

1-3. 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(2009).12. 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へ搬入する動物を「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(あるいはクリーン)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(人畜共通伝染病をはじめとして、主要な微生物感染症の結果)を公表しているため、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(モニタリング結果)」と「過去一年間のヘルスレポート(モニタリング結果)」を提出して、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。
- (3) 利用者が(1)、(2)以外から疾患モデルセンターにマウス・ラットを搬入する際には、まず、「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 14)」を提出する。その後、指定の方法(微生物指針別紙 1)あるいはそれに準じた方法で搬入する動物をモニターできる動物のヘルスレポート(モニタリング結果)(可能な限り結果判明後 2~3 日以内)を提出して、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。
- (4) 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)-(3)に準ずる。
- (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、上記(1)-(3)に準ずる。

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

- ① 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。
- ② 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(Lymphocytic Choriomeningitis Virus: LCMV)、マウス肝炎ウイルス(Mouse Hepatitis Virus: MHV)、センダイウイルス(Sendai Virus, Hemagglutinating Virus of Japan: HVJ)、肺マイコプラズマ(Mycoplasma pulmonis:

- Mp)、エクトロメリアウイルス、ティザー菌 (Tyzzer, Clostridium piliforme)とする。
- (2) クリーン飼育室
- ① 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 (SCID、ヌードマウス等)と考えられるマウス・ラットとする。
 - ② 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 (Mouse Hepatitis Virus: MHV)、センダイウイルス (Sendai Virus, Hemagglutinating Virus of Japan: HVJ)、肺マイコプラズマ (Mycoplasma pulmonis: 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)、唾液腺涙腺炎ウイルス (Sialodacryoadenitis Virus: SDAV)、センダイウイルス (Sendai Virus, Hemagglutinating Virus of Japan: HVJ)、肺マイコプラズマ (Mycoplasma pulmonis: Mp)、ティザー菌 (Tyzzer, Clostridium piliforme) を検査項目とする。
- (3) コンベンショナル飼育室
- ① 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・維持はしない)、中動物等とする。
 - ② 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 (Mouse Hepatitis Virus: MHV)、センダイウイルス (Sendai Virus, Hemagglutinating Virus of Japan: HVJ)、肺マイコプラズマ (Mycoplasma pulmonis: 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)、唾液腺涙腺炎ウイルス (Sialodacryoadenitis Virus: SDAV)、センダイウイルス (Sendai Virus, Hemagglutinating Virus of Japan: HVJ)、肺マイコプラズマ (Mycoplasma pulmonis: 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。

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) 2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。
 - ① 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(自己負担)、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) コンベエリアとクリーンエリアの実施代表者は、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 エリアでは、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、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、センターが負担する。
 - ② 実施代表者は、2匹のモニター動物によって、どのようにすべてのラック(2ラック以上)をモニターするのかその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や関わらず例外なく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(微生物指針別紙1参照)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(微生物指針別紙2参照)。但し、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。(指定日時に授業や診療等がある場合は、前日までに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、センターへ提出する。
(100 μ L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、センターへ提出する。
(100 μ Lの血清:希釈しない、凍結しない)

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) コンベアエリアとクリーンエリア

- (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。掛かる費用は自己負担とする。
 - * 確定検査の結果は数日でわかる。
 - * 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、冷静に対応してほしい。
- (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。(止むを得ない場合は、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 ヶ月をめぐり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自己負担とする。
 - * 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、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(各自のモニター動物の検査結果は陰性)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。
- * 隔離の場合は 3 ヶ月をめぐりに実験を終了し、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自己負担とするが、必要に応じ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 エリア

- (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モニター動物がモニターしていたラックの動物を、検査後 1 週間以内に安楽死を行う。(止むを得ない場合は、3 ヶ月をめぐりに隔離を認める。)
- * 受精卵保存している系統の場合は安楽死させる。
 - * 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 ヶ月をめぐり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自己負担とする。
 - * 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、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(各自のモニター動物の検査結果は陰性)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 ヶ月をめぐりに実験を終了し、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自己負担とするが、必要に応じ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. 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、エリア毎の「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。

5. 立入りの制限

- (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。

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

