

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
(H29-新興行政-一般-005)

平成29年度～令和元年度 総合研究報告書

研究代表者 森川 茂

令和2(2020)年 3月

目 次

I. 総合研究報告	
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
森川 茂	
(資料) 病原体等取扱施設管理における標準作業手順書 (SOP) 作成用ガイドライン	
(資料) 動物バイオセーフティレベル (ABSL) 3 施設の仕様及び管理に係る標準作業手順書 (SOP) 作成ガイドライン	
(資料) 三種・四種病原体等取扱講習教材	
II. 研究成果の刊行に関する一覧表	----- 13

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）
総合研究報告書

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・ウイルス第一部・客員研究員

研究分担者：加藤篤、石井孝司（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）、河合康洋（国立感染症研究所 バイオセーフティ管理室）、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：

本研究の成果は以下の通りである。

- 1) 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のための SOP を地方衛生研究所等が作成する際のガイドライン「病原体等取扱い施設管理における標準作業手順書 (SOP) 作成用ガイドライン」、
「動物バイオセーフティレベル (ABSL) 3 施設の使用及び管理に係る標準作業手順書 (SOP) 作成ガイドライン」を作成した。
- 2) 感染症法では一種及び二種病原体等の取扱者に対して定期的な教育訓練が定められているが、三種及び四種病原体所持者種及び取扱者に対する教育訓練は定められていないが、三種及び四種病原体等にはバイオセーフティレベル3に該当する病原体も含まれていることから、国立感染症研究所や地方衛生研究所等で共通の教材による定期的な教育訓練を可能とする教育プログラムの PDF 版を作成し、理解度試験をマークシートで行うシステムを構築した。
- 3) 国立感染症研究所の BSL4 施設における病原体取り扱いや検査における SOP を見直し、安全な作業を行うための SOP を作成した。また、感染症法に定める教育訓練とは別に、施設使用者へのより詳細な教育プログラムを作成した。また、長崎大学に設置計画が進んでいる BSL4 施設は、国内初のスーツ型であるため国内に参考例が存在しないことから、海外の高度安全実験施設の情報を基に長崎大学 BSL-4 施設に必要な施設運用に関する安全管理体制、規則・指定・SOP の素案を作成した。
- 4) 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剤、インターフェロン製剤等の収去検査を業務として行う公的試験機関であり、また、高病原性病原体を取扱う施設でもあることから、「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を導入することが望ましい。そこで、公的認定試験検査機関としての適合性の確認のため、おたふくかぜワクチンおよび BCG ワクチンの国家検定についての調査を受け、適合性の確認を受けた。検討した結果、国立感染症研究所の ISO/IEC 17025 認定の取得は、現状のシステムで十分可能であることが分かった。

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。BSL4 施設などの病原体等を取り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。

一方、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第56条の21では、一種及び二種病原体等の取扱者に対して定期的な教育訓練が定められているが、三種及び四種病原体所持者種及び取扱者に対する教育訓練は定められていない。三種及び四種病原体等にはバイオセーフティレベル3に該当する病原体も含まれており、曝露等による感染防止の観点からも教育訓練が望ましいが、施設ごとによる自発的な教育訓練に委ねられておりその体制は整っていない。2018年2月に行われたWHOによるIHR合同外部評価(JEE)の報告書で、三種及び四種病原体取扱者等を対象とした定期的な教育訓練を策定し、国内のすべての対象者へ教育訓練の導入をすることが望ましいと指摘された。このため、病原体リスクに応じた適切な取扱いのための教育体制を整えることは喫緊の課題である。そこで、本研究では三種及び四種病原体取扱者にとって利用可能な電子媒体を用いた教育訓練プログラムを作成し、実施可能な方法を検討することも目的とする。

B. 研究方法

1. 野兎病菌の不活化に関する研究

熱処理、濾過、種々の溶液(メタノール、エタノール、アセトン、ホルマリンなど)、界面活性剤、紫外線照射等による不活化試験を行った。また、細胞可溶化剤(Cell Lysis Buffer ; CST, Tokyo, Japan)やPCRのための抽出剤(Qiagen RNeasy mini kit 付属RLTなど)の市販試薬による不活化条件を検討した。

2. 炭疽菌の不活化に関する研究

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、炭疽菌芽胞

の湿熱（100℃）による不活化条件を検討した。

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、不活化法を検討した。抗体検出用抗原としての不活化検討は63℃、30分または72℃、15秒について検討した。臨床検査現場におけるMALDI-TOF MS用検体調整のための不活化法を検討した。

4. 狂犬病ウイルスの不活化に関する研究

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。国立感染症研究所が作成した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、アセトン固定とγ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患者の血清中には多量のウイルスが含まれることがある。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。

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

インフルエンザウイルスの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。

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BSL4施設における病原体取扱いや検査におけるSOPの作成とBSL4施設での作業向け講習会資料の作成と講習会の実施

国立感染症研究所には、BSL4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、BSL4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

作成した。WHOが刊行しているBiasafety Manual 3rd Editionや国立感染症研究所のBSL4施設安全操作指針等の内容を精査し、現行SOPに加えて作業者向けにさらに必要とされるSOPを作成した。

また、BSL4施設使用者用の講習会資料を作成して講習会を実施し、BSL4施設内で作業を実施する者が心得ておくべき各種手続きの確認、特定一種病原体特有の記録方法の確認、特定一種病原体を用いた作業の実践等について、作業者間で確認、議論した。

2. BSL4施設におけるバイオセーフティ管理室業務SOPへの記録様式の追加

BSL4施設のバイオセーフティ管理・運営に適用しているSOPを各種業務の記録が保管される様式へと改訂するため、現行SOPの中で記録を必要とする業務を抽出した。また、記録として保管する際に必要なSOPの様式、保管管理方法を含めた運用方法についても検討した。

3. 長崎大学のBSL4施設建設後の安全管理運営の検討と安全管理規則、教育訓練の見直し

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（アメリカ、ドイツ、カナダ、南アフリカ、中国、韓国）の高度安全実験施設（BSL3およびBSL4施設）から安全管理運営に関する情報を収集、整理した。次いで、感染症法等の法令や規則に則り、長崎大学BSL4施設で運用する安全管理に関する管理体制、規則・指定・SOP、稼働前から本格稼働に至るまでの教育訓練の内容・スケジュールの原案を作成した。また、これらの検討内容について、地域や関係機関向けに説明するための資料を作成した。また、長崎大学BSL4施設の安全管理検討で得られた結果を基に、BSL2, 3レベルの研究に関連した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）の内容見直しを行った。また、検討内容を基に、BSL2, 3実験室の利用者および病原体使用者に対する教育訓練実施内容を見直し、定期的な教育訓練に反映した。

3) 地方衛生研究所等におけるサーベイランス機能強化のため病原体取扱い施設管理事項に関するSOP作成ガイドラインの作成

病原体取扱い施設の管理事項について標準作業手

順書(SOP)作成ガイドラインを作成するため、地方衛生研究所等の病原体取扱い施設、および管理体制の現状を調査し、利用者および管理者毎に関わる項目を洗い出し、それぞれの項目について記載案を提示した。また、動物用BSL3施設での実験管理等に資するSOP作成のためのガイドラインを作成した。

4) 三種及び四種病原体所持者種及び取扱者に対する教育訓練教材の作成

2018年2月に行われたWHOによるIHR合同外部評価(JEE)の報告書で、三種及び四種病原体取扱者等を対象とした定期的な教育訓練を策定し、国内のすべての対象者へ教育訓練の導入をすることが望ましいと指摘された。そこで、当該教育プログラム案を作成し、協力機関や大学等で教育プログラムを用いた研修を行い、理解度試験を実施した結果、理解度の低い部分があることが分かったことから、教育プログラムを見直して最終版を作成した。

5) 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)の検討

ISO17025 公的認定試験検査機関としての適合性の確認のため、厚生労働省、PMDA による外部調査を受け、適合性確認の認定書を受領した。また、ISO17025をすでに認証されている国立医薬品食品衛生研究所と、ISO17025 認証の方策についての討議を行い、ISO17025 取得のために重要な点について検討を行った。また、ISO17025 の認証機関である日本適合性認定協会を訪問し、感染研が認定申請を行う場合の要求事項等について説明を受け、取得可能性について検討した。

C. 研究結果

1) 病原体の不活化に関する研究

野兎病菌の不活化を検討した結果、加熱処理(94℃で3分間、および56℃で30分間)で不活化された。濾過では、0.45 μmの滅菌フィルターは少しか通過した。消毒剤では、50%以上の濃度のエタノールで室温10分間処理すると不活化されたが、10%および30%エタノール処理では不活化できなかった。

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では不活化された。これらの成果を取り纏めて論文発表した(Azaki M, 他、Effective methods for the inactivation of *Francisella tularensis*. PLoS One, 14(11): e0225177, 2019)。

炭疽菌の芽胞の不活化を検討した結果、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。

ブルセラ属菌は、63℃、30分処理で不活化されたが、72℃、20秒処理では、10⁻⁷不活化されたが完全には不活化できなかった。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*ともに完全に不活化された。蛋白質解析用として用いられる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10²オーダーしか不活化されなかった。

狂犬病ウイルス感染マウス脳標本、感染細胞塗抹標本のアセトン固定では、20時間固定後に>3.3 x 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 x 10⁶ FFU/100μL)と狂犬病ウイルス感染乳飲みマウス脳(力価1.3 x 10⁶ FFU/100μL/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、80kGyで検出限界以下まで不活化(>1.6 x 10⁻⁶)できた。これらの結果から、他機関に配布する陽性対照用の狂犬病ウイルス感染マウス脳スタンブ標本は、20時間アセトン固定+80kGyのγ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 /mg は処理後には 7.0×10^{-5} /mg となり計算上は完全不活化が担保された。

SFTS ウイルスは、通常の血清非働化条件である 56°C 、30 分間の熱処理では 10^{-2} 感染価が低下したが不活化できなかつた。一方、 60°C 、60 分間の熱処理では感染価はかなり減少するが、高力価のウイルスが存在すると完全には不活化できなかつた。このため完全不活化には短波長の紫外線照射 (306nm 以下) との併用が望ましい。特に血清診断では 56°C 、30 分間の熱処理に ELISA などが行われるため、これらを国立感染症研究所での検査の SOP に反映させた。

インフルエンザウイルスの β -プロピオラクトン (BPL) による不活化を検討した結果、 $10^{8.2}$ TCID₅₀ 以上の力価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。

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 BSL4 施設における病原体取扱いや検査における SOP の作成と BSL4 施設での作業向け講習会資料の作成と講習会の実施

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が行う業務についての SOP は、BSL4 施設稼働前に作成、運用されている。

これに加えて作業員 (実験者) 向け SOP として、以下の SOP を作成した。

- 1) ガンマ線による病原体不活化の手順書 (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)
- 2) BSL4 実験室への入退室に関する手順書 (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 を含む)
- 3) グローブの交換に関する手順書 (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)

- 4) トランスファーボックスの取り扱いに関する手順書
- 5) グローブボックス内における細胞培養や遠心操作に関する手順書
- 6) 病原体の取り扱いに関する手順書 (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 を含む)
- 7) 動物への接種等における手順書
- 8) 動物の解剖を行う際の手順書
- 9) 採血等をする際の手順書
- 10) 血液生化学検査の手順書
- 11) ウイルス学的解析のための不活化サンプルの持ち出しの際の手順書
- 12) ホルマリン固定材料の切り出しと再固定、持ち出しの際の手順書
- 13) GBL 内での写真撮影と持ち出し際の手順書
- 14) 病原体保管庫での保管と記帳に関する手順書 (保管庫から一種病原体等の出し入れを行う場合の 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)。

また、2019 年 12 月に BSL4 実験室内作業員向け講習会を実施した。その際、BSL4 施設内で作業を実施する者が心得ておくべき各種手続きの確認、特定一種病原体特有の記録方法の確認、特定一種病原体を用いた作業の実践について、作業員間で確認、議論した。その結果、今後も定期的に作業状況を振り返り、関係者間で確認しながら前向きに作業の効率性と安全性を確保するための SOP を逐次整備していくこと、整備されている SOP を改訂する体制が整備される必要がある。

2. BSL4 施設におけるバイオセーフティ管理室業務 SOP への記録様式の追加

記録が保管される様式を追加するため、現行 SOP の内で記録を必要とする業務を抽出した結果、以下の業務については記録を要すると考えられ改定した。

- ・施設/設備の運用状況の確認に関する業務
- ・施設/設備の点検に関する業務
- ・各種査察対応に関する業務

3. 長崎大学の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ーン国立研究所 (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II」(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. 長崎大学のBSL4施設建設後の安全管理運営の検討と安全管理規則、教育訓練の見直し

長崎大学BSL-4施設の安全管理運営において、現行の長崎大学生物災害等防止安全管理規則(BSL-2, 3レベルを対象)とは別のBSL-4施設独自の体制および規則を定める素案を作成した。その際、建物完成から、施設稼働確認、BSL-2,3レベルでの病原体使用、特定一種病原体(BSL-4レベルでの病原体)の搬入、使用に至るまでには段階ごとに運用しながらの規則、体制の検討、見直し等が必要であることが明らかになった。

また、教育訓練について、海外BSL-4施設で実施されている内容を基に検討したところ、研究スタッフ、教育スタッフ、実験室管理運営スタッフおよび施設管理運営スタッフなどのカテゴリーに分けたそれぞれの内容、期間

の必要性が示され、検討内容を基に、教育訓練内容、スケジュールの素案を作成した。

これらの素案について、説明用のスライドおよび説明資料を作成し、地域連絡協議会や専門家会議等で情報提供を行った。

1) 安全管理規則および教育訓練の見直し

長崎大学BSL-4施設の建物完成後から稼働まで段階的に必要とされる安全管理運営の内容を見据えて、現行の長崎大学生物災害等防止安全管理規則の見直しが必要であることが明らかになった。そこで、長崎大学に既存のBSL-2,3実験室およびBSL-2,3動物実験室のSOP改訂版を作成し、定期的に行われる教育訓練内容に反映させ、教育訓練を実施した。

3) 地方衛生研究所等におけるサーベイランス機能強化のため病原体取扱い施設管理事項に関するSOP作成ガイドラインの作成

地方衛生研究所や大学等によって病原体取扱い施設、および管理体制は様々である。それぞれに対応した共通のガイドラインの作成は困難である。そこで、病原体取扱い施設管理における共通概念を共有するようなSOP作成ガイドラインとして「病原体等取扱い施設管理における標準作業手順書(SOP)作成用ガイドライン」を、ABSL3に関してもSOP作成ガイドライン「動物バイオセーフティレベル(ABSL)3施設の使用及び管理に係る標準作業手順書(SOP)作成ガイドライン」を作成した。これらをもとに地方衛生研究所等で個別にSOPを作成することが比較的容易になると考えられる。

4) 三種及び四種病原体所持者種及び取扱者に対する教育訓練教材の作成

三種及び四種病原体等にはバイオセーフティレベル3に該当する病原体も多く含まれており、曝露等による感染防止の観点からも教育訓練が望ましいが、施設ごとによる自発的な教育訓練に委ねられており、国内で共通の教育訓練体制は整っていない。2018年2月に行われたWHOによるIHR合同外部評価(JEE)の報告書で、三種及び四種病原体取扱者等を対象とした定期的な教育訓練を策定し、国内のすべての対象者へ教育訓練の導入をすることが望ましいと指摘された。そこで、三種及

び四種病原体取扱者にとって利用可能な電子媒体を用いた教育訓練プログラムを作成し、実施可能な方法を検討するために、複数の協力機関等に依頼して、病原体取扱従事者に作成した教材を用いて教育訓練を受講して頂き、達成度試験を行い、教材の有用性と問題点を検証した。その結果、理解度が共通して低い項目等が明らかになり、教育プログラムを改定し最終版を作成した。理解度試験を併せて実施することにより、教育プログラムの改定時に有用な情報が得られることが分かった。なお、現在は PDF により自主学习システムを想定しているが、将来的には教育プログラムに音声を入れた VOD 学習システムとすることが望ましい。また、逐次改定を行って適切な教材として利用されるようにすべきである。

5) 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)の検討

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、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。

(2) 検査あるいは実験室診断を行う公的機関の ISO/IEC 17025 認定について

国立医薬品食品衛生研究所 (国立衛研) は、食品衛生管理部第一室を対象施設として、平成 20 年 4 月 23 日に ISO/IEC 17025 認定を申請している。認定の目的は BSL3 試験室の安全性及び試験される細菌の取扱いの安全性確保の能力の確認である。認定取得の方法について、実際に認定作業を担当した食品衛生微生物部長の朝倉先生と面談を行い、感染研が認定取得を行う場合の課題について検討した。国立衛研が認定を依頼した日本適合性認定協会 (JAB) が、感染研が行う検査等の認定にも最も適していると考えられたため、JAB を訪問し、技術部生命科学マネージャーの田島様と面談を行った。感染研の品質マネジメントシステムについて説明し、認定取得には現在のシステムで管理上の要求条項 (15 項目) および技術的な要求条項 (10 項目) をほぼ満たしていることが確認された。認定を受ける試験については 1 件でいいことが確認でき、感染研が行っている試験の中では、ELISA 等による試験が最も適しているのではないかと意見をいただいた。手順としては、まず文書レビューを行い、次に第 1 段階として現地で予備審査を受け、改善すべき点についての指摘を受けた後、第 2 段階として本審査を受ける。認定取得後は、4 年毎に更新が必要であり、その 4 年の中で 2 回の中間審査があるが、この審査は取得時に比べ簡便なものである。感染研としては ISO/IEC 17025 認定の取得は十分可能であることが確認できた。

D. 考察

1) 病原体の不活化に関する研究

主な病原体に関する不活化条件はこれまでの研究により検証された。野兎病菌の不活化に関しては論文発表し、狂犬病の不活化に関してはマウス脳スタンプ標本の配布の際の不活化に採用している。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。ブルセラ属菌では、抗体検出用抗原加熱処理と比較よりマイルドな63℃、30分で高濃度の菌液でも完全に不活化された。この加熱条件で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、実験室診断用に菌を不活化する際に有用である。MALDI-TOF MS用に対しては、75%エタノール処理により不活化され安全性が担保される。タンパク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った。SFTSの血清診断では、血清の非働化（56℃、30分）では不十分であることから紫外線による不活化法との併用などが必要である。多くのウイルスで血清診断用のウイルス不活化処理を見直す必要があると考えられた。これらをそれぞれの病原体検出マニュアルなどのSOPに反映されることにより、不活化不十分の材料を実験室外に出してしまうことを防止することができる。

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

国立感染症研究所は2019年9月にエボラウイルス等の感染性のある特定一種病原体を（感染性のあるエボラウイルス、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、南米出血熱ウイルス）所持した。これらのBSL4施設において取り扱われる病原体は極めて高い致命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。このため、作業者は高い規範とともに、体制整備環境のもとで高い知識と技術を有する必要がある。昨年度は作成されるべきSOPを検

討し、今年度は実際に作業に必要なSOPを追加整備した。実際に感染性ウイルスを用いた検査法開発に関連する作業が開始されている。これらの経験に基づき、順次、必要に応じて作業に必要なSOPを整備していくことが求められる。ただし、漫然と必要に応じてSOPを整備していくという姿勢ではなく、定期的に作業状況を振り返り、関係者間で確認しながら、前向きに作業の効率性と安全性を確保するためのSOPを逐次整備していくこと、整備されているSOPを改訂する体制が整備される必要がある。国立感染症研究所では高度封じ込め施設作業員、施設長、バイオセーフティ管理室（2020年度からは安全実験管理部に移行）、事務部門との連携が不可欠である。BSL-4施設の稼働の安全性は、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。

長崎大学BSL-4施設の安全管理運営を行ううえで、海外BSL-4施設の運用レベル以上に行うための体制としては、当初予想より多くの人員の必要性が見込まれた。また、施設完成後、直ちに特定一種病原体（BSL-4レベルでの病原体）を使用した実験を行うことは現実的ではなく、建物の設備運用確認、スタッフの教育訓練を順次行いながら、規則、体制を見直し、段階的に安全管理運営の検討を持続して行うことの重要性が考えられた。長崎大学に設置されるBSL-4施設における安全管理運営に関する有用な情報が得られ、実際に運用するための体制、規則等の基礎情報となる素案が作成された。これらの結果により、施設完成後から本格稼働までを見据えた安全管理運用準備の道筋が示唆された。また、これらの結果は、現状BSL2,3レベルを対象としている長崎大学生物災害等防止安全管理規則および教育訓練の改訂、教育訓練の改善にも有用な情報となり、より安全な管理運用の実施に有効となった。

また、地方衛生研究所等におけるサーベイランス機能強化のため病原体取扱い施設管理事項や動物実験に関するSOP作成ガイドラインの作成を行った。地方衛生研究所等によって病原体取扱い施設、および管理体制は様々であり、その全てに対応したガイドラインの作

成は困難であった。そこで、各期間が SOP 作成の際にガイドラインとなる2種の案を作成した。これらを「病原体等取扱い施設管理における標準作業手順書(SOP)作成用ガイドライン」と「動物バイオセーフティレベル(ABSL)3施設の使用及び管理に係る標準作業手順書(SOP)作成ガイドライン」の案と命名した。前述した様に現時点で作成したガイドライン(案)は、具体的な内容が不足する部分が存在するため、今後、様々な病原体取扱い施設の現状を踏まえた例示を増やして実用的なガイドラインへと改定していくことで地方衛生研究所等での病原体取扱い施設管理に有用なガイドラインとなると考えられた。今後、厚生労働省結核感染症課とガイドライン案をもとに検討してガイドラインとしたい。

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第 56 条の 21 では、一種及び二種病原体等の取扱者に対して定期的な教育訓練が定められているが、三種及び四種病原体所持者種及び取扱者に対する教育訓練は定められていない。三種及び四種病原体等にはバイオセーフティレベル3に該当する病原体も含まれており、曝露等による感染防止の観点からも教育訓練が望ましいが、施設ごとによる自発的な教育訓練に委ねられておりその体制は整っていない。2018年2月に行われたWHOによるIHR合同外部評価(JEE)の報告書で、三種及び四種病原体取扱者等を対象とした定期的な教育訓練を策定し、国内のすべての対象者へ教育訓練の導入をすることが望ましいと指摘された。本研究では三種及び四種病原体取扱者にとって利用可能な電子媒体を用いた教育訓練プログラム案を作成し、実施可能な方法を検討して検証した結果、目的とする教材及び理解度試験法が作成できた。理解度が低かった事項に関しては教育訓練教材の見直し、理解度試験の設問の見直しを行った。今後、衛生微生物協議会等に諮って実際の運用を検討する必要がある。

一方、国立感染症研究所は「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を導入することが望まれている。公的認定試験検査機関としての適合性の確認のため、厚生労働省、PMDAによる外部調査を受け、適合性確認の認定書を受領した。既にISO17025をすでに

認証されている国立医薬品食品衛生研究所とISO17025の認証機関である日本適合性認定協会に相談した。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、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。また、国立医薬品食品衛生研究所とISO17025の認証機関である日本適合性認定協会に相談した結果、国立感染症研究所のISO/IEC 17025認定の取得は、現状のシステムで十分可能であることが分かった。他方、使用する機器の水準を保証するための校正費用等の負担が現状よりもかなり重くなると思われる点が課題として考えられる。また、認定を求める場合は試験1項目の調査でよいが、どの試験について審査を依頼すべきかについての検討も重要であると考えられた。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等の収去検査を業務として行う公的試験機関であり、さらに高病原性病原体を取扱う施設でもあることから、ISO/IEC 17025に準拠したシステムを導入することが強く望まれており、認定取得を真剣に検討する段階に来ていると考えられる。

E. 結論

これまでの研究で、主要な特定病原体等の不活化条件を検討したことから、それぞれの病原体検出マニュアルなどの SOP に反映されることにより、不活化不十分の材料を実験室外に出してしまうリスクを軽減できると考える。さらに多くの BSL3 病原体等について科学的知見に基づく不活化条件を逐次明らかにする必要がある。

BSL4 が稼働して必要な SOP は整備されているが、実際の運用を開始してから追加すべき SOP を検討し逐次整備した。必要に応じて新規に BSL4 施設を建設している長崎大学と情報交換して、両者がより適切な SOP を整備、改定できるシステムを構築することで、より安全が確保できる。

地方衛生研究所などでも BSL3 実験室が整備されてきており、COVID-19 のパンデミックで非常に多くの臨床検体を検査したり、ウイルス分離を行っている。このことから一層 BSL3 施設の管理の SOP、従事者の安全作業に資する SOP 等の必要性が喫緊となっている。本研究で各施設の SOP 作成のガイドライン案を作成した。これらをもとに各施設での SOP 作成が急務である。

また、三種・四種病原体等を取り扱う施設及び従事者向けの教育プログラムが完成したため、定期的な教育に利用されることが望ましい。なお、本教育プログラムは三種・四種病原体等だけではなく、一般的なバイオセーフティ講習用にも利用可能である。

国立感染症研究所は、ISO/IEC 17025 に準拠したシステムを導入することが強く望まれており、認定取得を真剣に検討する段階に来ていると考えられる。

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
- 4) Kato A, Fujita K, Ochiai M, Naito S and Konda T. Study on procedure for lot release of vaccines in Japan. Jpn. J. Infect. Dis. 72, 133-141 (2019).
- 5) Koga S, Takazono T, Ando T, Hayasaka D, Tashiro M, Saijo T, Kurihara S, Sekino M, Yamamoto K, Imamura Y, Miyazaki T, Yanagihara K, Morita K, Izumikawa K, Mukae H., Severe Fever with Thrombocytopenia Syndrome Virus RNA in Semen, Japan., Emerg Infect Dis. 2019 ;25(11):2127-2128.
- 6) Azaki M, Uda A, Tian D, Nakazato K, Hotta A, Kawai Y, Ishijima K, Kuroda Y, Maeda K, Morikawa S. Effective methods for the inactivation of Francisella tularensis. PLoS One. 14(11) : e0225177, 2019.
- 7) 西條政幸, 安田二郎, 平山謙二. BSL-4 施設の重要性と世界への貢献. 最新医学, 74:453-463, 2019.

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
- 2) 西條政幸. 痘瘡ウイルスが用いられるバイオテロ対策 (ワクチン, 抗ウイルス薬) に関する国際動向. 第 18 回日本バイオセーフティ学会総会・学術集会プログラム, 東京, 2018 年 11 月 14 から 15 日

- 3) 宇田晶彦、阿崎美佳、田徳雨、中里勝芳、堀田明豊、森川茂. 野兎病菌の安定性と不活化に関する包括的な検討. 第 18 回日本バイオセーフティ学会総会・学術集会プログラム, 東京, 2018 年 11 月 14 から 15 日
- 4) 棚林清、河合康洋、宇田晶彦、原田俊彦、斎藤智也、梅田浩史、森川茂. 特定三、四種病原体等取扱者用教育訓練プログラムについて. 第 19 回日本バイオセーフティ学会総会・学術集会プログラム. 東京. 令和元年 11 月 19 から 20 日、東京.

H. 知的財産権の出願・登録状況（予定を含む。）

なし

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
西條政幸, 安田二郎, 平山謙二.	BSL-4施設の重要性と世界への貢献.	最新医学	74	453-463	2019
Kato A, Fujita K, Ochiai M, Naito S and Konda T.	Study on procedure for lot release of vaccines in Japan.	Jpn. J. Infect. Dis.	72	133-141	2019
Koga S, Takazono T, Ando T, Hayasaka D, Tashiro M, Saijo T, Kurihara S, Sekino M, Yamamoto K, Imamura Y, Miyazaki T, Yanagihara K, Morita K, Izumikawa K, Mukae H.	Severe Fever with Thrombocytopenia Syndrome Virus RNA in Semen, Japan.	Emerg Infect Dis.	25(11)	2127-2128	2019