

5. ウイルス学分野のバイオハザード対策, キャビネットを中心として

日野 茂男

鳥取大学医学部ウイルス

バイオハザード対策の要は、機械や設備ではなく、作業者の教育と、作業者が規則を遵守する態度である。これがなければ、器具や機械、設備をどんなに備えても意味がない。器具や機械を導入するときには、効果のあるものを選択し、適切な管理・維持する必要がある。バイオハザード対策用クラス II キャビネットは安全機器である。使用期間を通じて安全性を保証しなければ意味がない。機械である以上、正常に動いていることを確認する作業は、是非とも必要である。正しい計器を、正しく使って、作業室の安全を確保するよう勤めたいものである。組換え DNA 実験に対して最近公布された法律は、適当な変更を加えて後、病原体等の取扱いに対しても適用すべきである。

はじめに

ウイルス学分野のバイオハザードを語るに当たって、遺伝子組み換えと全く関係のないウイルス学研究はほとんどないといって良いくらいである。遺伝子組み換えに関しては、遺伝子組換え生物等の使用等の規制による生物の多様性の確保に関する法律¹⁾と、それに付随した研究開発等に係る遺伝子組換え生物等の第二種使用等に当たって執るべき拡散防止措置等を定める省令(平成16年 文部科学省・環境省令第1号)²⁾(省令)がある。手続きなど非常にやこしい話になるので、ここでは、遺伝子組換え実験とは、直接関係のない病原体を対象としたウイルス学として話を進めたい。組換え実験を伴わない実験は上記の法律、省令には捕らわれない。

ウイルス学分野におけるバイオハザード対策は、いろいろなことが言われ、書かれているが、肝心の所はないがしろにされていることが多い。ウイルス学の専門家は、機械や建築についてはあまり知識が十分でなくても当前だし、バイオハザードに関する文章を少しかじった程度では、元々の考え方がどうだったのかわからないので、自分の考えを少し追加して改善したつもりが、とんでもない改悪に

なってしまうたりしていることが多い。それが、法律に書き込まれていたりするので怖い。ここでは、紙面も少ないので、すべての点について詳説することはせずに、近年私が考えていることを随筆的に書いてみることにする。

バイオセーフティ委員会

それぞれの事業所には、バイオセーフティ委員会が必要である。法的には要らないが、外国との試料のやりとりなどには必要となる。組換え DNA 実験用の委員会がない事業所はないだろうが、実験の申請用のものであろう。バイオセーフティの規則制定、遵守の監視、扱っている病原体の把握などを行うバイオセーフティ委員会が存在し、きちんと運用されている事業所はそんなに多くないと推察する。私の大学でも必要性を説いて、学部長に進言して以来15年間音沙汰はない。

専門家

何事にも資格を持った「専門家」を作るのがはやりである。そんな「専門家」がわかったようなことを書いたり、しゃべったりしているが、いいかげんな「専門家」に管理・支配されるのは迷惑である。しかしながら、委員会と規則があり、それにしたがった書類の山ができてくると、きちんと整理し、管理する専門家が必要になる。欧米では safety officer が必ずいるのだが、日本ではこの種の専門家(?)をおいている事業所は極めて限られている。私の所属する American biological safety association は20年以上の

連絡先

〒683-8503 米子市西町 86

鳥取大学医学部ウイルス

E-mail: hino@grape.med.tottori-u.ac.jp

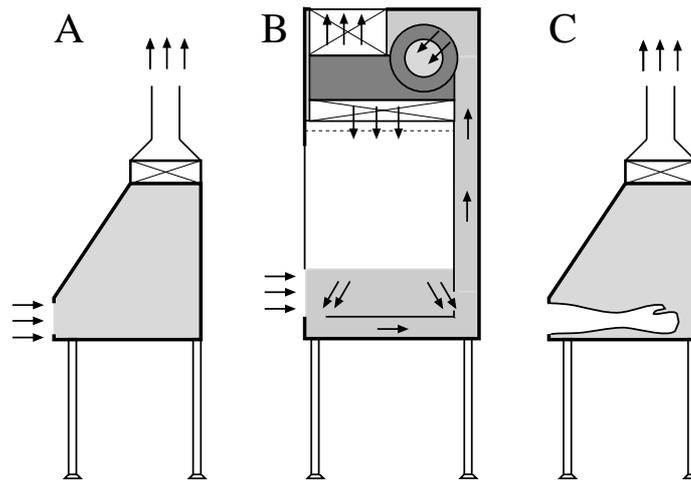


図1 バイオハザード対策用クラスI (A), II (B), III (C) キャビネット(模式図). クラスIキャビネットは、前面開口部からの吸い込み気流のみである. クラスIIキャビネットは、作業領域に清浄空気を供給するため、前面開口部での気流バランスが微妙である. クラスIIIキャビネットは前面開口部はなく、グローブで密閉されている.

歴史を持ち、米国には専門家を養成する大学の学部がかなり前からあるようだし、バイオセーフティ専門の学位も職もある.

国際バイオハザードマーク

感染性のある生物材料を扱う研究室、冷蔵庫、保存庫などにはバイオハザードマークを貼ることを知っている人は多い. しかしながら、マークに付随して、病原体の内容、使用責任者、等の情報を記載することを守っている事業所は極少ない. 誰が、何を使って、何をしているのかかわからないのは、宅急便の配達人だけでなく、事業所の責任者も同じことなのではなからうか? 病原体の使用に関するバイオセーフティの考え方は、我が国にはないのではなからうか? 実際の所、組換えDNA実験の規則はあっても、病原体取扱いの規則はないに等しい.

エアロゾル対策

ウイルス学研究室の大部分はBSL2, BSL3 (BSL: biosafety level) の原理に基づいて仕事をしているであろう. BSL2では、白衣と手袋を常用し、大量にエアロゾルを発生する機器を閉じ込めるのが基本である. バイオハザード対策用クラスIIキャビネット (キャビネット) は、生物材料の開放的な取扱いに使用する. しかし、もっとも問題なのは、遠心機などの大量にエアロゾルを発生する機器はほとんど対策なしに使われている. 遠心機の内部を清拭して汚れを検出できない研究室はまずないであろう. すなわち、遠心機の中では大量のエアロゾルが発生しており、実験室には汚染エアロゾルが漂っているのが現状である (通常の遠心機の蓋は密閉度が良くない). このような実験室に、それ以外の所だけバイオハザード対策を強化しても

あまり意味がないだろう. 通常の遠心機には、ドラフトの中に入れるなどの対策が必要であろう.

遠心機では、遠心管が壊れた経験のない研究者は少ないのではないだろうか? 遠心管が壊れたことを考え、ロータ自体にエアロゾル漏れがないようなものを選択することが望ましい. このようなロータを選択し、ロータの蓋を開ける前にキャビネットの中に持ち込むなら、遠心機自体をドラフトに入れる必要もない.

ここで省令のエアロゾル対策に少し触れておこう. 省令には上記のような運用に関する記載は全くないと言って良い. 省令では、エアロゾルを生じやすい操作をする場合に限って「研究用安全キャビネット」を使うように指定されている. 「研究用安全キャビネット」という言葉の定義はなく、この省令以外で使用されているのを見たこともない. おそらくバイオハザード対策用キャビネットのことと思われる.

バイオハザード対策用キャビネット

有機溶媒やガスなどの有害物質の取扱いには基本的にドラフトを使うべきである. 通常の室内換気で耐えられる濃度のガスに対しては室内換気で対応しよう. 病原体等を解放性に扱ってとき生じる汚染エアロゾルの封じ込めには、バイオハザード対策用キャビネットを使用する. これらには、クラスI, II, III (図1)があり、クラスIキャビネットは作業環境に高度の清浄度を必要としない作業に適する. 前面開口部では一様に内向きの気流があり、庫内からのエアロゾルの漏出を防ぐ. 排気はHEPAフィルタで濾過する. エアロゾルを出す可能性のある機器の収納にはこのクラスIキャビネットが適している. 有機溶媒などを使用する大部分の操作は厳密な清浄度を必要としないのでクラスIキ

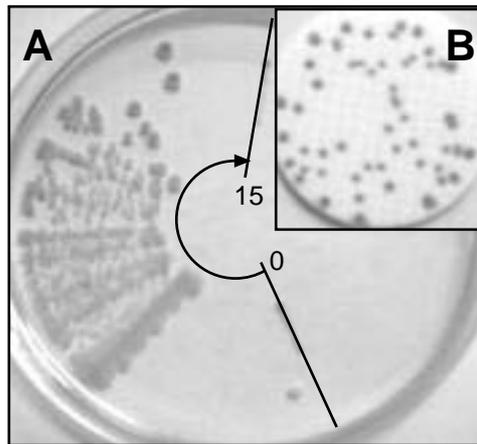


図2 クラスIIキャビネットの作業者安全性試験の一例。キャビネットの庫内で 8×10^8 個の枯草菌芽胞を噴霧する。(A) 庫外においたスリットサンプルで枯草菌芽胞の漏れをモニターする。性能の十分なキャビネットでは数個を超える芽胞を検出することはない。このキャビネットは性能が十分ないので菌を噴霧した5分から10分の間集中的に庫内から芽胞が流出しているのが検出された。(B) 庫外においたインピンジャ(水面に空気を衝突させ菌を捕集するガラス容器)に捕集された芽胞をミリポアフィルターに集め培養する。性能の十分なキャビネットでは10個を超える芽胞を検出することはない。このキャビネットでは、数十個の芽胞が検出された。性能検査が十分でない会社のキャビネットでは、このようなことが起こりうる。

キャビネットを使用すべきである。より安価で、安全性も高い。クラスIIキャビネットに比べて、前面開口部の気流バランスを気にしないでいいのでより安全である。

クラスIIキャビネットは作業空間に高度の清浄度を保証するが、前面開口部での気流バランスは極めて微妙であり、正しい使い方をしないと性能の保証はない(図2)。それ以前に、メーカーが規格に準拠していると自信(?)を持って販売しているキャビネットでも、第三者がその性能を確かめていないキャビネットは、予期した性能があるのか怪しいものである。実際、あまりに開発が困難なので、中途であきらめた会社が複数ある。実際に顧客に販売している代理店の管理・維持能力は会社によって雲泥の差がある。いい加減な販売会社から購入したキャビネットの性能保証は怪しい。搬入時の現場検査もしない販売会社があるくらいである。クラスIIIキャビネットはグローブボックスとも言われ、作業用の開口部はなく、ゴム手袋を通して作業するので、特殊目的以外には常用し難い。

クラスIIキャビネット(キャビネット)

キャビネットの性能の基本は、HEPAフィルタと前面開口部での気流バランスである。HEPAフィルタに穴が開いたときの危険性を憂い、密閉式のダクトで室外排気をする設計が多い。これは大間違いである。キャビネットの排気は、作業室にとるのが正しい。HEPAフィルタからの漏れを心配するのなら、HEPAフィルタの検査を頻回に行うべきである。

キャビネットの気流は極めて微妙なバランスに基づいて前面開口部の安全性を確保している。キャビネットの排気

風量は概略 $\pm 5\%$ 以内に制御されている必要がある。多くても、少なくとも性能はでない。単体の場合は、この排気風量を保つように設計されている。これに対して、建築物に付帯した空調設備の風量調節は極めて大まかである。通常の空調設備会社の設計では、密閉式のダクト接続をしたキャビネットの風量が $\pm 10\%$ 以内に調節できるとは考えにくい。私の経験では、一番やっかいなのは、外気の風の影響で、この影響を全く受けないと安心できる設計の研究室には、お目にかかったことがない。米国でもやっこのことに気がついたらしく、2年ほど前に見学したところ、以前は密閉式ダクト接続をしていたキャビネットのダクトはすべて切り離していた。ダクト接続をする場合には、使用後もキャビネットは止めてはいけない。

単独で排気ダクトに接続していた場合でもこれだけ危険である。多くの場合、更に問題を大きくしている要素がある。2台以上のキャビネットを共通のダクトに繋いでいる場合、片方を止めたり、運転したときのそれぞれの排気量に変化しないことは極めて考えにくい。もう一つ、安全性を高める(?)つもりで、ダクトの下流にHEPAフィルタをかませることがある。この場合には、HEPAフィルタの目詰まりによっても風量に変化する。

キャビネットの規格書としては、米国のNational Sanitation Foundation Standard No. 49, Class II (laminar flow) biosafety cabinet²⁾が世界的にもっとも幅を利かしている。設計、材料、構造、工作方法、性能、検査法に至る詳細な規定がある。5~10年毎に改訂されており、注意が必要である。この規格に対する検査に合格したキャビネットは<http://www.nsf.org/Certified/Biosafety/>に公開

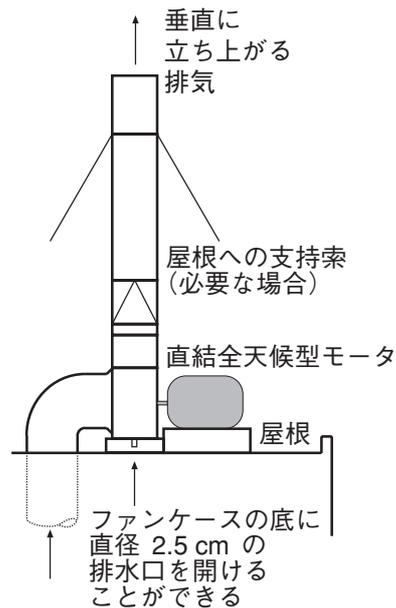


図3 室外排気をするための排気口。各キャビネットからの排気は独立にする。排気口は、風向きなどに影響を受けないよう、垂直にし、屋根面より3 m以上の高さとする。ベルトドライブのモータは避け、直結とすることにより、室内からのモニタを可能にする。

されている。NSFの認可を受けているキャビネットには、製作会社がNSF承認済のステッカーを貼ることができる。カタログ規格にNSF準拠と書いてあるものは、製作側が「規格に沿って作ったつもり」と言う意味であり、規格書に沿った性能があることを客観的に証明されたものではない。NSFのホームページで確認できないキャビネットは、客観的にその保証を受けていない。外国の規格保証のあるキャビネットでも、国内販売会社の維持管理能力が欠けているものもある。規格書で要求している風速の変動幅は約5%以内なのに、規格書に準拠したキャビネットのカタログに風速の変動幅は堂々と10%以内であると書いてあるものもある。

日本では、(社)日本空気清浄協会(JACA)のJACA Std. No. 16として1980年に発表された規格³⁾から発展し、JIS K 3800⁴⁾がある。1994、2000年版が既に発行され、2005年改訂版がそろそろ公表される予定になっている。JIS K 3800に合格していることを製作者以外で検査しているのは、JACAであり、製作者は、この検査に合格したキャビネットにJACAの認定ステッカーを貼ることができる。ある会社のJIS規格準拠製品の社内検査データを要求したところ、購入時にJIS規格内製品であることを要求されていなかったため、そんな検査はしていないという報告を受けたことがある。しかも社内検査データは社外秘なので、提出できないと言う。

ここで注意して欲しいのは、それぞれの時期に製作されたキャビネットは、それぞれの時期の仕様書に基づいて製作、認定されているので、古いキャビネットを新しい基準

に照らして検査することはできない。仕様書の内容を細かく記載する余裕はないので、詳細は規格書本体を熟読していただきたい。

一方、設置する部屋の設計、空調、電氣的配電状況などすべてが、キャビネットの設置に適当でなければならぬ。私自身、電圧の関係から発熱量が増加し10分運転すると自動停止する外国製キャビネットを納入されたことがある。

工場出荷時に十分な性能があったとしても、納入までの運送過程で壊れることもある。社内検査で合格した製品を設置したところ、おかしい態度をとるので、開けてみたところファンのブレードが逆さまに装着されていたのを経験したことがある。使用開始後時間的経過によるキャビネット運転性能の変化も問題である。きちんとした維持管理をしていないところで、検査するとキャビネットの多くが不合格になるといった報告はまれではない。

キャビネットを設置する作業員と作業室の安全を確保するには、キャビネットの性能が継続して保証しなければならない。必要な管理・維持に必要な人的・物的コストを省略してはいけない。

キャビネットの検査

キャビネットはかなり精密な機械であり、性能を発揮しているかどうかを検査する必要がある。少なくとも納入時、年1回の定期検査は必要である。その他、キャビネットの移動後や、維持管理に伴いキャビネットをいじった場合はその後に検査する。検査しないで放置したキャビネットの半数以上は正常に機能していないと言う報告がいくつもあ

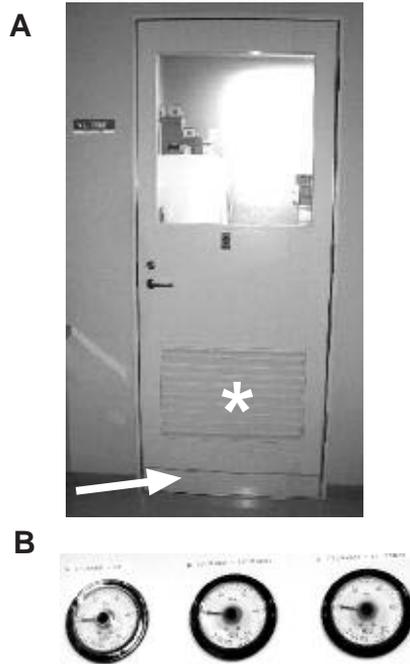


図4 (A) 実験室の扉。外開きとする。P2実験室では室内は負圧にしないが、P3とP2実験室の扉が逆向きに開くのは不便である。扉の下には100 mmの羽目板がある。履き物の処理、粉塵混入の防御などに有効(矢印)。前室から見たP3実験室の扉には、ガラリを切っており、扉が閉まっているときにも一方向気流を確保する。扉を開けたときに生じる気流の攪乱を少なくすることができる。前室の排気はすべて実験室に流すことで空調を簡単にすることができる。(B) P3実験室の気圧監視装置。

り、私も経験している。定期検査で最も重要なのは、HEPAフィルタの漏れ検査、流入風量検査、吹出し風速検査である。この3つは省略できない。詳細については、JIS規格あるいは拙著⁵⁾を参照されたい。

キャビネットの検査は30万円以上要求されると聞いたことがある。検査に必要な測定器は全部そろえると約300万円ほどかかる。検査には少し教育すればできる程度の技術を必要とするが、非常に難しいものではない。少し大きな事業所で数十台のキャビネットを保有しているところでは、検査器具と技術取得に少々の投資を行っても、1～2年で十分に元を取れるので、事業所内で検査できる態勢をとってはいかがであろう。

検査の時期

納入後新規設置時に行う。厳格な工場での出荷検査を行っているという会社からの品物もこの時点で欠陥の見つかることがある。ダクトを繋ぐ場合には、排気系がキャビネットに悪影響を与え、キャビネットの性能を乱している場合が多い。部屋の吸排気系では、1年を通じた風の向きや強さによって影響を受けないようにする。

毎年一回を目途として、定期検査を行う。

キャビネットの除染

使用開始後のキャビネットの検査には、作業の内容によ

り汚染領域に頭をつっこむ必要がでてくるので、除染が必要である。人体に悪影響を及ぼすおそれの少ない対象物のみを扱っていたキャビネットについては、表面除染のみで、燻蒸処理を省略できよう。その際、現場の作業責任者から、除染はしなくても、危険性はないことを保証した書面をもらっておく必要があろう。

除染とは、対象となる病原体等を完全に死滅させる方法を言う。単なる消毒とは異なり、「完全に死滅させること」を期待する。微生物は、99.99%殺しても十分でない。条件が整えば、1匹の細菌は1晩で10億匹に増殖する。除染には、10,000 ppmのホルムアルデヒドガスで24時間処理する(間口1,200 mm程度のキャビネットでは約10 gのパラホルムアルデヒドを使用する)。12時間以上処理すれば、ほぼ十分であるから、24時間という言葉は、一晩と置き換えていいだろう。後処理としてアンモニアガスを等モル炊いで中和する。この中和反応は瞬時に終わる。ホルムアルデヒドガスの炊き方の詳細は、JIS K 3800の附属書に記載してある。

燻蒸を業者任せにする研究者が多いであろう。使用するパラホルムアルデヒドは、研究者サイドで購入、保管、使用する必要がある。医薬用外劇物であり、おそらく資格のない者が購入・保管・販売すると違法行為となるので注意が必要である。キャビネット燻蒸の目的で顧客の所へ行く途中の業者の車が事故を起こし、その車からパラホルムア

ルデヒドの粉末がまき散らされたときのことを考えて欲しい。キャビネットユーザーのほとんどは許可をもっている施設のはずである。

キャビネットの排気

ここでキャビネットの排気についてもう一度確認しておこう。キャビネットの排気は、室内にとることを原則とする。キャビネットの排気量は厳密に制御する必要があるので、密閉式のダクト接続は危険度を高くする。ダクトを通して室外排気にするときは、キャノピ式の開放接続とする(要するに、焼鳥屋の火の上にある天蓋方式である)。このとき、キャノピの排気量はキャビネットの排気量の50%増しとする。又、キャノピ接続にしたときは、キャビネットは使用、不使用にかかわらず連続運転とする。排気は他の部屋に再利用されないようにする(図3)。

大量の化学物質、ガスなどを使用するため、どうしても密閉接続による室外排気とするときは、キャビネットの排気量が±10%の変動を起こさないように設計する。キャビネット毎の単独排気とすることが望ましい。単独排気にしないときはかなり大変な設計をする必要がある。

P3 実験室の設計など

P3 実験室の設計についていくつかの提言をしておこう。

1 扉。実験室の扉は外開きとする！ 内部が負圧となるので、うち開きでは、扉が閉まりにくくなる。扉の幅は有効で900×2000mmを確保する。できれば、高さは2100mm欲しい。単にこの大きさの扉を指定すると、戸当たりなどでかなり削られるので、大きなものの搬入に苦労する。扉の開放角度にも注意する。90°しか開かないような設計だと扉の厚さや、ノブで開口が相当削られることを覚悟しておかねばならない(図4A)。

実験室には前室が必要であり、前室の扉は、両方とも自動的に閉まる構造が要求されている。自動的にいっても電動である必要はない。ドアチェックをつけたり、釣り手を斜めにしたりすればよい。前室には更衣室機能を必要とするように組換えDNAの規則ではなっているが、外国のP3レベルの実験室では、室外で更衣することが多い。これは、一つには使い捨ての作業衣とover shoesが常用されるからであろう。この場合でも、脱ぎ捨ては外で行うのが普通である。

私は、扉の下側には、100mmの取り外し可能な羽目板をつけている。これによって、内外を明らかに区別できる。さらに、外側で脱いだ履き物が扉の開閉の邪魔になることを防げる。もう一つの大きな効用は、内部の部屋の汚れ方が目に見えて減ることである。

2 P3 実験室の気流が正常に保たれていることは部屋の

差圧計をおくことでモニタできる(図4B)。1週間に一度記録し、グラフに書くことで、フィルタの掃除などの期間を決定できる。モニタ用の計器がついていても、記録をしっかりとらない限り、ほとんど役に立たない。

3 組換えDNA実験のP3実験室では、出口近くに手洗い用のシンクが必要であり、肘か脚などで開閉できる蛇口をつけることが要求されている。近頃は赤外線で開閉できる蛇口が便所などに多用されているが、実験室では、器具の洗浄などにも使うので、600mm角程度のシンクに肘か脚などで開閉できる蛇口をつけるのが良からう。省令に書いてあることで始末の悪いのが、「実験室からの排水が、遺伝子組み換え生物等を不活化するための処置が講じられた後で排出されるものであること」と指定していることである。P3実験室では、組換え体を直接流すことはないはずである。そもそも手袋をした手から、手袋を脱いだ後、念のためもう一度手を洗えといっているのだから、この排水も危険物と考えるなら、作業員全体も実験室から出る前に除染する必要があることになる(つまり一旦入室した作業員は、生きて外には出られない)。すべての排水に不活化処理を要求するのは、明らかに行き過ぎで、早急に改正してもらいたい。排水をすべて除染しなければならないのは、P4レベルの話である。この除染設備は、P3では不要であり、もしつけるとしたら、多額の費用がかかることをわかっていない者が書いた規則である。このようなことを、書き込んだために、本来実験が終わったところで、あるいは一段落したところで、頻回に手を洗うことで事故を減らそうとする目的は、なるべく手を洗わないようにさせる方向に働いてしまう。実験室の安全性を下げる方向に働く規則は適当でない。

4 P3 実験室の排気。実験室からの排気は、他の部屋で再循環されないものであることが要求されている。再循環せずに室外に捨てる排気には、組換えDNA実験の規則でもHEPAフィルタ処理は要求されていない。実験者が作業中に呼吸している空気が危険なら、実験者自体の安全を確保していないことになる。P3実験室とはそれほどの危険を想定した実験室ではないのである。しかしながら、文章上は実験室に排気口を作り、パッケージに戻す構造の空調機では、HEPAフィルタが必要となる。実験室の空調の主役をセパレート型の空調機に任せることは、合格のほうである。部屋の空気をかき混ぜているだけで排気とはなっていないからである。セパレート型の空調機を活用するのがいいと思うのだが、積極的に使ってくれる設計者はまだ見当たらない。100%新鮮空気の設定は、聞こえはいいのだが、実際に使ってみると温度管理、湿度管理などに問題が多く、循環型の空調機で調節している実験室よりはるかに不快である。

文 献

- 1) 遺伝子組換え生物等の使用等の規制による生物の多様性の確保に関する法律 (平成 15 年法律第 97 号)
- 2) 研究開発等に係る遺伝子組換え生物等の第二種使用等に当たって執るべき拡散防止措置等を定める省令 (平成 16 年 文部科学省・環境省令第 1 号)
これらは, <http://www.bch.biodic.go.jp/hourei1.html> より得取できる
- 3) Class II Biological Safety cabinetry. National Sanitation Standard, No. 49. Ann Arbor, MI. 1976; 1983; 1987; 1992; 2002. 無料で手に入れるのは難しい.
http://www.nsf.org/business/biosafety_cabinetry/standards.asp?program=BiosafetyCab より購入する.
- 4) クラス II 生物学用安全キャビネット規格. JACA Std. No. 16. 1980. (社)日本空気清浄協会. 1983 (No. 16b), 1988 (No. 16c) 改訂. JIS 化にともない現在は廃棄状態である.
- 5) バイオハザード対策用クラス II キャビネット. JIS K 3800:2000. 日本規格協会. 東京. (初版は 1994, 2005 年改定予定). 無料で手に入れるのは難しい.
<http://www.webstore.jsa.or.jp/webstore/JIS/FlowControl.jsp> より購入する. 2005 年に改訂作業中である.
- 6) 日野茂男. バイオセーフティのあり方. バイオハザード対策用クラス II キャビネット安全性管理. 臨床と微生物. 32 (増刊号), 587-594, 2005.

Biological Safety in Virological Field with Special Considerations on Class II Biological Safety Cabinets

Shigeo HINO

Department of Virology, Tottori University School of Medicine,
86 Nishi, Yonago 683-8503 Japan

The most critical point for the biosafety is not sophisticated devices or facilities, but education of workers and their compliance to the regulation. Appropriate devices should be carefully selected in the introduction of new devices, and they should be properly maintained. The class II biosafety cabinet is one of the delicate safety equipments. It should be kept adequately maintained throughout the lifetime of the cabinet to insure safety of the laboratory. For the maintenance, appropriate measuring equipments should be used by trained technicians. The recently enforced law for control of recombinant DNA researches should be applied for the handling of pathogens even in non-recombinant DNA researches after proper modifications.

