

微生物材料の受入から配布まで —『安全性』の確保について—

亀井克彦

千葉大学真菌医学研究センター 〒260-8673 千葉市中央区亥鼻1丁目8-1

Maintenance of biosafety and security in the culture collection facility of fungi

Katsuhiko Kamei

Medical Mycology Research Center, Chiba University
8-1 Inohana 1-chome, Chuo-ku, Chiba 260-8673, Japan

1. はじめに

千葉大学真菌医学研究センターは、病原真菌及び真菌症の研究を行う全国共同利用施設であるが、その活動の一環としてナショナルバイオリソースプロジェクトの援助を受けつつ、病原真菌・放線菌の菌株保存を行っている。具体的に菌株保存に関する業務としては病原真菌・放線菌管理室が中心となり、(1) 病原真菌・放線菌の菌株保存・分譲事業、(2) これら病原菌の同定、(3) 危険度分類3に該当する病原体の維持管理などがある。また、当センターは真菌・放線菌の中でも特に病原菌を対象としてコレクションを作製しているが、(3) のように、病原真菌の中でもBSL3を中心とした危険度の高い株も含めて保有管理している点が際立った特徴であり(表1)、このために通常の維持管理に加え、バイオテロ対策も求められている。

2. 保存施設で起こりえる事故

菌株保存に関する事故は可能な限り防止しなければならないが、その可能性は常につきまとう。具体的には、(1) 受け入れ、保管、分譲作業における事故、(2) 運搬中の事故、(3) 菌の紛失、盗難、漏出(飛散)が考えられる。特に(3)は、高度病原菌株を保存管理していることから、これらの盗難あるいは紛失はバイオテロリズムに直結する問題として特に注意を払っている。

保存から受け入れまで、BSL1および2の場合は以下の手続きで行う。

- (1) 教員が可否を判断

- (2) 教員が受領・同定(顕微鏡観察・DNA塩基配列)
- (3) 菌株申請書の作成
- (4) 菌株のIFM登録
- (5) 菌株保存

特にBSL2では、安全キャビネット、オートクレーブなどを備えた実験室で作業を行い、取り扱いには臨床検査技師や経験の豊富な教官が行っている。また、新規採用者の場合は、業務開始の前に病原真菌の取り扱いに関して基本操作の講習を行うなど安全管理に留意している。

しかし、実際の問題はこれほど単純ではない。当センターでは保存と並行して、主に患者から分離された菌株について医療機関の依頼を受けて同定する作業を行っており、このため多くの場合、菌の性質が明らか

表1 病原真菌の危険度分類

危険度	該当する真菌
レベル1	レベル2および3以外の菌
レベル2	<i>Aspergillus fumigatus</i> <i>Candida albicans</i> <i>Cladosporium carrionii</i> <i>Cladosporium trichoides</i> (<i>C. bantianum</i>) <i>Cryptococcus neoformans</i> <i>Exophiala dermatitidis</i> <i>Fonsecaea pedrosoi</i> <i>Microsporium canis</i> <i>Sporothrix schenckii</i> <i>Trichophyton mentagrophytes</i> <i>Trichophyton verrucosum</i>
レベル3	<i>Blastomyces dermatitidis</i> <i>Coccidioides immitis</i> <i>Histoplasma capsulatum</i> (<i>duboisii</i> 含む) <i>Histoplasma farciminosum</i> <i>Penicillium marneffei</i> <i>Paracoccidioides brasiliensis</i>

E-mail: k.kamei@faculty.chiba-u.jp

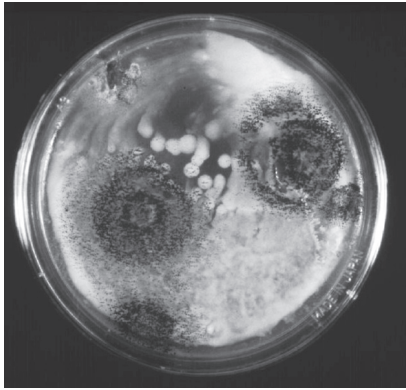


図1 送られてきた菌の例1

純培養が行われておらず、各種の真菌による汚染が見られる。シャーレは密閉できず強度も弱いため、本来菌株の輸送には不適である。

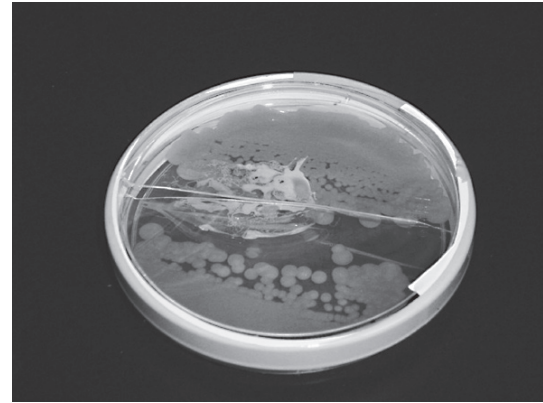


図2 送られてきた菌の例2

強度に問題のあるシャーレを不十分な梱包で輸送したため、シャーレの破損が生じている。

でないからである。この点、菌名が既に明らかな株の寄託を受ける場合と多くの点で異なっている。

臨床分離株の同定依頼を取り扱う際の問題点としては、このように菌名不明の菌株であることが問題であるが、さらに、高度病原性真菌（BSL 3 など）が混じっている可能性が存在することが安全管理の面から大切な問題となる。この際、高度病原性真菌はわが国ではいずれも輸入真菌症の原因菌であるため、海外から持ち込まれた菌であるかどうか（海外における感染が考えられるか否か）がきわめて重要である。そこで、手順として（1）海外渡航歴、経過、画像などの綿密な患者情報を確認して危険性を予備的に判断する（これらの情報が得られない場合は、菌株を受け入れない）、（2）BSL 3 の菌が疑われた場合は、BSL 3 実験室内でこれらの菌の取り扱いに習熟した職員2名以上により行う、さらに（3）最も感染力が高いと考えられる *Coccidioides immitis* が考えられる場合では、取り扱いを教官職に限定する、などの対策を講じている。残念ながらこれらによっても事故の可能性をゼロにすることは困難であるが、リスクを最小限に食い止めるため最善の努力は常に必要と考えられる。

3. 保存方法・設備における安全対策

千葉大学真菌医学研究センターにおける保存方法としては、（1）L 乾燥保存（主に 5℃）、（2）凍結保存（主に -80℃）を中心としており、これらに必要な設備を所有している。一部に（3）スラント保存（主に 20℃）を併用しているが、これは短期的な使用にとどめている。いずれも、菌種や使用目的に応じて使い分

けている。レベル3の菌株については専門のエリアで管理されており、当センターの職員も許可なく立ち入ることはできない。

4. 菌株分譲の流れと安全対策

菌株分譲の流れは他の多くの保存機関と大差はない。具体的には以下の手順である。

- （1）依頼者から担当者への菌株分譲の問い合わせ
- （2）担当者が分譲可否の確認
- （3）微生物委員会による審査、分譲希望者の使用目的の詳細、使用設備等の確認
- （4）生物遺伝資源分譲同意書（MTA）を交わす
- （5）菌株の発送

菌株の情報はNBRPの作製したデータベースで確認がある程度まで可能である。菌株の発送の際は、直接受け渡しが望ましいが、種々の事情によりこれが不可能な場合は郵送している。BSL 3 菌株については、生菌の分譲は行わず DNA のみを分譲可能としているが、この際も分譲相手先は共同研究者に限定し、特に厳重な審査を行っている。

5. 輸送の現状と問題点

1) 受け入れ時の輸送

受け入れ時の輸送に関しても様々な問題が存在する。受け入れ株の多くは一般医療機関から同定をかねて送られてくる株であるが、これらの施設は日常的に病原菌を取り扱っている施設でありながら、必ずしもそのすべてが病原性微生物に関する意識が高いとはいえないのが現状である。真菌のように浮遊性の高い微生物は輸送中の事故が起りやすいが、それを認識

している機関はむしろ少数といってもよいかもしれない。これは現在の病原性微生物の教育が主に一般細菌に力点を置いて行われており、真菌に関しては十分な知識が行き渡っていないことが影響している可能性が考えられる。このため、不十分な容器や不注意な取り扱いにより、輸送中の容器の破損による汚染はもちろんのこと、開封時の菌の飛散による事故の可能性など、真菌の基本的特性に関する知識に疑問を感じさせる検体がしばしば見られる。これらはいずれも緊急に啓蒙が必要とされる事項と考えられる（図1, 2）。

また、運搬において、BSL 2 の場合は業者に依頼して輸送しているケースが見られる。しかし、実際には様々な業者が存在しており、どの程度の危険性を認識し、どの程度の専門知識を持って業務にあたっているかに関して、業者間で大きな相違があるようである。このような業者の選定にも、送り手の認識が問われている。

BSL 3 に属する真菌が疑われた場合、当然のことながら、事態はより深刻である。BSL 3 の中でも *C. immitis* (*C. posadasii*) は3種病原体に指定されているため、本菌と確定すれば、輸送に関しては公安委員会への届け出を始めとする種々の厳しい規制があるが、確定していない段階の「疑い例」ではこのような規制はなされていない。しかし、本菌が混じっている可能性が想定される以上、これに準じた取り扱いが必要と考えられる。また、*C. immitis* 以外にも BSL 3 の菌は存在している。このため、我々の施設では危険を回避するため、このような菌が疑われた場合は、業者委託による輸送は行わず、十分な知識を持った依頼者側の関係者（主に医療関係者）に直接、運搬を依頼している。幸い、大部分の医療機関では少ない人員をやりくりしてこの依頼に応じていただいております、遠方の地域から菌を持参して主治医が来院することも稀ではない。ただし、菌の発育状態によっては、通常の方法では運搬そのものを避けるべき場合も存在することは忘れてはならない。

2) 分譲時の輸送

BSL 2 までの菌では問題は比較的少ない。分譲の際に安全性の観点から特に問題になるのは BSL 3 の菌種に関わるバイオテロ対策と考えられる。特に3種病原体である *C. immitis* の輸送に関しては厳重な規制下にあり、現実的には困難な場合が多いと思われる。当センターでは取り扱いの危険性も考慮して、本菌を始めとする BSL 3 の菌の分譲は行っておらず、DNA

でのみ分譲を許可している。

6. まとめ

大地震などの天災、大規模な火災などによる建物・保存施設の損傷などを考えると、事故、事件の可能性を100%排除することは残念ながら不可能であるが、あらゆる事態を考慮してさまざまな対策を検討しておく必要がある。

一般医療機関における病原真菌に関する意識が十分でない点は大きな問題であり、啓蒙活動と並行して分離菌輸送方法の検討も行う必要がある。

バイオテロリズムに関しては、今後もよりいっそうの注意が必要である。

<演題に対する質疑>

Q：安全性確保に関する啓蒙活動について、国などで推奨しているガイドラインのようなものはあるのか？

A：第3種病原体である *Coccidioides immitis* を除き、現時点ではおそらく何もないと思われる。真菌は感染力を持ったまま空气中に飛散・浮遊を繰り返すという特徴があり、一般細菌とは異なるハンドリングが要求されるが、医療機関のスタッフにはそのようなことを含めて一般的な知識（たとえば培地についての知識、等）がまだまだ不足しているのが実情である。

Q：運搬（輸送）のシステムやパッケージ等を体系化できないか？

A：スライドで紹介した BioPack 1 のような専用容器が一番良いが、高価なのが難点である（1個5,000円位）。専門の輸送業者もあるが、これも高い。サンプルを送ってくれる医療機関等には、「最低限シャーレで送るのは止めて、蓋のできる（密封できる）容器で送って欲しい」と頼んでいるが…。また、一般の宅配業者が病原微生物を取り扱ってもよいのかどうか、厳密には法律や規約面を検討しておく必要がある。

Q：スタッフの安全確保について、血清を保存しておくのは意味があるか？

A：扱っているものがウイルスであれば、安全確保上ある程度の効果は期待できると思う（事前・事後の抗体の有無で感染の判断に役立つ）。真菌の場合には一部の輸入真菌症の原因菌を除き、今のところあまり安全確保の上で役立つとは思えないが、将来的にはそのような検討も必要と思う。