WHO 指定研究協力センター

2005 年 5 月

指定分野	機関名
腸管感染ウイルスのレファレンスと研究	国立感染症研究所ウイルス第二部
ヒト・レトロウイルス性神経疾患	鹿児島大学医学部第三内科
ウイルス性肝炎のレファレンスと研究	長崎医療センター臨床検査部
インフルエンザや呼吸器ウイルスのレファレンスと研究	国立感染症研究所ウイルス第三部
熱帯病ウイルスのレファレンス及び研究	長崎大学医学部熱帯医学研究所
結核のレファレンス、研究、研修	結核予防会結核研究所
生物学的製剤の品質管理およびこれに関する研究	国立感染症研究所細菌第二部
特定動物実験	国立感染症研究所獣医科学部

出典 2005 年 8 月 31 日発行「国民衛生の動向」財団法人厚生統計協会

その他の海外の政府系研究機関としては、米国では CDC (Centers for Disease Control and Prevention, U.S. Department of Health and Human Services) や、NIH (National Institute of Health, U.S. Department of Health and Human Services の一部門)がある。

また、オーストラリアでは前述の通り Victorian Infectious Disease Reference Laboratory が西太平洋地域の WHO 協力センターであり、その他英国の Health Protection Agency (HPA, 以前の Public Health Laboratory Service) や National Institute for Biological Standards and Control、フランスの Institut Pasteur がある。

Draft

2007/2/1

BSL4（P4）実験室

最も危険な病原体である P4 レベルの病原体の診断（分離、同定）は前述したように BSL4 の実験室で実施する必要がある。世界には BSL4 の実験室が 20 箇所以上あり、日本の国立感染症研究所にも 1981 年に BSL4 の実験室が設置されたが、そこは地元自治体の要請により現在 P4 の病原体を扱うことができず、BSL3 の実験室として使用されている。したがって国内には P4 の病原体を扱うことのできる実験室がない状況である。そのことによる問題は、仮に P4 のウイルス性出血熱や天然痘といった病原体を原因とする病気が日本で発生した場合に十分な緊急対応ができないことである。2002 年以前であれば、米国 CDC が日本からの病原体検査送付の受け入れや日本人研究者の利用を認めていたが、2003 年 2 月の米国連邦法 42 条「"Possession, Use, and Transfer of select Agents and Toxins"」施行により、BSL4 病原体の検査受け入れも、日本人による重要病原体の調査・研究も不可能になった。

表 10 世界の BSL4 実験室

アメリカ	NIH
	CDC
	USAMRIID (US Army Medical Research Institute of Infectious Diseases)
	テキサス州立大学
	サウスウエスト財団
	ジョージア州立大学
	ボストン大学
イギリス	DSTL (Defence Science and Technology Laboratory)
	HPA
フランス	Inserm (Institut National de la Santé et de la recherche medicale)
ドイツ	マールブルク大学
スウェーデン	国立感染症対策研究所
カナダ	国立微生物研究所
南アフリカ	国立ウイルス研究所
ガボン	パスツール研究所
ロシア	ノボシビルスク ベクター研究所
インド	DRDE (Defence Research & Development Establishment) グアリオール)
オーストラリア	Victoria IDRL
台湾	国防大学予防医学研究所
日本	国立感染症研究所 (P4 として使用されていない)

Draft

2007/2/1

2 感染症危機管理に必要な実験室診断手技

実験室診断の精度は、検体の適切な収集、保存、輸送そして適切な時期に適切な方法で検査が行われるか否かによって決まる。以下の点に注意して実験室診断を実施する。

2.1 汚染除去

検査にあたって最も基本的なことは滅菌(sterilization)と消毒(disinfection)である。これは正確な結果を得るためには無菌でなければならないこと、およびバイオセーフティーのためである。

一般的な汚染除去方法

- 煮沸　　ぐらぐら煮立った状態のお湯（100℃）に20分間浸す。
- オートクレーブ　　加圧下で120℃を20分間保つ。滅菌するものは、水蒸気が中まで十分循環するように緩く包んでおく。
- 乾燥滅菌　　160℃のオーブンに45分間は入れること。主にガラス器具。
- 塩素（次亜塩素酸ソーダ）　　塩素はB型肝炎ウイルスを含む全ての微生物に対する消毒薬として広く用いられている。強い酸化剤であり金属を腐食させるが、有機物によってある程度不活化されることがある。塩素溶液は徐々に効力を失うのでたびたび新しく溶液を作る必要がある。0.02～0.5%で用いる。
- ヨウ素　　ヨウ素は植物性の生物、孢子、ウイルスおよび菌類に対する効果が高い。手洗い用の殺菌には44～50%のエタノール1リットルに対してヨウ素1.6グラムを加えた溶液が効果的で、その溶液に2分間浸すと細菌を80～90%除去することができる。しかし頻繁に用いると皮膚に炎症を起こす可能性がある。ヨードホールは水溶性のヨウ素の有機化合物複合体であり、皮膚に対する刺激は少ないが上記の溶液よりも殺菌効果は少ない。
- ホルムアルデヒド（ホルマリン）　　ホルマリンは1リットルの水にホルムアルデヒドを370グラムの割合で溶かしたものである。これを50グラム／1リットルに薄めたものが液体殺菌剤として効果的である。

Draft

2007/2/1

- アルコール（エタノール、イソプロパノール） エタノールとイソプロパノールは消毒薬として同じような性質を持つ。栄養細胞の細菌 vegetative bacteria、真菌、脂質含有ウイルスには効果があるが、孢子 spore には効かない。また、脂質を含有しないウイルスに対する効果はさまざまである。アルコール系は約70%(v/v)水溶液で最も効果的に作用し、それ以上でも以下でも殺菌力は落ちる。皮膚、実験室の作業台、バイオセーフティ・キャビネット、小型の外科用器具の消毒には70%(v/v)のエタノール水溶液が用いられる。アルコール水溶液の大きな利点は、処置したものに残留しないことであるが、蒸発により消毒効果が劣化しやすいので長期間の作り置きには向かない。

2.2 病原因子の特定

病原微生物による感染を診断するためには病原因子を特定せねばならず、それには大きく分けて次の4つの方法がある。

1. 病原体の分離(isolation)培養(cultivation)。
2. 検体中の特異的抗体を検出し測定する血清学的検査。
3. 検体中の病原微生物を直接観察あるいはその抗原を直接同定する。
4. 検体中の病原体の遺伝子を検出する。

まず最初に重要なことは検査の前に患者の症状や疫学状況などにより対象とする病原微生物を予想しなければならない。その予想に基づきどのような検体をつ採取するか、そして何をどの検査方法で検出するかといった検査方法が決定される。かつては1と2による検査が主流であった。しかしどちらも迅速性にかけるので、3、4の直接同定法が発達した。しかし、分離や血清学的方法は依然として基本であり、特にウイルスでは分離は最も大切な手技である。

2.2.1. 病原体の分離

病原性細菌のなかには炭素源や窒素源、無機塩類を含む標準的な培地で分離できるものもあるが、多くの微生物はそれぞれ特有の培地を必要とする。特に、病原因子が未知の場合、腐性菌を除外するための選択増菌培地を次々と使わねばな

Draft

2007/2/1

らない。真菌やマイコプラズマの場合も同様である。

リケッチア、クラミジア、そしてウイルスは、増殖するために生きている細胞を必要とするので、動物や培養細胞に検体を接種する。この場合でも病原因子の特定に関して手がかりがない場合、多種の培養細胞で分離が試みられる。

したがって従来の分離培養する方法では、時間がかかるだけでなく分離する方法も検体と目的により多様であり、培地も培養の目的とする病原体による使い分け、培養環境の選択といった実験室手技が必要とされる。

2.2.1.1. 病原細菌の分離と同定

細菌は菌種により生育環境に違いがあり、分離培養してそれぞれの細菌の基本的な生物学的特徴を確認することで菌種がだまかに見当つけられる。細菌の生育に成功すると集落、形態、運動性、染色性を観察し、グラム染色で形態的特徴を調べ、また糖分解・発酵、アミノ酸分解、カタラーゼ試験等の生化学的検査さらに抗体を用いた血清型特定結果を含めて総合的に判断する。

現在では後述するように 16S rRNA のデータが蓄積され、実験室でほぼ全ての病原細菌の検出が可能になったので、最近では DNA を使って菌種を同定することにより時間を短縮することが可能になったが、遺伝子診断系に過度に頼ると誤る可能性があるので、病原菌の分離同定は今も重要である。

2.2.1.2. ウイルスの分離と同定

検体中に少量しかなくても増殖によりウイルス自体が増える培養分離は、直接検出法よりも感度が高く信頼性の高い検査法である。ただし一部のウイルスは培養が不能である。ウイルス分離を行う場合には急性期のできるだけ早い時期に検体を採取する必要がある。採取した検体は乾燥を避け 4℃ で保存するか、直ちに分離を行わない場合には、-80℃ 以下に急速凍結させておく。

ウイルスは完全寄生性の生物であるので生きた細胞内（宿主）に寄生させ一定量以上に増殖させる。宿主としては、ウイルスの種類により培養細胞や実験動物、孵化鶏卵が用いられる。このうち培養細胞は動物や孵化鶏卵より取り扱いが簡便であり、より正確なウイルス定量が行える。実験動物は哺乳マウスやフェレット、サルなどが使われるが、ウイルスの種類によって宿主となる動物の種類とウイルスの接種ルートを選ばねばならない。孵化鶏卵は受精卵をある程度発育させたものが用いられ、接種部位は漿尿膜上、漿尿膜腔内、羊膜腔内、卵黄嚢内で、やはりウイルスの種類で接種ルートを選ばねばならない。また、孵化鶏卵には感受性を示すウイルスが限られているという難点がある。ウイルス粒子の観察あるいは

Draft

2007/2/1

ウイルス関連抗原検出により、ウイルス分離の判定が行われる。

ウイルスの同定： 一般にウイルスの同定では、ウイルス感染し破壊された細胞の形態変化（細胞変性効果 cytopathic effect (CPE)）の顕微鏡観察や電子顕微鏡を用いたウイルス粒子表面の形状により特定のウイルス科が推定され、単クローン抗体を用いた抗原性解析や特異抗体でのウイルス中和反応、遺伝子配列の確認、あるいは特異的プライマーを用いた PCR 法によって最終的な同定が行われる。

またウェスタンブロット法もウイルス抗原の特定に用いられる。この方法はウイルスを破壊し、ポリアクリルアミド電気泳動し各たんぱく質を分離、ナイロン膜などに転写し、検体血清と反応させ、洗浄後、結合抗ウイルス抗体を酵素ラベルした2次抗体（抗ヒト免疫グロブリン抗体）を加えて検出する。

2.2.2. 抗体診断系

これは、抗体の抗原に対する親和性が高く特異的に結合するという特性を利用した検査で、またこの検査の利点として、急性期に一時的に出現する病原因子を分離できる可能性が小さくても、抗体は感染から回復した後もずっと存在し続けるので病原因子を検出しやすいという点がある。

検査方法には以下のような種類がある。

- ◆ 凝集反応 agglutination（主に細菌系病原因子の場合）
- ◆ 補体結合 complement fixation
- ◆ 血球凝集阻止 haemagglutination inhibition, HI（主にウイルスの場合）
- ◆ 中和反応 neutralization
- ◆ 免疫電顕法 immune electron microscopy
- ◆ 免疫蛍光法 immunofluorescence, IF
- ◆ 酵素免疫測定法 enzyme immunoassay（酵素免疫吸着測定法、ELISA）

ある種の病気では、抗体（特に免疫グロブリン G, Immunoglobulin G, IgG）がしばらく高い抗体力価を持続する可能性があるため、実験室検査では罹患期間中に抗体価が上昇したことを確認する必要がある。したがって、2種類の血清検体（ペア血清）の検査が推奨されている。その場合、ひとつの血清標本は発症直後に採取したもの、そしてもうひとつは少なくとも7日後に採取することが望ま

Draft

2007/2/1

しい。

ある特定の病原因子に感染したことを確認するためには、特異的抗体の陽転（セロコンバージョン seroconversion；4倍以上の抗体価の上昇）を確認する必要がある。それよりも抗体価の上昇が低い時は実験結果の誤差であるかも知れない。しかし、ある種の病気では一体だけの血清検体(single serum)の高い抗体力価が新鮮感染の証拠となる場合もある。（ Dengue 出血熱における HI 価で 2560 倍以上）

ある病原体に生体が初めてさらされた時は、まず免疫グロブリン M (IgM) が産出されるが一定期間後には消失する。この特性から、特異的 IgM 抗体を測定することで一個の血清検体(single serum)でも新鮮感染を証明することができることから、感染初期における免疫グロブリン M(IgM)を検出する検査が利用される。

表 11 感染を判断する血清学的証拠のまとめ

標本	結果
一体の血清標本 Single serum	<ul style="list-style-type: none"> ・原因とみなされる病原因子に特異な IgM が存在する ・特異な複合抗体 (IgM+IgG) の高い抗体力価が見られ high titre of specific undifferentiated (IgM+IgG) antibodies、その病気に対して継続する免疫レベルよりも高い場合。
ペア血清 Paired sera	ある抗原に対して抗体力価 (IgM と IgG) が 4 倍以上に上昇

2.2.3. 形態観察、抗原検出系

直接の形態的特徴観察： 古典的な手技としては、病理学的材料の標本の染色（細菌のグラム染色法や寄生虫のギムザ染色）がある。比較的最近の手技としては、病原因子や抗原を、蛍光染料を血清とともに使う免疫蛍光法 (Immunofluorescence, IF) や基質に反応し色が現れる酵素を使う酵素免疫測定法 (Enzyme immunoassay EIA)、或いは酵素免疫吸着測定法 (Enzyme-linked immunosorbent assay, ELISA) がある。また、これらの方法は特にウイルス診断にとって革新的な検査方法でもある。EIA（あるいは ELISA）は、感度が高く抗原検出にも抗体測定にも利用できる。対向免疫電気泳動法 (counterimmunoelectrophoresis, CIE) のような寒天ゲルでの沈降反応を利用する技術は、病原因子から抗原性抽出物を準備することができ、かつ十分に強力な特異抗血清がある場合にある種の病気の診断に用いることができる。病原因子による身体器官の特異的病変を観察する組織病理学のおよび細胞学的染色法では、時には病原因子そのものを観察することもできる。脳脊髄液の化学検査における場合同様、体液の生化学反応（血液と脳脊髄液）も病気によっては診断に用いる

ことができる。

形態的特徴観察方法は数時間で結果が明らかになるという大きな利点がある。下表は形態的特徴観察方法の概略である。

表 12 形態的特徴観察方法の使用の概略

病原微生物	実験室手技					
	直接顕鏡法		IF	EIA と ELISA	組織病理学的、細胞学的方法	生化学的方法
グラム染色	ギムザ染色					
寄生性		+	+	+	+	+
真菌性		+	+	+	+	+
細菌性	+	+	+	+	+	+
マイコプラズマ		+	+	+		+
リケッチア		+	+	+	+	+
クラミジア		+	+	+	+	+
ウイルス			+	+	+(注)	+

注 病気によっては電子顕微鏡観察も行われる

2.2.4. 遺伝子診断系

各生物の遺伝子配列を直接比較することにより、種同士の違いを明らかにし、病原体の感染源を特定する方法が遺伝子による分類である。

1 6 SrRNA の比較

細菌から高等生物の細胞まで共通に存在するリボソーム RNA (rRNA) のうち、1 6 SrRNA を比較する。今日では1 6 SrRNA の遺伝子配列データがかなり蓄積されており、(2004 年現在) 細菌約 6,000 種 (990 属) のうち、97%にあたる菌種の配列がすでに決定され、3 つの国際的なデータベース (National Center for Biotechnology, European Molecular Biology Laboratory, DNA Data Bank Japan) に登録されている。系統の分からない未知の菌株の同定において、1 6 SrRNA の遺伝子配列を決定しデータベースと比較し系統的な位置を調べ菌種の決定を行う。

PCR (Polymerase chain reaction)

Draft

2007/2/1

目的とする病原体遺伝子の塩基配列のみを特異的に増幅させる手技である。PCR法を用いることにより、検体中にごく微量のDNAあるいはRNAしかなくても効率よく検出できるので感度の高い検査を行うことができる。増幅したい領域を含む鋳型DNAを熱変性により1本にし、耐熱性ポリメラーゼと過剰量の1対のプライマーを含む反応液中で反応させ、相補的なDNA鎖を繰り返し合成する。図7にDNAを使った菌種決定手順を示した。

2.3. 実験室診断における誤りの原因

実験室診断は感染症流行の原因因子を特定する上で不可欠な要素である。しかし実験室診断を誤ると、緊急で公衆衛生的な感染症対応策を誤らせて感染症流行による被害を増幅する結果となることがある。したがって、診断には極力誤りがないように細心の注意を払わねばならない。

実験室検査の解釈で起こる誤りの原因として表12のような要因がある。

表12 実験室検査結果の解釈における誤りの原因

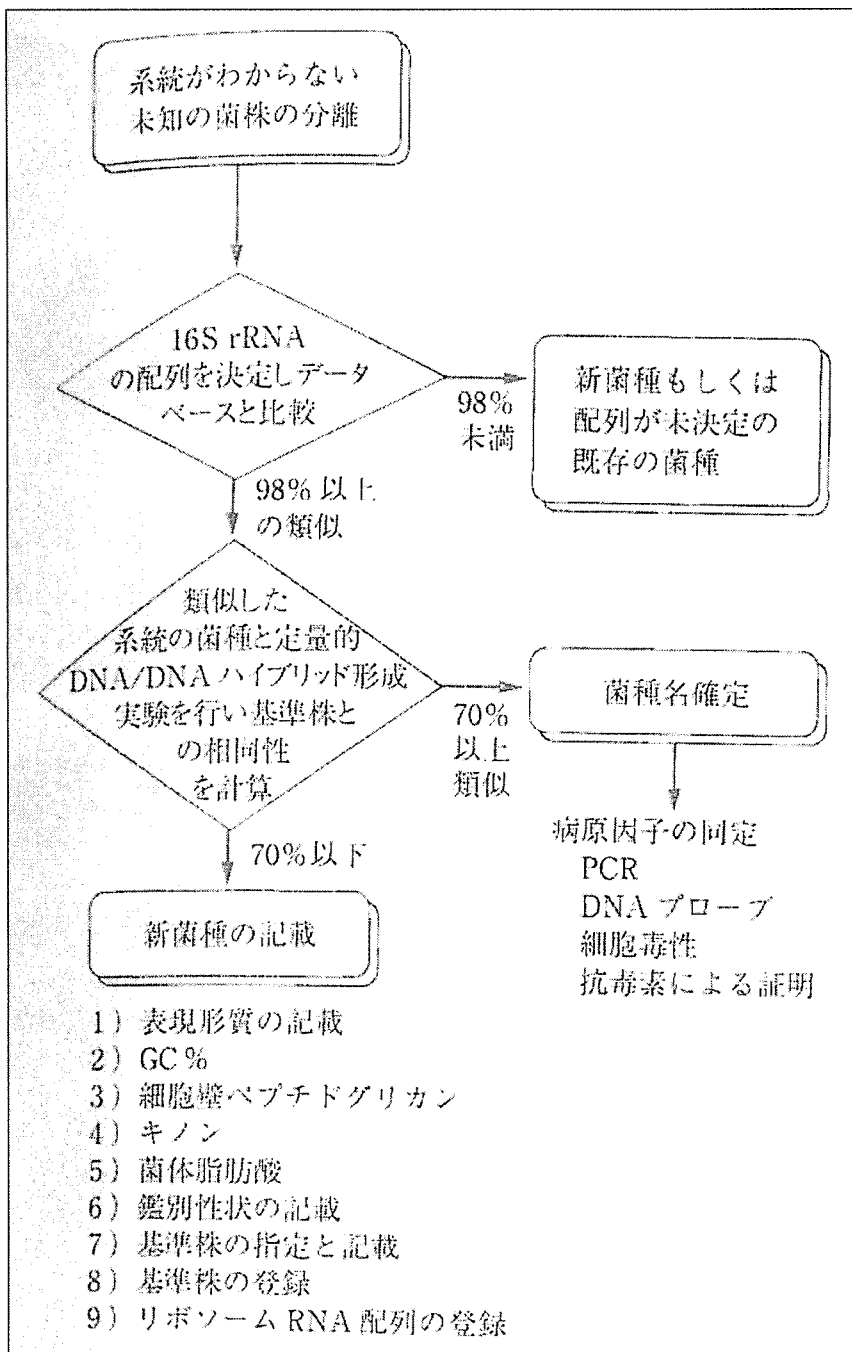
擬陽性	擬陰性
形態的特徴観察	
腐生菌の存在 Saprophyte present	不適切なサンプル採取 Inappropriate sampling
非特異的染色 Non-specific staining	不適切な染色 Inappropriate dye
	電子顕微鏡が必要 Need for electron microscopy
	標本中の病原物質の不足 Scarcity of agent in specimen
分 離	
病原体よりも感染症とは関係のない微生物の方が検出しやすかったか、標本の保存条件に持ちこたえられた Trivial agent easier to detect than causative agent or withstands storage conditions of specimen better	不適切なサンプル採取：標本が不適切であったか、標本を採る時期が不適切であった Inappropriate sampling: specimen inadequate or sample taken at wrong time
同時に風土病に感染（例えばマラリアや充血吸虫症） Concurrent endemic infection (e.g., malaria, schistosomiasis)	保存条件による病原体の損傷：熱、凍結融解サイクル Damage to agent by storage conditions: heat, freezing-thawing cycles
同時に存在する二つの病原体のうち一つ	不適切な実験室手技 Inappropriate

Draft

2007/2/1

しか分離しなかった Only one of two concurrent agents is isolated	laboratory techniques
毒物によって一義的に引き起こされたアウトブレイクに同時に病原体が存在していた Concurrent pathogen in an outbreak primarily caused by a toxic agent	「新しい」病原体を分離するには普通とは異なる条件が必要であった“new” agent requiring unusual conditions for isolation
標本や試薬の汚染 Contamination of specimens or reagents	免疫複合体の存在 Presence of immune complexes
血清学的方法	
風土病や関係のない病原体に対する抗体の存在 Presence of antibodies to endemic disease or trivial agent	標本が誤った時期に採取された Sample taken at wrong time
抗原的に関係のある病原体に相互反応する抗体 Antibodies cross-react with antigenically related agent	不適切な手技：特異性と感度の不足 Inappropriate techniques: lack of specificity and sensitivity
非特異反応 Non-specific reaction	免疫複合体の存在 Presence of immune complexes
過去の免疫付与 Previous immunization	
IgM 抗体に対して： 過剰な IgG リウマチ因子 For IgM antibodies: Excess of IgG Presence of rheumatoid factors	
遺伝子検出系（PCR）	
PCR過程でのPCR産物の汚染（コンタミネーション）	RT-PCRにおいてサンプルの不適切な処理によるRNAの破壊

図7 「標準微生物学」 p 1 3 3 の「DNA を使った菌種の決定手順」



2.4. 安全手技

実験室でのバイオセーフティーは施設や機材によってのみ保証されるものではない。実験者1人ひとりが安全手技に精通し適切に機器を使用することも極めて重要な要素であり、望ましい安全な実験手技を世界保健機関（WHO）では GMT（Good Microbiological Technique）と称している。GMTにはピペットの使用法の注意点、注射針をつけた注射器をピペット代わりに使うことの禁止、実験後の実験台の消毒方法、安全キャビネットの利用手順、ラテックス・グローブ、マスク、キャップ、ゴーグルの着用、プラスチック器具（ピペットなど）使用促進、採血処理や遠心機およびミキサー利用上の注意点、廃棄物の処理、病原体の輸送方法など115項目に及ぶ。

微生物実験に携わる場合には実験を開始する前にこのような GMT をよく習熟し、使用する病原体に対応した封じ込めレベルの実験室において研究を実施しなければならない。

参考として、WHO のバイオセーフティー・マニュアルに述べられている「実験室手技（Laboratory Techniques）の項目を挙げておく。

1. 実験室での検体の安全な取り扱い方 Safe handling of specimens in the laboratory

検体の採集、輸送、あるいは実験室内での取り扱いが不適切であると、それに関わる人たちは感染リスクを負うことになる。

➤ 検体容器 specimen containers

検体容器はガラス製でも良いが、プラスチック製が望ましい。頑丈であって、蓋やストッパーが正しく使用されている時に漏れがあってはならない。容器の外側にどんな物質も付着してはならない。中身が何かすぐ分かるよう、容器には正しくラベル表示しなければならない。検体リクエストや特定するための書類は容器の周りに巻きつけず、容器とは別にして、できれば防水タイプの封筒に入れるべきである。

➤ 施設内での検体の運搬 transport of specimens within the facility

不測の漏れやこぼれを防ぐために、箱のような第二の容器を棚にそぐわせて使用し、その中で検体容器をまっすぐ立てた状態に保たなければならない。第二の容器は金属もしくはプラス

Draft

2007/2/1

チック製で、オートクレーブにかけることができ、化学的な消毒に耐えるものであれば良い。シールはガスケット付きが望ましい。それらを定期的に汚染除去しなければならない。

- 検体の受領 receipt of specimens
多くの検体を受領する実験室は、受領する検体のために専用の部屋か場所を確保しなければならない。
- 容器の開封 opening packages
検体を受領し開封する人は付随する健康危機の可能性を意識していなければならない。標準予防策 (Standard precautions) を取るよう訓練されていなければならない。特に壊れたり、中身がもれたりしている容器を取り扱うときは尚更である。第一の検体容器は生物学的安全キャビネット内で開けなければならない。消毒薬を手元に備えておくべきである。

2. ピペット使用及びピペットエイドの使用 Use of pipettes and pipetting aids

- (a) 常にピペットエイドを使用すること。口を使ったピペット操作は禁止しなければならない。
- (b) ピペットはすべてピペット装置の汚染を軽減するために棉の栓を付けなければならない。
- (c) 病原菌を含む液体を通して空気が吹き出されてはならない。
- (d) ひとつのピペットで交互に吸引と排出をすることにより（複数の）感染性材用を混合してはならない。
- (e) ピペットから強制的に液体を排出してはならない。
- (f) mark-to-mark pipettes は最後の一滴の排出をしなくて良いので他のピペットより望ましい。
- (g) 汚染されたピペットの廃棄にあたって、適当な消毒薬を壊れない容器に準備し、廃棄前のピペットをその消毒薬に完全に浸し、適切な期間そのまま置いてから廃棄すること。
- (h) ピペットの廃棄用容器は生物学的安全キャビネットの外部ではなく、内部に設置すること。
- (i) 皮下注射針を装着したシリンジは決してピペットとして使用してはならない。
- (j) ピペットの使用を可能にし皮下注射針とシリンジを使わずに済む septum-capped bottles 開栓装置を使うこと。

Draft

2007/2/1

- (k) ピペットから滴り落ちた感染性材用の散乱を防止するため、作業スペース表面には吸収材料を置くこと。これは使用後感染性廃棄物として廃棄すること。

3. 感染性材用の飛散回避 Avoiding the dispersal of infectious materials

- (a) 感染性材用を飛び散らせないために、白金耳は直径2～3 mmで輪が完全に閉じたものでなければならない。また、振動を最小限にするため、柄は6 cm以下でなければならない。
- (b) 白金耳の滅菌には閉鎖された電子超小型焼却炉 microincinerator を使用し、むき出しのブンゼンバーナーの炎の中で感染性材用を飛散させるリスクを回避しなければならない。再度滅菌する必要のない使い捨て transfer loop の使用が望ましい。
- (c) 唾液や痰の標本を乾燥させる際にエアロゾル化を避けるよう注意しなければならない。Care should be taken when drying sputum samples, to avoid creating aerosols.
- (d) 標本や培養物の廃棄物でオートクレーブ処理されるものや廃棄されるものは、実験室用の廃棄袋のような漏出防止容器に入れなければならない。そういった漏出防止廃棄物容器に捨てる前に上端が（例えばオートクレーブ・テープで）しっかり封されていることを確認しなければならない。
- (e) 作業エリアは作業期間が終わるたびに適切な消毒薬で汚染除去されなければならない。

4. 生物学的安全キャビネットの使用 Use of biological safety cabinets

- (a) 生物学的安全キャビネットを使用する可能性のある者全員に使用方法と限界を国家規格や関連文書に準拠して周知しなければならない。書面にした手順や安全マニュアルもしくは操作マニュアルを職員に与えなければならない。特に、キャビネットを使用しても漏出、破損あるいは技術不足による事故から使用者を保護するものではないことを明示しなければならない。
- (b) キャビネットは正常に機能していなければ使用してはならない。

Draft

2007/2/1

- (c) キャビネットの使用中にガラスののぞきパネルを開けてはならない。
- (d) キャビネットには最低限の装置と材料しか入れてはならない。後部プレナムの空気循環は阻害されてはならない。
- (e) ブンゼン・バーナーをキャビネット内で使用してはいけない。熱が空気の流れを歪め、フィルターを損傷するかも知れないからである。Electric Microincinerator は許容範囲だが、sterile disposable transfer loopの方が好ましい。
- (f) 全ての作業が作業面の中央から後ろよりの部分で行われ、覗きパネルを通して見えなければならない。
- (g) 作業者の背面の人や物の行き来は最小限に抑えられなければならない。
- (h) 作業者は腕を繰り返し出し入れすることにより空気の流れを妨げることを慎むべきである。
- (i) Air Grill をメモ、ピペットやその他の道具で塞いではいけない。塞ぐと空気の流れが阻害され道具の汚染、ひいては作業者の暴露につながりかねないからである。
- (j) 作業終了後と一日の終わりに生物学的安全キャビネットの表面を適切な消毒薬を使って拭かねばならない。
- (k) キャビネットでの作業開始前と作業終了後に少なくとも5分間はキャビネットの換気扇をオンにしていなければならない。
- (l) 事務書類は生物学的安全キャビネットの中に入れてはならない。

5. 感染性材用の摂取及びそれらと皮膚や目との接触回避 Avoiding ingestion of infectious materials and contact with skin and eyes

- (a) 微生物の取り扱い時に飛散した大きな粒子や小滴（直径5 μm 以上）は作業台表面や取扱者の手に素早く付着する。使い捨て手袋を装着し、実験室で作業する者は口、目、顔を触らないようにしなければならない。
- (b) 食べ物や飲み物は実験室内で保存したり、飲食してはいけない。
- (c) 実験室内ではペン、鉛筆、チューインガム等いかなるものも口の中に入れてはいけない。
- (d) 実験室内で化粧をしてはいけない。

Draft

2007/2/1

- (e) 感染性材用であるかもしれない物質が飛び散りかねない操作を行う際はいつでも顔、目、口を覆うか何かで保護しなくてはならない。
6. 感染性材用の注入回避 Avoiding injection of infectious materials
- (a) 破損したガラス製品やそのかけらによる怪我で感染性材用を植えつけてしまう事故は、習慣や手順に注意を払うことで防止できる。ガラス製品は可能な限りプラスチック製品に置き換えるべきである。
 - (b) 皮下注射器（注射針）、ガラスのパスツールピペットや壊れたガラス等の尖ったものによる怪我から感染する事故が起こることもある。
 - (c) 注射針による怪我は、(i) 注射器や針の使用を最小限にすること（隔壁様のもので栓をした瓶 septum-stoppered bottle を開ける簡単な装置があり、それを使うとピペットを注射器や針の代わりに使うことができる）、また(ii) 注射器や針を使わねばならない場合にそういった鋭利なものを安全に使うことのできる装置を用いることにより減らすことができる。
 - (d) 注射針はけっして再度装着してはならない。使い捨てのものを蓋付きの対穿刺性容器に捨てねばならない。
 - (e) ガラス製の Pasteur pipettes はプラスチック製のものに置き換えねばならない。
7. 血清の分離 Separation of serum
- (a) 適切な訓練を受けたスタッフしかこの作業に従事してはならない。
 - (b) 手袋と目及び粘膜メンブレン保護用品を付けて作業しなければならない。
 - (c) しぶきやエアロゾルは適切な実験室手技によってのみ防止あるいは最低限に抑えることができる。血液や血清は丁寧にピペットで取り扱い、激しくそそいではいけない。口を使ったピペット操作は禁止しなければならない。
 - (d) 使用済みピペットは適切な消毒薬に完全に浸さねばならな

Draft

2007/2/1

い。そして廃棄あるいは再使用の為の洗浄と消毒の前に十分な時間浸したままにしなければならない。

- (e) 血の塊等を入れている廃棄標本試験管をオートクレーブにかけ焼却処理する時は適切な漏出防止容器に入れなければならない。
- (f) しぶきや漏出を汚染除去するために適切な消毒薬が用意されていないなければならない。

8. 遠心分離機の使用 Use of centrifuges

- (a) 実験で遠心分離機を使用する際、パフォーマンスに問題のない機械を用いることは微生物検査の安全を保つ為の必須条件である。
- (b) 遠心分離機は製造メーカーの指示に従って操作しなければならない。
- (c) 遠心分離機は作業者が trunnions やバケットを正しく取り付けのためにボールの中を覗き込める高さに設置すべきである。
- (d) 遠心分離機のチューブと遠心分離機内で使う検体容器は厚いガラスかできればプラスチック製のものを使い、使用前に不具合がないか点検しなければならない。
- (e) 遠心分離機にかける時は、チューブと検体容器は常に確実に蓋をしなければならない。その場合、ネジ式の蓋であることが望ましい。
- (f) バケットはしっかり装着し、平衡にし、密閉し、開けるときは安全キャビネット内で開けなければならない。
- (g) バケットと trunnions は重さが釣り合うようにし、チューブを適切な位置に置き、正しくバランスするようにしなければならない。
- (h) 遠心分離機内のチューブに最大どれだけの液体を入れることができるかは、メーカーの指示に従うこと。
- (i) 空のバケットをバランスさせるためには蒸留水かアルコール（70%のプロパノール）を使うべきである。生理食塩水や次亜塩素酸溶液は金属を腐食させるので使うべきでない。
- (j) リスクグループ3と4(P3とP4)の微生物を扱う場合は、密封式遠心分離機バケット（安全カップ）を用いなければならない。

Draft

2007/2/1

- (k) アングルヘッド遠心分離機ローターを使う時には、漏れの恐れがあるのでチューブを積みすぎないように注意しなければならない。
- (l) 遠心分離機ボウルの中はローターのレベルで染みや汚れがないか毎日点検しなければならない。そして染みや汚れが顕著である場合、遠心分離のプロトコルを再評価しなければならない。
- (m) 遠心分離機のローターとバケットは腐食の兆しや細かいひび割れがないか毎日点検しなければならない。
- (n) バケット、ローター及び遠心分離機ボウルは毎回使用後消毒しなければならない。
- (o) バケットは使用後、バランスさせるために使った液体がきれいよう上下逆さまに置いて置かねばならない。
- (p) 遠心分離機使用中に空気中で浮遊する感染性材用の粒子が排出されるかも知れない。遠心分離機が伝統的な前面の開いたタイプのクラス1やクラス2の生物学的安全キャビネットに設置されている場合、これらの粒子は浮遊スピードが速すぎてキャビネットの気流で捕捉できない。クラス3の安全キャビネットに、囲みのある遠心分離機であれば、放出されたエアロゾルが広い範囲に撒き散らされることは防止できる。とはいえ、正しい遠心分離機の手技と確実に蓋の閉まるチューブがあれば、感染性エアロゾルと粒子の拡散から十分な保護が得られる。

9. ホモジナイザー、シェーカー、ミキサー、音波粉碎機の使用 Use of homogenizers, shakers, blenders and sonicators

- (a) 家庭用（台所用）ホモジナイザーは漏れやエアロゾルの放出が起こりかねないので、実験室では使用してはならない。
- (b) キャップやカップ、ボトルは良好な状態であるべきであり、傷や変形があってはならない。キャップはしっかり閉まり、ガスケットも良好な状態でなければならない。
- (c) ホモジナイザーやシェーカー、音波粉碎機が稼動している間に容器内に圧力が高まる。その影響で感染性材用を含むエアロゾルがキャップと容器の間から漏れ出す可能性がある。そうしたことを考えると、容器がガラス製であった場

Draft

2007/2/1

合、ガラスが割れることにより感染性材用が放出されたり作業者が怪我をしたりする可能性があるので、容器の材質はプラスチック、特にポリ四フッ化エチレン（PTFE）が推奨される。

- (d) ホモジナイザーやシェーカー、音波粉碎機を使用する時は、透明な強化プラスチックケーシングで覆われなければならない。
- (e) コンテナは操作の最後に生物学的安全キャビネット内で開けなければならない。
- (f) 音波粉碎機を使用する人には聴覚保護具を支給しなければならない。

10. 細胞組織粉碎機 Use of tissue grinders

- (a) ガラス製の粉碎機は手袋をはめた手で吸収剤材料に包んで手に取られなければならない。プラスチック（PTFE）製の粉碎機はより安全である。
- (b) 組織粉碎機は生物学的安全キャビネット内で操作、開閉しなければならない。

11. 冷蔵庫及び冷凍庫の管理と使用 Care and use of refrigerators and freezers

- (a) 冷蔵庫やディープフリーザー（ -80°C ）、ドライアイスの貯蔵棚は定期的に霜取りや掃除をし、貯蔵中に破損したサンプル、チューブ等は取り除かねばならない。掃除の際には顔面保護材と頑丈なゴム手袋を身に付けなければならない。掃除後はキャビネット内の表面を消毒しなければならない。
- (b) 冷蔵庫等に貯蔵されている全ての容器には内容物を表す科学名、貯蔵した日及び貯蔵した人の名前を書いたラベルを貼らねばならない。ラベルの無い、あるいは古い日付のものはオートクレーブ後廃棄されなければならない。
- (c) 冷凍庫内の貯蔵物は常にリストにしておかなければならない。
- (d) 引火性の溶剤は防爆機能のある場合以外は冷蔵庫に入れてはならない。また、防爆機能付きの冷蔵庫である場合はその旨をドアに張らねばならない。

Draft

2007/2/1

12. 感染性材用のアンプルの開封 Opening of ampoules containing infectious materials

フリーズドライされた材用のアンプルは、アンプル内の気圧が減圧されている可能性があり、その場合開封することで空気が急激にアンプル内に流入し、中身を大気中に撒き散らすことがあり得る。従って開封には注意が必要である。アンプルは常に生物学的安全キャビネット内で開封しなければならない。その場合、以下の手順が推奨される。

- (a) アンプルの外面の第一の汚染除去。
- (b) チューブの表面に（もしあれば）綿やセルロースの栓の真ん中近くにやすりで印を付ける。make a file mark on the tube
- (c) やすりで印を付けた所で壊す前に手を守るためにアンプルはアルコールに浸した綿に包んで持つ。Hold the ampoule in alcohol-soaked cotton to protect hands before breaking it at a file scratch.
- (d) 上部を静かに取り除き、汚染材用を扱うように取り扱う。
- (e) 栓がまだアンプルの中身より上にある場合、殺菌したピンセットで取り除くこと。
- (f) 泡立ちを防ぐため再懸濁用の液体はゆっくり加える。

13. 感染性材用のアンプルの保管 Storage of ampoules containing infectious materials

感染性材用の入ったアンプルは決して液体窒素に浸してはならない。なぜならばひびが入っていたり、封が不完全なアンプルが壊れ、取り出すときに破裂する可能性があるからである。非常に低い温度が必要な場合、アンプルは液体窒素の上のガスの中に貯蔵しなければならない。そうでないならば、感染性材用は機械式の deep-freeze cabinet 内かドライアイス上に置いて貯蔵されなければならない。実験室で作業する者は、アンプルを低温貯蔵から取り出す時は目と手の保護具を身に着けなければならない。

また、上記のような方法で低温貯蔵されていたアンプルを取り出す際にはアンプルの外表面を消毒しなければならない。

14. 血液、その他の体液、細胞組織、排泄物についての標準予防策 Standard precautions with blood and other body fluids, tissues and