

17. バイオセーフティ管理室

室長 杉山 和良

概要

バイオセーフティ管理室は病原体等安全管理規程に基づき、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を担当している。また、病原体等の安全管理に関わるバイオセーフティについての研究及びバイオセーフティについての教育並びに情報提供を行っている。

病原体等安全管理規程に基づき、病原体等の取り扱いと保有、移動についての手続きの点検と記録管理及び病原体等取り扱い実験室の安全管理についてのプログラム立案と実施等の業務を行った。各部長の指揮監督のもとに各部の管轄するBSL2実験室における病原体等の取り扱いについての管理運営を行っている。一方、共同利用施設であるBSL3と4の実験室(指定実験室)の一元的な管理・運営はバイオセーフティ管理室が行っている。新規に病原体等を取扱う者に対してはバイオセーフティ講習会を行った。さらに、BSL3実験室利用者へのバイオセーフティ教育及び緊急時対応訓練等を実施した。管理室では病原体等の安全管理の一環として、特別の健康管理としての職員等の保存血清採取と管理を行った。また、BSL2実験室の生物学的安全キャビネット(安全キャビネット)の定期点検を実施した。また、特定病原体(HIV)取り扱い者に対する抗体測定を行った。病原体等の安全管理業務(バイオセーフティ講習会、実験室マニュアル等)の充実をはかった。

施設整備に関しては、村山分室6号棟のBSL3実験室の運用を平成15年1月24日より開始した。3号棟BSL3実験室は1月17日をもって運用を終了した。

研究業務としては各種消毒剤による炭疽菌芽胞及びウイルスの不活性化、安全キャビネットの給排気量の自動制御、実験室前室機能及びバイオハザード対策用の防護服の国際基準に関する研究等を行った。

第45回米国バイオセーフティ学会総会に出席し、高度安全実験室の改修に関わる研究成果を発表するとともにバイオセーフティについての最新情報の収集を行った。また、本学会の期間中に開催された国際バイオセーフティワーキンググループの会議に日本からのメンバーとして参加し、各国共通の問題について討議した。また、病原体輸送についてのセミナー(シンガポール)に出席し最新情報の収集を行った。

感染研が受け入れている国際協力事業団(JICA)からの研修生に対し、バイオセーフティについての講義を行った。バイオセーフティ管理室のホームページには、バイオセーフティ講習会の年間予定、バイオセーフティ講習会のプログラ

ム案内、病原体等取扱申請方法、病原体等安全管理規程、関連学会日程及び日本バイオセーフティ学会活動などを掲載し情報の提供を行った。

バイオセーフティ講習会

新規受講者を対象としたバイオセーフティ講習会は年間予定に従い2ヶ月に一度、6回実施した。また、外国人を対象としたバイオセーフティ講習会は随時行い、13回開催した。ウイルス第二部、宮村達男部長がバイオセーフティ委員長を務め、バイオセーフティの考え方について講演した。

新規受講者講習会に引き続き試験を導入し講習の教育効果を高めるように努めた。また、バイオセーフティの実践として、「安全キャビネットの使い方」、「汎用消毒薬の基本と使い方」についての項目を設けており、安全キャビネットの正しい使用法及び消毒剤の適切な使い方について指導を行った。

外国人研修生対象として、感染研エイズ国際研修、ポリオ国際研修及びハンセン病国際研修時にバイオセーフティについての講義を行った。

1. バイオセーフティ講習会受講者数

1) 平成14年度 新規講習会

実施日	受講者数
平成14年4月 3日	75
6月 4日	40
8月 2日	29
10月 2日	28
12月 3日	28
平成15年2月 4日	15
計	215 (人)

バイオセーフティ管理室

2) 平成 14 年度 外国人対象講習会

実施日	受講者数
平成 14 年 4 月 18 日	3
5 月 14 日	6
5 月 27 日	1
6 月 12 日	1
8 月 6 日	3
10 月 8 日	2
11 月 6 日	1
12 月 6 日	2
12 月 11 日	1
12 月 18 日	1
平成 15 年 1 月 14 日	1
2 月 5 日	1
3 月 11 日	2
計	25(人)

2. 平成 14 年度 利用者講習会月別受講者数

施行名 実施月	戸 山		村 山		筑 波	
	回数	人数	回数	人数	回数	人数
4 月	5	9	1	1	0	0
5 月	1	1	1	1	0	0
6 月	1	2	0	0	1	1
7 月	2	2	1	1	0	0
8 月	4	10	3	5	0	0
9 月	3	3	1	5	0	0
10 月	1	3	0	0	2	2
11 月	0	0	1	1	0	0
12 月	1	7	0	0	1	1
1 月	0	0	3	16	0	0
2 月	0	0	1	4	0	0
3 月	0	0	1	6	0	0
計	18	37	13	40	4	4

回数（講習会実施回数）

・ 指定実験室の管理・運営および利用状況

BSL3と4の実験室（指定実験室）の一元的な管理・運営を行った。戸山庁舎においては杉山及び高木弘隆研究官が、村山分室においては篠原克明主任研究官が、筑波支所においてはバイオセーフティ管理室併任の向井鏡三郎室長が担当した。甲原照子氏が非常勤職員として、11月まで戸山指定実験室の管理・運営にあたった。12月からは6号棟BSL3実験室の運用準備及び開始のため、村山指定実験室の管理・運営にあたった。引き続き、各指定実験室の日常の管理・運営、施設管理技術者の作業調整と監督、施設の定期総合点検の計画立案と実施及び指定実験室利用者に対する講習等の教育指導等を行った。

指定実験室の利用登録者と指定実験室利用者講習受講者を表に示した。

1. 平成 14 年度 指定実験室（BSL3）登録者数

庁 舎 名	登録者数
戸山庁舎	121
村山分室	40
筑波霊長類センター	40
計	201

・ バイオセーフティ教育と情報提供

バイオセーフティ教育の一環として、大学、国立機関、民間機関その他でバイオセーフティに関わる業務関係者を対象とした講義を行った。国際協力の一環として、JICAのトルコ研修生を受け入れ、バイオセーフティについての教育を行った。結核研究所における外国人研修時にバイオセーフティについての講義も引き続き行った。

外部機関から病原体等安全管理規程についての問い合わせや分与依頼、病原体のバイオセーフティレベル分けや実験施設・設備、BSL3の管理運営法及びバイオセーフティ委員会等についての問い合わせが引き続き多数寄せられ、これらの問い合わせについて資料提供並びに情報提供を行った。また、施設見学の受け入れと、これら見学者に対してバイオセーフティについての解説も多数行った。

病原体等の取り扱いにおける安全管理運営、安全装置及び実験施設設計等のバイオセーフティに関する学術研究の推進並びにバイオセーフティの普及を図り、バイオセーフティの向上発展に寄与することを目的とし、平成14年1月19日に設立された日本バイオセーフティ学会に参加し、14年11月に行われた総会・学術集会の運営にたずさわった。

研究業績

・バイオセーフティに関する研究

1. 微生物実験における密閉空間内の相対湿度調整方法の検討

微生物の繁殖および低減には環境因子として温度と共に、周囲の相対湿度が影響する。通常環境条件による影響を実験により評価する場合、温度に関しては恒温槽で容易に可能であるが、相対湿度は恒温恒湿槽の精度やコスト、および試験中でのコンタミネーションの問題より容易ではない。安定した相対湿度を作り出す方法として、各種無機飽和塩溶液を密閉チャンパー内に入れ、相対湿度を調節する方法が考えられる。そこで無機飽和塩の種類の違いによりチャンパー内の相対湿度を測定し、微生物実験への適用を検討した。

その結果、以下の無機飽和塩溶液で、それぞれの相対湿度(20%)で安定することを確認し、微生物実験への適用でできる感触を得た。

KNO_3 : 95%RH、 KCl : 90%RH、 BaCl_2 : 81%RH、
 $\text{Mg}(\text{NO}_3)_2$: 53%RH、 MgCl_2 : 33%RH。

[浜崎 浩、篠原克明、狩野文雄]

2. 安全キャビネットの給排気量の自動維持機構の検証

クラス II 安全キャビネットによる作業保護には、流入開口部に正常なエアカーテンを形成することが重要であり、そのためには給排気空気量を適量に維持することが必要である。そこで、給排気空気量モニター機能とコントロールシステムを搭載したクラス II 安全キャビネットを開発し、その性能を検証した。その結果、当該安全キャビネットは、BSL3 実験室内の圧力変動や並列接続された他の安全キャビネットの発停の影響を受けにくいことが確認された。

[篠原克明、深見 哲、杉山和良]

3. バイオハザード対策施設における前室機能に関する研究

BSL3 実験施設の前室の機能向上をめざして、差圧調整ダンパによる気流制御について研究を行っている。フロート式ダンパは、スライド式の差圧調整ダンパより開口面積を大きく取れるというメリットがある。そこで、フロート式とスライド式差圧調整ダンパの換気効率に与える相違を数値シミュレーションにより検討した。その結果、前室給気・更衣室排気の換気方式においては、壁上方に取り付けたスライド式ダンパに比べてドアに組み込んだフロート式ダンパの方が、部屋の換気効率を良好にできることが判明した。

[篠原克明、杉山和良]

4. バイオハザード対策用の防護服の国際基準に関する検討

バイオハザード対策専用の防護服の基準に関しては、現在 ISO 基準が策定されつつある。現在までのところ、素材の微生物浸透防護性能などについて ISO 基準とすべき数件の試験方法が提案されている。そこで、ISO 基準化を踏まえ、防護服素材に関する要求性能や試験方法などについて、国内外の状況や科学的根拠について調査、検討を行っている。

[篠原克明、高木弘隆、杉山和良]

5. 各種消毒剤による炭疽菌芽胞の迅速的不活性化に関する研究

バイオテロを想定した迅速かつ有効な消毒方法を検討すべく、そのモデルとして環境抵抗性の強い炭疽菌芽胞に対する各種消毒剤の不活性化効果について検討した。炭疽菌芽胞はパスツール 菌株及び 34F2 株より調製した成熟芽胞を使用した。消毒剤は芽胞に対して不活性化効果があるとされ、一般環境下でも使用可能と考えられる過酢酸、次亜塩素酸ナトリウム、二酸化塩素(安定化)の3種類についてその濃度と経時的な不活性化について検討を行った。

その結果両菌株 10⁶CFU以上の不活性化は、過酢酸では0.05%(過酢酸濃度として)以上で10分、次亜塩素酸ナトリウムでは0.1%、20分、希硫酸で活性化した二酸化塩素では0.05%、10分で達成されることが確認された。また0.07%過酢酸及び0.05%活性型二酸化塩素による環境分離 Bacillus sp.2 株の成熟芽胞に対する不活性化効果もみたところ、過酢酸ではその1株において40-60分作用後も3log₁₀の減少にとどまり株間での不活性化に大きな差違が認められたが、活性型二酸化塩素では30分以上作用させることで両株とも10⁶CFU以上が不活性化された。

[高木弘隆、杉山和良(バイオセーフティ管理室)、山田章雄(獣医科学部)]

なお本研究は厚生労働科学特別研究事業「バイオテロに使用される可能性の高い細菌の迅速的診断法及び消毒法に関する研究」(H14-特別-29)により実施したものである。

6. 塩素系消毒剤によるカリシウイルスの抵抗性に関する研究

capsid virusの消毒剤不活性化効果を検討してゆく中で、環境水へのヒト由来Norwalk-like virusの流出が示唆され、排水処理で行われる塩素消毒の適性について、ネコカリシウイルス(FCV)を用いた塩素系消毒剤抵抗性に関する検討を行った。FCVは弱毒ワクチン株及び臨床分離されたもの計8株について10⁶~10⁸PFU/0.1mlに調製し、有効塩素50ppmの次亜塩素酸ナトリウムに対する10分間での不活性化を経時的にトレースした。

その結果5株では3分で速やかに6log₁₀~7log₁₀の不活性化効果が認められたが、ワクチン株を含む3株で5分後に10²~10³PFUの残存がみられ、うち1株では10分後でも10²PFUの残存が確認された。これらについては引き続き、実際的な低塩素濃度での抵抗性を確認すると共に、こうした抵抗性株の出現頻度、分子生物学的解析を試みている。

[高木弘隆、篠原克明、杉山和良]

7. 各種消毒剤によるコロナウイルスの不活性化に関する研究

SARS コロナウイルスの世界的な outbreak により、その感染及び汚染防止対策が急務となった。そこでこの一環として同属のコロナウイルスを用いた各種消毒剤によるコロナウイルスの不活性化効果について検討を行った。供試ウイルスはブタ伝染性胃腸炎ウイルス(TGEV)を用い、消毒剤はハロゲン系に次亜塩素酸ナトリウム及びポピドンヨード(うがい用)、アルコール系としてエタノール、界面活性剤として、Nonidet P-40、Triton X-100 及び両性界面活性剤を使用し、2分間の作用による各々の不活性化効果をみた。なおこれまで界面活性剤は細胞毒性が強くこれを回避するには大量の希釈を行う必要があり、高力価ウイルスの不活性化評価が困難であったが、今回界面活性剤除去用ビーズを用いてウイルス力価を損なうことなく細胞毒性を軽減することができた。

その結果TGEV10⁶TCID₅₀を不活性化するためにはポピドンヨード0.5%、Nonidet P-40及びTriton X-100 0.1%以上、両性界面活性剤0.05%以上で可能であることが認められた。

エタノールは50%以上でTGEV 3×10³TCID₅₀が減少し、次亜塩素酸ナトリウムでは500ppmでTGEV 8×10⁴TCID₅₀が減少した。消毒剤不活性化効果試験の手法が確立できたとともに界面活性成分により有効な不活性化が行われることが示唆された。今後マウス肝炎ウイルス(MHV)及びSARSコロナウイルスに対して同様の試験を行ってゆく。

[高木弘隆、篠原克明、杉山和良(バイオセーフティ管理室)、森川茂(ウイルス部)]

その他

1. エイズウイルスに関する研究

V-1 clade B と clade E キメラウイルスの作製

SHIV-C2/1 KS661 をベースとして HIV-1 clade B と clade E の C2-V3 領域を組み込んだキメラウイルスを作製した。clade E の env 領域については、塩基配列の異なるクローンを数種類作製し、その性状について解析中である。

[高橋栄治、篠原克明(バイオセーフティ管理室)、網康至、須崎百合子(動物管理室)、阪井弘治、仲宗根正、本多三男(エイズ研究センター)]

2. ダニ媒介性脳炎ウイルス(TBEV)抗体測定ELISAの開発と動物血清中抗体価評価システム構築に関する研究

TBEV がイヌに感染した場合、発症せずウイルス血症を起こすため、感染後には高い抗体価を示す。関東近県でとくに郊外で飼われているイヌを対象とし、TBEV の感染実態を調査すべく、抗体価測定 ELISA の開発と抗体価測定に関わる課題について検討した。

TBEV抗原としてはウイルス部所有のロシア春夏脳炎ウイルス(RSSEV)を使用し、これを改変無血清培地によりVERO9013細胞で培養し10⁶PFU/mlのウイルス液を得た。ホルマリンにて不活性化し、透析・限外濾過に濃縮したものを固相化抗原としてELISAプレートに固相化した。北大より供与いただいた中和抗体陽性及び陰性イヌ血清、関東近県の動物病院から供与いただいたイヌ血清・血漿を用いてELISAを実施した。また同時に不活性化日本脳炎ウイルス(JEV)固相化プレートを作成し、同様にELISAを実施した。

その結果抗 TBEV 陽性及び陰性血清による暫定基準により、関東近県イヌ血清9検体中2検体で推定陽性となったが、これについて中和試験を行ったところ1:20未満であった。またこの2検体のJEV抗原に対する反応性は弱かった。これについてはIgM capture-ELISAによる他のフラビウイルスに対する反応性について引き続き検討している。

[高木弘隆、杉山和良(バイオセーフティ管理室)、高崎智彦(ウイルス部)]

3. ゲノムDNAのdot blot hybridizationによる*Listeria monocytogenes*の特異的検出に関する研究

4種類のPCR産物をprobeとした*L. monocytogenes* 遺伝子の特異的検出を昨年引き続き検討した。Biotin標識probeで問題となっていた非特異反応は菌体成分とAvidinが非特異的結合することが判明、DNA抽出方法を改良することによってこの非特異反応を軽減することが可能となったが、DIG標識probeと比較した場合特異性の面ではやや劣っていた。そこで改良DNA抽出法とDIG標識probeによる検出感度及び*L. monocytogenes*以外の*Listeria* spp. (5菌種17株)遺伝子に対する反応性をみたところ、検出感度は約10⁶copies/spotとほぼ理論値に近く、特異性についてはLM1/LM2およびmonoA/monoBの各probeで非特異反応がみられたが、prfA1/2及びLM1/HLYP-9の各probeでは*Listeria* spp. に対する反応は全くみられなかった。よって寒天培地上のコロニーの直接鑑別など同時多検体処理には大いに有効であると考えられる。

[高木弘隆、杉山和良(バイオセーフティ管理室)、井上智(獣医科学部)、村上裕之、丸山務(麻布大学)]

4. 環境河川中からの Norwalk-like virus 検出及び分子疫学的解析

2000 年から同一河川における継続調査を行い、2001 年 12 月で 2 年間をもって調査を終了した。

2001 年 6 月から 12 月にかけては上・中・下流及び河口汽水域すべてで NLV 特異遺伝子は検出されなかった。2001 年夏期は降雨量が少なく河川水量も減少しており、こうした自然条件が少なからず影響しているものと思われる。

また 2001 年 1 月から 5 月にかけて検出された NLV pol 遺伝子の一部について direct sequence を試みたところ、すべて G2 グループではあったが、月ごとにその homology は大きく違った。今後さらに広い領域での sequence を行い、より詳細な分子解析をする予定である。

[高木弘隆、杉山和良(バイオセーフティ管理室)、牛島廣治(東京大学)]

発表業績一覧

誌上発表

1. 欧文発表

- 1) Shinohara, K., Takagi, H., Fujii, H., Asano, T., Kitabayashi, A., Sugiyama, K. : Time course study of inflow velocity in Biological Safety Cabinet in National Institute of Infectious Diseases Japan. *Applied Biosafety*, 7 (1), 22-23, 2002.
- 2) Shinohara, K., Takagi, H., Sugiyama, K. and Kurata, T. Renovation of BSL-4 Laboratory. *Applied Biosafety*, 7 (4), 217, 2002.
- 3) Shinohara, K., Yamanaka, Y., Kogure, K., Ohkubo, T., Koba, Y., Takagi, H., Sugiyama, K. and Kitabayashi, A. The exhaust airflow stabilization System for multiple class II type B Biological Safety Cabinets in BSL-3 laboratory. *Applied Biosafety*, 7 (4), 219, 2002.

2. 和文発表

- 1) 杉山和良 : 2003 腎症候性出血熱、動物由来感染症その診断と対策。真興交易(株)医書出版部 92-96, 2003
- 2) 篠原克明 : バイオハザードとバイオセーフティ・セイフティ・ダイジェスト (Safety & Health Digest) Vol.48. No.7. 24-33. 2002. 7月. 社団法人 日本保安用品協会 (JSAA)

学会発表

1. 国際学会

- 1) Shinohara, K., Takagi, H., Sugiyama, K. and Kurata, T. Renovation of BSL-4 Laboratory. American Biological Safety Association, 45th Annual Biological Safety Conference, October 20-23, 2002, San Francisco, USA.

- 2) Shinohara, K., Yamanaka, Y., Kogure, K., Ohkubo, T., Koba, Y., Takagi, H., Sugiyama, K. and Kitabayashi, A. The exhaust airflow stabilization system for multiple class II type B Biological Safety Cabinets in BSL-3 laboratory. American Biological Safety Association, 45th Annual Biological Safety Conference, October 20-23, 2002, San Francisco, USA.

2. 国内学会

- 1) 大谷光幸、大野貴志、中村慎二、篠原克明 : フロート式差圧ダンパによる室圧制御と室内気流性状の検討。第 20 回空気清浄とコンタミネーションコントロール研究大会、2002 年 4 月、東京。
- 2) 篠原克明、坂本道子、永江啓夫、杉浦彰彦、清崎俊夫、三好哲夫、高橋栄治、高木弘隆、杉山和良 : 安全キャビネット及び実験室内ガス滅菌時のガス濃度推移。日本防菌防黴学会 第 29 回年次大会、2002 年 5 月、東京。
- 3) 榎瀬良美、山本俊郎、宇賀神秀樹、横山京子、鈴木元、桑田岳夫、阪井弘治、高橋栄治、篠原克明、三浦智行、喜多正和、速水正憲 : 弱毒 SHIV 感染免疫ザルにおける早期の強毒ウイルス攻撃接種に対する防御効果。第 50 回日本ウイルス学会学術集会・総会、2002 年 10 月、札幌。
- 4) 篠原克明、坂本道子、永江啓夫、杉浦彰彦、清崎俊夫、三好哲夫、高橋栄治、高木弘隆、杉山和良 : ホルムアルデヒドガス滅菌時のガス濃度モニタリング。第 2 回日本バイオセーフティ学会総会・学術集会、2002 年 11 月、東京。
- 5) 山中祐二、大久保孝雄、小暮一俊、木場裕介、北林厚生、小野恵一、本間圭一、篠原克明、杉山和良 : バイオハザード対策用クラス II タイプ B 安全キャビネットの排気安定化システムについて。第 2 回日本バイオセーフティ学会総会・学術集会、2002 年 11 月、東京。
- 6) 本多三男、仲宗根正、松尾和浩、網康至、泉康之、染谷健二、滝沢万里、浜野隆一、海津雅彦、川原守、原隆志、吉野直人、篠原克明、佐々木裕子、高橋栄治、阪井弘治、堀端重男、兼清優、浜岳牧子、山崎修道、山本直樹 : HIV ワクチンの実用化に向けて : サルからヒトへ。第 16 回日本エイズ学会学術集会・総会、2002 年 11 月、名古屋。
- 7) 喜多正和、榎瀬良美、宇賀神秀樹、横山京子、鈴木元、桑田岳夫、三浦智行、阪井弘治、高橋栄治、篠原克明、山本俊郎、今西二郎、速水正憲 : IFN- γ 遺伝子組込み弱毒 SHIV ワクチン効果。第 16 回日本エイズ学会学術集会・総会、2002 年 11 月、名古屋。
- 8) 高木弘隆、村上裕之、井上智、丸山務、杉山和良 : PCR 産物を probe としたバクテリアゲノム dot blot hybridization による *L. monocytogenes* の特異的検出の検討。第 23 回 日本食品微生物学会学術総会、2002 年 9 月、東京
- 9) 杉山和良 : 病原体の輸送。第 2 回日本バイオセーフティ学会総会・学術集会、2002 年 11 月、東京。