

2. 微生物実験と安全性

野本 明男*

微生物の中には病原性を有し、ヒトの感染症の原因となるものが数多く存在する。病原微生物研究、すなわち病原微生物による感染・発症のメカニズムを解明し、当該病原微生物制御のための戦略開発を目指す研究は、医学領域の必須の研究である。また、微生物と宿主の間の分子レベルでの相互作用を解析する研究から、生物学上の重要な発見が数多くなされており、先端生物学研究の重要な分野としても位置づけることができる。

病原微生物は、プリオン、ウイルス、細菌、真菌、寄生虫などに大きく分類されている。古くから知られている病原微生物の一部に対しては、予防ワクチンや治療薬などが開発されているが、対処法が確立していないものも多い。さらに、近年次々登場してくる新興・再興感染症は、改めて病原微生物研究の重要性を認識させるに至っている。

病原微生物を扱う実験の安全性に関する指針が設けられたのは、ごく最近である。病原微生物を封じ込めることにより、実験者を守り、また病原微生物の外部への漏出を防ぐために設けられた。それまでは実験者は感染の危険を覚悟しながら、その技術によって封じ込めを行ってきた。現在は、最も危険な微生物に分類され、BSL (bio-safety level) 4 の設備を要求されるマールブルグウイルスの分離・同定も、手袋・マスク・通常の防護服着用で、マールブルグ大学のまったく普通の研究室で、感染事故もなく行われたのである。SARS ウイルス (BSL3) の実験室内感染が報じられているが、実験者が病原微生物の取り扱い方を習熟することがいかに大事であることを示している。感染様式、感染経路、不活化の方法など、微生物が持つ性質をよく理解することも、安全な実験にとって必須である。近年、ウイルス発現ベクターは、微生物取り扱いに慣れない研究者によっても多用されているが、このような実験者もウイルスの性質をよく理解する必要があるだろう。

Safe experiment on microbiology

AKIO NOMOTO Department of Microbiology, Graduate School of Medicine, The University of Tokyo



*のもと・あきお：東京大学大学院医学系研究科微生物学教授。昭和49年東京大学大学院薬学系研究科修了。昭和57年東京大学医学部助教授。昭和62年東京都臨床医学総合研究所部長。平成3年東京大学医科学研究所教授。平成12年現職。主研究領域／ウイルスの分子生物学。

Key words

病原微生物
感染
取り扱い技術
封じ込め

1. 微生物とは

微生物は、プリオン、ウイルス、細菌、真菌、寄生虫などに大別されている(表1)。プリオンはタンパク質のみからなり、遺伝物質である核酸を保有していない。ウイルスは遺伝物質としてDNAまたはRNAを持つが、1) 栄養を取り込む機能、2) エネルギー産生機能、3) タンパク質生合成機能など、生物として必須の機能を持っていないので、プリオン同様に生命体とはいえない。これらの微生物は、生体に寄生してのみ増殖・複製が可能である。ウイルスは、独自の遺伝情報系を保持しており、感染細胞内では各ウイルスに応じたライフサイクルにより増殖・複製する。細菌、真菌、寄生虫は、栄養を与えれば単独で増殖することができるので生命体である。

生命体である微生物は、原核生物と真核生物に分けることができる。細菌の細胞には核が存在しないので原核生物、真菌や寄生虫の細胞には核が存在するので真核生物である。ウイルスは、バクテリオ・ファージのように原核生物に感染するものと、真核生物に感染するものがある。ウイルスは宿主の核酸合成機能やタンパク質生合成機能を利用して、宿主細胞内で増殖するため、宿主が持つこれら機能のメカニズムを解明するために使用された。それゆえ、多くの生物学上重要な発見がウイルス複製研究の中から生まれている。逆転写酵素、RNA スプライシング、キャップ構造、IRES (internal ribosome entry site) などの発見はよい例である。

微生物は、病原微生物、有用微生物、その他の微生物に分類することができるが、地球上に現存している微生物の種の1%程度しか認識されていないとされている。病原微生物は、ヒトに疾患を起こすがゆえに発見された。とくにウイルスは、人工培地では増殖・

表1 微生物の種類と特徴

微生物		単独増殖	ゲノム
プリオン	非生物	×	×
ウイルス	非生物	×	
リケッチア	原核生物	×	
クラミジア	原核生物	×	
細菌	原核生物		
真菌	真核生物		
寄生虫	真核生物		

複製しないため、病気を起こすものでないと、発見は極めて困難である。科学技術の進歩に伴い、将来は、感染によりむしろ健康を得られるというようなウイルスが発見される可能性もある。今後明らかとなる未知の微生物に対する興味はつきない。

2. 病原微生物

医学領域で扱う微生物は、病原微生物が多く、研究遂行上、感染する危険が常に伴う。実験者への感染に留まらず、実験室外への拡散が起こらないよう十分注意を払った取り扱いが要求される。病原微生物の取り扱いには、当該病原微生物をよく知り、それに応じた取り扱いに習熟していることが最も重要である。現在は、最も危険な微生物に分類され、BSL (biosafety level) 4 の設備が要求されるマールブルグウイルスの分離・同定は、手袋・マスク・通常の防護服着用で、マールブルグ大学のまったく普通の研究室で、感染事故もなく行われた。SARS ウイルス(BSL 3)の実験室内感染が報じられているのと対照的である。実験者の微生物取り扱い技術がいかに大切かを示している。

病原微生物を扱う研究の安全性に関する指針が設けられたのは、ごく最近である。ここでは、その指針に示されている事柄を解説する。

表2 現存する主なワクチンと治療薬

ワクチン	細菌	百日咳ワクチン, ジフテリアトキソイド, 破傷風トキソイド, コレラワクチン, レプトスピラ症ワクチン, 肺炎球菌ワクチン
	ウイルス	ポリオワクチン, インフルエンザワクチン, 日本脳炎ワクチン, 麻疹ワクチン, おたふくかぜワクチン, 風疹ワクチン, 狂犬病ワクチン, 黄熱ワクチン, 水痘ワクチン, B型肝炎ワクチン, A型肝炎ワクチン
治療薬	細菌	多くの抗生物質
	ウイルス	アシクロビル, アマンタジン, ザナミビル, リバビリン

3. ワクチン

一部の病原細菌や病原ウイルスに対しては、ワクチンが開発されている(表2)。ワクチンのほとんどは予防ワクチンであり、感染してからでは手遅れなので、ワクチンが開発されている病原微生物の取り扱い者は、あらかじめワクチン接種(投与)しておくことが推奨されている。

病原微生物は、多くの成分により構成されているが、感染防御に関与する抗原はその一部である。病原微生物全体を不活化し、ワクチンとすることも可能であるが、副作用を考えると、必要不可欠な構成成分のみを使用したワクチン製造が望ましい。したがってワクチン開発には、感染防御抗原を特定することが第一歩となる。菌体外毒素を産生する細菌では、外毒素がワクチンの材料となる。ウイルスは基本的に毒素成分を持たないので、全ウイルス粒子を用いた不活化ワクチンが可能であるが、インフルエンザやB型肝炎では、エンベロープ表面に存在する主要感染防御抗原を材料としたワクチンが使われている。病原微生物の有効構成成分のみを使ったワクチンは、コンポーネントワクチンと呼ばれている。不活化ワクチンのほかに、生ワクチンが開発されている。生ワクチンは、病原性を低下させた微生物である。経口生ポリオワクチ

ンは、自然感染経路と同じ経口で投与される。

不活化ワクチンは血中の中和抗体のみを産生させる。したがって、血中を介した体内伝播により標的器官に到達する病原微生物に対しては高い感染防御効果が期待できるが、インフルエンザウイルスによる上気道炎などには、血中抗体による感染防御は成立しにくい。感染病理を知ったうえでのワクチン開発が重要である。

4. 物理的封じ込め

病原微生物は、その危険度に従ってP1~P4レベルに分類されている。表3にP1からP3の各レベルの実験室に要求される設備を示した。P4レベルでは、さらにグローブボックス内での作業、または宇宙服スタイルでの作業が要求される。P4レベルでの取り扱いが定められている病原微生物は、エボラウイルス、マールブルグウイルス、ラッサウイルス、天然痘ウイルスなどである。

このような指針は、実験者への感染を防ぎ、危険な病原微生物の実験室外への拡散を防ぐために設けられている。ただし前述のように、どのような設備を使用しても実験者が病原微生物取り扱い方法を習得していなければ、危険を回避することは難しい。

表3 封じ込めに要求される設備 (P1 ~ P3) と P4 レベルの微生物

物理的封じ込め	
	病原微生物の危険分類に従って P1 ~ P4 レベルがある
P1 レベル:	・通常の生物の実験室等
P2 レベル:	・エアロゾルが生じやすい操作をする場合には、安全 ・キャビネット内で操作
P3 レベル:	・前室を設置し、前室の前後の扉を同時に開けない ・実験室は、容易に水洗い・燻蒸でき、密閉状態が維持される構造 ・足等で、または自動で操作可能な手洗い設備 ・空気が内側へ流れていくための給排気設備 ・排水は、原則として、実験室・建物内の他の部屋に再循環されない ・排水は、遺伝子組み換え生物等の不活化後に排出されること ・実験室内に高圧滅菌器を設置 ・専用の真空ポンプを使用
P4 レベル:	エボラウイルス、マールブルグウイルス、ヘンドラウイルス、ニパウイルス、ラッサウイルス、天然痘ウイルスなど

5. 病原微生物の性質を知る

感染事故や拡散事故をなくすためには、実験者が病原微生物の性質をよく理解していることが最も重要である。気道感染や経口感染する病原微生物はエアロゾルとならないような取り扱いが必須であるし、血液感染するものであれば、血液に直接接触することは避けなければならない。

不活化の仕方も熟知している必要がある。一般的な方法は高圧蒸気滅菌や塩素系消毒薬による処理であるが、エンベロープを持つウイルスは界面活性剤処理で不活化する。しかし、異常プリオンなどは非常に不活化処置に抵抗性を示す。

不注意な増殖実験により、微生物の性質が変化してしまう場合がある。たとえば、温度感受性の微生物を高い温度で増殖させると、たちまち高温でも増殖できる変異株が出現する。RNA をゲノムとして持つウイルスは、とくに変異率が高いので要注意である。周囲で行われている他の微生物実験からの微生物の混入により、組み換え体が発現する可能性も

ある。たとえば、P2 レベルのレンチウイルスベクター(HIV を改変したベクター)も複製可能な HIV が混入すると、両者の組み換え体が発現し、P3 レベルの危険度となることが容易に想像できる。

おわりに

安全に病原微生物を取り扱う方法は、病原性研究をさらに推進することである。相手をよく知れば、その分だけ取り扱いの方法、感染防御の方法、ワクチンや治療薬の開発といった病原微生物を制御するための戦略が生まれるからである。自然界における新興・再興感染症の出現の様子、ポリオ根絶計画の困難さの原因などからも病原微生物に対する対応の基本を学ぶことができる。どんな病原微生物の出現にも対処できるような危機管理体制の基本は、安全な微生物実験を目指す姿勢の中にあるといえる。

質 疑 応 答

座長(清水) どうもありがとうございます。
た。

岸本忠三(日本医学会副会長) 次々と新しいウイルスが出てくるし、日本にも入ってくるし、患者も必ず出てきます。それに対する対処と研究は、ナショナルプロジェクトとしていかなければなりません。その中で一つ非常に問題なのは、BSL(Biosafety Level)4 の患者も扱える、検査もできる、そして実験・研究をするという設備が日本に一つも稼働していないことです。誰もがそれは必要だと言うのですが、実際にどこにしますかとなると、みんな腰が引けてしまう。吉倉先生にもお聞きしたいのですが、東村山の一つさえ全く稼働していない。稼働していないから、それを使う人が育ってこない。育ってこないから、いざというときにより危険になるという問題を抱えていると思います。

野本 大変難しい問題ですが、稼働していない原因は住民の反対運動です。P4 施設を使いたいという日本人の研究者は、外国のP4 施設で研究を進めています。そうして研究者を育てることはできますが、日本の中でどうやって稼働させるか、これは国の危機管理の問題として国民のディスカッションをさかんにし、むしろ設備があったほうが安全だと知っていただかないと、いかんともしがたい問題です。あるいは、誰も住んでいない孤島にP4 施設をつくって、そこで研究することも考えられるかもしれません。

吉倉 廣(国立感染研) 最近までP4 施設のあった国立感染症研究所にいました。ラッサ熱の診断の話ですが、少し訂正しますと、抗体検査でラッサ熱の診断はいちおう感染研で行いました。米国で確認検査を行ったということです。全くできないということはありません。

ません。

ラッサ熱について興味深いのは、どこに患者を送るかもあります。この患者さんは日本に帰ってきて1週間ほど、自宅から開業医にかかっていた。それで熱が下がらないので東大医科学研究所に送り、そのうちに治ってしまいました。当時、医科研はあまり流行らない病院でしたから、ほかの患者ともあまり接触しないという状況がありました。

私はSARSのときも感染症分科会の座長を務め、現実の問題と過剰な反応との間で非常に困りましたが、もう少し冷静に現実的にどうするかを考え、このような感染症の患者さんが開業医にかかることをよく理解したうえで対応する必要があると思います。

P4 施設稼働の話は、WHOのガイドラインでも研究は止めることとしても、診断は可能にする必要があるとしています。ですから、ラッサ熱、マールブルグ病、エボラ熱などが、日本に突然入ってきて、厚生労働省から感染研で診断を行うよう言われれば、これは国の話なので、地方自治体はそれを止めることはできません。行政的にはそのように割り切っています。いかに反対が起ころうが、行わざるをえないと思います。

座長 先ほどの基本的な三つの安全取り扱いが基礎で、その教育は実験者の間でかなり徹底されていると考えてよいのでしょうか。

野本 不十分だと思います。先ほど組み換えという問題をお話ししましたが、レンチウイルスベクターの例があります。HIVをベースとした発現ベクターですが、キットとして販売されており、法制化されP2レベルで使うことになりました。しかし、法制化以前は東大医学部ではP2の扱い、医科研ではP3としていました。医科研では多くの研究者がHIVを使っており、HIVとレンチウイルスベクターがいつどこで組み換えを起こすかわからないからP3にしていた、ということです。こ

のような判断ができることが大切です。また、これがガイドラインのよいところだと思います。

変異の問題は、微生物を扱う人なら誰でもわかっていますが、ベクターだけを使う人にはそうした教育が欠けていると思います。いま多くの人々がベクターを使い始めていますから、教育が必要ではないかと考えています。

座長 三つの方法、知識はもちろん重要ですが、単純な物理的封じ込めだけでは解決できません。同じレベルの危険なものが2種類あると、組み換えが起こる可能性があるわけですね。

野本 あります。変異の起こりやすさを含めた微生物取り扱いを感覚的に知ることは非常に重要で、それは少くとも教育をしても難しい問題かもしれません。遺伝子治療のプロトコルを見ますと、ウイルスの感染価ではなく、ウイルスを何 μg 使いなさいと書いてあります。大量にあったとしても、それが生物活性のないパーティクルならゼロに等しいわけで、プロトコルを書いた人からしてセンスがないなと思います。

吉倉 先ほどの私のコメントで誤解があったかもしれませんが、感染研のP4施設は、いつでもP4病原体を使える状況にあります。P4を使っていないだけで、施設は十数年間使っています。ですので、やにわにP4病原体を使うということはありません。

もう一つ野本さんのコメントに関して、組み換えについて補足があります。大腸菌の毒素遺伝子をプラスミドに組み込んで、それを相当に増やして検査キットとして売られることをどのようにとらえるか。つまり毒素遺伝子がないと検査キットとしてコントロールが取れないわけで、組み換え体が生後商業ベースに売られ始めるときのレギュレーションに問題が出てきます。いま審査の対象の中にそういうものがありまして、非常に苦慮してい

るところです。特にそういうものはプラスミド群を除いてしまうと組み換え体ではなくなりますから、よけい判断が難しい。

最後に野本さんにうかがいます。9月半ばにイタリアのフラスカッティで、研究資源および研究の悪用を防ぐための会議があって、私も出席します。その中で天然痘ウイルス、あるいは野本さんがとても大事にされているポリオウイルスを全部なくしてしまうのか、あるいは取っておくのか、その使用についてなどの議論が出ると思います。一言コメントいただけますか。

野本 天然痘ウイルスに関しては、本当はもうなくしてよいはずですが、取っておいた理由は、地球上からウイルスといえども一つの種をなくしたときに、環境に何が起こるかわからないという状況でしたので持っていようということでした。そこで米国と当時のソ連（英国も保有していましたが、後にウイルスによる事故が起きて保有をやめたようです）、二つの超大国が保持していたわけです。しかしその後長い間何も不都合なことが起きていないわけですから、もうなくしてもよいのではないかと思います。ところが、今はもし敵が天然痘を使ったらどうするかということで、防御の観点から天然痘を廃棄するのをやめています。当初の環境に関する心配はなくなりましたが、テロの問題で廃棄できないというのが現状だと思います。

ポリオは小さなウイルスで、ゲノムの長さが7,500ヌクレオチドしかありません。テロに使われたりするのが怖いからなくそうと言っても、7,500ヌクレオチドのゲノムであれば、いまは簡単に合成でつくれますので、天然痘をなくすことに比べると大きな意義があるとは思えません。悪用しようと思えば、いくらでもつくられてしまいます。

岸本 先ほど吉倉先生より、東村山の施設は維持されている、使おうと思えば使えと

いご発言がありました。実際はほとんど使われていません。だからカナダに行って実験が行われると言う現状があります。確かかどうか存じませんが、厚生労働大臣は就任すると東村山の市長に使わないという覚書を出しているとか聞きます。維持しているだけで、使うつもりもないというのは、具合が悪いのではないのでしょうか。どのようにするかを考えなければならないかと思えます。

吉倉 P3 病原体を使っていますし、定期的に使わないと設備がすべて使えなくなってしまう。ただ緊急でない限り P4 病原体は使いません。たとえば総合科学技術会議が決めて、使ったらよいとおっしゃるとよろしいのではないかと思えます。

出月康夫 (日本医学会副会長) ふだん聞けない大変怖い話をうかがっていますが、先ほどラッサ熱の例がありました。開業医のとこ

ろに行く可能性があり、また実際にこのケースも 1 週間そうだったということです。私は外科ですが、一般の病院の先生方はこういったお話をうかがう機会がまずないと思えます。ですから研修医レベルなどで、感染症の講義のときにこういった内容が入っていないといけないと思えます。東大病院ではお話しされているのですか。

永井良三 (東大附属病院) まずは MRSA です。ね。

出月 MRSA はあまりにも有名ですが、あのケースは非常にラッキーだったと思えます。しかしそういう機会は今後も出てくる可能性があると思えます。そうした心配を持っています。いまのお話をうかがいました。

座長 今日の話は研修医や開業医を対象に話す必要もあるということですね。どうもありがとうございました。