

添付資料 2

地方衛生研究所におけるポリオウイルス保有に関する調査（平成 17 - 18 年度）

集計結果 - 1

1. ポリオウイルス保有状況

設問	回答	回答数*	割合(%)**
1-1 野生株ポリオウイルスを 保有しているか？	保有している	9	12
	可能性のある材料を保有している	2	2.7
	不明な検体を保有している	4	5.3
	保有していたが廃棄した	6	8.0
	保有していない	59	79
	計	80	
1-2 VDPV を保有しているか？	保有している	10	13
	可能性のある材料を保有している	10	13
	未検査検体を保有している	20	27
	保有していたが廃棄した	1	1.3
	定義がよく分からない、記載無し	0	0
	保有していない	46	61
計	87		
1-3 OPV 株を保有しているか？	保有している	33	44
	可能性のある材料を保有している	14	19
	同定済 OPV 株を保有している	23	31
	未同定 OPV 株を保有している	11	15
	定義がよく分からない、記載無し	0	0
	保有していない	25	33
計	106		
1-4 今回調査を実施した部門	ポリオ・エンテロ実験室	1	1.3
	ウイルス検査実験室	44	59
	感染症部門	19	25
	すべての検査部門	3	4.0
	施設内すべて	4	5.3
	不明、記載無し	4	5.3
計	75		

回答数*：複数回答あり

割合(%)**：アンケート回収 75 施設中における割合

地方衛生研究所におけるポリオウイルス保有に関する調査（平成 17 - 18 年度）

集計結果 - 2

2. ポリオウイルス野生株 (VDPV) 保有施設 (29 施設) に対する調査

設問	回答	回答数*	割合(%)**
2-1 保管している野生株 ポリオウイルスある いはVDPVの種類	野生株 (日本分離株)	3	10
	野生株 (海外分離株)	0	0
	実験室標準株	7	24
	VDPV	7	24
	未同定ポリオウイルス株	15	52
	未検査検体	4	14
	ポリオ核酸検体	1	3.4
2-2 野生株ポリオウイルス あるいは VDPVの使用状況	その他	2	6.9
	BSL-2 で使用	9	31
	BSL-2/polio で使用	1	3.4
	BSL-3 で使用	0	0
	保有しているが使用していない	17	59
2-3 野生株ポリオウイルス あるいは VDPVの使用予定	その他	1	3.4
	今後とも使用する	1	3.4
	今後とも保管する	6	21
	廃棄予定	5	17
	使用予定無、要請により廃棄可	12	41
2-4 ポリオウイルス 保管記録簿	使用予定有り、要請により廃棄可	5	17
	その他	0	0
	有り	22	76
2-5 ポリオウイルス 抗体検査	無し	7	24
	その他	0	0
	実施	4	14
2-6 ポリオウイルス ワクチン接種	未実施	25	86
	その他	0	0
	実施	1	3.4
	未実施	27	93
	その他	1	3.4

回答数*：複数回答あり

割合(%)**：野生株 (VDPV) 保有施設 (29 施設)における割合

病原体管理のシステム化に向けての基礎調査

分担研究者 杉山和良 国立感染症研究所バイオセーフティ管理室

協力研究者 原井基博 富士ソフト株式会社ソリューション事業本部

研究要旨：本研究では、これまで実施してきたバイオセキュリティにおける概論と手法の確立を目指した業務モデルの研究を基に、病原体（検体を含む）の受入から保管管理までの一連の業務フローに対して、バイオセキュリティを考慮したシステム化に必要な要件の現況調査を行った。調査方法としては、現在、不特定の調査依頼検体の中から病原体等（病原性のウイルス・細菌等）の調査・研究・同等等の実務に従事している研究者へのヒヤリングを行い、その調査結果から、病原体管理システム化モデルの策定・検討を行った。これにより、外部からどのような病原性のあるものか分からない検体を受ける研究者が安全に病原性を確定し、それをどういうレベルで、保管管理の対象として扱うかまでの流れについて考察した。入荷業務、入庫業務、出庫業務、出荷業務、保管業務、管理業務という業務内容に対し、システム化モデルでは、対象となる管理検体、保管容器、保管場所、管理区域など、具体的な取り扱い方法から、検体検査管理機能、倉庫管理機能、情報照会機能の3機能を軸としたシステム化を図った。また、これに対して、RFID、バーコード等のIDタグ付けのシステム導入を検討し、有効性の可能性が認められた。

A. 研究目的

バイオセーフティは、研究・医療施設における感染事故のリスクを最小限にし、実験室や（検査室）の作業者を感染事故から守ること、実験室外環境への病原体汚染を防ぐことを目的とする。また、意図的な病原体の使用によるテロや製品に損傷を加えること等を如何に防ぐかがバイオセキュリティの課題である。これらの病原体を含む微生物検体管理のシステムについて有効な

モデル化を行うため具体的な検体取り扱いについて業務フローの検討を行った。

管理システム化の目的としては、以下の項目を設定し、対象となる業務の調査を実施した。

- 1) 検体の取り違い等の防止
- 2) 検体からの感染の防止
- 3) 作業の効率化
- 4) トレーサビリティの確立

バイオセーフティでは管理に関わる運営

面の問題と施設、安全装置、防護用具などのハード面が相互に組み合わさることが重要である。そのため病原体管理のシステム化については、施設現場での管理体制と一体的に考察する必要がある。

今回の研究では、国立感染症研究所（以下、感染研）と、（財）結核予防研究所（以下、結核研）の協力を得て現況調査を実施した。感染研バイオセーフティ管理室は、感染研全体にわたる病原体等の安全な取り扱いに関する管理業務および共同利用施設である BSL3 と 4 実験室（指定実験室）の一元的な管理・運営を担っている。

本研究では、病原体等安全管理規程に基づき、病原体等取り扱いと保有、移動について手つづき点検と記録管理を基に現況調査を実施した。

B. 調査方法

調査方法としては、現実に病原性のウイルス等の調査・研究・同定等の実務に従事している研究者に対して、以下の項目に沿ってヒヤリングを行い、現状と課題点の分析を行った。

1. 入荷業務：各機関から送られてきた検体の登録、入荷処理の方法。

・病原体等移動（受入）届／・入荷処理

2. 入庫業務：送られてきた検体の入庫受付、情報登録及び保管登録の方法。

・格納ロケーション登録／・入庫処理／・格納

3. 出庫業務：培養に利用する検体の特定、保管場所からの持ち出しの方法。

・病原体等取扱申請書／・出庫処理／・病原体等移動届／・研究室移動処理

4. 出荷業務：検体の取り出し出荷処理、他機関へのお荷の方法。

・病原体等移動（受入）届／・出荷処理

5. 保管業務：検体の照会及び移動、廃棄等の管理の方法。病原体の棚卸を行なう。論理在庫と実在庫の差を確認。

・検体照会／・検体移動／・廃棄処理／・棚卸

6. 管理業務：各種記録の管理の方法。

これらの業務に対して、検体の管理と情報の管理、保管容器と保管場所の管理を中心に、現行の管理方法と今後システム化に望まれるニーズのヒヤリングを行った。

また同時に、対象となる病原体による管理方法、基準についての調査も行った。

これにより、外部からどのような病原性のある物か分からない検体を受ける研究者が安全に病原性を確定し、それをどういうレベルで、保管管理の対象として扱うかまでの流れを検討した。

主な病原体はウイルスと細菌に2分されるが、感染研感染症情報センターによる病原微生物検出情報（ウイルス3区分、細菌2区分）を参考とし、ヒヤリング対象としてポリオ（ウイルス）及び結核（細菌）を中心に行った。ヒヤリング対象は、感染研ポリオ研究グループおよび結核研の結核研究グループとし、聞き取り調査を行った。

C. 調査結果

1. ポリオ検査業務フロー：感染研ポリオ

研究グループに対する業務フローのヒヤリング結果は以下の通りである。

1-1. 受付（便検体パターン）：・メール、FAXにて検体調査依頼／・管理一覧表（Excel）に記入／・受取り便検体貼り付け用ラベル印刷（テプラ使用）／・検体到着／・検体受取り

1-2. 同定検査：・開梱／・元便検体ヘラベル貼り／・便検体から便抽出液を作成／・便抽出液を24穴プレートを使用して細胞培養／・便検体、便抽出液をフリーザに保存・細胞培養24穴プレートをインキュベーターに保管し培養。（nWeek）／細胞培養観察／・ポリオウイルス同定の場合、チューブへ移し替え（ポリオウイルス以外の場合は、管理・検査対象外としチューブ移し替えは行なわない）／・24穴プレート、観察スライドをオートクレーブ後廃棄／・次ステップであるポリオウイルス型内識別ヘフリーザ保存

1-1'. 受付（分離株パターン）：・メール、FAXにて検体調査依頼／・管理一覧表（Excel）に記入／・受取り便検体貼り付け用ラベル印刷／・検体到着／・検体受取り／・開梱／・他機関ウイルス分離株ヘラベル貼り／・チューブの移し替え／・他機関ウイルス分離株をフリーザに保存／・次ステップであるポリオウイルス型内識別ヘフリーザで保存

1-3. 共通：型内識別検査：・ポリオウイルス型内識別（識別結果がワクチン株の場合は保存用フリーザへ保管／識別結果が野生株、VDPVの場合は強毒株用フリーザへ保

管）／・依頼元へ報告（メール）管理一覧表修正

1-4. 研究目的：・研究対象取出し（保管ルーム／実験室）／・研究中／・研究終了（廃棄（使い切った・実験用）／返却（残った）／新規追加（増えた）

1-5. フリーザ整理：適宜：・実験室内のフリーザ整理（廃棄／保存用フリーザへ移動）

1-6. 棚卸：年次：・保管ルーム内の保存用フリーザ棚卸（管理一覧表との突合せ／廃棄（保存期間満了・不明）／管理一覧表修正）

1-7. 研究室内移動：・対象検体取出し／・対象検体を不活化、移動検体にラベルを貼る／・不活化後検体移動／・管理一覧表修正

1-8. 他機関（所外）移動：・他機関（所外）からの移動依頼／・対象検体の移動（実験室からの移動／保管ルームからの移動）／・発送／・管理一覧表修正

2. 結核検査業務フロー：結核研グループに対する業務フローのヒヤリング結果は以下の通りである。

2-1. 受付（結核研究所）：・TELにて検体検査依頼／・検査依頼書が送付されてくる／・輸送セットを依頼元へ送付／・検体到着／・検体受取り／・台帳インデックスに記帳（手書き）、ラベル作成

2-2. 同定検査：・開梱／・輸送されてきた菌株を液体培地に分注する／・培養／・観察（コロニー化）／・輸送されてきた菌

株は、検査結果が出るまで保存（nMonth）
 ／・コロニー化確認／・結核菌同定検査（陰性：保存用フリーザへ保管／陽性：遺伝子検査へ進む（フリーザに一保管）／・輸送されてきた菌株をオートクレーブ後に廃棄

2-3. 遺伝子検査：・過去の検体を検査室へ持ち込み／・遺伝子検査／・薬剤感受性検査へ進む（フリーザに一保管）

2-4. 薬剤感受性検査：・薬剤感受性検査／・検査終了後、保存用フリーザへ保管／・報告書作成、依頼元へ報告／・管理一覧表修正

2-5. 研究：・研究申請→複十字病院倫理委員会／・菌株入手／・研究

2-6. 棚卸：年次：・保管ルーム内の保存用フリーザ棚卸（管理一覧表との突合せ／廃棄（保存期間満了・不明）／管理一覧表修正）

2-1'. 受付（研究センタ業務フロー）：・TELにて検体検査依頼／・検体受取り（受け取り方法は様々、入手情報も様々）

2-2'. 同定検査：分離培養：・開梱／・培地へ分注する／・送られてきた臨床検体をフリーザに一時保管／・分離培養
 ・観察（陰性：オートクレーブ後、廃棄／陽性：増菌培養へ進む（フリーザに一時保管））

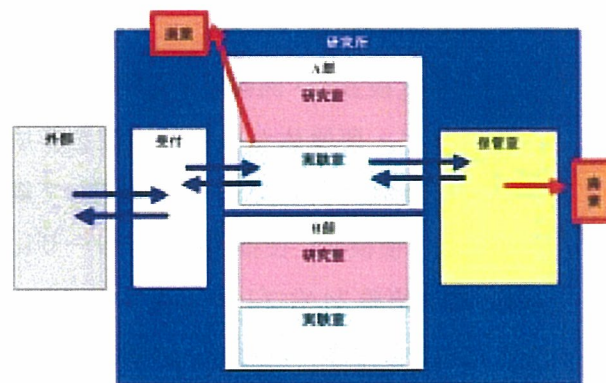
2-3'. 同定検査：増菌培養：・フリーザより分離培地取出し／・増菌培地へ分注する／・分離培地をフリーザに一時保管
 ・増菌培養／・観察（コロニー化）

2-1". 同定検査：・コロニー確認／・結核菌同定検査／・3本のチューブ（液体培

地）に分注しフリーザで保存／・保存用の3本以外は、全てオートクレーブ後、廃棄

／・検査結果を依頼元へ報告／・台帳を修正
 これらの業務フローに関して、特に以下の課題・ニーズが指摘された。

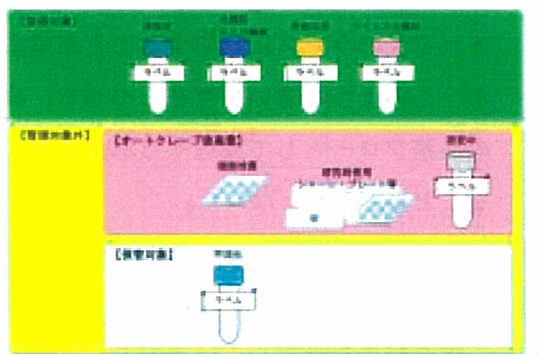
【図1:業務の流れ】



1. 管理する対象について：便検体は、海外（ラオス、カンボジア）からの検体（WHOのレファレンスラボのため）も含め、外部から検査を依頼される。現在の取り扱いでは臨床検体（便検体）は病原体として扱っていない。いつ病原体として管理し始めるのが重要である。研究所内に入ってきたときを始まりとする考え方で統一していく。

WHOの根絶プロジェクトの成果によってBSL2がBSL3に扱いが変わる可能性がある。その場合は元の便検体にまでさかのぼって管理する必要が出てくる可能性がある。そのため管理する物しない物を明確にする必要がある。期間を区別（一時保管、長期保管など）して管理するものを決めたほうがよい。（以上、感染研）

【図2:管理対象の整理】

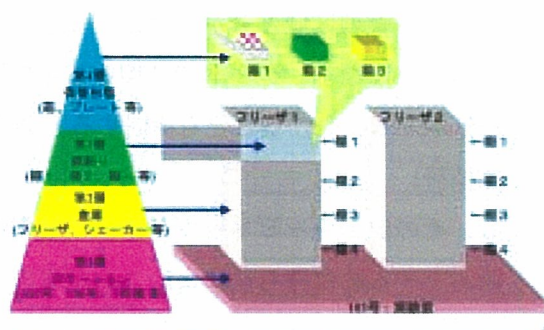


2. 保管容器について：検体を入れる容器には、一次容器(チューブ等)、二次容器(プラスチック製の筒等)、三次容器(段ボール等)、オーバーパック(冷凍用ドライアイスが入るもの)がある。

チューブに病原体を認識する「コード or 名前」等はラベル/メディコード(液体窒素につけても剥がれない)が提供(支給)されているが、使用に関しての規定はない。

検査中はコード管理とし、菌の同定や検査が終了した時点でコードに情報を付加し、保存するときにラベルを起こす。情報を送れるようにバーコードを付けて管理をしていくことを検討している。(以上、感染研)

【図3:ロケーションの整理】



3. 保管場所について：保管場所のロケーションとしては、1) 施設、2) 保管設備、3) 保管棚、4) 保管形態の4つのレベルに区分できる。

BSL 3 検体は、現在専用保管場所はなく、各研究室で各研究員が保管している。今後 BSL 3 検体の保管は特定し、その中に冷凍庫、冷蔵庫、保管庫を設置し、入室・退室・検体持ち出しを管理していく。

保管庫から検体を出すときには申請書を入力し、それと符合するものしか持ち出せないようにしている。必要な申請書は、主任研究員、一般研究員、協力(外部)研究員という立場によっては分かれている。(以上、感染研)

低温室では一時保存として数ヶ月培地を保存している。冷凍室には長期保存(10年以上保存するもの)を保存している。(以上、結核研)

4. 管理区域について：P3 の入室はカードによる認証を行っている。細胞の培養は安全キャビネット内のみで行い、フリーザは各実験室にある。各実験室の検体は研究者が管理している。(以上、感染研)

セキュリティを行うとしても、ドアをどうするかなど建物の老朽化が問題である。明らかに管理区域と分かれば必ずしも壁を作るのではなく、ゲートで区切ることで管理区域として分けることも検討する。(以上、結核研)

5. その他：キャビネットの中には端末を始めとする物は持ち込まないことが原則となる。ノートなどの持ち出しも出来ないのを実験室の中から研究室に FAX を送ったりして記録を実験室外に出している。(以上、感染研)

内部不正をどれだけ防げるかが一番重要である。これをシステムに含めるか、内部の人間をどの範囲までチェックを行ってよいのかという課題がある。(以上、結核研)

本調査により病原体管理のシステム化を考える際、一般の管理システムとは異なる以下の特徴が明らかになった。

- 1) 病原体管理は人を介在した管理であること
- 2) 病原体自体も各種のバージョン、危険度のレベルを持つこと
- 3) 病原体のトレーサビリティの確立が必要であること
- 4) 検体及び保管容器の管理と検体情報の管理が不可分であること
- 5) 安全性のためにアクセスコントロールが必要であること

また、病原体ごとの管理システムに対する特徴的なニーズも明らかとなった。

ポリオウイルスでは、受け入れ形態の違いにより、検査フロー、セキュリティレベ

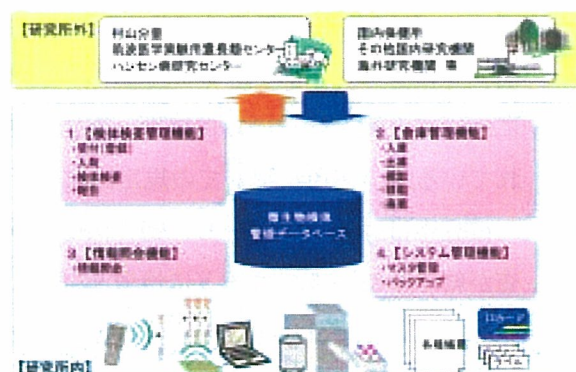
ルを変えて対応する必要がある。また、結核菌群細菌の受け入れ方法も一定ではなく、それぞれのケースに対応することが望まれる。このような違いが存在しつつも、検査の業務フローとして共通する部分が多くあることが明らかとなった。

D. 考察

調査結果を分析し、以下のような病原体管理システムモデルを策定した。

検体検査管理機能、倉庫管理機能、情報照会機能の3機能を軸に、システム管理機能を加えたシステム構成とした。

【図4:システム化モデル】



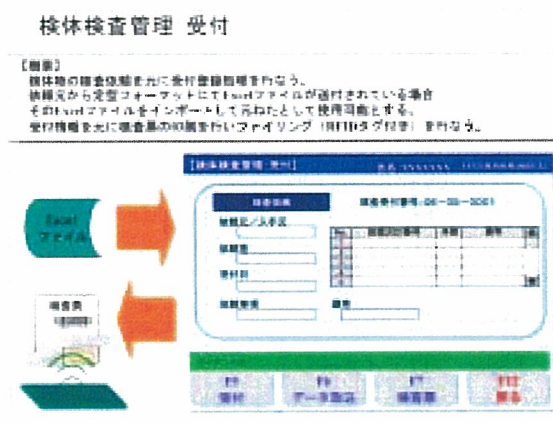
1. 検体検査管理機能：・受付（登録）／・入荷／・検体検査／・報告
2. 倉庫管理機能：・入庫／・出庫／・棚卸／・移動／・廃棄
3. 情報照会機能：・情報照会／・ロケーション照会／・個人認証
4. システム管理機能：・マスタ管理／・バックアップ

1. 検体検査管理機能

1-1. 検体検査管理：受付：検体物の検査依頼を元に受付登録処理を行なう。依頼元

から定型フォーマットにて Excel ファイルが送付されている場合、その Excel ファイルをインポートして元データとして使用可能とする。受付情報を元に検査票の印刷を行いファイリング（RFID タグ付き）を行なう。

【図5:機能例1:受付】



1-2. 検体検査管理：入荷・修正：実際の検体物が入荷されたら、該当検査票がファイリングされているファイルフォルダのRFID情報を利用して、データを読み出し検体物へ貼り付けるラベル印刷や入荷日の登録データ修正等を行なう。検体物に同梱されてきた書類群は、全て当該ファイルフォルダにファイリングする。

1-3. 検体検査管理：検体検査：検体検査中は、実験室内でのPCを使用しての作業は行なわない（出来ない）ものと考え、必要事項・チューブの追加等については、手書き書類での対応とし、それらを全てファイルフォルダにて管理し、事後に研究室にてPCにて修正を行なう。

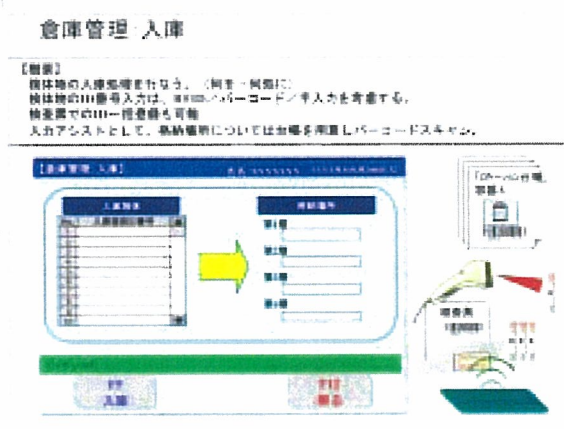
1-4. 検体検査管理：報告：検査が終了したら、該当検査票がファイリングされてい

るファイルフォルダのRFID情報を利用して、データを読み出し検査結果の入力を行なう。

2. 倉庫管理機能

2-1. 倉庫管理：入庫：検体物の入庫処理を行なう。（何を・何処に）検体物のID番号入力は、RFID／バーコード／手入力を考慮する。検査票でのID一括登録も可能。入力アシストとして、格納場所については台帳を用意しバーコードスキャンを行う。

【図6:機能例2:入庫】



2-2. 倉庫管理：出庫：検体物の出庫処理を行なう。（何処の・何を）検体物のID番号入力は、RFID／バーコード／手入力を考慮する。検索一覧でのID一括登録も可能。入力アシストとして、格納場所については台帳を用意しバーコードスキャンを行う。

2-3. 倉庫管理：実在庫登録：検体物の実在庫情報データの登録を行なう。検体物のID番号入力は、HT／RFID／バーコード／手入力を考慮する。在庫登録の単位は格納場所単位とする。

2-4. 倉庫管理：在庫一覧：格納場所単位の現在在庫の状況を一覧表示する。

2-5. 倉庫管理：棚卸誤差一覧：論理在庫と実在庫での誤差を一覧表示する。

2-6. 倉庫管理：移動：検体物の所内・所外での移動処理を行なう。「検体移動届」の印刷も可能。

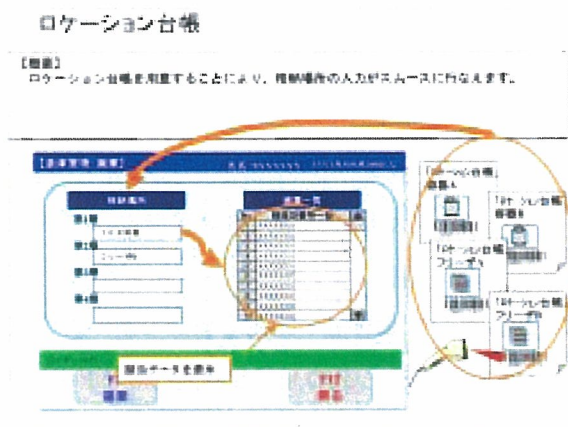
2-7. 倉庫管理：廃棄：該当検体の廃棄（データ消去）処理を行なう。

3. 情報照会機能

3-1. 情報照会機能：各種抽出条件を元に、該当データを一覧表示する。また、抽出一覧をバーコード付きで印刷出力可能。このバーコードをスキャンすることにより、該当検体の画面表示やデータ取込が可能となり、入庫／出庫／廃棄等の消し込みが楽になる。

3-2. ロケーション台帳：ロケーション台帳を用意することにより、格納場所の入力がスムーズに行なえる。

【図7：機能例3：ロケーション管理】



3-3. 個人認証：PC へのログインについては、IC カードとパスワードにて認証を行なう。利用者は IC カードをカードリーダーにかざすことによりログオン画面が表示され

パスワード入力を行い利用可能となる。

また、これらのシステム化モデルに対して以下の検討を行った。

1. RFID 等による ID 管理：RFID 技術の導入を検討し、以下のような有効性が検証された。

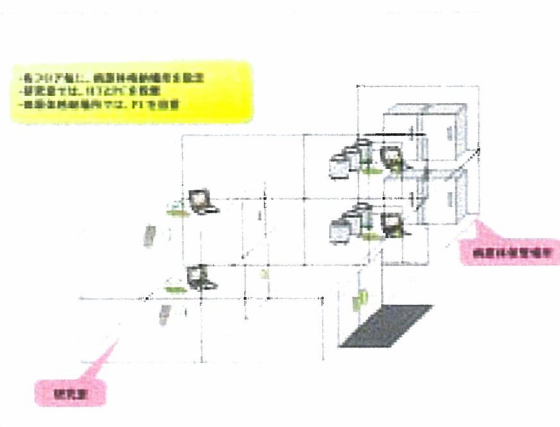
1) 検体（保管容器）で管理し識別するための「個品管理」

2) 検体個品についての履歴情報管理（トレーサビリティ）

3) 人が作業介在を減らすことによる省力化・効率化

4) 移動する検体の検知によるリアルタイムのデータ収集

【図8：フロアイメージ】



2. セキュリティレベル：セキュリティとしてはレベルの設定、ゾーン・セキュリティレベルなど定義の設定をすることが重要である。セキュリティレベルの基準を決め、レベルごとの管理を設定するなど、運用を見据えたシステムを考えていかなければならない。

3. 個人管理・認証：各庫内に部門別の保管箱または個人の箱を設ける必要ある。（同

じ部署であっても、上司であっても研究者は他の研究者の研究については周知していないため、個人での管理が必要という指摘から)従って、今回のシステムのポイントは個人認証となる。

4. 管理区域のアクセス権限：入退館システム「FSGate」(富士ソフト)の視察により、アクセス権限についての検討を行った。

カードのデータ(アクセス権限)については管理端末から入力する。フロアごとに管理(階層型管理)や個人単位での時間、日付を指定してアクセス権限を与える事が可能である。

また、資格取得、講習会受講等で年に数回アクセス権限が変更することがある場合、資格毎に簡易にアクセス権をセット、ドアをグループ化することも可能である。

4. システム管理機能

4-1. システム管理: マスタ管理: データ改ざん・削除行為の防止 (登録データの物理削除禁止)

ユーザの作業履歴 (登録、変更、参照) の保持

4-2. システム管理: バックアップ: システムの二重化(データセンターによる対応) データベースの二重化(レイド5)

E. 結論、今後の課題

今回の研究では、不特定の検査依頼検体を、病原体として特定し病原体レベルに準じた保管管理を実施し記録を管理するプロセスを検討考察した。今後は既に検討されたプロセスを活用して病原体の研究利用時

のプロセス作成を、行う事となる。

今後検討を進めて行くべき課題としては、以下の項目があげられる。

1. 研究者・関係者の簡便性：毎日、病原体を扱う研究者に対し管理のため業務の負荷をかけることは望ましくなく、継続性の維持・モラルの維持・研究の効率の面からも十分な配慮が必要と考えられた。現在ある検体を新しい容器に移すのは、取り違えなどの事故が起こる可能性もあり、検体数も多いので研究者からは反対意見がある。システム導入時のスムーズな以降計画が必要となる。

2. 検体 ID 読み込み：現在、検体の棚卸はしていないが、液体窒素素容器のフタを空けHTでスキャン(棚卸)し、試験管立て(検体立て)毎に読み込みが出来るようにするか検討する。ICタグが読めないときの運用は、別容器に移して対応する。

3. 個人情報の保護：研究者の個人情報と検体提供者の個人情報の保護。システムはこの二つの個人情報に配慮した形を模索しなければならない。研究者の個人情報の管理については、セキュリティ上重要であるが、管理される側から了承を得る必要がある。民間では社員規定に明記するなどを行っている。人的安全対策という形で文章化するのが良いのではないか。

今後は、検体の保管管理に人的運用も含めた総合的なシステム化の検討が必要と考える。

F. 健康危険情報

特になし

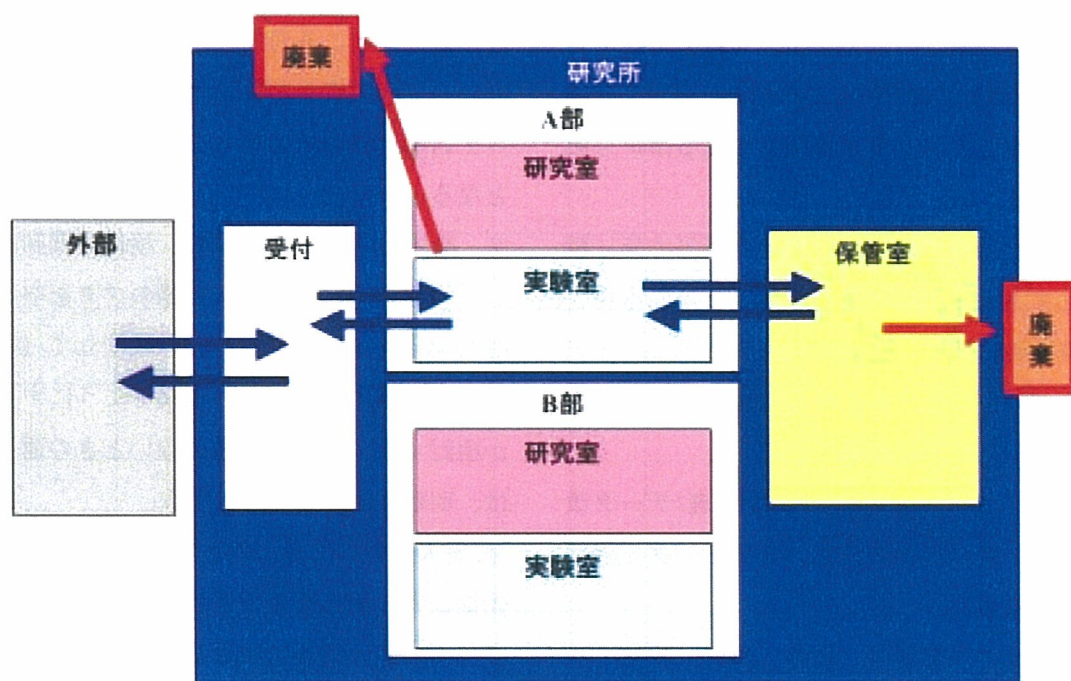
G. 研究発表

特になし

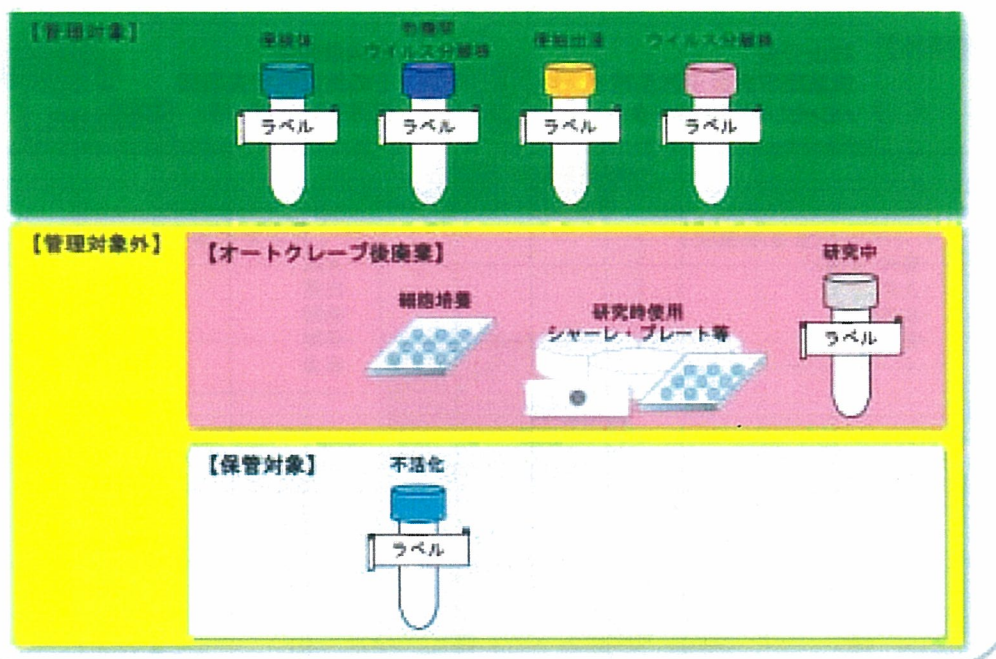
H. 知的財産権の出願・登録状況

(予定を含む) 特になし

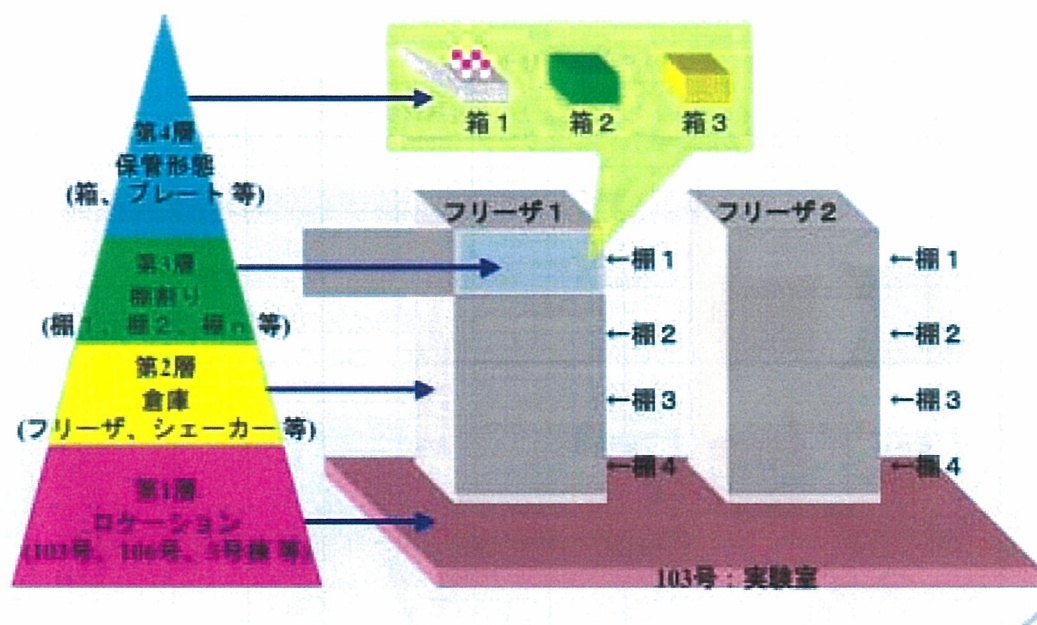
【図1:業務の流れ】



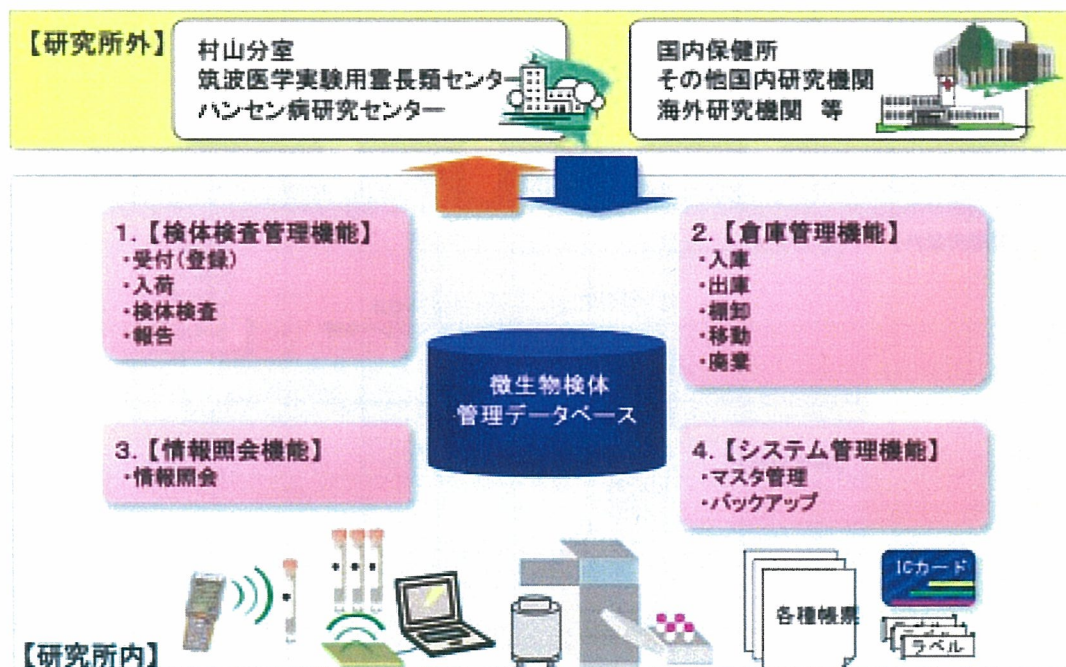
【図2:管理対象の整理】



【図3:ロケーションの整理】



【図4:システム化モデル】



【図5:機能例1:受付】

検体検査管理:受付

【概要】
 検体物の検査依頼を元に受付登録処理を行なう。
 依頼元から定型フォーマットにてExcelファイルが送付されている場合
 そのExcelファイルをインポートして元ネタとして使用可能とする。
 受付情報を元に検査票の印刷を行いファイリング (RFIDタグ付き) を行なう。

【検体検査管理 受付】 氏名:XXXXXXXX XXXX#MM#DD#YY

Excel
ファイル

検査票

検査依頼 検査受付番号:06-05-0001

依頼元/入手元

依頼者

受付日

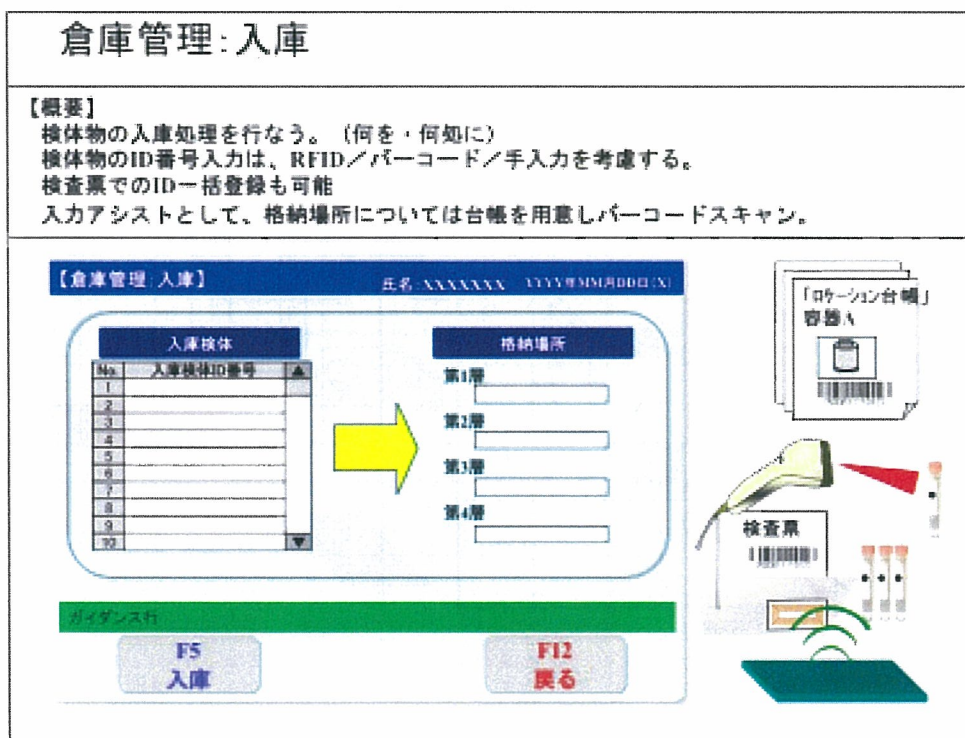
依頼事項

No.	依頼元ID番号	本数	備考
1			
2			
3			
4			
5			

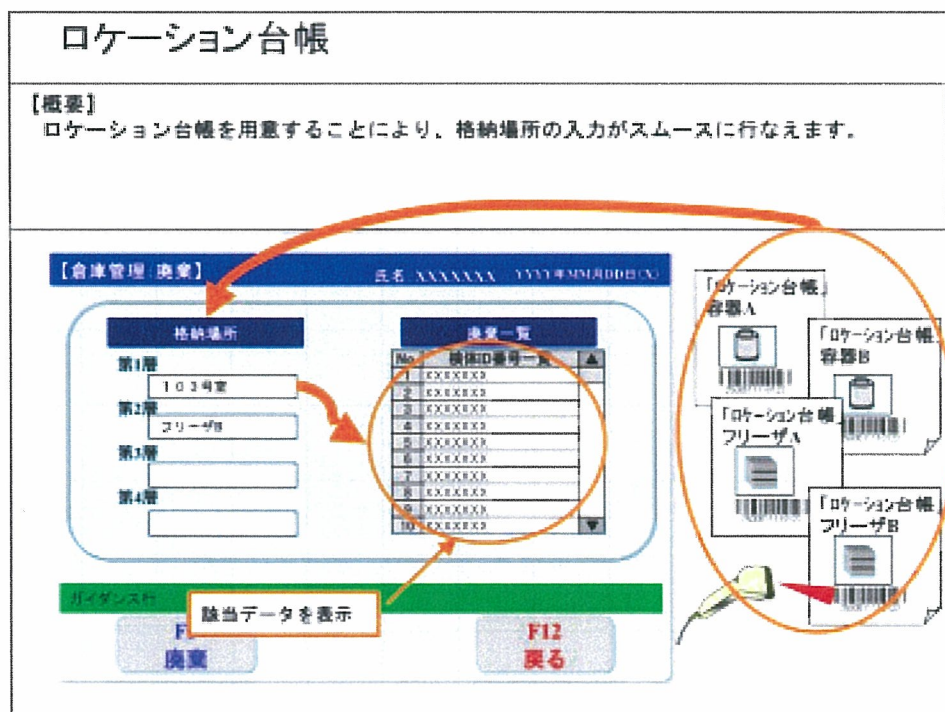
備考

F5 受付 F6 データ取込 F7 検査票 F12 戻る

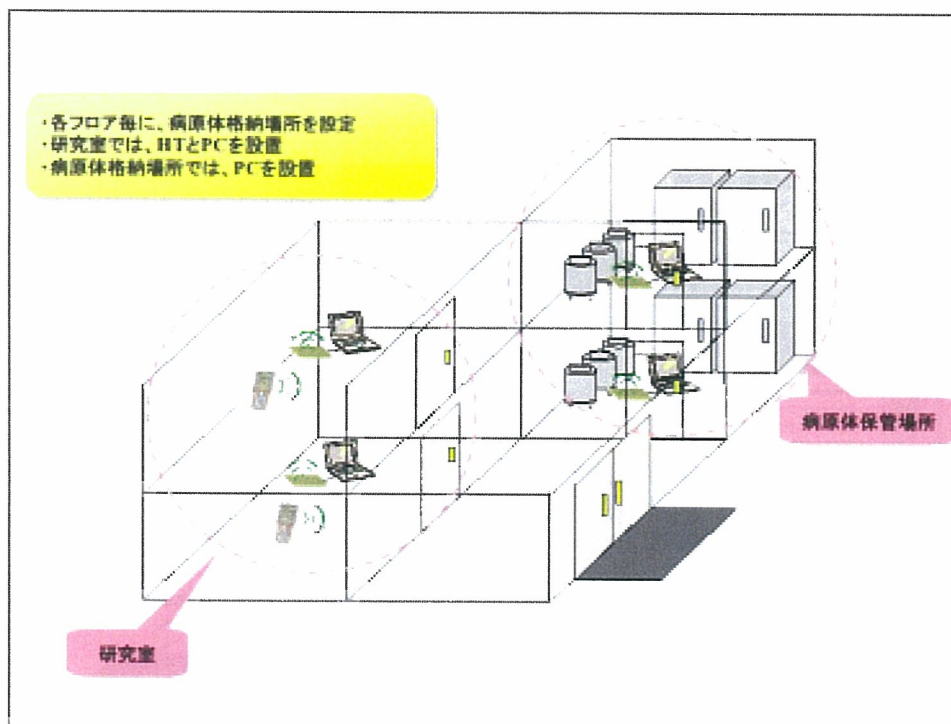
【図6:機能例2:入庫】



【図7:機能例3:ロケーション管理】



【図8:フロアイメージ】



炭疽菌芽胞混入疑いのある粉体検体の取扱技術開発と
トレーニングプランについての研究

分担研究者 高 木 弘 隆

協力研究機関： 北海道立衛生研究所 山口県環境保健研究センター

研究要旨：炭疽菌混入疑いの粉末サンプル取扱いにおけるリスク解析とより安全性の高い方法について検討を重ね、*B.anthraxis* と同属であり、BSL1 で取り扱い可能な *B.thuringiensis* 芽胞を用い、かつタルクパウダーと混合することでシミュレーションが実現できた。これらを用いてグローブバッグ内で取り扱った場合、その方法によっては芽胞含有粉末が容易に拡散し、作業者の手指などを確実に汚染することも認められた。グローブバッグの使用と取扱い方法の構築により、生物学的安全キャビネット（BSC）内への汚染および作業員への暴露回避が可能であることが示唆され、こうした一連の作業に関わる実習・研修プログラムの実現化が可能となった。

A.研究目的

2001 年米国における炭疽菌芽胞を用いた郵便物混入・拡散暴露事件により、炭疽菌を用いたバイオテロがよりいっそう現実的なものとなった。日本国内においてもこれ以前に狂信的宗教団体による炭疽菌散布事件が確認されているが、幸いにも弱毒ワクチン株が使用されていたため事なきを得ていた。

この米国での事件発生以来、いわゆる「白い粉」と呼ばれる粉末による郵便や散布といった、模倣・愉快犯的な事件が各地で発生しており、その検査に各地方衛生研究所（以下地衛研）が対応に当たっていた。この際の粉末検体取扱いについては地衛研ごとに作成された SOP、もしくは当研究所発行の「病原体検出マニュアル」に基づき実施されているのが現状であった。しかしながら「粉体」の取扱上留意すべき湿度や静電気に対する対策や取扱時の「粉体」拡散に対する対処などが欠けていること、除染のための消毒方法がまちまちであることは否めな

かった。

そうした背景からも炭疽菌混入粉体の取扱に関する実習・トレーニングはカリキュラムとしての希望が多く、保健医療科学院主催の細菌コース実習でもその実現が早くから望まれていた。炭疽菌は弱毒株であっても、当研究所規定によりバイオセーフティレベル（以下 BSL）3 として分類されており、一般実習では取扱が事実上不可能であることから、実習を企画する場合などは近縁で BSL2 以下の芽胞菌を検索する必要があった。昨年度の報告では、炭疽菌の近縁で、BSL1 分類である *B.thuringiensis* が芽胞形成能、生化学性状や芽胞耐熱性ともに炭疽菌に非常に類似することが見出されている。

よって今回 *B.thuringiensis* を用いた画法混入粉末の調製、その取扱シミュレーションと安全性向上・拡散防止のための封じ込め技術について検討し、研修・実習の実施に向けたカリキュラムを構築したので、ここに報告する。

B.研究方法

(1) トライアル-1

○芽胞単体の粉末化とこれを用いた取扱シミュレーション

- ・使用菌株：*B.thuringiensis* NBRC3951

本菌株を TSA plate に接種し、37℃にて 24 時間培養した後、4℃で 1 週間以上保存する。auto-lysis による半透明化を確認後、コロニーを回収し洗浄を繰り返してこの芽胞画分を得る。60℃1 時間処理を施し菌数減少がないことをもって供試芽胞とする。

- ・new-パームチェック SCD 寒天
日研生物医学研 製
- ・簡易グローブバック

I²R@GLOVE BAG model S-20

- ・除電用カーボンプレート
- ・帯電防止プラスチックバッグ

その他

- ・アースプレート PD-101
- ・静電気測定器 FMX-003

a)芽胞粉末サンプルの調製

精製水に懸濁させた供試芽胞 5.2×10^7 CFU/20 μ l をシール付 plastic bag (A9 サイズ) にいれ、室温下にてデシケーターにより 3 日以上乾燥させる。シールで密閉し、外側から軽く揉み解してこれを試験検体とした。

b)グローブバック内での芽胞検体取扱時における芽胞の飛沫・拡散の検討

芽胞検体及び必要機材を簡易グローブバック内に収納した後、空気を注入しグローブバックを適当に膨らませる (写真 1 参照)。カーボンプレートを使用した場合未使用の場合にわけ、TSA plate を作業面に配置し、「plastic bag から粉末を取り出す」という作業を行ってもらい、作業面への芽胞拡散状況を見た。終了時に右手について、パームチェックによるスタンプを行い、作業手指への飛沫・付着状況について

も確認した。また一連の作業を通して、除電および帯電状況を測定器により確認した。

なお本トライアルは 6 月上旬に山口県環境保健センター生物学部協力の下で実施した。

(2) トライアル-2

○芽胞含有粉末検体の調製とこれを用いた粉末検体取扱シミュレーション

a)芽胞含有検体の調製

トライアル 1 で用いた芽胞懸濁液とタルクパウダーとをシール付 plastic bag 内で適当量混合し、乾燥させた。乾燥後シールをして外側から軽く揉み解したものを試験検体とした (写真 2 参照)。なお粉末検体調製の詳細については情報の安全確保から割愛させていただく。

b)グローブバック内での芽胞検体取扱時における芽胞飛沫・拡散の検討

トライアル 1 と同様に簡易グローブバックを準備した。TSA plate による飛散芽胞の検出およびパームチェックによる右手指の汚染状況を見た。今回はトライアル 1 の作業効率および作業時間より実習手順書 (別添資料参照) を作成し、これに基づき「粉末 bag に精製水を 3ml 注入して十分に懸濁させた後、これを回収」という基本手順 (グループ A) と「粉末バッグの中からスパーテルを使用して検体の一部を回収」という協力地衛研の SOP に基づいた手順 (グループ B、この際帯電防止措置はとらないものとして、カーボンプレートの代わりにクリアシートを使用) とで比較を行った。

なお本トライアルは北海道立衛生研究所スタッフの協力の下で 6 月中旬に実施した。

C.結果

(1) トライアル A について

芽胞単体の乾燥化検体については、乾燥状態が不均一であり、「粉体」として満足の行くも

のではなかった。また飛沫・拡散の発生もほとんど認められなかった。この結果を踏まえてシミュレーション用としての「粉末検体」の改良が必要となった。

(2) トライアル B について

・グローブバック内での芽胞飛沫状況

図 1 に示すようにグローブバッグ内作業面 6 箇所 TSA plate を配置し、各グループとも 3 名ずつ作業を行った。その結果 A・B での顕著な差は認められず、見かけ上グループ A での飛沫が B を上回るとも取れることがみられた（写真 3-1、3-2 参照）。また作業面で発生した静電気は A で 0.01V 以下、B で +2.7 ~ 3.5kV とおよそ 10 万倍の差が認められた。

・右手指への芽胞飛沫状況について

グループ A・B において顕著な差が認められた。グループ A (2 名分) では共にコロニー数 10 個以下だったのに対し、グループ B (3 名分) ではコロニー数 6~150 個と顕著に多かった。このうち 1 名はコンタミと思われる巨大なコロニーが認められた（写真 4 参照）。

D. 考察

(1) 取り扱い環境への芽胞含有粉末の飛散について

今回使用している簡易グローブバックはあくまで「BSC 内で使用する」ことを前提としており、本製品の注意書きにも「気密性は厳密ではないので、毒性物質の取り扱いはしないこと」となっている（写真 参照）。ただし従来どおり BSC 内で粉末検体を直接取り扱うことによる BSC 自身の汚染防止および作業員への暴露防止には十分に効果が期待でき、またサイドにパススペースや吸気・排気口が設けられているので、BSC への芽胞粉末の漏洩もかなりの確率で防止できる。今回の取り扱いシミュレーションにおいて、

① 静電気の強弱に限らず、不用意な検体の取

り扱いによりバッグ内に芽胞含有粉末が飛散すること

② この飛散は粉末をすばやく液状化（または懸濁化）することでかなり防止できることが示唆された。粉末検体を取り扱う上で「湿度管理」と「静電気対処」はセットにもなっているが、今回使用したグローブバッグはそのものが帯電しにくい素材であるため、本バッグからの静電気の影響は少ないものと思われる。

また芽胞含有粉末については、単体よりも乾燥化を促すタルクのような素材と混合することによりシミュレーションにおける検体調製の安定化が達成できた。タルクはもともとほぼ無菌的であり、そのものを寒天培地などに接種しても菌体増殖は確認できない（別添実習書参照）。今回調製した粉末検体は 10^7 CFU という菌量を混合しており、懸濁化サンプルを 1 白金耳寒天培地に塗抹しても確実にコロニー発現を確認できる（写真参照）。

(2) 芽胞含有粉末を用いた取扱いシミュレーションの実習への応用について

今回 2 箇所の地衛研に協力していただき、実習の企画、準備、実施におけるタイムスケジュールと内容など様々な観点からの検証も試みた。基本的に参加人数とグローブバッグでの作業が律速となるが概ね 2-3 時間、これに粉末検体からの遺伝子抽出と PCR による特異遺伝子検出とを含めるとほぼ 1 日の研修となる。また研修要望の多い、炭疽菌からの遺伝子抽出と PCR 検出なども組み合わせることが可能であることは両トライアルでも実証された。昨年度の報告でも芽胞そのものは 100℃ 処理により不活性化が達成できるので、これをスタート検体とした遺伝子検出実習は十分可能であろう。これからとしては粉末サンプルの飛沫防止をより強化した取扱い技術を考案・実証してゆきより安全で効率的な手順を確立してゆくことを目指す。またグローブバッグでの作業は他の病原体取扱いについても応用・転用が可能であ

るため、そのトレーニングの機会も順次増やしてゆければと考える。

そして、これらの結果を踏まえ、「平成 18 年特定研修 新興再興感染症技術研修」(担当：感染症情報センター 伊藤健一郎室長、平成 18 年 11 月 6 日～11 月 28 日)で、初めての実習を企画・実施した。この詳細については結果等の集計中につき、別途改めて報告する。

E. 結論

炭疽菌芽胞含有粉末の取扱いに関するシミュレーションを試み、BSL1 である *B.thuringiensis* を用いた芽胞含有粉末の調製を行い、グローブバッグ内での飛散状況を確認することができた。これを応用しての実習プログラムの構築と実施が可能となった。

【謝辞】

本研究において、トライアル実習に多大なご協力をいただきました山口県環境保健研究センター生物学部 富田先生、中尾先生、西田先生、岡本先生、戸田先生、北海道立衛生研究所 伊木先生、山口先生、木村先生、清水先生ほかスタッフの皆様方に改めまして深謝いたします。

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、高尾信一、福田伸治、島津幸枝、桑山勝、宮崎佳都夫、重松美加、谷口清洲、杉山和良 Human Adenovirus type3 分離株における塩素感受性についての検討 第 80 回日本感染症学会総会・学術講演会 2006 年 4 月 東京

2) 高木弘隆、西藤岳彦、小田切孝人、二宮愛、今井正樹、篠原克明、杉山和良 Influenza virus 株間における nonion 界面活性剤の感受性について 日本防菌防黴学会 第 33 回年次大会 2006 年 5 月 東京

3) H.Takagi, M.Shigematsu, K.Taniguchi, Y.Tomita, K.Shinohara, K. Shugiyama Efficacy of Common Detergents in SARS coronavirus and Influenza virus Disinfection. 12th International Congress on Infectious Diseases, Lisbon, June, 2006

4) Hiroataka Takagi, Kenichiro Ito, Mika Shigematsu, Katsuaki Shinohara, Kazuyoshi Sugiyama The Handling Method and Training Plan for Samples Possibly Contaminated with Anthrax Spores The 49th Annual Biological Safety Conference of ABSA, Boston, October, 2006

H. 知的財産権の出願・登録状況(予定を含む) なし