

# 論文の内容の要旨

論文題目 Studies on control measures for viral contamination in a laboratory animal facility  
(動物実験施設におけるウイルス汚染の防除対策に関する研究)

氏 名 滝 本 一 広

実験動物の微生物汚染は動物の健康のみならず動物実験結果に影響を及ぼすことが知られており、実験動物の微生物学的品質は極めて重要である。したがって、動物実験においては、通常、特定の病原微生物を持っていない Specific pathogen-free (SPF) 動物の使用が推奨されている。しかし、動物実験施設（施設）に SPF 動物を搬入してもそれを維持する設備や技術がなければ、微生物汚染は容易に起こる。さらに、実験動物の遺伝子改変技術の進歩に伴い、多数の遺伝子改変マウスが作出され、またそのような遺伝子改変マウスの施設間での移動も増加し、1つの施設の汚染事故が容易に複数の施設の微生物汚染に拡大する可能性も増大し、これまで以上の配慮が必要となっている。

実験動物の微生物汚染を防止するための方策、すなわち、微生物学的コントロールにはいろいろな要素が含まれている。まず、施設に搬入する動物が SPF であるかどうか検査することが必要になる。また、施設で飼育している動物の微生物学的状態を定期的に調べる微生物モニタリングが実施されている。それらのためには、簡便で、安全で、かつ正確な微生物検査システムが必要である。また、医科学実験には細胞や病原体などの多様な生物材料が用いられるが、そのような生物材料に意図しない病原微生物が潜んでいる可能性がある。さらに、SPF 動物を飼育するためのバリア施設の日常の衛生管理、例えば清掃、消毒・滅菌作業なども微生物学的コントロールの重要な要素である。施設の微生物学的コントロールは各施設の構造や目的などにより異なり、決して1つの解しか無い類の問題ではない。むしろ、多種多様なケーススタディの知識や技術の積み重ねから最良の解が見出せるものである。本研究は国立感染症研究所（感染研）動物実験施設で申請者が現場の要請に応えるべく行ってきた、施設における病原微生物、特にウイルスによる汚染の防除対策に関する複数の研究から構成されている。各章の要約は以下の通りである。

第1章では、バキュロウイルス発現ベクターシステムを用いて作製された組換えリンパ球性脈絡髄膜炎ウイルス-核タンパク質 (LCMV-NP) 抗原を用いた Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) システムの有用性について検討した。施設の清浄度を維持するためには SPF 動物のみを導入し、飼育期間中も SPF 品質を維持することが重要である。微生物モニタリングは飼育動物が SPF であることを確認するための有効な手段であり、細菌の培養、寄生虫の検鏡、ELISA、補体結合 (CF) 試験あるいは免疫蛍光抗体法 (IFA) などの血清学的検査、Polymerase-chain reaction (PCR) による病原体遺伝子の検出などによって行われる。ELISA で用いられる抗原は、通常、細胞内で感染性ウイルスを増殖させて作製されることが多い。しかし、

感染性ウイルスの使用は実験室や施設での汚染につながる可能性があるため、抗原の作製には感染性ウイルスを使わないことが望ましく、近年大腸菌やバキュロウイルス発現ベクターシステムを用いた組換え抗原の開発が多くなった。また、バキュロウイルスは哺乳類に基本的に非病原性であり、組換えバキュロウイルスは通常の実験室で使用する事が可能である。

組換えバキュロウイルスで発現した LCMV-NP を高濃度の尿素で精製し、ELISA 法の抗原として用いた。陰性抗原にはポリヘドリン欠損バキュロウイルス感染昆虫細胞溶解液を用いた。LCMV Armstrong 株または分離株 (M1 株) を感染させた成熟マウスの血清を本 ELISA システムで検査したところ、ウイルス株に関係なく、全例で抗 LCMV 抗体が検出された。同様に、新生子期に M1 株を感染させたマウスの血清においても全例で抗 LCMV 抗体が検出され、いわゆる「免疫寛容」現象は認められなかった。これに対し、非感染マウスでは全例が抗 LCMV 抗体陰性であることが確認された。また、Armstrong 株を感染させたハムスター、マストミス、スナネズミでも全例で抗 LCMV 抗体が検出され、これらの非感染動物の血清はすべて陰性であった。これらの結果により、本 ELISA はマウスだけでなく、ハムスター、マストミス、スナネズミの血清に対しても応用可能であり、また自然宿主であるマウス、ハムスターに加えて、マストミス、スナネズミも LCMV に対し感受性があることが示唆され、マウス等と同様に定期的な検査が必要であると考えられた。さらに、これらの結果は IFA による抗体検出の結果と一致し、本 ELISA が IFA と同程度に高感度かつ特異的に抗 LCMV 抗体を検出できることが示された。LCMV は人獣共通感染症の 1 つであるが、本 ELISA システムの確立により、ヒトや実験動物に対する LCMV 汚染のリスクを伴わない、抗 LCMV 抗体検出系の作製に成功した。

Hemagglutinating virus of Japan (HVJ) はマウスの呼吸器疾患の原因ウイルスである。第 2 章では感染研で発生した HVJ 汚染事故の原因究明と HVJ の排除の経緯について詳述し、動物実験に用いられる生物材料の検疫の重要性を示した。汚染原因の究明は微生物汚染を拡大させないため、そして汚染を繰り返さないために非常に重要である。感染研においてもマウス肝炎ウイルス (MHV)、気管支敗血症菌 (*Bordetella bronchiseptica*)、HVJ 等の汚染事故を経験しているが、汚染原因の究明は必ずしも容易ではない。

感染研の施設内のマウス馴化インフルエンザウイルス株の感染実験が行われているラック内で、対照マウスが突然死亡した。同じラック内のマウスの微生物学的検査を行ったところ、抗 HVJ 抗体が検出された。動物室の消毒・滅菌作業を行いしばらくして、再度同様の感染実験を行ったところ、再度 HVJ 汚染が発生した。実験に使用していたラック内の全マウスの抗 HVJ 抗体を検査したところ、ELISA で 42 匹中 35 匹が抗 HVJ 抗体陽性であった。これらの経緯から感染実験に用いたインフルエンザウイルスが HVJ の汚染源ではないかと疑い、感染実験に使用した 3 種のインフルエンザウイルス株を用いて検証実験を行った。その結果、3 株の 1 つであるインフルエンザ A/Yamagata 株に HVJ が混入していたことが判明した。このインフルエンザウイルス株は、マウスの肺で馴化・継代されていたことから、馴化・継代に使用したマウスが HVJ に汚染していたためにインフルエンザウイルス接種液に HVJ が混入したのではないかと考えられた。この経験から、馴化ウイルス等の生物材料の作製や継代には SPF 動物を使用することの重要性が示された。また、保存されている生物材料を使用する際には、事前に微生物学的検査を実施し、汚染のないことを確認すべきであることが示唆された。今回 HVJ 混入が確認されたインフルエンザウイルス株は、抗 HVJ マウス血清で 4 回処理

をして HVJ の排除を行い、再度感染実験を行って抗 HVJ 抗体が陰性であることを確認後、当該区域で使用可能となった。これらの汚染事故以降、感染研の施設では HVJ 汚染事故は発生していない。

施設において、実験動物の環境維持のために「清掃・消毒」は必要不可欠な作業である。近年では、様々な消毒剤を購入・使用することができるが、消毒効果だけでなく安全性や利便性なども考慮して、施設の環境に合った消毒剤を選ぶことが重要である。最近、その高い消毒力と安全性、そして安価であることから、弱酸性次亜塩素酸水（WAHS）が施設や病院等で使用され始めている。第 3 章では、マウスノロウイルス（MNV）に対する WAHS の消毒効果を次亜塩素酸ナトリウム溶液、70%エタノールと比較した。また、WAHS は希釈せずに飲用することができるので、飲水としてマウスに与えることによってマウスからの MNV 排除およびマウスの MNV 感染防御を試みた。

MNV に対する WAHS の *in vitro* での不活化効果をブラックアッセイによって調べ、その効果を次亜塩素酸ナトリウム（商品名：Purelox）希釈液および 70%エタノールと比較した。30 秒の反応で、WAHS は 70%エタノールおよび Purelox 希釈液と同様に非常に有効だった。消毒薬による MNV 不活化における有機物混入の影響を調べるために、マウスの糞便乳剤存在下で MNV の不活化を行った。30 秒の反応で、70%エタノールではウイルス力価が 5 Log<sub>10</sub> 以上減少したが、WAHS と 600 倍希釈 Purelox では、2.3 Log<sub>10</sub> および 2.6 Log<sub>10</sub> の減少であった。しかし、糞便乳剤存在下でも 5 分間 WAHS と反応することによりウイルス力価は 5 Log<sub>10</sub> 以上減少した。WAHS は *in vitro* で MNV 不活化に有効であったので、WAHS の連続飲用による MNV 感染マウスからの MNV 排除を試みた。MNV 感染 1 週後にマウスの飲水を WAHS に変更後、4 週間 WAHS を与え続け、マウスの糞便、大腸、小腸の MNV を RT-nested PCR 及びブラックアッセイにより検出した。WAHS を飲用したマウスの十二指腸では MNV は検出されず、MNV を排除した可能性が示唆された。しかしながら、盲腸からは MNV が検出され、また糞便にも MNV が排泄され続けていることが RT-nested PCR 及びブラックアッセイにより確認された。塩素系消毒薬が MNV の感染を防ぐことができるか調べるために、マウスに WAHS または 6,000 倍希釈 Purelox を飲用させながら、MNV 感染マウスと同居させた。しかしながら、MNV は同居 1 週間後には全マウスの糞便から検出された。本研究では、簡便かつ安価な方法として、塩素系消毒薬を飲水としてマウスに与えることによってマウスからの MNV 排除およびマウスの MNV 感染防御を試みたが、効果は認められなかった。現段階で MNV 汚染を防ぐためには、検疫により MNV 汚染動物の侵入を防ぎ、適切な消毒薬を用いて施設の環境維持に努め、さらに微生物モニタリングにより定期的に検査を行い、感染動物をすみやかに摘発することが重要であると考えられる。

本研究により、動物実験において信頼できる研究結果を得るためには、微生物モニタリングの実施や適切な消毒剤の使用により施設を清浄な環境に維持すること、それに加えて施設で作製された生物材料の検疫を研究者が責任を持って行い、微生物汚染がないことを確認してから動物実験に使用することが重要であることが示された。