

厚生労働科学研究補助金

新興・再興感染症及び予防接種政策推進研究事業

サーベイランスの機能強化に資する病原体の適切な管理と検査体制に関する研究
(H 2 9- 新興行政- 一般- 0 0 5)

平成 2 9 年度 総括研究報告書

研究代表者 森川 茂

平成 3 0 (2 0 1 8) 年 5 月

目 次

I . 総括研究報告 サーベイランスの機能強化に資する病原体の適切な管理と検査体制に関する研究	----- 1
II . 研究成果の刊行に関する一覧表	----- 25

厚生労働科学研究補助金（新興・再興感染症及び予防接種政策推進研究事業
（分担）研究報告書）

サーベイランスの機能強化に資する病原体の適切な管理と検査体制に関する研究
（H29- 新興行政- 一般- 005）

研究代表者 森川茂 国立感染症研究所・獣医科学部・部長

研究分担者：加藤篤（国立感染症研究所 品質保証・管理部） 棚林清（国立感染症研究所 バイオセーフティ管理室） 花木賢一（国立感染症研究所 動物管理室） 西條政幸（国立感染症研究所 ウイルス第1部） 森田公一（長崎大学熱帯医学研究所）

研究協力者：木村昌伸、今岡浩一、奥谷晶子、宇田晶彦、野口章、井上智（国立感染症研究所 獣医科学部）、福士秀悦、下島昌幸（国立感染症研究所 ウイルス第1部）、浅沼秀樹（国立感染症研究所 インフルエンザウイルス研究センター）、早坂大輔（長崎大学感染症共同研究拠点施設・安全管理部門）

研究要旨：

本研究は、サーベイランスの機能強化に資する病原体の適切な管理と検査体制に資するガイドラインの作成を最終目的とするが、初年度は、バイオセーフティ、セキュリティに資するために病原体の不活化条件の科学的検討を行い、特定病原体等の取り扱い施設の管理、使用、病原体の保管に関して既存の SOP をより良いものに改定するための案などを取り纏めた。また、ABSL4 施設に係る SOP の基礎となる ABSL3 施設、及び ABSL4 施設の使用及び管理に係る模範的な SOP 案を策定した。また、検査と実験室診断を行う際に実施する試験の信頼性を高いレベルで維持するために必要な事項を「品質マネジメント体制」と定義し、体制に必要な事項を ISO/IEC の観点から考察した。

その結果、病原体の不活化に関しては、野兎病菌の不活化条件をはじめ網羅的に検討し、その実測データを提供した。炭疽菌芽胞の湿熱条件下での不活化は、チューブ内の温度を高い精度で制御できるサーマルサイクラーを用いることで 99.9（温度制御精度 ± 0.1 ）15 分間加熱することで不活化可能であることが示された。ブルセラ属菌体を検査用に不活化した上で提供する事を想定し、その検査内容・目的に合致する不活化法の検討を行い加熱殺菌法（63℃, 30 分）は遺伝子検出用の不活化としても適していることが示された。国立感染症研究所が、狂犬病ウイルス接種マウス脳スタンプ標本を FTA の陽性対照として自治体等の研究機関に配布するためにウイルスの不活化条件を検討し、アセトン固定と 線照射の併用で完全に不活化可能な条件を設定した。SFTS 疑い患者の血清中のウイルス不活化に資する検討を行った。また、高病原性鳥インフルエンザの不活化試験に細胞培養を用いる場合の基礎検討を行った。

病原体の適切な管理に資するバイオセーフティ、セキュリティに関する研究に関しては、BSL-4 施設における病原体取り扱いや検査において、安全に作業するための SOP を作成する上で、求められる項目を検討した。施設の管理者向けには、既存の SOP を改定して、施設稼働を管理、定期検査、セキュリティ強化、BSL-4 施設での病原体取扱者の適正確認、作業者の健康管理、緊急時の対応（停電、曝露、設備の不具合、盗取・盗難、地震、火災、その他）BSL-4 施設に設置される機器等の管理に関する SOP とすることを提言した。BSL-4 施設作業員向けには、作業員による作業上での安全性確保、動物実験実施、BSL-4 施設内で使用され

る機器等の取り扱い、実験室環境、実験機器グローブボックス(内部)の消毒に関する SOP を策定する。海外(アメリカ、ドイツ、カナダ、南アフリカ等)の高度安全実験施設(主に BSL4 施設)の例を参考に、BSL3、BSL4 実験室の安全管理運営に関する SOP 作成およびマニュアルに関する情報を収集した。ABSL4 施設に係る SOP の基礎となる ABSL3 施設、及び ABSL4 施設の使用及び管理に係る模範的な SOP の策定を行った。また、検査と実験室診断を行う際に実施する試験の信頼性を高いレベルで維持するために必要な事項を「品質マネジメント体制」と定義し、体制に必要な事項を ISO/IEC の観点から考察した。

A. 研究目的

米国で天然痘ウイルスの誤保管(Nature, news 9July2014)、炭疽菌(CDC press release 11July2014)やエボラウイルス(J Clin Microbiol, 2015, 53(10): 3148-3154)の不活化不十分な処理後の実験室外への搬出と実験事例、高病原性鳥インフルエンザウイルスを季節性インフルと誤認した一般検査機関への配布、不活化されていない炭疽菌芽胞の米国内外への誤配送など、バイオセーフティ、バイオセキュリティ上重要な問題が生じている。米国では CDC による NIH 等への立ち入り査察が行われ、エボラウイルスに関しては科学的知見(EID 2016, 22(7): 1292-1294)に基づく不活化の SOP を作成し、BSL4 実験室から不活化した検体の実験室外への搬出基準を見直している。これらの事例から、特定病原体等の診断・検査、研究において、ある段階で病原体の不活化が科学的に担保されなければバイオセーフティ上問題が生じることから、重要な病原体等の不活化条件を科学的に検討し SOP に反映することを目的とする。

一方、国立感染症研究所の高度封じ込め施設が、平成 27 年 8 月 7 日に厚生労働大臣により「感染症の予防及び感染症の患者に対する医療に関する法律」(感染症法)に定める特定一種病原体等所持施設として指定され、長崎大学に BSL4 実験施設を建設することが決定したことから、病原体管理をより強固にする必要がある。さらに、感染症法の改訂で、地方衛生研究所でも多くの感染症の実験室診断を行うことから、高病原性病原体を取扱う施設やその検査を行う施設を ISO17025 に準拠することを目指す。国内のバイオセーフティ、バイオセキュリティに関する規程等の適切な改訂を行い、その標準化を目指す。BSL-4 施設などの病原体等を取扱う施設にお

ける安全性、一類感染症の検査体制などを適切に担保するために、各種 SOP を作成、改訂する。また、病原体輸送に関するガイドラインの適切な改訂作業も行う。これらにより、バイオセーフティ、バイオセキュリティ上の安全確保をより確実なものとする。さらに、科学的知見に基づいた不活化法の再評価と安全な不活化法を確立し SOP を作成する。これらの成果をガイドラインとして取りまとめ、感染症サーベイランスや研究を担う、国立感染症研究所、地方衛生研究所、長崎大学等の機能強化を図ることを目的とする。

B. 研究方法

1) 病原体の不活化に関する研究

1. 野兔病菌の不活化に関する研究

野兔病菌は、非常に少量の感染性細菌で高い感染性と致死性を有することから、感染症法で二種病原体等に指定され BSL 3 に分類されている。野兔病菌を含む検体の血清学的検査、遺伝子検査、タンパク質解析、病理学的解析、フローサイトメトリー解析や共焦点レーザー顕微鏡による観察は、多くの場合 BSL1 や 2 で実施されている。野兔病菌の含まれる検体を BSL3 から不活化して外部での解析に供するために必要な不活化条件を解析した。

野兔病菌株: *F. tularensis* subsp. *tularensis* (野兔病菌) SCHU P9 株は、Chamberlain defined medium (CDM 液体培地)で培養した後、10%グリセロールを含む CDM 液体培地に浮遊させ、使用するまで -80 で保管した。以降の野兔病菌を取扱う操作は、BSL 3 で実施した。

遠心による生菌数への影響: 野兔病菌 (2.2×10^6 CFU)は、100 μ L の CDM に浮遊させ遠心(12,000 \times g、4、2 分間)した。遠心前の菌溶液と、遠心

後の上清は 10 倍段階希釈を作製し、生菌数を測定した。遠心後の菌沈殿物は、100 μ L の CDM に再浮遊させた後、その生菌数を測定した。これらの実験は 4 連で実施し、その平均値 \pm 標準偏差 (standard deviation, SD) および有意差を算出した。

熱処理による不活化試験：野兎病菌を、水、CDM、PBS (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) または FBS 溶液に約 5.7×10^5 CFU/100 μ L の濃度で浮遊させた。これらの菌溶液は、0.2 mL PCR 用チューブ (INA OPTIKA, Nagano, Japan) に、100 μ L ずつ添加し、94 で 3 分間、または 56 で 30 分間熱処理をおこなった。コントロールとして、同じサンプルを氷上で 3 分間、4 で 30 分間静置した。これらのサンプルにおける生菌数は、4 連で解析し、その平均生菌数 \pm SD 値を算出した。処理前および処理後のサンプルは、Student t-test で有意差検定を行った。

滅菌フィルターでろ過した溶液中に生残する菌数：CDM で浮遊させた野兎病菌 ($\sim 2.9 \times 10^6$ CFU) を、1 mL シリンジで吸い上げた後、0.22 μ m または 0.45 μ m の滅菌フィルター (Merk Millipore) でろ過した。ろ過前後の菌溶液の生菌数は、4 連で解析し、その平均生菌数 \pm SD 値および有意差を算出した。

種々の溶液による不活化試験：5 μ L の野兎病菌溶液を、100 μ L の水、10 % から 90 % エタノール (Sigma-Aldrich)、100 % メタノール (Nacalai, Kyoto, Japan)、100 % アセトン (Sigma-Aldrich)、50 % メタノール+50 % アセトン溶液、10 % 中性緩衝ホルマリン溶液 (Wako, Osaka, Japan)、4 % パラホルムアルデヒド (Wako) 含 PBS、100 % アセトニトリル (Sigma-Aldrich) に添加し、室温で 10 分間インキュベートした。一方、100 μ L の界面活性剤は、5 μ L の野兎病菌溶液と混合し、4 で 10 分間、1 時間、24 時間インキュベートした。処理後のサンプルは、溶媒を除くために遠心 (12,000 \times g、4、2 分間) した。菌沈殿物は CDM で再浮遊させ、生菌数を測定した。これらの実験は 4 連で実施し、その平均生菌数 \pm SD 値および有意差を算出した。

UV に対する野兎病菌の耐性試験：5 μ L の野兎病

菌溶液と、100 μ L の水、CDM、FBS を混合し、1.5 mL アシストチューブ (Sarstedt) および 0.2 mL PCR 用チューブ (INA OPTIKA) に添加した。各々のサンプルは、254 nm の紫外線を照射するフナ UV クロスリンカー (Funakoshi, Tokyo, Japan) を用いて、室温で 5、10、15、30、60 分間照射した。コントロールとして非照射サンプルを用意した。これらの実験は 4 連で実施し、その平均生菌数 \pm SD 値および有意差を算出した。

市販試薬による不活化試験：5 μ L の野兎病菌溶液 (3.7×10^6 CFU) を、100 μ L の Cell Lysis Buffer (CST, Tokyo, Japan) と混合し、4 で 10 分間、1 時間、24 時間インキュベーションした。また、100 μ L の Qiagen RNeasy mini kit (Qiagen, Hilden, Germany) 付属 RLT、および 100 μ L の RLT と 70 % エタノールの等量混合溶液に、5 μ L の野兎病菌溶液 (3.5×10^6 CFU) を混合した。処理前および処理後の菌溶液は、4 連で生菌数を測定し、その平均生菌数 \pm SD 値および有意差を算出した。

統計学的解析：生菌数の測定は 4 連で実施し、平均値および \pm SD を算出した。加熱処理前後の生菌数の有意差検定は、student t test を用いた。また、その他の処理前後の有意差検定は、1 - way analysis of variance (ANOVA)、2 - way ANOVA を用い、有意差 ($P < 0.05$) が認められた場合には Bonferroni post-tests を行った。これらの計算は GraphPad Prism 5 software を用いて実施した。

2. 炭疽菌の不活化に関する研究

炭疽菌は感染症法で二種病原体等に指定され BSL3 に分類される。炭疽菌の芽胞を白い粉状にして郵便物に意図的に混入させた生物テロが 2001 年に米国で発生し、日本でも模倣犯が多数おきて国立感染症研究所と地方衛研で検査が行われた。白い粉を含む炭疽菌芽胞からの分離同定検査を安全に行うためには、炭疽菌芽胞の不活化を徹底し二次感染、二次感染事故を防ぐ必要がある。今回、懸濁液中の炭疽菌芽胞の湿熱 (100) による不活化条件について検証した。

炭疽菌：弱毒無莢膜株 34F2 芽胞液 (含有芽胞数

1.0 × 10⁸ 個/mL) を用いた。芽胞液は、無莢膜弱毒炭疽菌芽胞を 50vol % グリセリン加生理食塩液に浮遊したワクチン(化血研 炭そ予防液“化血研”)を用いた。

加熱による不活化：芽胞液の原液 100 μL を 0.2 mL チューブに分注し供試芽胞液とした。湿熱温度を 100 とするため、GeneAtlas サーマルサイクラー(ASTEC 社製)を温度制御範囲上限の 99.9 (温度制御精度 ±0.1)に設定して 5 分間、10 分間、15 分間反応させた。各時間 3 本ずつ供試した。反応時間終了後直ちに、10 倍段階希釈液を PBS buffer で作成し、各希釈列 20 μL を LB 寒天培地上に塗抹し、37 恒温槽にて 20 時間、48 時間、1 週間、2 週間培養を行い生育した菌数を測定し、LB 培地上に生育したコロニー数(CFU/mL)を、各反応時間毎の残存芽胞数として算出した。

3 . ブルセラ属菌の不活化に関する研究

ブルセラ属菌のうちアボルタス、カニス、スイス、メリテンシスは感染症法で三種病原体等に指定され BSL3 に分類される。ブルセラ属菌は安全キャビネットが普及するまで実験室感染の最も多い病原体であった。ブルセラ症では、家畜ブルセラ菌(*Brucella abortus*, *B. melitensis*, *B. suis*) に対する抗体検査は、加熱処理(80 , 30 分)により調整された *B. abortus* の市販不活化全菌体を用いた試験管凝集反応が用いられている。また、遺伝子検出には、通常、加熱処理後(99 , 15 分)の遠心上清が用いられている。今回、ブルセラ属菌菌体を検査等に使用するために、不活化した上で提供する事を想定し、その検査内容・目的に合致した不活化法の検討を行った。

ブルセラ属菌： *B. abortus* 544株および *B. suis* 1330株を用いた。マイクロバンクに保存していた菌を、まず5%羊血液寒天培地で37°C、48時間(*B. abortus* は全て5%CO₂条件下)培養し復帰させた。これを新しい5%羊血液寒天培地に継代、24時間培養後、PBSに懸濁し、8x10⁹/ml溶液を作成した。さらに、以下の希釈列(8x10⁷, 8x10⁵, 8x10³/ml)を作成した。

抗体検出用抗原としての不活化検討：生乳殺菌基準である 63°C, 30 分または 72°C, 15 秒保持式処理を

検討した。0.2ml PCR チューブに、PBS を 37.5μl 入れ、さらに各希釈菌液を 12.5μl 加え、混和後、サーマルサイクラーで加熱処理(63°C, 30 分または、タイムラグを考慮して 15 秒ではなく、72°C, 20 秒保持式)を行った。その後、各検体(2x10⁹ ~ 2x10³/ml)をそれぞれ 10 倍段階希釈(たとえば 2x10⁹ なら、2x10⁹~2x10²)し、それぞれ 5μl ずつ、3 点(Triplicate)セアーマーチン寒天培地にスポットし、72 時間培養後、コロニーをカウントした。加熱処理を行わない未処理対照も同様に培養した。

臨床検査現場における MALDI-TOF MS 用検体調整としての不活化条件検討：近年、臨床検査分野では MALDI-TOF MS による菌の同定が広く行われるようになってきている。しかし、検体プレートに直接菌を塗抹、乾燥させる方法では、ブルセラ属菌は不活化されず、検査室感染のリスクが生じる。そこで、エタノール・ギ酸抽出法の使用が望ましい。本方法では、まず 75%エタノールに菌を懸濁することから、75%エタノール処理(4°C, 20 分)による菌の不活化を検討した。1.5ml チューブに、各希釈菌液を 125μl 入れ、99.9%エタノールを 375μl 加え、混和後、4°C, 20 分処理し、コロニーカウントして生存菌数を測定した。

ブルセラ属菌タンパク解析用としての不活化条件検討：一般的に、菌のタンパク解析には Western-Blotting 法が用いられることが多い。そこで、当該検査法の検体調整に用いられる界面活性剤を含有する RIPA buffer (1% NP-40, 0.15% Sodium deoxycholate, 0.1% SDS 含有)について、不活化の検討を行った。1.5ml チューブに、各希釈菌液と PBS を各 125μl 入れ、さらに 2xRIPA buffer を 250μl 加え、混和後、4°C, 20 分処理し、コロニーカウントした。

4 . 狂犬病ウイルスの不活化に関する研究

狂犬病ウイルスは感染症法で三種病原体等に指定され BSL3 に分類されている。狂犬病は、日本、英国、スカンジナビア半島の国々など一部の地域を除いて全世界に分布しており、発症すると 100%死亡する。狂犬病清浄国・地域と思われていた台湾で 3 年前に野生のイタチアナグマ間で長期に亘って狂犬

病が維持されていたことがわかったことから、疑い動物の狂犬病診断体制を国内で整備してきた。疑い動物の診断の Gold standard は脳スタンプ標本のアセトン固定抗原を直接蛍光抗体法 (FAT) で抗原の有無を確認する方法である。OIE のプロトコールではアセトン固定は冷アセトンで 20 分間以上となっている。国立感染症研究所は狂犬病ウイルス接種マウス脳スタンプ標本を、FTA の陽性対照として自治体等の研究機関に配布するためにウイルスの不活化条件を検討した。アセトン固定と 線照射に関して不活化条件を検討した。

5 . SFTS ウイルスの不活化に関する研究

SFTS 患者の血清中には 10^9 /mL 以上のウイルス RNA が含まれることがある。現在、地方衛研での行政検査は RT-PCR で行なうため RNA 抽出過程でウイルスは不活化される。しかし、血清診断を実施する場合には通常は熱処理による非働化などが実施される。そこで、そのための温度条件を検討した。ヒトプール血清に SFTS ウイルスを混ぜて模擬的な患者血清を作成し (スパイク試験) 熱処理による不活化を検討した。種々の熱処理後、ウイルス感染価を測定した。

6 . 高病原性鳥インフルエンザウイルス (HPAI) の不活化に関する研究

HPAI は感染症法で指定感染症 (2 類感染症) に指定され BSL3 に分類されてる。また、家畜伝染病法においても法定伝染予防病に指定されている。現在、国立感染症研究所のインフルエンザウイルス研究センターでは、鶏卵を用いた不活化確認試験の手順書 (SOP) を作成しているが、バリデーションが完了していない。一方、インフルエンザウイルスの分離や増殖は、鶏卵ではなく培養細胞を用いることもあり、鶏卵を用いた不活化確認試験では対応できないことも想定される。そこで、培養細胞を用いた不活化確認試験の確立を目指し、不活化剤による細胞毒性の検討、ならびに不活化条件の検討を行った。

細胞毒性試験: - プロピオラクトン (BPL) を様々な濃度に調整し、96 穴プレートに培養した MDCK

細胞に添加後、細胞の変性について検討した。

感染価測定: MDCK 細胞で分離・継代した A/H1N1pdm09 株である A/Narita/1/2009 (A/N) 株の 50% 鶏卵感染能 (EID₅₀) と 50% 細胞感染能 (TCID₅₀) を測定した。EID₅₀ は 10 倍段階希釈した A/N をそれぞれ 6 個ずつの 10 日発育鶏卵に 200 μ L ずつ接種し、35、2 日間培養後 4 で安楽殺し、0.5% 七面鳥赤血球液を用いて HA 価を測定、Reed & Muench の計算式で EID₅₀ 値を算出した。TCID₅₀ は 96 穴プレートの MDCK 細胞に同様に段階希釈した A/N を 4 穴ずつ添加し数日培養後、細胞変性の有無を確認、Reed & Muench の計算式で TCID₅₀ 値を算出した。

MDCK 細胞を用いた不活化確認試験: 様々な濃度に調整した BPL に細胞で馴化した A/N (CK15) を混合し、24 ないしは 48 時間反応させた。その後 96 穴プレートに 10 穴ずつ添加し、数日培養後、細胞変性の有無を確認した。

2) 病原体の適切な管理に資するバイオセーフティ、セキュリティに関する研究

1 . 国立感染症研究所の BSL-4 施設における病原体取扱いや検査における SOP 作成

国内外で、日本の感染症法で BSL-4 病原体に指定されている病原体には、エボラウイルス、マールブルグウイルス、クリミア・コンゴ出血熱ウイルス、ラッサウイルス、南米出血熱ウイルス、痘瘡ウイルス等がある。日本では 1981 年に国立感染症研究所 (武蔵村山市) に高度封じ込め施設 (いわゆる BSL-4 施設) が設置された。その施設は 2014 年 8 月に厚生労働大臣から BSL-4 施設としての施設稼働の指定を受けた。一方、国内では長崎大学においても BSL-4 施設の建設が進められている。国内外における BSL-4 病原体による感染症対策に関する研究の重要性が高まっている。2014 年に大規模エボラウイルス病流行が発生したり、スペインでクリミア・コンゴ出血熱が流行していることが確認されたり、ナイジェリア等で大規模ラッサ熱流行が続いている。日本でも極めて致命率の高いダニ媒介性ウイルス感染症 (ウイルス性出血熱に含まれる) が流行しているこ

とが明らかにされている。BSL-4 病原体による感染症が発見されてから久しいが、その診断・治療・予防法の開発等の作業の重要性は今も同じか、むしろ、一層高まっていると考えられる。

その作業を行う上で、作業者の安全を確保することは極めて重要で、そのための基盤がなければ、その作業を行うことは認められるものではない。

国立感染症研究所には、BSL-4 病原体を適切に取り扱うための基盤となる各種規程（病原体等安全管理規程、BSL-4 施設安全操作指針）やそれを管理するシステム（バイオリスク管理委員会、高度封じ込め施設運営委員会、動物実験委員会、等）が設置されている。本研究では、作業者が、等しく BSL-4 施設において病原体を安全に、かつ、継続して取り扱うことようにするために必要は標準作業手順（SOP）を作成することを目的とした。本年度は、BSL-4 施設において病原体を安全に取り扱う上で準備されるべき SOP の項目を検討し、提言する。WHO が刊行している Biosafety Manuaru 3rd Edition (http://www.who.int/csr/resources/publications/biosafety/WHO_CDS_CSR_LYO_2004_11/en/) や国立感染症研究所の BSL-4 施設安全操作指針等の内容を精査し、SOP を作成すべき事項を、作業者向けと管理者向けに分けて整理した。

2. 研究機関で定める安全管理規程等の改訂および BSL4 施設等のバイオセーフティ管理の SOP 作成

長崎大学において、スーツ型の BSL-4 施設を設置する計画が進んでいる。しかしながら、これまで国内ではスーツ型の BSL-4 施設がなかったことから、施設の安全管理運営については、海外の BSL-4 施設の情報を基にしたマニュアルや標準操作手順書（SOP）の作成が必要となる。そこで本研究では、長崎大学に設置予定の BSL-4 施設で用いるマニュアルおよび SOP 作成の参考のために、海外の高度安全実験施設（主に BSL4 施設）において用いられているマニュアルおよび SOP の情報収集を目的とする。また、得られた情報を基に、現在長崎大学で実施している、BSL-1, 2, 3 レベルの実験を行う者に対する

教育訓練実施内容への反映を目的とした。

1) 安全管理運営に関する情報収集：海外（アメリカ、ドイツ、カナダ、南アフリカ等）の高度安全実験施設（主に BSL4 施設）の安全管理運営に関する SOP およびマニュアルの情報を、各施設の安全管理担当者や研究者から収集した。

2) 安全管理規則および教育訓練の見直し：BSL-1, 2, 3 レベルの教育訓練実施内容を改定する。またそれに関連した項目について、長崎大学生物災害等防止安全管理規則（感染症発生予防規程）の改訂に反映した。

3. ABSL3、4 施設の使用及び管理に係る SOP の標準化に関する研究

国立感染症研究所が定めている病原体等安全管理規程（平成 29 年 11 月 2 日）BSL3 実験室安全操作指針（平成 23 年 4 月 1 日）及び BSL4 実験室安全操作指針（平成 28 年 9 月 27 日）を基本とし、ABSL3 及び ABSL4 施設の使用及び管理に係る SOP の策定に際して参考となる文献、資料を国内外から収集し、それらを集約して模範的な SOP を策定する。また、実験動物の適切な飼養保管に関する事項、実験動物による咬傷や搔傷を未然に防ぐための動物種の特性を理解するために資する事項、動物アレルギーや動物由来感染症といった動物実験に係る労働安全衛生に関する事項についても、文献、書籍等を国内外から収集し、それらを参考にして SOP を策定する。

4. BSL4 や BSL3 病原体取扱い施設の検査・実験室診断能力に関する品質マネジメント体制に関する検討

国立感染症研究所の高度封じ込め施設が、特定一種病原体等所持施設として指定され、BSL4 病原体の検査及び実験室診断の為の取扱いが法的に可能になった。また、長崎大学にも高度封じ込め施設が建設される。今後、国内で疑い患者が発生した場合、これらの施設を用いて検査を迅速に行い正確な診断を行い、その結果として適切な医療を患者に施すといった患者個々のレベル貢献のみならず、適切な隔

離を講ずる事により感染拡大を防ぐといった公衆衛生レベルの貢献が期待されている。これらの施設で実施する試験が疑い患者の実験室診断の要であり、その信頼性の確保が重要である。そこで、検査技術や機器の充実に留めず、更に信頼性を高めたシステムとして維持するために必要な事項を「品質マネジメント体制」と定義し、体制に必要な事項をISO/IECの観点から考察した。

(1) 従来の手順について：国立感染症研究所では、従来から国の感染症危機対策の一環として地方衛生研究所と協力して病原体診断を行ってきている。腸管出血性大腸菌 0157 を含めて、それらの取扱いと検査方法が「病原体検出マニュアル」として整備されている。病原体によっては、地方衛生研究所での実験室検査に加えて国立感染症研究所でも検査を行い、その結果で判定を確定するという手順が取られる事もある。これらの手順を病原体の検査・実験室診断能力に関する品質マネジメント体制として構築する時の問題点を検討した。

(2) 試験所及び校正機関の能力に関する一般要求事項 (ISO/IEC 17025)：国立感染症研究所は、ワクチン、血液製剤等の国家検定ならびに抗菌製剤、インターフェロン製剤の収去検査を業務として行う公的試験機関でもあり、「試験所及び校正機関の能力に関する一般要求事項 (ISO/IEC 17025)」に準拠したシステムで、試験の信頼性を確保している。ISO/IEC 17025 の要求要件を病原体の検査・実験室診断能力に関する品質マネジメント体制に当てはめる時の問題点を検討した。

(3) 検査あるいは実験室診断を行う公的機関について：ISO/IEC 17025を取得している検査あるいは実験室診断を行う公的機関を検索し、その機関と国立感染症研究所で期待される機能とを比較した。

C. 研究結果

1) 病原体の不活化に関する研究

1. 野兔病の不活化

野兔病菌の不活化に有効な処理方法：

野兔病菌の不活化方法として、加熱処理および有

機溶媒を用いた固定方法が汎用されてきた。そこで本研究では、従来から行われてきたこれらの不活化法の安全性を再検証した。加熱処理 (94 °C で 3 分間、および 56 °C で 30 分間) した場合、100 μ L の水 (H_2O)、CDM 培地、ウシ血清 (FBS) 中に浮遊させた野兔病菌は不活化され、生残した菌は確認されなかった (図 1A と B)。一方で、氷上で同時間静置した非加熱処理サンプルは、約 5.7×10^5 CFU の生菌が確認された。

少量の液体サンプルを滅菌する場合、滅菌フィルターがよく用いられる。この滅菌フィルターによる除菌能力を測定するために、CDM を用いて野兔病菌浮遊液を調整した後、0.22 および 0.45 μ m の滅菌フィルターでろ過した (図 1C)。ろ過前の野兔病菌生菌数は約 2.9×10^6 CFU/100 μ L だったが、0.22 μ m のフィルターを用いたろ過液には生菌は含まれていなかった。しかし、0.45 μ m のフィルターを用いたろ過液では 5.5 CFU/100 μ L の生菌が確認された。

病原体を取扱う実験室には、70 %エタノールが常備され、汚染が疑われる場合には速やかに 70 %エタノールのスプレーによる除菌が必要とされる。野兔病菌の実験操作を実施する上で、エタノールの有効濃度を測定する必要性が考えられた。そこで、エタノール溶液に野兔病菌を 3.1×10^6 CFU/100 μ L の濃度で浮遊させ、室温で 10 分間静置後、遠心操作によりエタノールを完全に除去した。この遠心によって、野兔病菌の生菌数が変動しないことは予め確認した (図 1D)。50 %以上の濃度のエタノールで室温 10 分間処理した場合、野兔病菌は全く検出されなかったが、10 %および 30 % エタノール処理では 1.6×10^6 CFU および 1.2×10^4 CFU の生残菌が確認された (図 1E)。同様に、固定試薬として汎用されているメタノール、アセトン、10 %中性緩衝ホルマリン、4 % パラホルムアルデヒドや、その他有機溶媒であるアセトニトリルについて不活化能を測定した (図 1F)。これらの有機溶媒を用いて室温で 10 分間処理した場合、 1.2×10^6 CFU の野兔病菌は完全に不活化されていた。

界面活性剤および紫外線照射による野兔病菌の殺菌効果：

野兔病菌の菌体または感染細胞からのタンパク質抽出には界面活性剤が用いられる。そこで、様々な界面活性剤による野兔病菌の不活化能を測定した。SDS-PAGE のサンプル作製に用いている 1% Lithium Dodecyl Sulfate を含む緩衝液や、1% TritonX-100、1% NP-40 を含むウシ胎児血清(FBS) に 2.9×10^6 CFU の野兔病菌を混合し、4 で 10 分間、1 時間、24 時間のインキュベーションを行った (図 2A)。この結果、野兔病菌不活化能の強弱が有るものの、全てのサンプルで生菌が確認された。

紫外線 (UV) 照射は、病原体を不活化する手段として常用されている。そこで、水、CDM、FBS で調整した野兔病菌浮遊液を、1.5 mL アシストチューブ (Sarstedt) および 0.2 mL PCR 用チューブ (INA OPTIKA) に添加した後、紫外線を照射した (図 2B)。これらサンプルの生菌数を測定したところ、5 分間 (1.8 J/cm^2) の紫外線照射により、水および CDM 中の野兔病菌は全て死滅していた。しかし、FBS では紫外線の殺菌効果は明らかに減弱していた。そこで、FBS 中の野兔病菌を殺菌するために、紫外線の照射時間を 60 分間まで延長して、生菌数を測定した (図 2C)。この結果、FBS 中の野兔病菌の生菌数は、照射時間の長さに依存して生菌数は減少したが、60 分間照射でも完全に滅菌することはできなかった。また、病原体を封入した容器の種類による影響を調査したところ、0.2 mL PCR 用チューブ (INA OPTIKA) を用いた場合の殺菌効果は高く、1.5 mL アシストチューブ (Sarstedt) を用いた場合の殺菌効果は低かった。しかし、どちらのチューブを用いても、60 分間の紫外線照射を行っても、野兔病菌を完全に殺菌することはできなかった。

市販試薬を用いた処理による野兔病菌生残試験：

RNA 抽出の際に使用される RNeasy mini kit (Qiagen) 付属 RLT (図 2D) およびサイトカイン濃度測定の際に使用される Cell lysing buffer (CST) (図 2E) の殺菌効果について検討した。RNeasy mini kit 付属 RLT に 3.5×10^6 CFU の野兔病菌を添加した

ところ、生菌は確認されなかった。同様に、RLT と 70%エタノールを等量混合した溶液でも、生菌は確認されなかった。一方で、 3.7×10^6 CFU の野兔病菌を CST を用いて氷上で 10 分間処理した場合、その生菌数は 1/53 量 (7.1×10^4 CFU) に減少したものの、多くの生菌が確認された。

2 . 炭疽菌の不活化

加熱前 (反応時間 0 分に相当) の芽胞数を生育コロニー数から算出したところ、 1.0×10^8 個/mL であった。反応時間毎の希釈列を塗抹した LB 培地上のコロニーは 24 時間後には全て発育し、2 週間の培養期間中コロニー数の増加はなかった。

湿熱条件下 (99.9) による加熱では 5 分後では芽胞数は 10 分の 1、10 分後の芽胞液では 1000 分の 1 と有意に減少したものの ($P < 0.001$)、完全には不活化できず、残存した芽胞がコロニーを形成した。一方、15 分後の芽胞液は検出限界以下となり培養期間中の 2 週間も残存芽胞によるコロニーの出現は認められなかった (図 3)。

3 . ブルセラ属菌の不活化

抗体検出用抗原として (加熱処理)：

63 、30 分処理で *B. abortus*、*B. suis* 共に完全に不活化された。一方、72 、20 秒処理では、*B. abortus* は完全に不活化されたが、*B. suis* は 2×10^2 /mL から 2×10^7 /mL の濃度の菌液では完全に不活化されたが、 2×10^9 では 10^2 菌が生残した。

臨床検査現場における MALDI-TOF MS 用検体調整として (エタノール処理)：

MALDI-TOF MS 用検体調整でエタノール・ギ酸抽出法を用いる場合の菌の懸濁に用いる 75%エタノール処理で、*B. abortus*、*B. suis* とともに完全に不活化された。

ブルセラ属菌タンパク解析用として (RIPA 処理)：

RIPA buffer (1% NP-40, 0.15% Sodium deoxycholate, 0.1% SDS 含有) による 4 、20 分間の処理では、*B. abortus*、*B. suis* 共に 10^2 オーダーしか不活化されず、菌が生残した。

4. 狂犬病ウイルスの不活化

狂犬病ウイルス感染マウス脳標本、狂犬病ウイルス感染細胞塗抹標本に関してアセトン固定を行った結果、20時間の固定後に $> 3.3 \times 10^{-4}$ 以上の感染力価低下が認められたが完全に不活化できなかった。

狂犬病ウイルスは文献では 20kGy で不活化できると報告されている。そこで、MNA 細胞に狂犬病ウイルスを感染させた培養上清（力価 6.3×10^6 FFU/100 μ L）と狂犬病ウイルス感染乳飲みマウス脳（力価 1.3×10^6 FFU/100 μ L/mg）を PIIC-480C 型コバルト 60 ガンマ線照射装置で照射して不活化曲線を求めた。その結果、文献による不活化条件の 20kGy ではいずれも不活化できず、80 kGy で検出限界以下まで不活化できた。MNA 細胞培養上清での不活化は 80 kGy で $>1.6 \times 10^{-6}$ となった（図 4）。乳飲みマウス脳での不活化は 80 kGy で $>3.3 \times 10^{-5}$ となった。このため、配布する狂犬病ウイルス感染マウス脳標本は、20 時間アセトン固定 + 80 kGy の 線照射とした。この処理で計算上では $> 5.3 \times 10^{-11}$ の不活化となり、狂犬病ウイルス感染乳飲みマウス脳の力価 1.3×10^6 FFU/100 μ L/mg は処理後には 7.0×10^{-5} FFU/100 μ L/mg となり計算上は完全不活化が担保される。

5. SFTS ウイルスの不活化

スパイク試験の結果、通常の血清非働化条件である 56、30 分間の熱処理では 1/100 程度の感染力の低下がみられたが、不活化は不十分であった。一方、60、60 分間の熱処理ではウイルス感染力は検出限界以下となった。SFTS 患者血清（ 10^6 RNA コピー/mL）を用いて同様に熱処理し、Vero 細胞に接種してウイルス分離を行ったところ、56、30 分間の熱処理した全ての血清からウイルスが分離され、スパイク試験と同様、不活化は不十分であることが判明した。60、60 分間の熱処理でも、一部の血清からウイルスが分離されたことから、血清中の SFTS ウイルスを完全に不活化するためには、熱処理（60、60 分）に加え、UV 照射等の 2 重の処理が必要と考えられた。

6. 高病原性鳥インフルエンザウイルス（HPAI）の不活化に係る試験法

BPL の細胞毒性：

-30 で保管、もしくは 27（常温）ないしは 37 で 24 時間保温した BPL を様々な濃度（1, 0.5, 0.25, 0.125, 0.063, 0.031, 0.016, 0.008%）に調整し MDCK に添加後、2~3 日培養し細胞の変性を確認した。その結果、全ての温度で保温した BPL において、0.063%以上の濃度では、細胞に著しい変性が認められ、0.031%の濃度では細胞の部分的な円形化が認められた。一方、0.016%以下の濃度では、細胞の変性は全く認められなかった。以上の結果から BPL で不活化処理したウイルスの MDCK 細胞を用いた不活化確認試験を行う場合には、培養液中の BPL 濃度を 0.016%以下とする必要があると示唆された。

細胞で分離・継代したインフルエンザウイルスの感染価：

MDCK で分離・継代したインフルエンザウイルス A/N 株の鶏卵および MDCK における感染価を測定した。MDCK で分離後 2 代継代した A/N（CK3）の EID₅₀ 値は 4.9 で TICD₅₀ 値は 7.4 であった。さらに 12 代継代した A/N（CK15）では EID₅₀ 値は 5.0 で継代前と同等であったが、TICD₅₀ 値は 8.2 に増加した。このことは継代による馴化によって MDCK を用いた感染価は増加するが、鶏卵における感染価には変化がないことを示唆している。また、MDCK で分離したインフルエンザウイルスは鶏卵よりも細胞に対する感染価が高いことが示唆された。

細胞で継代した A/N（CK15）の BPL を用いた不活化条件の検討：

様々な濃度の BPL と A/N を等量混合し（BPL の最終濃度：0, 0.02, 0.01, 0.005, 0.0025%）4 で 24 もしくは 48 時間静置後、MDCK に添加した結果、0.01%の濃度で 48 時間反応させた場合でのみ、細胞変性が認められなかった。このことは BPL で TCID₅₀ 値が 8.2 以上のウイルスを不活化するためには 0.01%以上の濃度で 48 時間の反応時間を要すると示唆された。また 0.02%の濃度で不活化したウイルスを添加した MDCK 細胞で認められた細胞変性は、BPL 濃度が 0.016%よりも高かったことによ

る細胞毒性であることが示唆された。

2) 病原体の適切な管理に資するバイオセーフティ、セキュリティに関する研究

1. 国立感染症研究所の BSL-4 施設における病原体取扱いや検査における SOP 作成

A) 管理者 (バイオセーフティ管理) 向け SOP としては、管理運営に関してバイオセーフティ管理室員が行う業務についての SOP は、BSL-4 施設稼働前に作成、運用されている。現在、現行 SOP を各業務の実施状況が記録として保管される様式へと改訂中である。これに加えて、管理業務およびその記録がより明確にするために SOP を細分化する事が必要と考えられた。それにより別途準備すべき SOP として以下の項目が挙げられた。

1) 定期的な施設の機能 (実験室内外の差圧, 給気・廃棄システム, 排水処理システム) を確認するための SOP

2) 年に 1 度の定期検査を実施するための SOP

3) セキュリティ強化のための SOP

BSL-4 施設にアクセスすることのできる作業員の認定のための SOP

BSL-4 施設にアクセスすることのできる作業員の BSL-4 施設へのアクセスするための入退室管理システムへの登録・解除設定のための SOP

BSL-4 施設周辺の安全管理システム (監視モニター, 防犯の定期的な監視) を実施するための SOP

BSL-4 実験室排水の高圧滅菌及びその後の排水消毒処理実施のための SOP

有害化学物質を含む実験廃液の消毒・滅菌及び所定の方式による廃棄作業のための SOP

4) BSL-4 施設での病原体取扱者の適正を確認するための SOP

作業員の精神的な安定性を年に 1 度調べるための健康診断を実施するための SOP

BSL-4 実験室利用者講習会実施のための SOP

BSL-4 実験施設利用者向け教育訓練実施のための SOP

5) 緊急時の対応 (停電、曝露、設備の不具合、盗取・盗難、地震、火災、その他) のための SOP

6) BSL-4 施設に設置される機器等の管理に関する SOP

BSL-4 施設の機器及び器材等の搬出と搬入

B) 作業員 (病原体取扱者) 向け SOP 項目としては、以下の項目が挙げられた。

1) 作業員が安全に作業を行う上で準備されるべき SOP

保管庫から一種病原体等の出し入れを行う場合の SOP

BSL-4 実験室の設備及び機器等の日常点検を実施するための SOP

個人防護用具の準備, 脱着, 廃棄を安全に実施するための SOP

病原体を安全に保管 (保管庫の鍵の管理 SOP, 保管管理リストの記載・記録 SOP, 病原体保管方法 SOP) するための SOP

病原体やその他の材料等をグローブボックス外に取り出す作業用 SOP

作業終了時の消毒・滅菌作業を実施するための SOP

作業終了時に行うべき作業 (使用後のマスク, 手袋及び防護服等の消毒・滅菌, 等) の実施のための SOP

実験作業記録用紙 (日誌) 及び特定一種病原体等使用・滅菌等記録, 実験ノート, 病原体保管ノート, 等) の BSL-4 施設外への搬出に関する SOP

ガンマセル室でガンマセルを用いて病原体を不活化する作業のための SOP

グローブボックスに装着されているグローブが破損した場合の対処方法に関する SOP

1) 動物実験実施における SOP

BSL-4 施設への動物搬入に関する SOP

BSL-4 施設への動物飼育用ケージの搬入に関する SOP

BSL-4 施設における動物の飼育方法に関する SOP

BSL-4 施設における動物実験の詳細な実施手技に関する SOP

2) BSL-4 施設内で使用される機器等の取り扱いに関する(使用機器の消毒, 滅菌, 故障時の対応を含む) SOP

超遠心機

遠心機

グローブボックス内に設置されている CO2 インキュベーター

顕微鏡および撮影機器

冷蔵・冷凍庫

3) 実験室環境, 実験機器, グローブボックス(内部)の消毒に関する SOP

実験室内環境の化学的消毒法(グローブボックス外)のための SOP

器具・機器類の化学的消毒法

実験に使用したグローブボックス内の消毒

2. 研究機関で定める安全管理規程等の改訂および BSL4 施設等のバイオセーフティ管理の SOP 作成

1) 安全管理運営に関する情報収集

アメリカ NIAID ロッキーマウンテン研究所から、BSL-4 実験室のマニュアルおよび SOP の情報入手した。また、アメリカのガルベストン国立研究所(GNL)、ボストン大学新興感染症研究所(NEIDL)、ドイツのフィリップ大学マールブルク、カナダ国立微生物学研究所、南アフリカ国立伝染病研究所の安全管理担当者および使用している日本人研究者から、安全管理運用に関する情報を得た。

2) 安全管理規則および教育訓練の見直し

BSL-1, 2, 3 レベルの実験を行う者に対する教育訓練実施内容を見直し、長崎大学が実施する教育訓練に反映させた。また、教育訓練にかかわる部分について、長崎大学生物災害等防止安全管理規則(感染症発生予防規程)の改訂に反映させた。

3. ABSL3, 4 施設の使用及び管理に係る SOP の標準化に関する研究

ABSL3 及び ABSL4 施設における実験手技、安全機器・設備に関する SOP は、世界的に知られている WHO の「実験室バイオセーフティ指針 第3版」と米国の"Biosafety in Microbiological and

Biomedical Laboratories 5th Ed." (BMBL; CDC and NIH, USA)をはじめ、以下の資料を収集した。

1) "Testing and Performance-Verification Methodologies for Ventilation Systems for Biosafety Level 3 (BSL-3) and Animal Biosafety Level 3 (ABSL-3) Facilities" (ANSI/ASSE Z9.14, the American Society of Safety Engineers & the American National Standards Institute, USA; 2014)

2) "Guidelines for Safe Work Practices in Human and Animal Medical Diagnostic Laboratories" (CDC MMWR, USA; 2012)

3) "Select Agents and Toxins Biosafety/Biocontainment Plan Guidance" (CDC and APHIS, USA; 2017)

4) "Safety Standards for Microbiological & Biomedical Laboratories" (Department of the Army Pamphlet 385-69, USA; 2013), "Biosafety Level 3 Manual Version 2" (Emory University, USA; 2017)

5) "Biological Safety Plan" (University of Texas at San Antonio, USA; 2017)

6) "Biosafety Manual" (University of Louisville, USA; 2017)

7) "Biological Safety Manual" (New York University, USA; 2016)

8) "Biological Safety Manual Version 1.0" (University of Pennsylvania, USA; 2013)

9) "Animal Biosafety Manual" (Arizona State University, USA; 2012)

10) "ABSL-4 aerobiology biosafety and technology at the NIH/NIAID integrated research facility at Fort Detrick" (Lackemeyer et al., 2014. Viruses 6: 137- 50)

11) "Personal Protective Equipment in Animal Research" (Villano et al., 2017. Comp Med. 67: 203- 14)

12) "Novel Approach for Validating Autoclave Cycles for Biomass in BSL-3/-4" (Santacroce et al., 2015. Applied Biosafety 20: 141- 45)

13)「微生物によるバイオハザードとその対策」
(岩田和夫編、ソフトサイエンス社)

これらの資料を参考にし、国立感染症研究所 BSL3 実験室安全操作指針及び BSL4 実験室安全操作指針の項目に沿って策定した。

実験動物の適切な飼養保管に関する事項、実験動物による咬傷や搔傷を未然に防ぐための動物種の特性を理解するために資する事項、動物アレルギーや動物由来感染症、その他動物実験に係る労働安全衛生に関する事項の SOP は、以下の資料を収集し、これらを参考にして策定した。

- 1)「実験動物の飼養及び保管並びに苦痛の軽減に関する基準の解説」(環境省自然環境局総務課動物愛護管理室編集; 2017)
- 2)「動物実験の適正な実施に向けたガイドライン」(日本学術会議; 2006)
- 3)「実験動物の管理と使用に関する指針 第 8 版 (Guide for the Care and Use of Laboratory Animals 8th ed., 2010)」(National Research Council, USA; 社団法人日本実験動物学会監訳/アドスリー)
- 4)「実験動物の管理と使用に関する労働安全衛生指針 (Occupational Health and Safety in the Care and Use of Research Animals 1997)」(National Research Council, USA; 日本実験動物環境研究会編集/アドスリー)
- 5)「実験動物の技術と応用 実践編」(社団法人日本実験動物協会編/アドスリー)
- 6)「アニマルマネジメント」「アニマルマネジメント」(大和田一雄監修、笠井一弘著/アドスリー)
- 7) "Animal Research Facility Standard Operating Procedures Version 1.1" (Nanyang Technological University, Singapore; 2015)
- 8)「サル類の飼育管理及び使用に関する指針 第 3 版」(京都大学霊長類研究所; 2010)
- 9)「動物実験施設等における動物由来の咬傷、搔傷および感染症への対応について」「動物実験施設等における負傷、疾病への対応について」「動物実験施設等で使用する有害化学物質の取り扱いについて」(以上、国立大学法人動物実験施設協議会

環境保全委員会)

4. BSL4 や BSL3 病原体取扱い施設の検査・実験室診断能力に関する品質マネジメント体制に関する検討

(1) 現在の手順について

国立感染症研究所で病原体を扱うために定められている最も上位にある規則が「国立感染症研究所 病原体等安全管理規程」(現在、第三版の平成 29 年 11 月改訂版が最新)(以下「安全管理規程」である(図 5)。これは、「感染症の予防及び感染症の患者に対する医療に関する法律(以下、感染症法)」で定める病原体の安全管理を諮ることを目的としている。安全管理規定は、第 1 章 総則、第 2 章 安全管理体制、第 3 章 安全管理基準、第 4 章 健康管理、第 5 章 遵守義務と罰則、第 6 章 雑則に加えて別表及び別冊から構成され、事故防止に係る安全上の観点と防犯対策上の観点から書かれている。教育訓練、記帳の義務については、第 3 章で触れている。これに加えて、国立感染症研究所において取り扱う家畜伝染病予防法で定める家畜伝染性病原体の安全管理を「国立感染症研究所 家畜伝染病病原体安全管理規程」(現在、第一版の平成 29 年 11 月改訂版が最新)として別に定め、病気の発生を予防し、その蔓延の防止を諮っている。加えてこの下位文書として、「病原体等の分与等に関する取扱要領」「病原体等の輸送・運搬に関する取扱要領」「公用車による病原体等の運搬に関する要領」「特定病原体等の施設内管理区域運搬要領」「病原体等事故対応要領」「病原体等安全管理区域運営規則」「BSL2 及び BSL3 実験室」運営規則」及び「同」高度封じ込め施設」運営規則」があり、この下位文書として「BSL2 実験室安全操作指針」、「BSL3 実験室安全操作指針」、「BSL4 実験室安全操作指針」があり、さらにその下位文書として「病原体等暴露事故応急対応マニュアル」が存在している。BSL4 レベルでの実験を想定した規則及び指針は、防犯上の理由で関係者以外には公開されていない。安全管理組織体制を図 6 に示した。病原体の取扱いは、すべて所長、バイオリスク管理委員会が管理し、外部有識者を含む病原体

等取扱安全監視委員会が、病原体等の取扱いの実施状況を査察・監視し、安全な取扱いを確認する役目を負っている。BSL2 及び BSL3 病原体の取扱いは、バイオリスク管理運営委員会が取り決めており、BSL4 病原体の取扱いに関しては、高度封じ込め施設運営委員会が別に設置され、取り決める事になっている。病原体の取扱いに係る文書の変更修正は、バイオリスク管理委員会が担っており、最上位の規程の改訂には国立感染症研究所の所長(部長会)の承認が必要とされている。要領・規則及び指針はバイオリスク管理委員会の承認により改訂される。BSL2 実験室は、国立感染症研究所各部センター等に散在していることから、各部センター長がそれぞれの状況に合わせて個別ルールを定めている場合もある。今回はこれらの個別ルールについては無視した。

国立感染症研究所では、感染症法に基づいて感染症の報告がなされる際の検査の標準化のために、全国の地方衛生研究所と共同して病原体検出マニュアルを作成し、科学の進歩並びに感染症を取り巻く環境の変化に合わせてより適切なものに更新を行っている。これらの病原体検出結果はまとめられ、国の感染症対策を決めるための重要な情報を提供している。マニュアルに書かれている疾病で感染症法上、1 類感染症として分類されるエボラウイルス、マールブルグウイルス、クリミア・コンゴ出血熱ウイルス、ラッサウイルスといった病原体により引き起こされる疾病は BSL4 病原体によるものである。同じく 2 類感染症法として分類される重傷急性呼吸器症候群(SARS)、トリインフルエンザ(H5N1)、結核といった疾病で、SARS ウイルス、H5N1 インフルエンザウイルス、結核菌といった病原体により引き起こされる疾病は BSL3 病原体によるものである。

(2) 試験所及び校正機関の能力に関する一般要求事項(ISO/IEC 17025)

国立感染症研究所はワクチン、血液製剤等の国家検定、ならびに抗菌製剤、インターフェロン製剤の収去検査を行う公的試験検査機関である。2014 年 7 月に日本(厚生労働省、医薬品医療機器総合機構、47 都道府県薬務主幹課)は、「医薬品査察協定および医薬品査察協同スキーム(PIC/S)」の 45 番目の加

盟国となった。この時、医薬品の調査当局だけでなく、収去試験を実施する公的試験検査機関(国立感染症研究所、国立医薬品食品衛生研究所、各都道府県の地方衛生研究所)も PIC/S の要求を満たすことが求められ、そのため「試験所及び校正機関の能力に関する一般要求事項(ISO/IEC 17025)」に準拠した規格が各機関内に構築された。

最も基本となるのが、検査を行う組織の体制とこの体制を PDCA サイクルの中で動かすための品質マネジメントである。次に実際に運用する手順として文書管理、苦情処理、変更管理、逸脱処理、教育、内部監査、マネジメントレビュー等が 2013 年度から運用され現在に至っている。ISO/IEC 17025 の要求要件を BSL3/BSL4 病原体の検査・実験室診断に当てはめてみると以下ようになる。組織については、所長、バイオリスク管理委員会、バイオリスク管理運営委員会、高度封じ込め施設運営委員会、各部センター長等、BSL2/3/4 実験室運営責任者、BSL2/3/4 病原体取扱者(図 6) ならびに、試験・検査試料の受取、試験・検査担当部への資料受渡、試験・検査結果の受取と連絡と言った流れは、既に出来上がっている。

国家検定、収去試験に置いては、試験材料、試験結果の取り違えが無いように、専用のデータ管理システムに管理されており、所内で一括化されている。一方、試験・検査の最終結果は、担当した各部センター等で定められた様式になっている。病原体検出マニュアルでは、試験方法並びに結果の判定方法について書かれているものの、各実験室環境に合致した SOP を別途作る必要がある。

病原体等の取扱いの実施状況を査察・監視し、病原体等の安全な取扱いを確認する組織として病原体取扱安全監視委員会(図 6) が設置されているが、検査・実験室診断能力の確認までは、この委員会の活動の範疇には含まれていない。病原体の検査・実験室診断に携わる職員の病原体取扱にかかる安全上の教育および訓練は、毎年、所として実施されているが、検査の頼り性に係る教育および訓練は、所としては行われていない。

(2) 検査あるいは実験室診断を行う公的機関

帯広畜産大学原虫病研究センターは 1990 年に帯広畜産大学に設置された研究センターで、2009 年に文部科学省の共同利用・共同研究拠点として認定され、原虫病に特化した研究施設として研究活動を続けてきた。原虫病に対する正確な診断が、有効な治療及び病気の拡大防止に役立つため、2017 年には国内にある大学としては初となる食品・生物系検査の国際規格である ISO/IEC 17025:2005 を取得し、牛バベシア病、馬ピロプラズマ病及びスーラ病に係る検査業務の品質を高めた。更に加えて同センターが国際獣疫事務局 (OIE) 認定のリファレンスラボ、コラボレーションセンターとして研究・検査活動を行う際に、その活動が国際的に通用するレベルとして認知されるのにも貢献しており(図 7)、海外からの研修生の受け入れ、JICA 国際プロジェクトの推進にも ISO 認証の成果が活用されている。同センターでは、有料の検査業務も担っており、診断結果の信頼性を高めるのにも役立っている。

D . 考察

1) 病原体の不活化に関する研究

高い感染性と致死性を有する無芽性の野兔病菌は、BSL3 施設での取扱が義務付けられている。野兔病菌の生物学的性状や野兔病菌に感染した宿主の免疫応答などの解析を行うために、BSL3 で作製した野兔病菌サンプルは、多くの場合 BSL2 または BSL1 施設に移動する必要に迫られる。既知の報告や、これまでの経験と、本研究の結果から、加熱処理(94 で 3 分間、56 で 30 分間)、0.22 μm フィルターを用いたろ過滅菌、70% エタノール、アセトン、メタノール、10% 中性緩衝ホルマリン溶液、4% パラホルムアルデヒドなどを用いた処理法は、野兔病菌の不活化に有効であることが確認された。一方で、0.45 μm フィルターを用いたろ過滅菌、界面活性剤や紫外線照射を用いた殺菌法は、野兔病菌の完全不活化は不可能である可能性が示唆された。本研究で示したデータは、現在までに考えられてきた野兔病菌の不活化条件と大きな差はないと思われるが、本研究は野兔病菌の不活化条件を網羅的かつ詳細には

じめて検討し、その実測データを提供した。

我々は、野兔病菌を含むサンプルを用いて、血清学的診断、病理学的解析、ウエスタンブロット解析、遺伝子発現解析、サイトカイン濃度測定などを日常的に実施している。これらのサンプル作製の安全性について、検証した。ELISA、凝集反応、ウエスタンブロットなどの血清学的診断に用いる血清は、非働化処理を行う。この非働化処理は殆どの場合、血清を 56 で 30 分間インキュベートする。これまでの知見および本研究のデータから鑑みて、野兔病菌はこの加熱条件で死滅することから(図 1B)、非働化処理された血清は安全に取り扱うことができると考えられた。病理学的解析やフローサイトメトリー解析をおこなう際に、感染細胞はホルマリンやパラホルムアルデヒドを用いて固定される。これらの固定液の野兔病菌不活化能は非常に優れているが、浸透速度を考慮する必要性がある。また、4% パラホルムアルデヒドを用いれば 5 分間でマクロファージ内の野兔病菌は完全に殺菌できるが、1%パラホルムアルデヒド溶液では 24 時間処理してもマクロファージ内の野兔病菌は不活化できなかったとの報告 (Emery ら, 2014) がされている。故に、野兔病菌を固定する際には、固定液の濃度や処理時間について十分に注意を払う必要がある。我々は、細胞などから RNA を抽出する際に RNeasy mini kit を用いている。このキットでは、キット付属 RLT で細胞を可溶化した後、等量の 70% エタノールを混合する手順となっている。これらの溶液で処理すると野兔病菌は殺菌されていたことから(図 2D)、このキットで精製された RNA サンプルは、安全に取り扱うことができると考えられた。野兔病菌感染サンプルからタンパク質を抽出する際には、界面活性剤が汎用される。ウエスタンブロット解析のサンプルであれば、一般的に加熱処理(94 で 15 分間)を伴うことから、安全性は簡単に確保できると考えられた(図 1A)。しかし、サイトカイン測定などタンパク質非変性条件下の殺菌処理が必要不可欠な場合には、0.22 μm フィルターを用いたろ過滅菌(図 1C)、リゾチームなどの溶菌試薬、ゲンタマイシンなどの抗生物質処理と併用する必要があると考えられた。野

兎病菌の不活化条件を網羅的に検討しその詳細なデータを提供した。今後は、非変性条件下のタンパク質抽出する際の不活化条件について検討する必要があると考えられた。

炭疽菌芽胞の湿熱条件下での不活化は、チューブ内の温度を高い精度で制御できるサーマルサイクラーを用いることで 99.9 (温度制御精度 ± 0.1) 15分間加熱することで不活化可能であることが示された。

2週間にわたる培養期間中、新たに生育し始めるコロニーは認められなかったことから、炭疽菌芽胞の一部が損傷し増殖が遅延する現象は確認されなかった。このことから 99.9 (温度制御精度 ± 0.1) の湿熱処理は精度の高い不活化であることが示された。

ブルセラ属菌を不活化した上で各検査機関等に提供する場合、その使用目的として、抗体検出用の抗原、遺伝子検出用菌体としての利用が考えられる。現在、抗体検出用抗原は市販されており、加熱処理 (*B. abortus* は 80°C, 30分、*B. canis* は 60 , 1時間) により調整されている。また、生乳は、国内では 63°C, 30分、米国は 62.8°C, 30分、欧州は 71.7°C, 15秒保持式処理が殺菌基準として用いられている。そこで、抗体検出用抗原加熱処理と比較して、よりマイルドな 63°C, 30分を検討したところ、高濃度の菌液でも完全に不活化されることが明らかとなった。本条件は、凝集反応用としても抗原性が保持されており、また、遺伝子検出用菌液としても使用可能であることから、いわゆるラボ検査目的に菌を不活化して提供する際の、第一選択の不活化法であることが明らかとなった。今回、72°C, 20秒処理で、*B. suis* が生残したが、これは、サーマルサイクラーの設定上(71からカウントが始まる) 20秒の保持式が難しかったためかもしれない。また、臨床検査分野で急速に普及してきている MALDI-TOF MS 用に対しては、75%エタノール処理が適していることが示された。タンパク質解析用の界面活性剤処理(RIPA処理)では、菌の不活化は不十分で RIPA 処理後に通常行われる加熱処理が必須であることが明らかとなった。

狂犬病疑い動物の脳スタンプ標本の FAT による

診断法は gold standard であるため、検査対応機関に陽性対照抗原として狂犬病マウス感染マウス脳スタンプ標本を配布した。そのための不活化条件を検討した結果、アセトン固定だけでは不活化が不十分であることが明らかとなり、線照射を追加することにより不活化が担保された。しかし、実際の疑い動物の脳サンプルのスタンプ標本の不活化に関して線照射を行なうことは不可能であることから、アセトンとメタノールの併用や短時間のホルマリンやプルタルアルデヒドの固定を組み合わせるなど、抗原性を失わずに不活化できる条件を更に検討することが必要である。

SFTS の実験室診断は地方衛研での行政検査で RT-PCR が実施されている。今後、血清診断が導入されることを想定して血清中のウイルスの熱不活化条件を検討した。その結果、血清の非働化条件である 56、30分間の処理では、不活化できないことがわかった。温度と処理時間を上げて 60、60分間処理するとかかなり感染価が減少したが完全には不活化できなかった。血清中には大量のタンパク質が含まれるため熱処理に比較的耐性になると考えられる。このため、熱処理(60、60分間)に加え、UV照射等の2重の処理が必要と考えられた。エボラウイルスの不活化に関しては、不活化不十分な処理後の実験室外への搬出と実験事例が米国で報告され(J Clin Microbiol, 2015, 53(10): 3148-3154)、不活化条件を詳細に検討した論文が発表され、それに基づいた SOP が NIID では作成されている。SFTS ウイルスも不活化に関する条件を検討した結果、特にタンパク質濃度の高い血清中のウイルスは熱処理に比較的耐性であることがわかった。このことは、脂質膜を有するウイルスは同様に血清中では比較的安定である可能性がある。特に血清診断では血清の非働化が行われるがこの熱処理では不十分であることから、不活化が可能で抗体検査に支障がない不活化法を検討する必要がある。

高病原性鳥インフルエンザウイルス(HPAI)の不活化に係る試験を鶏卵接種試験とは別に、培養細胞を用いた不活化確認試験の確立を目指し、現在インフルエンザウイルスの不活化剤として用いられてい

る BPL の細胞毒性および不活化効率を検討した。その結果、0.01%の濃度で 48 時間反応させることにより、 $10^{8.2}$ TCID₅₀ 以下の細胞感染価のインフルエンザウイルスを不活化できることが示された。しかしながら BPL 濃度が 0.016%以下でないとい細胞障害があり試験ができないためこの濃度いかになるよう検体を希釈する必要がある。BPL は不活化工程で速やかに -ヒドロキシプロピオン酸に加水分解されるため、不活化反応中に細胞に対する毒性も減弱すると予測されたが、48 時間反応後においても 0.02%の濃度で細胞障害が認められたことから、BPL を用いた不活化作業の適切な評価をするためには培養時の最終濃度の調整は必須である。また、発育鶏卵を用いた不活化確認試験では不活化したウイルスを鶏卵に接種する作業を 3 サイクル行う手順となっているが、今回の試験では 96 穴プレートのウェル数を多くすることで鶏卵数を増やして試験することと同等の評価とした。今後、培養サイクル数に関するバリレーションも必要である。

2) 病原体の適切な管理に資するバイオセーフティ、セキュリティに関する研究

BSL-4 施設において取り扱われる病原体は極めて高い致死率の病気を引き起こす。作業者の安全は、最大限確保されなければならない。それなくして感染症対策研究はなしえない。BSL-4 施設の稼働の安全性は、施設の機能、セキュリティ管理等の基準とともに、作業従事者の行動規範、作業手順、知識と技能の向上がなくして確保することはできない。BSL-4 施設管理者、BSL-4 施設作業従事者の高い知識と技術、規範、そして、作業の透明性の確保が求められる。作業従事者の安全を確保するには、誰もが等しく適切に行うべき作業基準がある。それを確保するために必要なものとして、SOP が挙げられる。本研究では、BSL-4 施設の稼働に必要な SOP 項目を挙げた。これらの項目に過不足がないかどうか、継続した検討が求められる。

今回、挙げられた SOP 項目について、優先順位をつけて SOP を順次整備していくことが必要である。また、その SOP を作成するためのフォーマットを準備

することも必要となる。

国立感染症研究所では、特定病原体等の保管と管理は各々の使用者が実験室内にて使用・滅菌記録簿を記載する方式をとっているが、リアルタイムで保管状況が把握できることが望ましい。具体的には共通の保管記録様式を用いて記録方法を統一し、特定期間毎にその状況を把握することで現有する特定病原体等の保管状況の把握が可能となる。現在、この保管管理システムの SOP を作成中である。また、特定病原体等を取り扱う施設の定期点検実施中においても検査等の緊急事対応が可能ないように各庁舎において最低 2 カ所に必要最小限の特定病原体等を保管・管理するためのシステムが必要である。これらに関しては、翌年度以降に整備、検討したい。

海外の研究機関のスーツ型 BSL-4 施設の安全管理運用に関するマニュアルおよび SOP については、各施設の安全管理の考え方や状況に応じた対策がなされていた。長崎大学に設置予定の BSL-4 施設では、各施設の情報を比較検討したうえで、最も適した対策を採用した安全管理運営のためのマニュアルおよび SOP の作成を行っていく。

また、ABSL3 及び ABSL4 施設の使用及び管理に係る模範的な SOP の策定を行った。構成としては実験手技、安全機器・設備に関する SOP、実験動物の飼養保管に関する SOP、実験動物の取扱い（特性）に関する SOP、動物アレルギーや動物由来感染症等の労働安全衛生に関する SOP で、これらは感染動物実験を安全に行うために必要最低限の内容である。そして、動物飼育器材や動物実験のための安全機器・設備は施設によって異なるため、それらの取扱いに関する SOP は施設毎に策定する必要がある。

本研究では感染動物実験特有の事故として、実験動物による咬傷や搔傷、実験処置のために使用する鋭利なものによる傷害、塵埃やエアロゾルを介しての病原体曝露等について注意を払うよう、動物種毎に取扱いに関する SOP を策定した。しかし、最も実験で使用されるマウスに限っても、系統によって特性が大きく異なることが知られている。日本チャールス・リバー社より提供されたマ

ウスの各系統の特徴に関する情報(2009年)によると、BALB/cAnNCrCrIjは低週齢よりファイティングを認める。C57BL/6NCrCrIjは音に敏感。ファイティングは少ないが、交配経験をもつ雄は起こしやすい。DBA/1JNCrIjは臆病な性格。不意に触ると噛み付くことがある。高く跳び上がりやすい(ケージ交換時に逃亡しやすい)とある。そのため、ABSL3及びABSL4施設における咬傷や搔傷、動物が暴れることによる塵埃やエアロゾルの発生を防ぐためには、動物種だけでなく、系統や品種の特性を踏まえたSOPの策定を行うことが望ましいと考える。

国立感染症研究所は、従来から病原体検出マニュアルに未記載の病原体を含めて依頼検査、行政検査等検査を行ってきた。近年、メディア等から注目された検査としては、エボラ疑い症例、中東呼吸器症候群(MERS)疑い症例がある。また、インフルエンザウイルス研究センター設置後直後の2009年にブタから発生した新型インフルエンザウイルスA(H1N1)pdmの検査は非常に多検体に及んだため、他部門からの協力体制も構築し24時間3交代制の検査が行われたが、100例目の陽性例が確認された段階で、インフルエンザウイルスA(H1N1)pdmは広く国内に蔓延しており、隔離等の措置はもはや馴染まないとして、それ以降の診断及び報告は中止された。当時、感染研インフルエンザウイルス研究センターにより詳細な作業手順書と多くの検査試薬が用意され、均一な手順で同じ試薬を使って操作できることが担保された。加えて、検査担当者はインフルエンザウイルス研究センターの職員による事前訓練を受け、適切な技量を満たしているとされた者が、実際の作業に携わったことにより、技量のレベルも担保された。こうして得られた検査結果は、二人以上の担当者のチェックを得て最終判定結果としてまとめられ、判断に困る様な事例は存在しなかった。バリデーションされた手法により、一定の水準を満たした者が適格者として作業し、明確な判断基準のもとに判定され、記録として残されたという点から、優れた実験室診断手法であったと言える。しかし、比較的短期間で終えたために問題点が表に出なかつ

た可能性もある。国立感染症研究所はインフルエンザウイルス、腸内ウイルス及び生物学的製剤の品質にかかるWHOコラボレーションセンターになっており、インフルエンザウイルス、麻疹ウイルス等のWHOリファレンスラボにも認定され、他のWHOセンターやラボとの交流、外国人研修生の受け入れ等を行っている状況を見ると、国際基準を満たしている事を対外的に示して国際的に活動しやすくし、信頼を得やすくするには有効であると考えられる。帯広畜産大学原虫病センターのISO17025取得が参考にして、ISO17025取得のメリットとデメリットを検討する必要がある。

BSL4やBSL3病原体取扱い施設の検査・実験室診断能力にBSL3/4病原体検出マニュアルは欠かせないが、病原体の検査を適切に行うには、実験室と検査担当者の実情に合わせた最適化、すなわち実験操作標準手順書(SOP)の作成が求められる。SOPの中には、試験に用いる試薬、機器ならびに試験手順、判定方法に加えて、試験成立条件、再試験要件についても記載が必要である。さらに加えて、作業手順チェックシート、最終判定書の様式についても定めておくことが望ましい。仮に、SOPに書かれていないことが起こった場合、あるいは書かれていない手順を実行した場合にどう対応するのかを定めた逸脱規程並びに、逸脱のレベルに応じた報告についても準備しておく必要がある。また、判定作業に携わる担当者の技能要件に則り、教育訓練の記録、認定、再認定の記録を残しておくことも求められる。

BSL4やBSL3病原体取扱い施設の検査・実験室診断を長期に渡って適切に行うためには、PDCAサイクルをうまく品質マネジメントとして取り入れていく必要がある。現時点で不足している項目を補い、ISO17025相当に底上げすることが重要である。上記に挙げた項目の他、検査体制を毎年1回は監査できるような体制を構築するとともに、毎年すべての活動を総括して次年度に改善項目として反映させていく体制も合わせて構築する必要がある

E. 結論

野兔病菌不活化に有効な処理方法は、加熱処理

(94 で3分、56 で30分)ろ過滅菌(0.22 μm) 70% エタノール、メタノール、アセトン、10% 中性緩衝ホルマリン溶液、4%パラホルムアルデヒドであった。野兎病菌を殺菌できない処理方法は、界面活性剤と紫外線照射であった。市販キット付属溶液の殺菌能は、付属する処理溶液の種類に強く依存することがわかった。

炭疽菌芽胞は湿熱条件下での耐性は低く、100 15 分間の加熱が精度高く行うことで、炭疽菌芽胞の不活化が簡便かつ安定して行えることが確認された。白い粉など乾燥状態の検体を扱う場合は、緩衝液により直ちに粉状物を湿潤させた後に加熱を行うことで効果の高い不活化が達成できるものと考えられる。

ブルセラ症の一般的な検査法に供するための菌の不活化法としては、生乳の殺菌基準である 63 、30 分保持式が適していることがわかった。

狂犬病疑い動物の診断法の Gold standard である FAT のためのマウスのスタンプ標本の不活化条件を検討した結果、アセトン固定のみでは不十分で線による不活化と併せて行う必要があった。SFTS ウイルス等の脂質膜を有する RNA ウルスの検査や診断に係る不活化に関しては、エボラウイルスと同様にタンパク質の多く含まれる血清中の非働化処理ではウイルスが不活化できず、抗体活性を保つ上限に近い 60 、60 分間の熱処理でも完全に不活化できなかった。このため、血清診断における検体の処理には紫外線照射など追加の不活化法を組み合わせる必要があるため、今後、有効な不活化法を検討する必要がある。

特定病原体取扱施設の管理者向けには、施設稼働を管理、定期検査、セキュリティ強化、BSL-4 施設での病原体取扱者の適正確認、作業者の健康管理、緊急時の対応(停電、曝露、設備の不具合、盗取・盗難、地震、火災、その他)、BSL-4 施設に設置される機器等の管理に関する SOP 作成が必要である。また、BSL-4 施設作業員向けには、作業員による作業上での安全性確保、動物実験実施、BSL-4 施設内で使用される機器等の取り扱い、実験室環境、実験機器、グローブボックス(内部)の消毒等に関する SOP 作成が必要と考えられた。今後、これらの SOP の準備状況を確認して上で、各項目の具体的 SOP を作成

する作業が求められる。

長崎大学に設置予定の BSL-4 施設において、安全管理運営に関する有用な情報が得られた。今後、得られた情報を基に、現在長崎大学に設置されている、SFTS ウイルス等の病原体を取扱う BSL3 実験室および ABSL3 における安全管理マニュアルおよび SOP の改訂と実践、BSL3 実験室に設置されている安全機器(安全キャビネット、オートクレーブ、遠心機、冷凍保管庫等)の日常点検および定期点検の方法の見直しと実施、BSL3 管理区域内へ立ち入る者への教育訓練内容の改訂を検討する。

ABSL3 及び ABSL4 施設の使用及び管理に係る模範的な SOP の策定を行った。ただし、封じ込め施設において感染動物実験を安全に実施するために必要最低限の内容であり、実験に使用されるすべての安全機器・設備を網羅したものでは無い。そのため、ABSL3 及び ABSL4 施設の運用に当たっては、模範的な SOP を参考にして施設毎に固有の SOP を策定する必要がある。

国立感染症研究所は地方衛生研究所と協力して病原体検出マニュアルを作成する等、正確な病原体の検出が感染症の国内蔓延状況の把握となり、それが適切な感染症対策に繋がるとの理解のもと、多くの重要な実験室診断に関わってきた。感染研が BSL3 病原体に加えて BSL4 病原体検査施設として指定されたことにより、より一層検査の重要性が増している。これに伴って検査結果の信頼性を国際的レベルに上げる努力を試みるのが妥当だろう。現状、ISO10702 に照らして不足していると思われる項目を段階的に拡充していくことが大切である。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表

1) 立崎英夫, 阿南英明, 西條政幸, 堤弥生, 奥村敬, 橋本真由美. CBRNE への対応. 編集: 三澤寿美, 太田晴美, 災害看護(Gakken ,東京), p148-160, 2018

2) 森田公一：グローバル化時代における One Health と国際協力、最新医学, Vol.72(4):584-589, 2017

3) 森田公一：熱帯病研究と克服に向けてのわが国の貢献、感染・炎症・免疫、Vol.48(1),39-45, 2018

2. 学会発表

1) Saijo M. BSL-4 laboratory in the National Institute of Infectious Diseases (NIID), Tokyo, Japan: preparedness for highly pathogenic emerging virus infections. WHO Consultative Meeting on High Containment (Biosafety level -4) Laboratories Networking, Lyon, France, 13-15 December 2017

なし。

H . 知的財産権の出願・登録状況（予定を含む。）

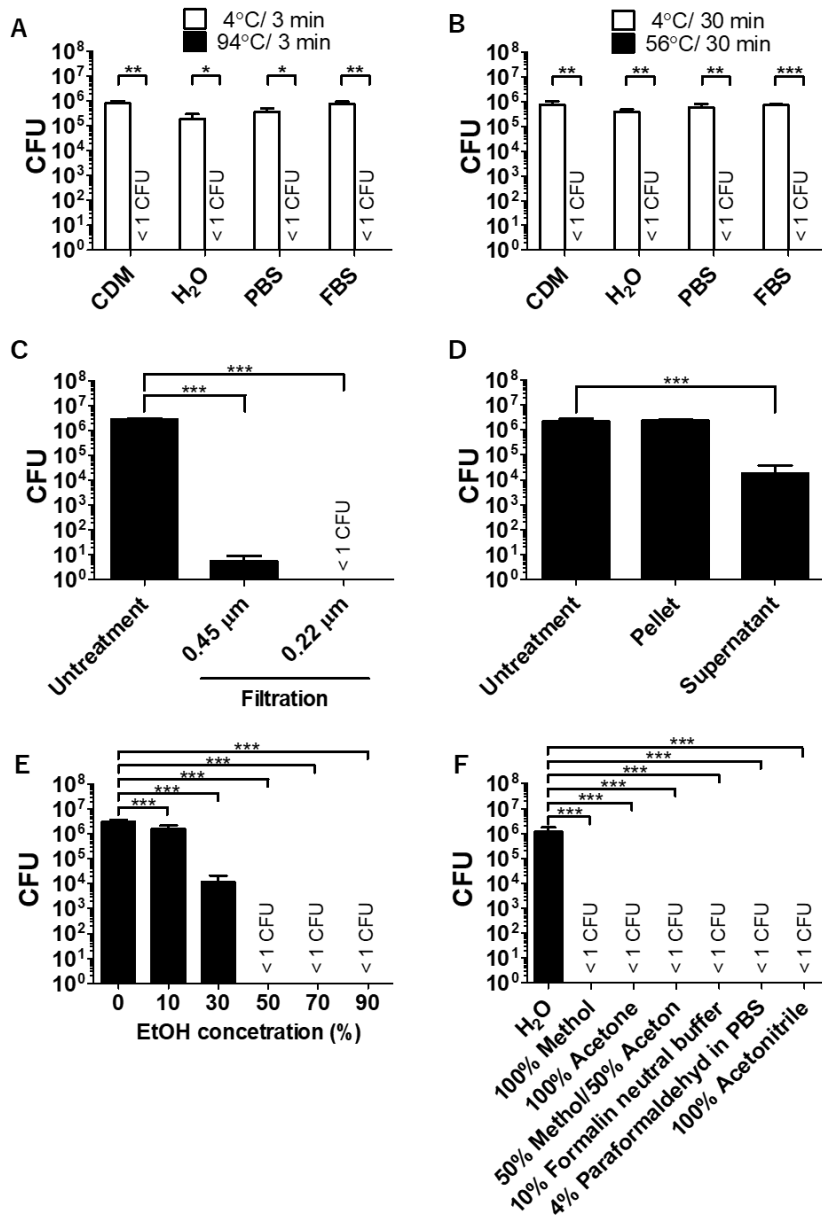


図 1. 野兔病菌の不活化に有効な処理方法

(A と B) 野兔病菌を CDM 液体培地 (CDM)、水 (H₂O)、PBS、RPMI 1640 培地、ウシ胎児血清 (FBS)、10%FBS 含 RPMI 1640 培地に浮遊させ、94 で 3 分間 (A) と 56 で 30 分間 (B) の加熱処理を行った。実験は 4 連で実施し、得られた生菌数から、平均値 ± SD および有意差検定をおこなった。(C) 野兔病菌浮遊液の生菌数およびろ過滅菌後の生菌数を示した。これ以降の実験は全て 4 連で実施し、各サンプルに含まれていた平均生菌数 ± SD および処理前後における生菌数の有意差を算出した。(D) 遠心による野兔病菌生菌数の影響を調べた。遠心前の菌浮遊液、遠心後の上清および菌沈殿物の生菌数を測定した。(E と F) 野兔病菌に対するエタノール (E) や他の溶媒 (F) の殺菌能を測定した。様々な溶媒に野兔病菌を接種し、室温で 10 分間処理した後、遠心により溶媒を完全に除去した。沈殿した菌は CDM 液体培地で浮遊させた後、生菌数を測定した。* P<0.05、** P<0.01、*** P<0.001。

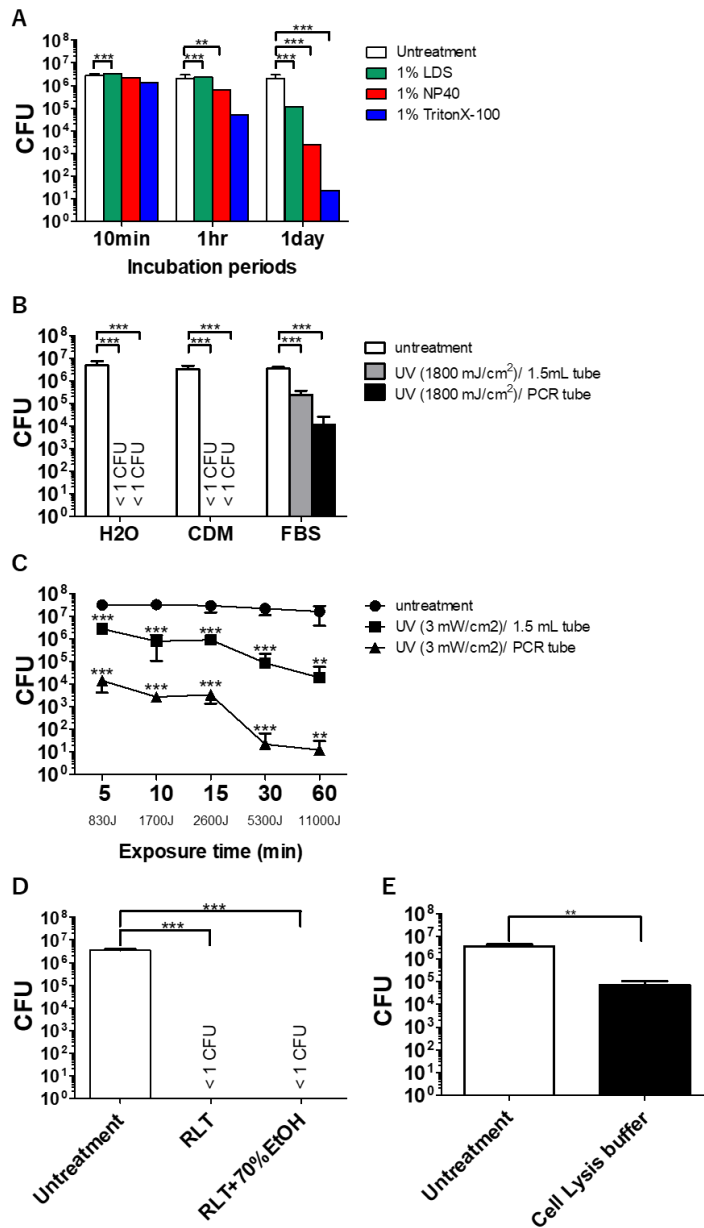


図2. 界面活性剤、紫外線照射、市販試薬による殺菌効果の検証

(A) 野兔病菌を、水(H₂O)、1% LDS、1% NP-40、1% Triton X-100 と混合し、4℃で規定時間静置した。(B) 野兔病菌を、水(H₂O)、CDM、FBS に浮遊させ、1.5 mL チューブまたは PCR チューブに添加の後、室温で紫外線照射を5分間おこなった。(C) 野兔病菌を FBS と混合し、室温で規定時間の紫外線照射をおこなった。(D) 野兔病菌を Qiagen RNeasy mini kit 付属の RLT および RLT+70%エタノール混合液と混和した。(E) 野兔病菌を Cell lysis Buffer と混和し、4℃で10分間静置した。これら全ての実験は4連で実施し、その平均生菌数±SDと有意差を算出した。** P<0.01、*** P<0.001。

Transition of numbers of *B. anthracis* spore after 100°C treatment to spore solution

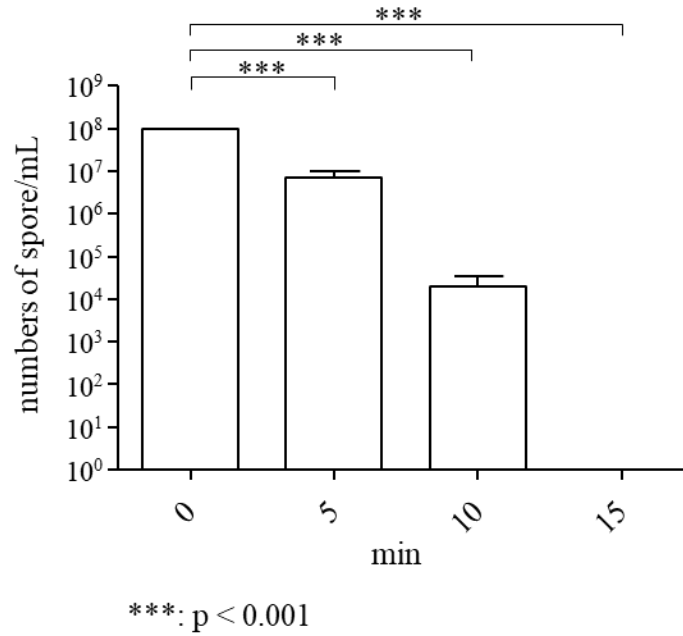
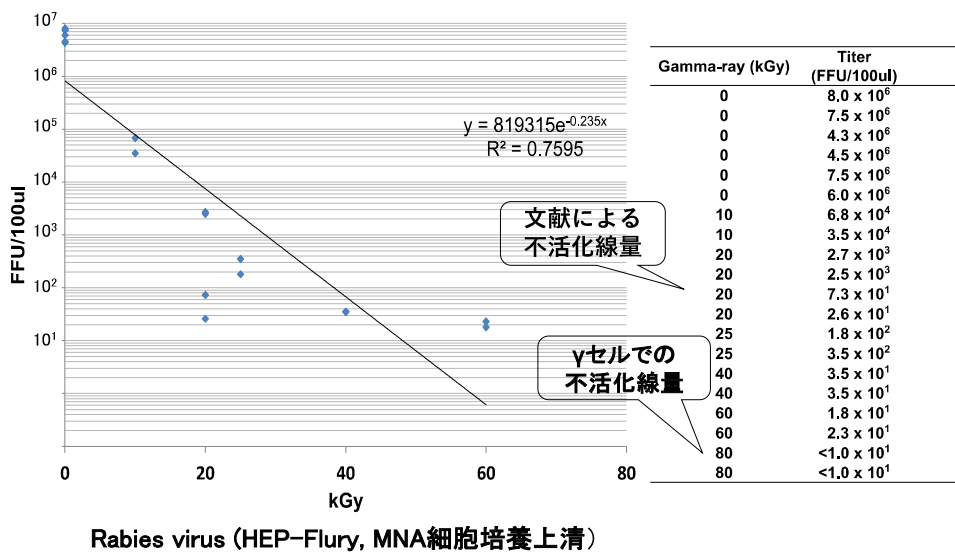
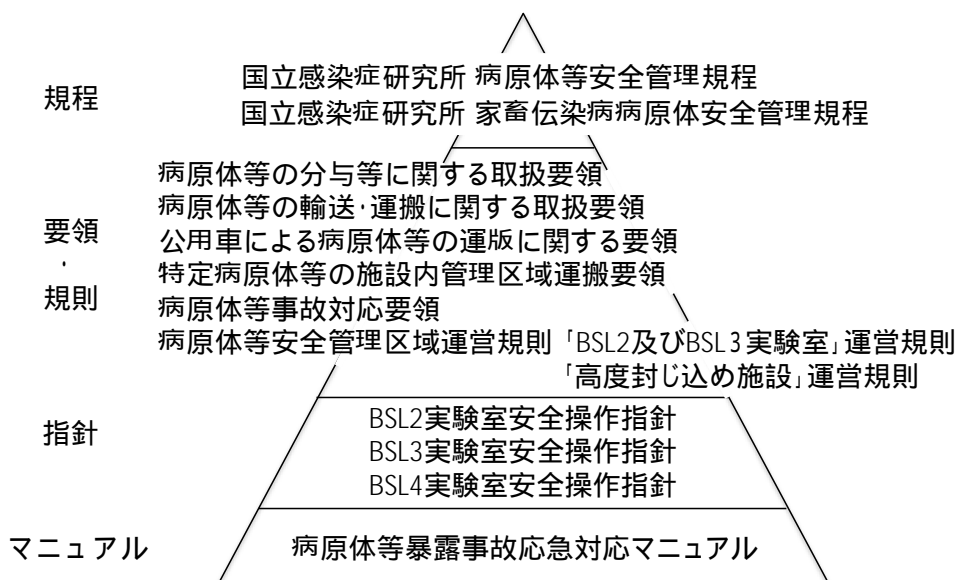


図3 培養期間中の湿熱（99.9（温度制御精度±0.1）50vol %グリセリン加生理食塩液中）による反応時間ごとの残存炭疽菌芽胞数

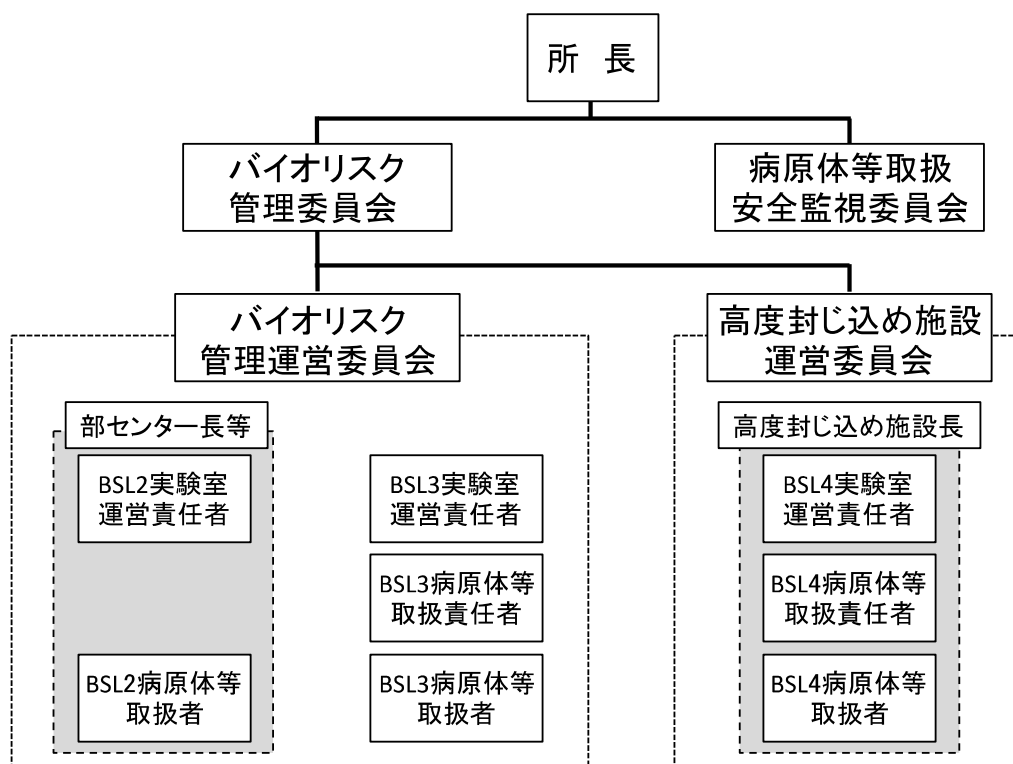
図4. ガンマ線照射による狂犬病ウイルスの不活化



文書階層



安全管理組織体制



帯広畜産大学原虫病研究センターが取得したISO/IEC 17025:2005

原虫DNA判定試験

原虫病研究センターは、「ウマピロプラズマ病」「ウシバベシア病」「スーラ病」の3疾病について、OIEレファレンスラボとして認定され、PCR法を用いた原虫DNA判定試験の受託を行っています。

下記の「検査依頼方法」をご確認の上、「検査依頼書」に必要事項をご記入いただき、[原虫DNA判定試験チーム \(NRCPD17025@obihiro.ac.jp\)](mailto:NRCPD17025@obihiro.ac.jp) までEメールでお申し込みください。

2017年3月3日に、大学として国内初となる食品・生物系検査で国際規格ISO/IEC17025:2005認定を取得しました。

認定範囲は、OIEのレファレンスラボラトリーとして、動物疾病の診断（確定診断）を行う「OIE Manual of Diagnostic Tests and Vaccines for Terrestrial Animals 2016に基づくウシバベシア病、ウマピロプラズマ病及びスーラ病のPCR法を用いた原虫病DNA判定試験」です。



<http://www.obihiro.ac.jp/~protozoa/ISO.html>より引用

研究成果の刊行に関する一覧表

書籍

著者氏名	論文タイトル名	書籍全体の編集者名	書 籍 名	出版社名	出版地	出版年	ページ
立崎英夫， 阿南英明， 西條政幸， 堤弥生，奥 村敬，橋本 真由美	CBRNEへの対応	三澤寿美， 太田晴美	災害看護	Gakken	東京	2018	148-160

雑誌

発表者氏名	論文タイトル名	発表誌名	巻号	ページ	出版年
森田公一	グローバル化時代における One Health と国際協力	最新医学	Vol.72 (4)	584-589	2017
森田公一	熱帯病研究と克服に向けてのわが国の貢献	感染・炎症・免疫	Vol.48(1)	39-45	2018