

遺伝子組換えカイコ飼育施設の開発

(第 1 報) 施設の全体計画および清浄度の測定結果

麻 田 鷹 司 (新菱冷熱工業)
山 下 一 彦 (新菱冷熱工業)
菊 池 充 (新菱冷熱工業)
横 田 昇 平 (新菱冷熱工業)
湯 懷 鵬 (新菱冷熱工業)

西 谷 善 紀 (新菱冷熱工業)
樋 口 修 二 (新菱冷熱工業)
田 中 幸 悦 (新菱冷熱工業)
麻 生 由 布 (新菱冷熱工業)

近年、医薬品原料の生産系としてカイコの繭(マユ)の中に原料成分を含有する遺伝子組換えカイコが注目されている。そこで、遺伝子組換えカイコの飼育に必要な環境条件や設備を検討した結果を反映した飼育施設を建設してその性能を検証した。

今回建設した飼育施設にはカイコの飼育から繭の後処理までに必要な設備や省令に基づき遺伝子組換え体の飼育に必要な拡散防止措置を組み込んだ。さらに、既往研究をもとに定めたカイコの飼育に適した温湿度、清浄度の管理値を満たすための空調設備を設置している。本施設について、運用前に温湿度と清浄度を、飼育中には清浄度のみ測定した。その結果、ほぼすべての測定点において温湿度と清浄度ともに管理値や許容基準を満足していた。特に、カイコの大量飼育装置内は外気の温湿度の影響を受けることなく目標値付近で安定しており、浮遊微粒子や環境微生物も少なく、好適な環境で飼育できることが示された。ただし、運用中において環境微生物の許容基準を満足しない箇所があったため、クリーンアップ頻度を見直すとともに、衛生管理方法の確立が必要であることが分かった。

1. はじめに

近年、繭の中に医薬品原料となる多量の目的タンパク質を生産する遺伝子組換えカイコが新たな生産系として注目されている。筆者らは、遺伝子組換えカイコの飼育に必要な環境条件や設備を検討し、飼育施設を建設してその性能を検証した。本報では、飼育施設の全体計画、温湿度および清浄度の測定結果について報告する。

2. 施設の概要

弊社イノベーションハブに建設した施設は、(1)クリーンスーツに着替えるための前室、(2)カイコ大量飼育装置(以降、飼育装置)を設置した飼育室、(3)繭を作らせるための上簇室、(4)遺伝子組換えカイコの不活化や繭・蛹の後処理をするための収繭・繭切室で構成される。施設の外觀と飼育装置を図1に、各室レイアウトを図2に示す。

本施設は「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)に定め

られているPIAレベルの拡散防止措置を講じている。省令の主な要求事項¹⁾と本施設での対応を表1に示す。



図1 建設した施設の外觀(写真左)と飼育装置(写真右)

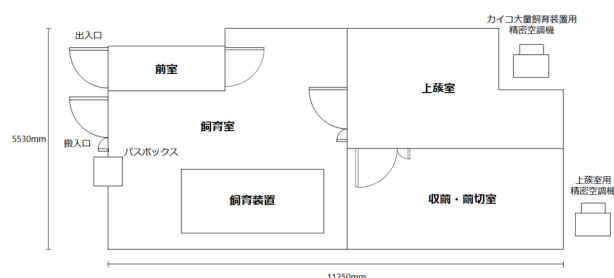


図2 各室レイアウト

表 1 省令における主要要求事項と本施設での対応

要求事項	本施設での対応
①組換え動物等の習性に応じた逃亡防止設備を設置する	(i)排気口などの開口部に防虫網もしくは不織布のフィルターを設置 (ii)前室手洗いの排水口に個体・卵をトラップできるネットを設置
②廃棄前に遺伝子組換え生物等を不活化する	(iii)施設内のディープフリーザーで不活化後に廃棄
③実験室等の窓等については、昆虫等の侵入を防ぐため、閉じておく等の必要な措置を講ずる	(i)排気口などの開口部に防虫網もしくは不織布のフィルターを設置

3. 各室の環境条件と設備

各室の環境条件と空調設備を表 2 に示す。飼育室内の飼育装置は、最大 33,600 頭のカイコを同時に飼育できる。飼育装置内部には、複数の棚が積層され、それぞれの棚に専用の飼育ケージを入れて飼育する。カイコの成育適温は 20～28℃であると言われており²⁾、飼育装置内は専用精密空調機によって空調される。カイコの品種や成育の段階(齢)に応じて温度を調節することもできるが、デフォルト設定として温度の管理値を 25±1℃としている。また、本施設におけるカイコの飼育には桑を加工した人工飼料を用いている。人工飼料の乾燥速度は環境条件によって変わるため、温湿度管理も重要であり、装置内の湿度管理値は 50±5%としている。なお、成育状態に応じて必要な人工飼料の保湿および乾燥は保湿用フィルムの着脱で対応する。また、蚕病発生防除のために各室内はクリーンルーム用パッケージ空調機や HEPA フィルター付き精密空調機で清浄度を維持している。

室圧は各系統に設けられた CAV および差圧ダンパによって制御している。飼育工程において清浄度を高く維持するため、飼育室の室圧をもっとも高く設定している。

表 2 各室の環境条件と空調設備

部屋名	温湿度環境	室圧 (大気圧比)	空調系統
前室	温湿度成り行き	+15Pa	-
飼育室	25±3℃、湿度成り行き	+30Pa	PAC
飼育装置	25±1℃、50±5%RH	-	精密空調機
上簇室	18～30±1℃、30～60±5%RH	+20Pa	精密空調機
収繭・繭切室	25±3℃、湿度成り行き	+10Pa	PAC

4. 空調システムフロー

本施設の空調システムフローを図 3 に示す。前室を除く各室の空調空気は、空気質対策のために一部を排気し、残りを還気とする。各室の導入外気と排気は CAV で制御し、飼育室および収繭・繭切室のパッケージ空調機、上簇室の精密空調機にそれぞれ外気を導入している。

5. 温湿度環境

施設運用前に温湿度の連続測定を行った。測定点は飼育装置内において空調吹出し口(SA)、飼育棚上、作業台上、および外気取入れ口(OA)とした。温湿度の測定には無線温湿度照度ロガー(チトセ工業㈱、CWS-32C 型)を用い、測定間隔は 5 分間とした。飼育室内における温度の管理値は 25±3℃とし、23.5℃の暖房モードで設定したパッケージ空調機で運転した。また、飼育装置内の温湿度の管理値は 25±1℃・50±5%RH とし、精密空調機の温湿度設定値を 24.6℃・50%RH とした。

温湿度の測定結果を図 4 に示す。外気として導入していた実験棟内の温度は約 16℃～24℃で推移していた。飼育装置の作業台上はパッケージ空調機の発停に伴い、26℃～27℃で推移していた。SA と飼育装置内の棚上の温度は約 25℃で安定し、外気温度の影響を受けることなく、管理値を満足していた。また、飼育装置内の棚上湿度は温度同様、外気湿度の影響を受けることなく、目標の 50%付近で安定しており、管理値を満足していた。

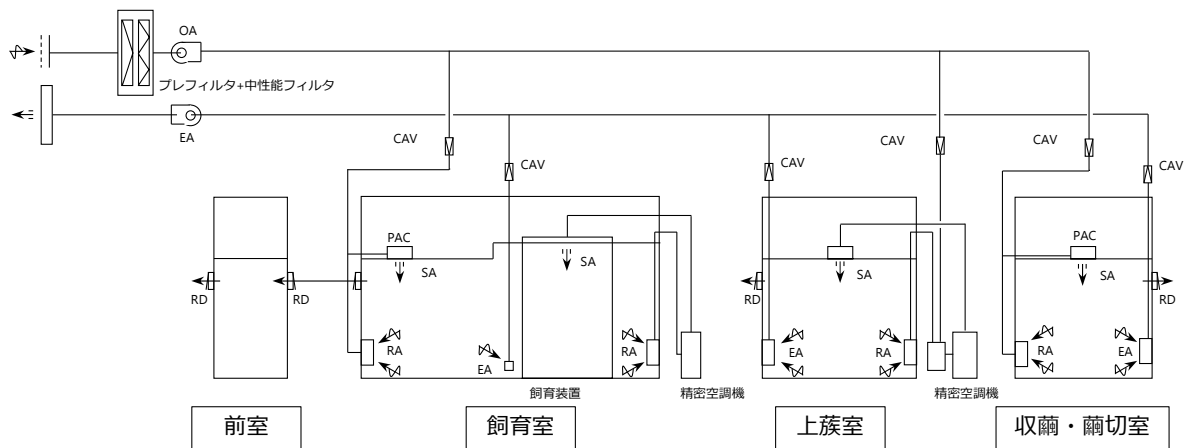


図 3 空調システムフロー

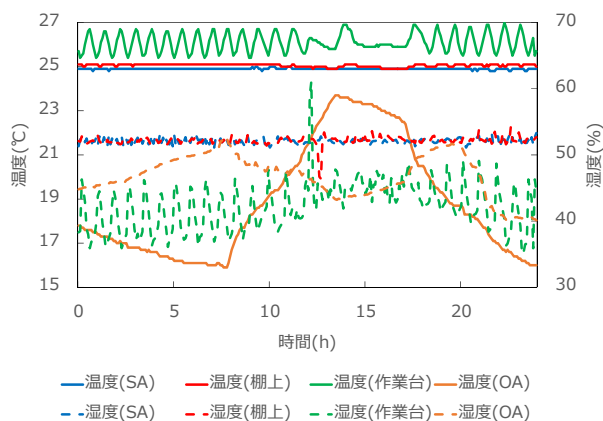


図4 温湿度の測定結果

6. 施設運用前の清浄度のモニタリング

施設運用前に施設内の浮遊微粒子および環境微生物のモニタリングを行った。前室を除く各室を管理区域とし、清浄度区分は生産物である菌を無菌医薬品用途にも適用できるように、無菌医薬品製造におけるグレードBとした³⁾。各室をクリーンアップした後に浮遊微粒子を測定し、その後、飼育室内と飼育装置内を除染して環境微生物をモニタリングした。各室のクリーンアップ方法は、飼育室内と飼育装置内は純水拭き、それ以外は純水拭きした後にエタノール拭きとした。

除染は、ホルムアルデヒド濃度を 1200 ppm で 6 時間以上維持し、ケミカルインジケータ(CI)による発色とバイオロジカルインジケータ(BI)で陰性であることを確認して適正に完了したと判断した。

6-1. 浮遊微粒子の測定箇所および測定方法

各室における浮遊微粒子の測定点数は ISO14644-1 : 2015 に準拠し、飼育室で 6 点、飼育装置内で 4 点、上蔭室で 6 点、収菌・菌切室で 6 点とした。測定点の高さは、飼育装置内は床上 60 cm、飼育装置以外は床上 1 m とした。測定箇所の平面図を図 5 に示す。測定にはパーティクルカウンタ (Particle Measuring Systems 社、Lasair III 110 型) を用いた。1 回の測定につき 28.3 L/min の吸引量で 1 分間吸引し、各測定点で 5 回測定してそれぞれ平均値を求め、1 m³ あたりの個数に換算した。なお、粒径測定範囲は 0.5 μm 以上および 5.0 μm 以上の 2 段階とした。

6-2. 環境微生物のモニタリング箇所および方法

モニタリングの対象微生物は浮遊菌、落下菌、付着菌とし、対象菌種は一般細菌および真菌とした。浮遊菌、落下菌、付着菌のモニタリング箇所を図 5 および図 6 に示す。浮遊菌の捕集には 1 段多孔型エアサンプラ(ミドリ安全株、BIO SAMP MBS-1000 型)を用い、100 L/min の吸引量で 10 分間吸引した。落下菌は直径 90 mm のペトリ皿を 4 時間静置してサンプリングした。浮遊菌および落

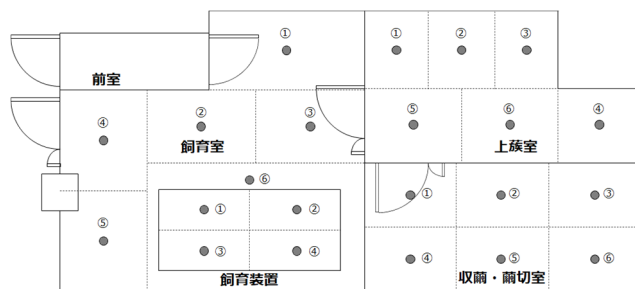


図5 浮遊微粒子、浮遊菌、落下菌のモニタリング箇所

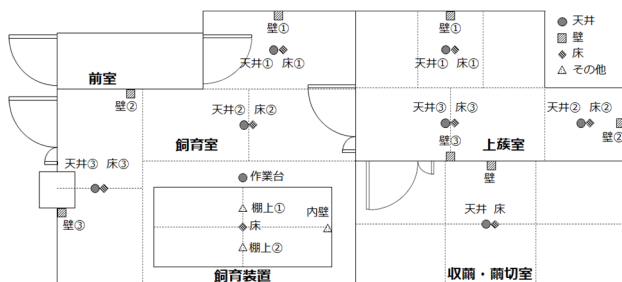


図6 付着菌のモニタリング箇所

下菌のモニタリングの高さは、飼育装置内は床上 60 cm、飼育装置以外は床上 1 m とした。付着菌のサンプリングには 25 cm² のコンタクトプレートを用いた。一般細菌用の培地は SCD 寒天培地、真菌用の培地は CP 添加ポテトデキストロース培地を用い、培養条件は一般細菌が 32 °C で 2 日間、真菌が 25 °C で 7 日間とした⁴⁾。

6-3. 浮遊微粒子の測定結果

各室における浮遊微粒子濃度の合否判断基準は、無菌医薬品製造におけるグレード B の非作業時の許容基準、つまり 0.5 μm 以上の粒子が 1 m³ 中に 3520 個以下、5 μm 以上の粒子が 1 m³ 中に 29 個以下とした。各室の浮遊微粒子の測定結果を表 3 に示す。

すべての測定点において清浄度は許容基準値以下であり、高い清浄度が実現されていることがわかった。特に、飼育装置内は清浄度が高く、浮遊微粒子の顕著な発生がなかったといえる。高い清浄度により、カイコを好適な環境で飼育できると考えられる。

6-4. 環境微生物のモニタリング結果

各室における環境微生物の合否判断基準は同じく無菌医薬品製造におけるグレード B として、浮遊菌は 1 m³ 中に 10 CFU 以下、落下菌は 5 CFU/plate 以下、付着菌は 5 CFU/25 cm² 以下とした。各室の環境微生物のモニタリング結果を表 4、5 に示す。

各室の環境微生物数は許容基準値以下であり、浮遊微粒子と同様、高い衛生環境が実現されていることがわかった。ただし、飼育室のパスボックス付近で浮遊菌が、床では付着菌が他のモニタリング箇所と比較して多く検出された。この原因は、パスボックスから資材を搬入し

表3 運用前の各室における浮遊微粒子の測定結果

室名称	飼育室						飼育装置内				上簇室						収菌・菌切室						許容基準
測定点	①	②	③	④	⑤	⑥	①	②	③	④	①	②	③	④	⑤	⑥	①	②	③	④	⑤	⑥	
0.5μm以上(個/m ³)	587	643	855	565	763	1922	35	14	42	14	636	826	1773	502	1392	777	650	580	615	1449	1760	919	3520
5μm以上(個/m ³)	14	14	14	7	21	28	0	0	0	0	28	7	14	0	7	0	0	0	0	14	21	7	29

表4 運用前の各室における浮遊菌および落下菌のモニタリング結果

室名称	飼育室						飼育装置内				上簇室						収菌・菌切室						許容基準
測定点	①	②	③	④	⑤	⑥	①	②	③	④	①	②	③	④	⑤	⑥	①	②	③	④	⑤	⑥	
浮遊菌	一般細菌(CFU/m ³)						1				0						1						10
	真菌(CFU/m ³)						0				0						0						10
落下菌	一般細菌(CFU/plate)						0				1						1						5
	真菌(CFU/plate)						0				0						0						5

表5 運用前の各室における付着菌のモニタリング結果

室名称	飼育室										飼育装置内				許容基準		
測定点	天井①	壁①	床①	天井②	壁②	床②	天井③	壁③	床③	作業台	棚上①	棚上②	床	内壁			
一般細菌(CFU/25cm ²)	0	0	1	0	0	0	0	0	4	0	0	0	0	0		0	5
真菌(CFU/25cm ²)	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0		0	5
室名称	上簇室										収菌・菌切室			許容基準			
測定点	天井①	壁①	床①	天井②	壁②	床②	天井③	壁③	床③	天井①	壁①	床①					
一般細菌(CFU/25cm ²)	0	0	0	0	0	2	0	0	0	0	0	0	0		5		
真菌(CFU/25cm ²)	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0		5		

た時の影響であると考えられる。今後の改善対策として搬入時に資材を消毒するとともに、パスボックス内も事前に消毒することにした。

7. 飼育中の清浄度のモニタリング

飼育中に飼育室および飼育装置内の清浄度をモニタリングした。飼育中のクリーンアップは、飼育室内は飼育開始後に床を毎日掃除機かけした後に純水拭きし、飼育装置は飼育管理後に作業台上を毎日エタノール拭きした。

7-1. 浮遊微粒子の測定箇所および測定方法

測定箇所は、飼育装置内は飼育ケージ近傍で2点、飼育ケージを設置していない棚上で2点とし、飼育室内は運用前と同じ6点とした。飼育室内は飼育管理(給餌・糞の除去作業)中に、飼育装置内は飼育管理直後に測定した。その他の測定条件および測定機器は運用前の測定と同様とした。

7-2. 環境微生物のモニタリング箇所および方法

モニタリング箇所およびモニタリング点数を表6に、モニタリングの様子を図7に示す。モニタリングのタイミングは飼育管理直後とし、その他の測定条件および測定機器は運用前の測定と同様とした。

7-3. 浮遊微粒子の測定結果

各測定点における浮遊微粒子濃度の合否判断基準は、無菌医薬品製造におけるグレードBの作業時の許容基準、つまり0.5μm以上の粒子が1m³中に352000個以下、5μm以上の粒子が1m³中に2900個以下とした。各測定点の浮遊微粒子の測定結果を表7に示す。

飼育室内では飼育管理作業の影響により、浮遊微粒子数は多かったものの、いずれも許容基準値以下であった。

表6 飼育中の環境微生物のモニタリング箇所と点数

室名称	モニタリング箇所	モニタリング点数
飼育室	運用前のモニタリングと同様	浮遊菌・落下菌:6 付着菌:10
飼育装置内	浮遊菌 (1)飼育ケージ近傍	2
	(2)飼育ケージを設置していない棚上	2
	落下菌 (1)飼育ケージ内	2
	(2)飼育ケージを設置していない棚上	2
	付着菌 (1)飼育ケージ近傍の棚上	1
	(2)飼育ケージ近傍の棚裏	1
	(3)飼育ケージを設置していない棚上	1
	(4)飼育ケージを設置していない棚裏	1
	(5)床	1
	(6)吹出し口付近の内壁	1



図7 飼育装置内の微生物のモニタリングの様子(左から浮遊菌、落下菌、付着菌)

表7 飼育中の浮遊微粒子の測定結果

室名称	飼育室						飼育装置内				許容基準
測定点	①	②	③	④	⑤	⑥	ケージあり①	ケージなし②	ケージなし③	ケージなし④	
0.5μm以上(個/m ³)	31187	4416	134495	28360	24431	38615	27	3	37	12	352000
5μm以上(個/m ³)	1131	106	1950	1329	770	975	0	0	0	0	2900

一方、飼育装置内は清浄度が高く、浮遊微粒子の顕著な発生がなかったといえる。高い清浄度により、カイコは好適な環境で飼育できると考えられる。

7-4. 環境微生物のモニタリング結果

各モニタリング箇所における環境微生物の合否判断基準は同じく無菌医薬品製造におけるグレードBとして、浮遊菌は1m³中に10CFU以下、落下菌は5CFU/plate以下、付着菌は5CFU/25cm²以下とした。各箇所の環境微生物のモニタリング結果を表8、9に示す。

各モニタリング箇所の環境微生物数は、飼育ケージを設置した棚上と床上以外、許容基準値以下であった。今

後の改善対策として床上と棚上のクリーンアップ頻度を見直すことにした。

表 8 飼育中の浮遊菌および落下菌のモニタリング結果

室名称		飼育室						飼育装置内				許容基準
		①	②	③	④	⑤	⑥	ケージあり ①	ケージなし ②	ケージなし ③	ケージなし ④	
浮遊菌	一般細菌(CFU/m ³)	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	10
	真菌(CFU/m ³)	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	10
落下菌	一般細菌(CFU/plate)	1	1	0	2	2	0	0	2	0	0	5
	真菌(CFU/plate)	0	0	0	0	0	0	0	5	0	0	5

表 9 飼育中の付着菌のモニタリング結果

室名称		飼育室										許容基準		
測定点		天井①	壁①	床①	天井②	壁②	床②	天井③	壁③	床③	作業台			
一般細菌(CFU/25cm ²)		0	0	2	0	0	4	0	0	4	0	5		
真菌(CFU/25cm ²)		0	0	0	0	0	1	0	0	1	0	5		
室名称		飼育装置内										許容基準		
測定点		ケージあり				ケージなし		床	内壁					
		棚上		棚裏		棚上				棚裏				
一般細菌(CFU/25cm ²)		13		0		3		0		12		0		5
真菌(CFU/25cm ²)		0		0		0		0		1		0		5

8. まとめ

本報では、遺伝子組換えカイコ飼育施設の全体計画と温湿度環境および清浄度の測定結果を報告した。温湿度・清浄度ともにほぼすべての測定点において管理値や許容基準を満足しており、医薬用途にも適用できると考えら

れる。ただし、運用中において環境微生物の許容基準を満足しない箇所があったため、クリーンアップ頻度を見直すとともに、衛生管理手法の確立に努める。

謝 辞

農研機構 瀬筒秀樹先生、飯塚哲也先生からカイコの飼育条件やカルタヘナ法対応についてアドバイスを頂いた。ここで謝意を表す。

参 考 文 献

- 1) 全国大学等遺伝子研究支援施設連絡協議会、「遺伝子組換え動物の拡散防止措置の例(2)カイコ」、
http://www.idenshikyo.jp/download/anzen_silkworm.pdf、(参照 2023.5.11)
- 2) 財団法人大日本蚕糸会 蚕業技術研究所、「養蚕」、2010.3
- 3) 厚生労働省：無菌医薬品製造区域の環境モニタリング法 (2019)
- 4) 日本建築学会：浮遊微生物サンプリング法規準・同解説 (2013)