

疾患モデル教育研究センターにおける微生物学的統御に関する指針

施行 平成 21 年(2009) 4.1

改訂 平成 23 年(2011) 11.1

改訂 平成 24 年(2012) 4.1

はじめに

動物実験とは、実験処置によって動物が示す反応を観察しその反応を通して加えた実験処置がヒト等にどのような効果や影響をもたらすかを推測(外挿)することである。動物実験では動物の反応に再現性がみられることが重要であるが、その再現性を得るためには、実験動物の微生物学的統御が適切になされていなければならない。そこで、本「微生物学的統御に関する指針」は、疾患モデル教育研究センター(以下疾患モデルセンターという)内の疾患モデル動物(実験動物)における「微生物モニタリング項目」と「感染した際の対応策」を明文化することによって、疾患モデルセンターをできるだけ早く「再現性の高い動物実験」が行える微生物学的環境に戻すことを目的として設定する。

1. 疾患モデルセンターおよび本学における微生物モニタリング項目を下記のように取り決める。

1) 搬入

目的:疾患モデルセンターおよび本学に搬入する動物を「適切な微生物学的統御がなされている動物」に限定する。

(1) 三大繁殖業者(日本チャールス・リバー、日本クレア、日本SLC)からSPFレベルのマウス・ラットを購入する際はヘルスレポート(モニタリング結果)の提出を免除する。

三大繁殖業者は毎月繁殖場の微生物モニタリングの検査結果(人獣共通感染症をはじめとして、主要な微生物感染症の結果)を公表しているので、それを代用する。

(2) 三大繁殖業者以外の繁殖場からSPF(あるいはクリーン)レベルのマウス・ラットを搬入する場合には、事前に「1ヶ月以内のヘルスレポート(微生物モニタリング結果)」と「過去一年間のヘルスレポート(微生物モニタリング結果)」を提出して、センター長の許可を得る。ヘルスレポート(微生物モニタリング結果)は、ICLAS モニタリングセンターの血清セット I、培養セット I、鏡検セット I とする。

(3) 利用者が(1)、(2)以外の機関から疾患モデルセンターにマウス・ラットを搬入する際以下の手続きを踏むものとする。

(a) 利用者は、「過去一年間のヘルスレポート(微生物モニタリング結果)」と「実験動物授受のための動物健康及び飼育形態調査レポート(様式22)」を提出する。ヘルスレポート(微生物モニタリング結果)項目は、ICLAS モニタリングセンターの血清セット I、培養セット I、鏡検セット I とする。

(b) 利用者は、最終ヘルスレポート(微生物モニタリング結果)を提出する。

ヘルスレポート(微生物モニタリング結果)項目は、ICLAS モニタリングセンターの血清セット I、培養セット I、鏡検セット I とする。不足する場合は、必ず検査を依頼する。

(c) センター長が書類審査を行う。

(d)利用者はセンター長の許可が得られれば、動物を検疫室に搬入する。搬入日は、最終ヘルスレポート(微生物モニタリング結果)検査日から1ヶ月以内とする(感染事故防御の観点からは可能な限り早く(数日程度)搬入することが望ましい。)。必要に応じ、(b)の提出前に、センター長の意見を求める。

(e) 利用者は、検疫終了後、ヘルスレポート(微生物モニタリング結果:ICLAS モニタリングセンターの血清セットI、培養セットI、鏡検セットI)を提出する。センター長の許可が得られれば、飼育室に搬入できる。

なお、検疫の目的に鑑み、業者に委託し受精卵から生体にクリーンアップした直後やこれに準じる場合は検疫を免除することがある。但し、所定の手続きを経て、センター長の許可を得ること。

【検疫について】

目的: 書面審査だけでは感染症の侵入を防げない可能性があるため、検疫を行うことで、疾患モデルセンター内への微生物侵入を防御する。

検疫方法の概略: 検疫室に疾患モデルセンター搬入予定動物を搬入し、モニター動物(同居開始時8週齢以上とする。雌が推奨される。)と同居飼育するかあるいは、モニター動物を検疫している動物のケージ数と同匹数購入し、常に検疫している動物の床換後のケージで飼育する。1ヶ月以上飼育したモニター動物を ICLAS モニタリングセンターへ送り、血清セット I、培養セット I、鏡検セット I の検査を依頼する。費用は利用者負担とする。検査結果をもとに疾患モデルセンター内飼育室への搬入許可をセンター長から得た後、搬入する。(詳細な飼育方法等は、別に定めるルールに従う。)

(4)利用者が(1)、(2)以外の機関から疾患モデルセンター以外の承認された動物実験室あるいは実験動物飼育室にマウス・ラットを搬入する場合は、「過去一年間のヘルスレポート(モニタリング結果)」と「実験動物授受のための動物健康及び飼育形態調査レポート(FHU)(様式22)」を提出の上、3 か月以内のヘルスレポートを事前に提出し、センター長の許可を得る。微生物モニタリング項目は、ICLAS モニタリングセンターの血清セット I、培養セット I、鏡検セット I とする。

(5)マウス・ラット以外の小動物の微生物モニタリングは、上記(1)-(4)に準ずる。

(6)モルモット・ウサギなどの中動物等の微生物モニタリングは、上記(1)-(4)に準ずる。

(7)ブタは、SPF 家畜ブタあるいは SPF ミニブタ以上の微生物グレードの場合のみ搬入許可するものとし、搬入時微生物モニタリング結果を提出する。

2) 定期的微生物モニタリング

目的: 搬入された「適切な微生物学的統御がなされている動物」の飼育中の微生物の状態を確認する。

(1) SPF 飼育室

(A) 使用基準は、本学にしか種動物がいないマウスあるいはそれと同等と考えられるマウスとする。

(B) 微生物モニタリングは3ヶ月に一度とし、項目はマウス血清セット I : リンパ球性脈絡髄膜炎ウイルス (LCMV)、マウス肝炎ウイルス (MHV)、センダイウイルス (HVJ)、肺マイコプラズマ (Mp)、エクトロメリアウイルス、ティザー菌 (Tyzzer, Clostridium piliforme) とする。
また、蟯虫とパスツレラの微生物モニタリングを定期的実施する。

(2) クリーン飼育室

(A) 使用基準は、自家繁殖による継代・維持を行うマウス・ラット、あるいはそれと同等に注意を払わなければならないと考えられるマウス・ラットとする。(免疫不全動物、老齢動物等)

(B) 微生物モニタリングは6ヶ月に一度とし、マウスは血清4項目: マウス肝炎ウイルス (MHV)、センダイウイルス (HVJ)、肺マイコプラズマ (Mp)、ティザー菌 (Tyzzer, Clostridium piliforme)、ラットは血清5項目: 腎症候性出血熱ウイルス (Hantavirus) (年 1 回)、唾液腺腺炎ウイルス (SDAV)、センダイウイルス (HVJ)、肺マイコプラズマ (Mp)、ティザー菌 (Tyzzer, Clostridium piliforme) を検査項目とする。また、蟯虫とパスツレラの微生物モニタリングを定期的実施する。

(3) コンベンショナル飼育室

(A) 使用基準は、購入した小動物(基本的に自家繁殖による継代・維持は行わない。)、中動物等とする。

(B) 微生物モニタリングは6ヶ月に一度とし、マウスは血清4項目: マウス肝炎ウイルス (MHV)、センダイウイルス (HVJ)、肺マイコプラズマ (Mp)、ティザー菌 (Tyzzer, Clostridium piliforme)、ラットは血清5項目: 腎症候性出血熱ウイルス (Hantavirus) (年1回)、唾液腺腺炎ウイルス (SDAV)、センダイウイルス (HVJ)、肺マイコプラズマ (Mp)、ティザー菌 (Tyzzer, Clostridium piliforme) を検査項目とする。

(4) マウス・ラット以外の小動物の微生物モニタリングは、コンベンショナル飼育室のマウス・ラットの項目に順ずる。

(5) モルモット・ウサギなどの中動物等の微生物モニタリングは、コンベンショナル飼育室のマウス・ラットの項目に順ずる。

(6) 定期的微生物モニタリングは、結果が判明した時点で速やかに公表する。

3) 不定期的微生物モニタリング

(1) センター長が必要と認めた場合は、管理運営費を用いて不定期に微生物モニタリングを行うことができる。

(2) 動物の搬入あるいは搬出目的で行った微生物モニタリング結果(利用者負担)は、速やかにセンター長に報告する。

(3) 不定期的に得られる微生物モニタリング結果を知りたい教職員は、疾患モデルセンター

管理室内で閲覧できる。但し、結果を個人的に利用することはできない。

2. 微生物モニタリング方法を下記のように定める。

目的: 不幸にして感染してしまった場合は、初期段階に検出する。

1) モニター動物の数

- (1) モニター動物は原則として1ラックに1匹とする。
- (2) 実施代表者は、疾患モデルセンターが用意する1-2匹のマウスあるいはラットをモニター動物とする。(2匹までは疾患モデルセンター負担)
- (3) 3ラック以上飼育している実施代表者は、以下のいずれかの方法によって飼育しているすべての動物をモニターする。
 - (A) 実施代表者は、モニター動物配布日にすべてのラックにモニター動物を充てるように準備し(利用者負担)、モニタリング責任者(疾患モデルセンター教員)に、(a)か(b)を連絡する。
 - (a) コンベンショナル飼育室とクリーン飼育室の実施代表者は、疾患モデルセンターで準備する ELISA の準備の都合上、モニター動物配布日までに増やしたモニター動物数を伝える。
 - (b) SPF 飼育室では、実施代表者が直接 ICLAS モニタリングセンターへ増やしたモニター動物の検査の依頼を行い(利用者負担)、コピーを提出する。輸送費は疾患モデルセンター指定日時に血清を提出すれば、疾患モデルセンターが負担する。
 - (B) 疾患モデルセンターが提供する2匹のモニター動物でモニタリングを行う場合は、実施代表者は、2匹のモニター動物によってすべてのラック(3ラック以上)をモニターする方法をセンター長に書面にて申請し、助言を得る。

2) 微生物モニタリング対象動物

モニター動物配布日に疾患モデル動物(実験動物)を飼育している場合には、飼育動物数やその後の飼育期間に関わらず微生物モニタリング対象動物とする。

3) モニター動物飼育方法

実施代表者は、モニター動物の検査によって確実に微生物を検出できる方法でモニター動物を飼育する。

4) モニター動物飼育期間

モニター動物飼育期間は原則2ヶ月とする。

5) モニター動物の血清の提出方法

実施代表者は、指定日時にモニター動物から血清を採取し 0.1%アジ化ナトリウムで10倍希釈し提出する。但し、疾患モデルセンター教員に採血を依頼する場合は、モニター動物を指定日時に指定場所に提出する。(都合により指定日時に提出できない場合は、前日までに疾患モデルセンター管理室に連絡し提出方法を打ち合わせる。)

指定日時に動物や血清を未提出の場合は、利用者が ICLAS モニタリングセンターに検査依頼(費用は利用者負担とする。)して結果を疾患モデルセンターに報告する。報告締め切りは、モニター動物回収日から3週間以内とする。

6) モニター動物飼育期間中に実験が終了する場合

- (1)実験終了時にモニター動物をすでに4週間以上飼育していれば事前にセンター管理室に連絡した上でモニター動物の血清を採取し、疾患モデルセンターへ提出する。
(100 マイクロリットルの血清:希釈しない、凍結しない)
- (2)実験終了時にモニター動物を飼育して4週間経っていなければ、ラック内の塵等をケージ内に入れて4週間飼育後血清を採取し、疾患モデルセンターへ提出する。(100 マイクロリットルの血清:希釈しない、凍結しない) ただし、1.の1)の(1)および(2)の動物については、必ず実施しなければならないわけではない。

3. 微生物モニタリング結果の対処方法を下記のように定める。

目的:初期に検出された感染の影響を最小限に止めるための対策をとる。

1)コンベンショナル飼育室とクリーン飼育室

- (1)疾患モデルセンターは、モニター動物から得た血清を用いて ELISA 検査(モニライザ)を行う。ELISA 検査では、「感染」の他、「偽陽性反応」と「交差反応」においても陽性所見がみられることから、ELISA 陽性検体(血清)は ICLAS モニタリングセンターに送付し確定検査(IF法)を依頼する。
- (2)疾患モデルセンターは、当該動物実験責任者及び実施代表者に ELISA 検査結果を伝え、モニター動物以外の動物の検査を希望するか確認する。希望する場合は ELISA 陽性検体(血清)とともに ICLAS モニタリングセンターに送付する。掛かる費用は利用者負担とする。
 - *確定検査は約1週間で結果が判明する。
 - *本指針の目的は、「万が一疾患モデル動物(実験動物)がモニタリング項目の微生物に感染していることが判明した場合、適切に対処することで、他の利用者の動物への感染の影響を最小限に止める」ことであることを再度認識し、冷静な判断と協力をお願いする。
- (3)動物実験責任者及び実施代表者は、確定検査でも陽性が確認されたモニター動物がモニターしていたラックの動物を、確定検査結果が伝えられた後1週間以内に安楽死を行う。(種動物の保全に必要な場合は、3ヶ月をめどに隔離を認める。)
 - *購入可能な動物を用いた実験の場合は安楽死させる。
 - *入手が困難な系統維持動物の場合は、陰圧 HEPA フィルターラックで飼育し、3ヶ月をめどにクリーンナップする。(事前に受精卵保存することを推奨する。)
 - 掛かる費用は原則として利用者負担とする。
 - 安楽死させる場所や方法、使用中の飼育機材(ケージ等)の対処は、センター長の指示に従う。
- (4)動物実験責任者及び実施代表者は、各自のモニター動物の検査結果が陰性であっても、確定検査陽性であったモニター動物と同室のすべての動物を、確定検査結果が伝えられた後1週間以内に安楽死か隔離を行う。
 - *隔離は種動物の保全に必要な場合とし、3ヶ月をめどにクリーンナップする。
 - 隔離中の飼育方法は、センター長の指示に従う。
 - *動物をクリーンナップあるいは再購入する際の費用は原則として利用者負担とするが、必要に応じ疾患モデルセンターが相談に応じる。
 - *感染が判明した微生物の宿主とならないことが科学的に明らかな動物種は安楽死や隔

離の対象としないが、飼育室のクリーンナップのため移動する必要があるので、センター長の指示に従う。

感染経路には、動物が他の動物に直接接触して感染する場合や飼育者の手指を介して間接的に接触感染する場合の他に空気伝播(エアロゾール)もある。また、ELISA 検査で陰性判定された動物でも判定時は潜伏期間であった可能性は否定できない。そこで、陽性項目の微生物のクリーンナップはラック毎では不完全であると考えられ、少なくとも飼育室単位で行うことが合理的である。

- (5)疾患モデルセンターは、当該飼育室から動物が居なくなった時点で速やかに消毒作業を行う。費用はセンター管理費でまかなう。

2)SPF 飼育室

- (1)動物実験責任者及び実施代表者は、ICLAS モニタリングセンターの検査結果が陽性であった場合検査後1週間以内にすべての動物の安楽死を実施する。(止むを得ない場合は、3ヶ月をめどに隔離を認める。)

＊受精卵保存している系統の場合は安楽死を原則とする。

＊受精卵保存していない系統の場合は、陰圧 HEPA フィルターラックで飼育し3ヶ月をめどにクリーンナップする。(事前に受精卵保存することを推奨する。)

これらの費用は原則として利用者負担とする。

安楽死させる場所や方法、使用中の飼育機材(ケージ等)の対処は、センター長の指示に従う。

- (2)動物実験責任者及び実施代表者は、各自のモニター動物の検査結果が陰性であっても、ICLAS モニタリングセンターの検査結果が陽性であったモニター動物と同室のすべての動物を、結果が伝えられた後1週間以内に安楽死か隔離を行う。

＊隔離の場合は3ヶ月をめどに実験を終了し、疾患モデルセンターへの再搬入は行わない。

隔離中の飼育方法は、センター長の指示に従う。

＊動物をクリーンナップあるいは再購入する際の費用は原則として利用者負担とするが、必要に応じ疾患モデルセンターが相談に応じる。

- (3)疾患モデルセンターは、当該飼育室から動物が居なくなった時点で速やかに消毒作業を行う。費用はセンター管理費でまかなう。

4. 疾患モデルセンター飼育室間の動物の移動について

飼育室間の動物の移動は、原則禁止とする。但し、以下の条件が満たされていれば、その限りではない。

- SPF 飼育室間および SPF 飼育室からクリーン飼育室への動物の移動は、搬入時微生物モニタリング結果(ICLAS モニタリングセンターの血清セットI、培養セットI、鏡検セットI)を提示し、事前に実験動物管理者およびセンター長に許可を得る。
- SPF 飼育室からコンベンショナル飼育室あるいはクリーン飼育室からコンベンショナル飼育室への移動は、定期微生物モニタリング結果が陰性であれば可能とし、事前に実験動物管理者およびセンター長に許可を得る。

＊また、動物実験計画書には系統の名前をすべて記載する。承認期間中に系統数が増える

などの場合には必要に応じ、変更届を提出する。

5. 感染のリスクを抑える方法

疾患モデルセンターには、SPF 動物(「人獣共通感染症」と「主要な動物から動物にうつる病気」に感染していないことが保証された動物)を搬入しているので、その状態を保つために、下記の点に注意する。

(1)利用者は、動物実験の再現性に影響を与える微生物に関する知識を積極的に得る。

(2)利用者は、該当する「利用心得」を遵守する。

<http://www.fujita-hu.ac.jp/CAMHD/CAMHD/riyou/riyou.htm> を参照する。

(3)利用者は、疾患モデルセンターに入室する期間、モニタリング項目に該当する微生物の宿主となりうる動物をペットとして飼育しないよう心がける。

(ペットは我々ヒトと同様にコンベンショナル環境下で生活している。)

(4)利用者は、野生マウスやラットの感染症を媒介する可能性のある昆虫を見つけたら処分する。

6. 立ち入りの制限

(1)利用者の中で飼育状況に問題があると認められた場合には、センター長が当該実施代表者に改善を促す。もし、改善が認められない場合は、立ち入りを制限する場合がある。

(2)微生物モニタリングで陽性判定があった場合は、聞き取り調査を行い、今後の感染防御に役立てる。飼育状況等に問題があると認められた場合には立ち入りを制限する場合がある。

別紙 1 搬入時提出する Health Report の微生物モニタリング項目

マウス

培養 I セット

Citrobacter rodentium, Corynebacterium kutscheri, Mycoplasma pulmonis,
Pasteurella pneumotropica, Salmonella spp

血清反応 I セット

Clostridium piliforme, Ectromelia virus, Lymphocytic choriomeningitis virus (LCMV),
Mouse hepatitis virus, Mycoplasma pulmonis, Sendai virus

鏡検 I セット

消化管内原虫, 蟯虫, 外部寄生虫

ラット

培養 I セット

Bordetella bronchiseptica, Streptococcus pneumoniae, Corynebacterium kutscheri,
Mycoplasma pulmonis, Pasteurella pneumotropica, Salmonella spp

血清反応 I セット

Clostridium piliforme, Sialodacryoadenitis virus (SDAV), Hantavirus,
Mycoplasma pulmonis, Sendai virus

鏡検 I セット

消化管内原虫, 蟯虫, 外部寄生虫

詳細については、担当者までお問い合わせください。

疾患モデル教育研究センターにおける微生物学的統御に関する指針の概略

ICLASで検査（抗体、抗原）：SPF

疾患モデルセンターでELISA検査（抗体）：クリーン、コンベ

疾患モデルセンターで鏡検（蟻虫）、パスツレラ（PCR、培養）：SPF、クリーン

陽性

陰性＊

疾患モデルセンターでELISA検査陽性の場合、
ICLASでの確定検査（抗原）（第三者機関）

陽性

検査結果判明後直ちに
あるいは
確定検査後直ちに公表

陰性＊

血清項目陽性→1週間以内に安楽死
（あるいは隔離）

蟻虫陽性→駆虫薬の投与
パスツレラ陽性→抗菌薬の投与
（当該利用者がおこなう）

・血清項目の確定検査で陽性の動物がいた場合、感染症を封じ込めるため、1週間以内に同飼育室内のすべての動物は安楽死あるいは隔離する。但し、宿主とならないことが明らかな動物種はその限りではない。（例：宿主がマウスのためのMHVやラットのみのSDAV）これらの作業は、当該利用者がおこなう。

・駆虫薬あるいは抗菌薬を投与する必要がある場合は、その方法についてはセンターの指示に従う。これらの作業は、当該利用者がおこなう。かかる費用は利用者負担とする。

血清項目の場合、
クリーンアップにかかる費用は利用者負担とする。
飼育室の消毒はセンター負担とする。