

I 組換え体作製実験及び増殖実験に係る物理的封じ込め(大量培養実験に係るものを除く。)

各レベルに応じた物理的封じ込めの設備、実験室の設計及び実験実施要領は、以下のとおりとする。

1. P1レベル

(1) 封じ込めの設備、実験室の設計

実験室は、整備された通常の微生物学実験室と同じ程度の設備を備え、かつ、設計が施されていること。

(2) 実験実施要項

- ① 実験中、実験室の窓及び扉は閉じておくこと。
- ② 実験台は、毎日、実験終了後消毒すること。また、実験中汚染が生じた場合には、直ちに消毒すること。
- ③ 組換え体を含むすべての廃棄物は、廃棄の前に滅菌すること。その他の汚染された機器等は、洗浄、再使用及び廃棄の前に消毒又は滅菌すること。
- ④ 機械的ピペットの使用が望ましいこと。
- ⑤ 実験室内での飲食、喫煙及び食品の保存はしないこと。
- ⑥ 組換え体を取り扱った後、及び実験室を出るときは、手を洗うこと。
- ⑦ すべての操作においてエアロゾルの発生を最小限にするよう注意を払うこと。
- ⑧ 汚染した物質等の汚染を実験室以外の場所で除去しようとするときは、堅固で洩れのない容器に入れて、実験室から搬出すること。
- ⑨ 実験室の昆虫、げっ歯類等の防除をすること。
- ⑩ 他の方法がある場合には、注射器の使用は避けること。
- ⑪ 実験室内では、実験着等を着用し、退室時にはこれを脱ぐこと。
- ⑫ 実験室は、常に整理し、清潔に保つこと。
- ⑬ その他実験責任者の定める事項を遵守すること。

2. P2レベル

(1) 封じ込めの設備

組換え体の処理を行うため、ブレンダー、凍結乾燥器、超音波細胞破碎装置、遠心分離機等のエアロゾルが大量に発生しやすい機器を使用するときには、汚染エアロゾルが外部に漏出しないように工夫すること。キャビネットを使用する場合は安全キャビネット(以下別表1参照)が望ましい。なお、キャビネットの性能は必要に応じて検査すること。

(2) 実験室の設計

実験室は、汚染物及び廃棄物の処理のための高圧滅菌器を備えた建物内に置くこと。

(3) 実験実施要項

- ① 実験中、実験室の窓及び扉は閉じておくこと。
- ② 実験台及び安全キャビネットは、毎日、実験終了後消毒すること。また、実験中汚染が生じた場合には、直ちに消毒すること。

- ③ 組換え体を含むすべての廃棄物は、廃棄の前に滅菌すること。その他の汚染された機器等は、洗浄、再使用及び廃棄の前に消毒又は滅菌すること。
- ④ 機械的ピペットを使用すること。
- ⑤ 実験室内での飲食、喫煙及び食品の保存はしないこと。
- ⑥ 組換え体を取り扱った後、及び実験室を出るときは、手を洗うこと。
- ⑦ すべての操作においてエアロゾルの発生を最小限にするよう注意を払うこと。
- ⑧ 汚染した物質等の汚染を実験室以外の場所で除去しようとするときは、堅固で洩れのない容器に入れて、実験室から搬出すること。
- ⑨ 実験室の昆虫、げっ歯類等の防除をすること。
- ⑩ 他の方法がある場合には、注射器の使用は避けること。
- ⑪ 実験室内では、実験着等を着用し、退室時にはこれを脱ぐこと。
- ⑫ 実施されている実験の性質を知らない者のみを実験室に入れないこと。
- ⑬ 実験が進行中の場合には、P2レベル実験中の表示を実験室の入口に掲げること。
- ⑭ 実験室は、常に整理し、清潔に保つこと。
- ⑮ 封じ込めレベルがP1でよいとされる他の実験を同じ実験室で同時に行う場合には、明確に区域を設定して注意深く行うこと。
- ⑯ その他実験責任者の定める事項を遵守すること。

3. P3レベル

(1) 封じ込めの設備

- ① 組換え体を取り扱う場合には、エアロゾルを生じうる操作及び機器の使用が可能な安全キャビネットを設置すること。ただし、エアロゾルが外部に洩れない設計が施されている機器を使用するときにはこの限りでない。
- ② 安全キャビネットの設置に際しては、定期検査、HEPAフィルターの交換、ホルムアルデヒドによる燻蒸等が安全キャビネットを移動しないで実施できるよう配慮すること。また、安全キャビネットは、設置直後次のアからウまでの検査を行うとともに、定期的に年1回以上ア及びイの検査を行うこと。
 - ア 風速・風量試験
 - イ HEPAフィルター性能試験
 - ウ 密閉度試験

(2) 実験室の設計

- ① 実験区域(出入を管理するための前室によって他の区域から隔離された実験室、廊下等からなる区域をいう。以下同じ。)を設けることとし、前室は両方が同時には開かない扉を前後にもち、更衣室を整えること。
- ② 実験区域には、汚染物及び廃棄物の処理のための高圧滅菌器を置くこと。
- ③ 実験区域の床、壁及び天井の表面は、容易に洗浄及び燻蒸ができる構造及び材質とすること。
- ④ 実験室及び実験区域の主な出口には、足若しくはひじで、又は自動的に操作できる手洗い装置を設けること。
- ⑤ 実験区域の窓は、密閉状態とすること。

- ⑥ 真空吸引装置は、実験専用のものとし、実験区域以外の区域とは別に独立して設けること。
吸引口にはフィルター又は消毒液によるトラップを設けること。
- ⑦ 実験区域には空気の排出換気装置を設けること。このシステムは、空気の流れが前室から実験区域へ向うように設計すること。実験区域からの排気は、濾過その他の処理をした後排出すること。

(3) 実験実施要項

- ① 実験中、実験室の扉は閉じておくこと。
- ② 実験台及び安全キャビネットは、毎日、実験終了後消毒すること。また、実験中汚染が生じた場合には、直ちに消毒すること。
- ③ 組換え体を含むすべての廃棄物は、廃棄の前に滅菌すること。その他の汚染された機器等は、洗浄、再使用及び廃棄の前に消毒又は滅菌すること。
- ④ 機械的ピペットを使用すること。
- ⑤ 実験区域内での飲食、喫煙及び食品の保存はしないこと。
- ⑥ 組換え体を取り扱った後、及び実験区域を出るときは、手を洗うこと。
- ⑦ すべての操作においてエアロゾルの発生を最小限にするよう注意を払うこと。
- ⑧ 汚染した物質等の汚染を実験区域外の他の場所で除去しようとするときは、堅固で洩れのない容器に入れ、実験区域から搬出すること。
- ⑨ 実験区域の昆虫、げっ歯類等の防除をすること。
- ⑩ 他の方法がある場合には、注射器の使用は避けること。
- ⑪ 実験区域内では長袖で前の開かないもの、ボタンなしで上からかぶるもの等の形式の実験着を着用し、実験区域を出るときはこれを脱ぐこと。また、この実験着は洗たく前に消毒すること。
- ⑫ 実験区域への出入りは前室を通して行い、実施されている実験の性質を知らない者のみを入れないこと。
- ⑬ 実験が進行中の場合には、P3レベル実験中の表示を実験室及び実験区域の入口に掲げること。
- ⑭ 実験区域は、常に整理し、清潔に保ち、実験に関係ないものは置かないこと。
- ⑮ 試料を扱う場合には、実験用手袋を使用すること。使用した手袋は、作業終了後、他のものを汚染しないよう取りはずし、消毒すること。
- ⑯ 実験中、当該実験室内では、封じ込めレベルP2が以下でよいとされる他の実験を同時に行わないこと。
- ⑰ その他実験責任者の定める事項を遵守すること。

II 大量培養実験に係る物理的封じ込め

各レベルに応じた物理的封じ込めの設備・設計及び実験実施要項は、以下のとおりとする。

1. LS—Cレベル

(1) 封じ込めの設備・設計

- ① 培養装置その他の装置、機器は、よく整備された状態を保持すること。
- ② 組換え体の培養装置の排気ガスは、組換え体の漏出を最小限にするように排出される設計とすること。

(2) 実験実施要項

- ① 実験に係る組換え体に由来するすべての廃棄物及び廃液は、実験終了後、廃棄前に浄化処理すること。この処理の有効性は、あらかじめ、実験に用いる宿主に対して確認すること。
- ② 培養装置に組換え体を植菌する場合、及び培養装置から組換え体を試料用に採取する場合には、培養装置の外壁等の汚染を最小限にするように注意を払うこと。
- ③ 培養装置から他の装置、機器に組換え体を移す場合は、組換え体の漏れによる汚染を最小限にするように注意を払うこと。
- ④ 実験室内の実験を行うための区域(以下「大量培養実験区域」という。)を清潔に保つこと。また、同区域の昆虫、げっ歯類等の駆除に努めること。
- ⑤ 実験が進行中の培養装置等には、LS-Cレベル大量培養実験中の表示を掲げること。
- ⑥ 実験用の被服等の使用は、実験責任者の指示に従うこと。
- ⑦ その他実験責任者の定める事項を遵守すること。

2. LS-1レベル

(1) 封じ込めの設備・設計

- ① 組換え体の外部への漏出が防止できるように設計され、かつ閉じた状態のままで内部の滅菌操作を行い得る培養装置を設置すること。また、当該培養装置は、設置直後及び定期的に年1回密閉度の検査を行うこと。
- ② 組換え体の処理を行うため、ブレンダー、凍結乾燥器、超音波細胞破碎装置、遠心分離機等のエアロゾルが発生しやすい機器を使用する場合には、それらの機器を収容するために、汚染エアロゾルが外部に漏出しないよう設計された安全キャビネット又はそれに相当する封じ込め機能を有する装置(以下「安全キャビネット等」という。)を設置すること。ただし、エアロゾルが外部に洩れない設計が施されている機器を使用するときにはこの限りではない。また、安全キャビネット等は設置直後及び定期的に年1回性能の検査を行うこと。
- ③ 組換え体の培養装置の排気ガスは、除菌用フィルター又はそれに相当する効果を有する除菌用機器(「除菌用フィルター等」という。(2)⑮において同じ。)を通じてのみ排出される設計とすること。また、除菌用フィルター等は、設置直後及び定期的に年1回性能の検査を行うこと。
- ④ 装置及び機器について、封じ込めの状態に関係する部分の改造又は交換を行った場合は、その都度、当該装置及び機器の密閉度、性能の検査を行うこと。

(2) 実験実施要項

- ① 大量培養実験区域を明確に設定すること。
- ② 培養装置その他の汚染された装置及び機器並びに実験に係る組換え体に由来するすべての廃棄物及び廃液は、実験終了後、廃棄前に滅菌すること。この滅菌操作の有効性は、あらかじめ、実験に用いる宿主に対して確認すること。
- ③ 機械的ピペットの使用が望ましいこと。口によりピペットを操作するときは、綿栓付ピペットを使用すること。
- ④ 大量培養実験区域内での飲食、喫煙及び食品の保存はしないこと。
- ⑤ 組換え体を取り扱った後、及び大量培養実験区域を出るときは、手を洗うこと。
- ⑥ すべての操作においてエアロゾルの発生を最小限にするよう注意を払うこと。

- ⑦ 培養装置に組換え体を植菌する場合、及び培養装置から組換え体を試料用に採取する場合には、培養装置の外壁等が汚染しないようにすること。汚染が発生した場合には、直ちに消毒すること。
- ⑧ 培養装置から他の装置又は機器に組換え体を移す場合は洩れないようにすること。汚染が発生した場合は、直ちに消毒すること。
- ⑨ 安全キャビネット等の中で取り出す場合並びに⑦及び⑧に定められた場合を除き、組換え体を含む培養液は、滅菌操作を施さないで培養装置等から取り出さないこと。この滅菌操作の有効性は、あらかじめ、実験に用いる宿主に対して確認すること。
- ⑩ 汚染した物質等の汚染を大量培養実験区域以外の他の場所で除去しようとするときは、堅固で洩れない容器に入れて、大量培養実験区域から搬出すること。
- ⑪ 大量培養実験区域の昆虫、げっ歯類等の防除をすること。
- ⑫ 実験が進行中の場合は、LS-1レベル大量培養実験中の表示を大量培養実験区域に掲げること。
- ⑬ 実験用の被服等の使用は、実験責任者の指示に従うこと。
- ⑭ 実験の進行中は、毎日1回以上培養容器の密閉度等の状況を確認すること。
- ⑮ 安全キャビネット等及びその他の装置の除菌用フィルター等は、その交換直前及び定期検査時に滅菌すること。
- ⑯ 封じ込めのレベルがP1でよいとされる他の実験を同時に行う場合には、明確に区域を設定して注意深く行うこと。
- ⑰ その他実験責任者の定める事項を遵守すること。

3. LS-2レベル

(1) 封じ込めの設備・設計

- ① 組換え体の外部への漏出が防止できるように設計され、かつ閉じた状態のまま内部の滅菌操作を行い得る培養装置を設置すること。特に、培養装置に直接接続する回転シール、配管弁その他の部品は、組換え体の漏出の防止に対して十分に配慮した設計とすること。また、当該培養装置は、設置直後及び実験の都度、密閉度の検査を行うこと。
- ② 組換え体の処理を行うため、ブレンダー、凍結乾燥器、超音波細胞破碎装置、遠心分離機等のエアロゾルが発生しやすい機器を使用するときには、それらを収容するクラスⅡの安全キャビネット又はそれに相当する封じ込め機能を有する装置(以下「クラスⅡの安全キャビネット等」という。)を設置すること。ただし、エアロゾルが外部に洩れない設計が施されている機器を使用するときには、この限りではない。
- ③ 組換え体の培養装置の排気ガスは、除菌用フィルター(除菌効率がHEPAフィルターと同等以上のフィルターに限る。)又はそれに相当する効果を有する除菌用機器(「除菌用フィルター等」という。④及び(2)⑯において同じ。)を通じてのみ排出される設計とすること。また、除菌用フィルター等は、設置直後及び定期的に年1回、性能の検査を行うこと。
- ④ クラスⅡの安全キャビネット等の設置に際しては、定期検査、除菌用フィルター等の交換、ホルムアルデヒドによる燻蒸等がクラスⅡの安全キャビネット等を移動しないで実施できるよう配慮すること。また、クラスⅡの安全キャビネット等は、設置直後次のアからウまでの検査を行うとともに、定期的に年1回以上ア及びイの検査を行うこと。

ア 風速・風量試験

イ 除菌用フィルター等の性能

ウ 密閉度試験

- ⑤ 培養装置，それに直接接続する機器及び安全キャビネット等の封じ込め設備には，実験中の密閉度を監視するための装置を整えること。
- ⑥ すべての設備及び機器には，一連の識別番号を付し，厳重な管理の下におくこと。この識別番号は，検査記録，操作記録を含むすべての記録に記載すること。
- ⑦ 実験室は，汚染物及び廃棄物の消毒のための高圧滅菌器を備えた建物内に置くこと。
- ⑧ 装置及び機器について，封じ込めの状態に関係する部分の改造又は交換を行った場合は，その都度，当該装置及び機器の密閉度，性能の検査を行うこと。

(2) 実験実施要項

- ① 実験中，実験室の窓は，閉じておくこと。また，実験室の扉の開閉は，最小限にすること。
- ② 培養装置その他の汚染された装置及び機器並びに実験に係る組換え体に由来するすべての廃棄物及び廃液は，実験終了後，廃棄前に滅菌すること。この滅菌操作の有効性は，あらかじめ，実験に用いる宿主に対して確認すること。
- ③ 機械的ピペットを使用すること。
- ④ 実験室内での飲食，喫煙及び食品の保存はしないこと。
- ⑤ 組換え体を取り扱った後，及び実験室を出るときは，手を洗うこと。
- ⑥ すべての操作においてエアロゾルの発生を最小限にするよう注意を払うこと。
- ⑦ 培養装置から組換え体を試料用に採取する場合には，培養装置の外壁等が汚染しないようにすること。汚染が発生した場合には，直ちに消毒すること。
- ⑧ 培養装置から他の装置又は機器に組換え体を移す場合は洩れないようにすること。汚染が発生した場合は，直ちに消毒すること。
- ⑨ クラスⅡの安全キャビネット等の中で取り出す場合並びに⑦及び⑧に定められた場合を除き，組換え体を含む培養液は，滅菌操作を施さないで培養装置等から取り出さないこと。この滅菌操作の有効性は，あらかじめ，実験に用いる宿主に対して確認すること。
- ⑩ 汚染した物質等の汚染を実験室以外の他の場所で除去しようとするときは，堅固で洩れののない容器に入れ，実験室から搬出すること。
- ⑪ 実験室の昆虫，げっ歯類等の防除をすること。
- ⑫ 実験室内では実験着等を着用し，退出時にはこれを脱ぐこと。
- ⑬ 実施されている実験の性質を知らない者を実験室に入れないこと。
- ⑭ 実験が進行中の場合には，LS—2レベル大量培養実験中の表示を実験室の入口に掲げること。
- ⑮ 実験室は常に整理し，清潔に保ち，実験に関係のないものは置かないこと。
- ⑯ 実験が進行中は，培養装置及びそれに直接接続する機器，クラスⅡの安全キャビネット等の封じ込め設備の状況を常時，監視装置により確認すること。
- ⑰ クラスⅡの安全キャビネット等及びその他の装置の除菌用フィルター等については，その交換直前及び定期検査時並びに実験内容の変更時に，装置を密封し，10g/m³のホルムアルデヒドで燻蒸した後約1時間放置するなどの処理により汚染を除去すること。
- ⑱ 封じ込めのレベルがP1，P2でよいとされる実験又はLS—C，LS—1でよいとされる他の実験を同時に行う場合には，明確に区域を設定して注意深く行うこと。

- ⑰ その他実験責任者の定める事項を遵守すること。

附 則

この規程は平成3年4月1日から施行する。

別表1

安全キャビネット及びHEPAフィルターの規格

クラス I

用途	低度及び中程度の危険性を持つ微生物・病原体等の取扱いで、作業空間に清浄空気を必要としない場合に使用する。
構造規格	前面開口部と排気口を有し、前面開口部からの流入気流が汚染エアロゾルの流出を防ぎ、排気はHEPAフィルターで処理後キャビネット外に放出すること。平均流入風速(排気量/前面開口部面積)が0.40m/s以上あること。

クラス II

用途	低度及び中程度の危険性を持つ微生物・病原体等の取扱いで、作業空間に清浄空気を必要とする無菌作業に使用する。 通常の生物学を目的とした作業用(タイプA)と、少量の有害危険化学物質・放射性物質・ガス状物質など、HEPAフィルターに効率よく補集されない物質を取扱うためのもの(タイプB)がある。
構造	前面開口部と排気口を有し、前面開口部からの流入気流が汚染エアロゾルの流出を防ぎ、作業空間にHEPAフィルター濾過された層流の清浄空気を供給すること。排気はHEPAフィルターで処理後キャビネット外に放出すること。 タイプAは、陽圧汚染プレナムが外壁に接する型は推奨しない。タイプBは必ずダクトを接続し、室外に排気すること。
規格	密閉度 空気によりキャビネット内を50mm水柱に加圧したとき、30分後の内圧低下が10%以内であるか、石鹼水あるいは発泡漏れ検出剤をキャビネットのすべての溶部及び貫通部等に塗布または噴霧しても洩れによる発泡を認めないこと。(陽圧プレナムが外壁に接する型では、ハロゲンガスの漏れ量が $5 \times 10^{-7} \text{cc/sec}$ 以下であること。) 作業者の安全性試験 5~10×10 ³ cfu(colony forming unit)の枯草菌芽胞を噴霧して検査したとき、4台のインピンジャーに補集されるコロニー数は合計10個以下であること。試験開始後5~15分に補集するスリットサンプラーのコロニー数は、試験ごとに5個以下であること。連続3回の試験すべてに合格すること。 試料保護試験 5~10×10 ⁶ cfuの枯草菌芽胞を噴霧して検査したとき、寒天平板(10cm径シャーレーを可能な限り敷きつめる。以下同じ)に補集されるコロニー数は、試験ごとに合計5個以下であること。連続3回の試験すべてに合格すること。 試料間の相互汚染防止試験

	<p>5～10×10⁴cfuの枯草菌芽胞を噴霧し検査した時、平板の中心が側面から355mm以上離れた位置の寒天平板に補集されるコロニー数は合計2個以下であること。左右から3回ずつの試験すべてに連続合格すること。</p> <p>吹出し速度 15cm以内の格子で測定した各測定点の吹出し風速は平均値の±20%以内であること。吹出し風速に勾配ができるように設計されたキャビネットでは、製作者の指定する各領域内で計算すること。</p> <p>流入風速 前面開口部からの平均流入風速は0.40m/s以上(タイプBでは0.50m/s以上)あること。</p> <p>送風機 送風機は、フィルターの圧力損失が20%上昇した時、回転制御せずに処理風速量の減少が25%以内であること。</p> <p>気流方向 発煙管等で煙の流れる状態を目視により判定する。前面パネル下端より100±10mm上の高さ、作業空間の下向き層流の前後吸込み口への気流振分け位置、及び前面パネル下端から150±20mm上の高さ、前面パネルの20～30mm内側の位置で、作業空間左右側面間を走査したとき、煙は滑らかに下に流れること。煙の流れない部位や、上向きに流れる部位がないこと、また、煙がキャビネットから漏出しないこと。前面開口部外側30～40mmの位置で、前面開口部前周を走査した時、一旦キャビネット内に入った煙は、キャビネットから漏出しないこと。また、作業空間に漏入しないこと。</p> <p>温度上昇 室温とキャビネット内部の温度差は4時間連続運転後8℃以内のこと。</p> <p>騒音レベル 騒音レベルは67dBA以下であること。</p> <p>照度 平均照度は800～1200luxであること。</p> <p>振動 直交3方向の作業台振動変位は5μmRMS以下であること。</p> <p>液体受皿 液体受皿は容易に清掃が行える構造で、4l以上の容量を持つこと。</p>
清掃と滅菌に対する考慮	<p>液体とその飛沫等により汚染する可能性のある表面は、工具を用いずに清掃できること。作業台及び作業空間の隅部を局面処理すること。</p> <p>本体を移動せずにホルムアルデヒドガス滅菌ができる構造であること。前面開口部・排気口等は、金属板・プラスチックシート・粘着テープ等で密閉できる構造であること。容易に清掃できるため、床と安全キャビネットの最下面との間隔は80mm以上の空間を設けるか、あるいは床又は台に密着シールを施すこと。</p>
検査	<p>HEPAフィルターの目詰り等使用開始後も性能に直接影響する変化を起こすことがある。設置後及び年1回現場検査を行うことが望ましい。</p>

用途	高度の危険性を持つ微生物・病原体等の取扱いに使用する。
構造規格	密閉型のキャビネットで、吸気口からの流入気流と排気口からの排気は、それぞれHEPAフィルターで処理すること。排気はHEPAフィルターで2段濾過するか、または、焼却滅菌装置を通過させてから外界に排出すること。作業空間は作業室に対して負圧(15mm水柱以上)にすること。作業用の手袋、試料・器具の出し入れ用の高圧滅菌器または消毒液槽を装備すること。
性能等	HEPAフィルターの1次側に試験エアロゾルを負荷して検査したとき、想定した各微小区画の透過率(2次側エアロゾル濃度の1次側濃度に対する比)が0.01%を超えないこと。相対濃度計、または28.31/分を吸引する粒子計数器を用い、等速吸引に近い条件で走査試験した時、0.3 μ m付近のエアロゾル透過率が0.01%を超えないことを、搭載された状態で確認する。アルミ製セパレーターを使用すること。HEPAフィルターの圧力損失を表示する差圧計を設置することが望ましい。