

生物遺伝資源の安全な取り扱いに関する NBRC の取り組み

川崎浩子

(独) 製品評価技術基盤機構 バイオテクノロジー本部 生物遺伝資源部門
〒292-0818 木更津市かずさ鎌足 2-5-8

Safety handling of bio-resources in NBRC

Hiroko Kawasaki

NITE Biological Resource Center (NBRC), Department of Biotechnology, National Institute of
Technology and Evaluation
2-5-8 Kazusakamatari, Kisarazu, Chiba 292-0818, Japan

1. はじめに

NBRC : NITE Biological Resource Center は、我が国のバイオテクノロジー分野における産業競争力を強化するため、遺伝子情報を含む生物遺伝資源の提供体制という知的基盤の整備のために、2002年4月、独立行政法人製品評価技術基盤機構内に開設された生物遺伝資源センター (BRC) である。NBRC が提供する生物遺伝資源の用途は、①法令、規制などで指定された試験・検査の標準株、②学術論文、特許の証拠となる微生物株を用いた追試および発展的研究、③微生物の持つ未知の潜在能力の探索のための材料に大別され、バイオセーフティーレベル 2 (BSL2) 以下の微生物、ファージ、cDNA クローンの提供を行っている。NBRC では、寄託者から遺伝資源を安全に受け入れ、微生物取り扱い従事者と周辺住民の安全を考慮して管理し、さらにそれらを安全に提供しよう努めている。本年度の実務担当者会議では、NBRC が現在行っている安全対策の取り組みについて、下記の4つの項目について紹介した。

- ①微生物の病原体及びその他リスクの把握
- ②微生物取り扱い従事者への病原体リスク情報の提供 (BSL2 である等)
- ③施設設備の安全性の確保
- ④安全に対する意識の向上と共有化

2. 微生物の病原体及びその他リスクの把握

1) リスク評価基準

NBRC で取り扱う遺伝資源は、人体に影響を与え

ない、もしくは重大な健康被害を与えない微生物を対象としている。しかしながら、その評価についてはすべての微生物株に対し多方面から厳密なリスク評価をすることはできない。そこで、NBRC では、国立感染症研究所における「病原体の BSL 分類」を一つの基準とし、バイオセーフティーレベル (BSL) 1 もしくは BSL2 に指定されている微生物のみを提供することとしている。国立感染症研究所が定める「病原体の BSL 分類」とは、病原体等のリスク群による分類 (リスク群 1 ~ 4) を基準として、WHO の「実験室バイオセーフティー指針第 3 版 (2004 年)」の考え方をもとにして各病原体のリスク評価を行い、その評価結果をもとに定めたバイオセーフティーレベル (BSL) 分類である。BSL1 とは、ヒトあるいは動物に疾病を起こす見込みのないものを指している。BSL2 とは、ヒトあるいは動物に感染すると疾病を起こし得るが、病原体等取扱者や関連者に対し、重大な健康被害を起こす見込みがなく、有効な治療法や予防法があり、関連者への伝播のリスクが低いものを指している。加えて、NBRC では、国立感染症研究所が定める「病原体 BSL 分類」で BSL2 に指定されていない微生物であっても、白癬症のような疾病の原因菌として報告のある微生物については、BSL2 と同様にその取り扱いには注意し、微生物等取り扱い従事者への注意喚起を行っている。

2) 遺伝資源の受け入れ

NBRC への遺伝資源の受け入れ方法には、図 1 に示したいくつかのケースがある。NBRC では、BSL2 以下の微生物を取り扱うこととしており、BSL2 を

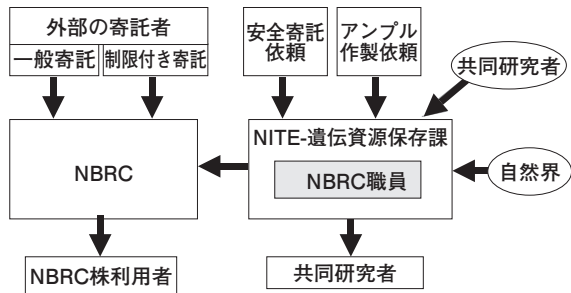


図1 NBRCにおける生物資源(微生物と遺伝子)の流れ

BSL1として取り違えないようにするため、さらに危険性の高い微生物等を受け入れないように、受け入れの手順方法を定め、それに添って遺伝資源の受け入れを行っている。

外部寄託者からの一般寄託と制限付き寄託の例を表1に示した。外部より微生物株を受け入れる際、担当者（NBRCでは遺伝資源の種類によって管理担当者を設けている）と事務的管理者とNBRC長の少なくとも3名が、書面にて病原体リスクを含むすべての情報の確認を行っている。3名で個別に確認する理由は、個人の思いこみによる病原体リスクの見落としをなくすためである。具体的には、国立感染症研究所における「病原体のBSL分類」表との照らし合わせを行うことと、遺伝資源の分離源の確認、寄託株の情報内容から学名の妥当性を確認している。

微生物の受け入れには、外部寄託者から寄託される以外に、共同研究者からの未同定株の提供や、自らが自然界より分離して持ち込むケースも少なくない（図1）。未同定微生物はBSL2と見なし、BSL2相当の取り扱いを行っている。ただしNBRCでは未同定臨床分離株を扱うことはない。

バイオセーフティーレベルの確認以外にも、国内植物の安全性確保の観点より、外国産の植物寄生菌や国内の植物に影響を与える可能性のある微生物については、農林水産省の植物防疫所が定める方法に従って受け入れと分譲を行っている。さらに、微生物多様性条約に関連して、遺伝資源利用者が安全に使用できるように、微生物多様性条約第15条の「遺伝資源の取得の機会」に従って、受け入れる遺伝資源が国内産でない場合は、原産国の同意があることを確認し、遺伝資源の受け入れを行っている。

3) NBRCにおける微生物の簡易同定

受け入れ時の学名の妥当性について確認を行うことにより、病原体を誤って一般微生物として扱うことを

防いでいる。受け入れ手続きの際、書面上の確認を行っているが、それに加えて、遺伝資源の管理担当者が簡易同定を行い、寄託依頼時の学名との照合を行っている。細菌（放線菌含む）、アーケア、酵母については、分子情報を用いた簡易同定、藻類については形態観察による簡易同定、糸状菌については形態観察と分子情報による簡易同定を行っている。分子情報としては、リボソームRNA遺伝子の塩基配列の決定を行い、既知菌との相同性比較を行っている。病原細菌の場合、16S rRNA遺伝子では一般細菌と区別できないものが存在する。その場合は、寄託者からの分離源等を含む詳細な情報を入手し判断している。

4) 分譲依頼者への病原体リスクの通知

利用者から分譲依頼があった時、その依頼株がBSL2の場合、その旨を分譲依頼者に通知すると共に、受取書はがきを送付することによって、確かに微生物株が依頼者に届いたことを確認し、安全に管理されるよう通達を行っている。

5) その他のリスクの把握

遺伝資源を安全に保管し、安定に提供していくためには、保存時に死滅させるリスクを回避しなければならない。NBRCでは、遺伝子資源の安全な管理と提供のために、遺伝資源毎に最も適した方法で保存を行っている。

多くの株で採用しているのがL乾燥保存法である。微生物細胞を液体に懸濁し、そのまま乾燥させアンプル中に真空状態で保存する方法である。L乾燥標品については、加速保存試験を行い、長期保存後の推定生菌数を求めることで、微生物を安全に保存・管理している。IFO研究者の調べによると、37℃にてある一定期間アンプルを保管した後の生菌数は、4℃で長期保存を行った際の20年後の生存菌数に相当することがわかっており、NBRCでは、作製したアンプル標品を37℃で2週間（細菌）～1ヵ月（酵母・糸状菌）保管し、その後アンプルから復元数（CFU）を測定し、20年後の生存菌数を推定している（加速保存試験）。

さらに、安全に保管するために、可能なものについては2種類の長期保存法（L乾燥法とLN₂保存法）を用いて、死滅するリスクを軽減させている。

災害リスクに備え、NBRC保存株は、千葉県・木更津市の当センター建物と、宮城県・仙台市にあるNITE東北支所の2ヵ所に保管している。

表1 NBRC 寄託（一般寄託と制限付き寄託）の手続きと微生物取り扱い

| 項目 | 内容 |
|-----------------------|---|
| 寄託依頼 | NBRC 寄託受付もしくは NBRC 各担当者に依頼有り。 |
| 内容の確認（書面上、もしくは電話等） | 第一段階の受け入れ判断 NBRC の各微生物担当者（NBRC ではキーパーと呼ばれている）による受入判断。 【確認項目】 1) 学名 2) 原産国（および関連書類の有無） 3) 培養方法（特に培養困難なもの） 4) 送付培養状態（特に培養困難なもの） 5) 生物の危険性の有無 |
| 菌株の受領 | 菌株並びに寄託申請書が NBRC に到着する。 |
| 検査同定 1 （糸状菌と藻類の場合） | キーパーが顕微鏡による細胞形態の観察を行い、BSL3 以上でないことを確認する。 同時に、生きた細胞であるか検査する。 |
| 受け入れ登録 | 寄託申請書（Accession Form）をもとに、書面による情報の確認を行い、菌株情報を NBRC データベースへ登録する。 * 担当者による再チェックと情報の共有化を行う。 |
| 受入のための所内正式手続き | 第二段階の受け入れ判断 寄託者からの寄託申請書と担当キーパーからの受入伺い書をもとに、管理職 1 名が感染研病原体リスク表との照らし合わせを行い、さらに NBRC の長が見直し、受入の最終判断を行う。 * 受入判断は、少なくとも 3 名の確認作業によって行われる。 |
| 培養 | 担当者（キーパー）が培養を開始する。 |
| 登録（NBRC 番号の付与） | 受け入れると判断された場合は、NBRC 番号が付与される。 |
| L-標品、凍結標品等の標品作製 | 担当キーパーは所内の微生物取り扱い方法に従い標品を作製する。補助職員に対しては、BSL レベルを明記し、危険性リスク情報を提示し、BSL2 や未同定株の場合は、特に注意を喚起する。 |
| 標品作製と平行して、同定試験 | 分子情報（形態観察）による同定を行い、その情報をデータベースに登録し共有化する。 【細菌・アーキアの場合】 16S rDNA 塩基配列 【酵母の場合】 LSU rDNA（D1/D2 領域）塩基配列 【糸状菌の場合】 形態観察と、LSU rDNA（D1/D2 領域）、必要であればさらに ITS 領域の塩基配列 純粋培養体であることの確認を行う。 アンプル標品と凍結標品を作製し、保存時の病原体リスクを軽減する。作製したアンプル標品は、加速保存試験を行い、20 年後の推定生存菌数の測定を行う。 |
| 保存 | 分譲チームと、菌株担当者の両者が保存管理。 建物災害等のリスク回避のために、NITE 東北支所にも保管する。 |
| 分譲開始 | 分譲先へ BSL レベルの通知と、受け取り確認を文書で行っている。 |

3. 微生物取り扱い従事者への病原体リスク情報の提供（BSL2 である等）

遺伝資源の分譲・保存・解析には、複数の職員が従事しているため、取り扱う遺伝資源の病原体リスクを微生物取り扱い従事者全員に開示し、病原体暴露被害を防がなければならない。そのための取り組みとしては、能動的情報提供と受動的情報提供の両方を行っている。微生物取り扱い従事者は、NBRC データベース

上の微生物データをいつでも閲覧することができる。そこで、自分が担当する遺伝資源の病原体リスクを知ることができる。一方、微生物を株の単位で取り扱うため、学名よりも菌株番号で管理し作業するケースが多いことから、管理担当者から別の職員に作業を依頼する際は、書面上に BSL レベルを表記し、情報の提供に努めている。例として微生物の L 乾燥アンプルの溶封依頼を行う際の様式を図 2 に示した。このこと

| L - 乾燥標品調製作業依頼伝票 | | | |
|------------------|--------------|-------|----------|
| 依頼日 | 2008年 6月 2日 | | |
| 依頼者名 | 川崎浩子 | | |
| 作業日 | 2008年 6月 20日 | | |
| 菌株番号 | BSL | サンプル数 | 160°C/3h |
| 1 1594 | 2 | 60本 | |
| 2 10217 | 1 | 40本 | |
| 3 10213 | 1 | 20本 | |
| 4 | | | |
| 5 | | | |
| 6 | | | |
| 7 | | | |
| 8 | | | |
| 9 | | | |
| 10 | | | |
| 備考 | | | |
| アンプル引渡日 | 担当者 | | |

図2 BSL1とBSL2の情報の提供

- ① NBRC 内のリスク評価表を全員に通知
- ② データベース上で菌株情報の共有化
- ③ キーパーは学名情報からリスクを把握
 - * 感染研 BSL レベルより厳しい判断をすることあり
 - * 新規受入株は同定が済むまで扱い注意
- ④ キーパーから実験補助者に、口頭でその病原体リスクを通知
- ⑤ アンプル標品作製については、複数の実験補助者が携わるので、紙面上にそのリスクを明記し、アンプル標品作製に携わる全員が病原体リスクを認識できるようにしている

により、アンプル溶封従事者が作業中に病原体暴露被害を生じた場合、速やかに適切な対応を行うことができる。

4. 施設設備の安全性の確保

遺伝資源を安全に取り扱っていくためには、微生物の取り扱い従事者が微生物学実験手技を習得していることは勿論のこと、安全設備が十分に整っている必要がある。さらに、それらが正常に機能している必要がある。NBRC では BSL2 病原体の取り扱いについては、国立感染研ならびに WHO の指針に従い、個人用暴露防止器具の使用と、バイオハザード標識を表示することで周知し、安全機器としては、安全キャビネットの使用を義務としている。本年度、遺伝資源の種類別実験室の全室に、安全キャビネットの設置が完了する。

NBRC では、ISO9001:2000 マネジメントシステムを導入し、機器点検制度を定期的に行っている。安全キャビネットを始めとして、バイオクリーンベンチ、オートクレーブ、ピペットマン、天秤、pH メーターの定期的自己点検、加えて外部点検を実施し、安全設備や機器が正常に機能するよう体制化している。

表2 微生物の安全についての組織的取り組み

| |
|---------------------------------|
| 【微生物取り扱い従事者の安全】 |
| 安全衛生に関する講習会や講演会の開催 |
| 微生物の取り扱いに関する教育訓練 |
| 微生物取り扱いのマニュアル・テキスト整備 |
| 機器と薬品の取り扱いテキスト整備 |
| 健康診断の実施と予防接種の管理 |
| 【安全システムの構築】 |
| ISO9001:2000 の認証を受け、その中に機器点検制度、 |
| 監査制度を導入 |
| 緊急時対応マニュアルの整備 |
| 【その他】 |
| 外部開催の講習会への参加 |

5. 安全に対する意識の向上と共有化

微生物の取り扱いによって生じる被害を防ぐためには、組織の取り組みに加え、微生物取り扱い従事者個人が、安全に対する高い意識を持つことが重要である。また、その意識は同じレベルでなければならない。しかしながら個人の自発的な安全への意識の向上には個人差があることから、組織として微生物取り扱い従事者の安全意識を向上させるための取り組みが必要である。

NBRC は、NITE バイオテクノロジー本部の一部門であり、全職員の安全意識の向上にはバイオテクノロジー本部全体で取り組んでいる。これまでは、安全衛生に関する講習会もしくは、微生物の取り扱いや化学薬品の取り扱いに関する講習会を年に1度開催してきた。産業医と業務管理者による実験室の見回りの実施、遺伝子組換え体については、遺伝子組換え委員会開催の講習会を行ってきた。昨年度より所内の安全に対する取り組みの見直しをはかり、①新人研修の実施、②定期的教育訓練の実施、③独自の微生物実験における安全テキストの作製とその内容の実施、④安全衛生講習会実施、⑤予防接種の管理、⑥外部の安全講習への参加を推進していくこととして、全職員に安全対策の意識向上を促している(表2)。

十分に微生物取り扱いに熟知していると思われる人でも、その知識が古いとか、間違った認識をしている場合がある。所属する部署や研究室には、独自のルールも存在する。組織の中で一人が間違った行動や異なったルールで行動をした場合、他人にも病原体暴露被害を与えることが十分想定される。全員が安心して、安全に微生物を取り扱うためには、十分なコミュニケーションをはかり共通の認識を持って行動することが大切である。現在、バイオテクノロジー本部の安全対策の実務担当を任されており、組織的な安全対策

の取り組み方法を検討してきた。今後は、新たな取り組み方法を実行に移し、職員全員の安全意識がさらに向上していくよう願っている。また、現場の意見を聞きながらより良い方向に向かうよう努めていきたい。

<演題に対する質疑>

Q：BSL レベルの確認をあえて専門外のスタッフ（たとえば事務方の人）に判断してもらうのはどういう理由か？

A：微生物の専門家でない人が、BSL レベル表に記載されている学名を照合させることにより、慣れた人たちだけによる思わぬ見落としや思い込み等を

防ぐ効果があると考える。

Q：BSL1 でも感染の可能性がある株の場合、分譲先にそれを伝えているか？

A：現在は伝えていない。所内でそうした株を BSL2 扱いにしている理由は、やはり感染の危険があるので用心のため。未同定株が BSL2 扱いとなっているのは、正体が不明で危険性がある菌株かもしれないから。

Q：分譲を受ける者の立場からは、BSL1 だけど危ないかもしれないと言われるよりも、BSL2 と言われる方がよりきっちりと対応できるのだが？

A：一理ある意見で、今後検討の価値があると思う。