

実験用動物の品質について（微生物を中心として） —その1—

長崎大学医学部附属動物実験施設
佐藤 浩

—その1—

1. 微生物学的品質の定義
2. 諸外国の状況
3. 実験動物の授受
4. 微生物検査体制の充実

—その2—（つづき：予定）

5. 国動協作成の授受の際の微生物メニュー（改訂版）について
6. 今後、広義の“実験（用）動物”を含めた実験動物において注目される病原体

「実験用動物の品質」という随分と大きなタイトルを「20周年記念誌編集委員会」より戴いた。深く考えずに引き受けたことをあとで後悔しても始まらない。さて、これを書くにあたって随分と私なりに悩んだ（年末・年始）のであるが、このタイトルをよ～く見ると、どうもこれには編集委員会の深い含蓄があるように思えてきた。衆知の如く、われわれの分野では「実験用動物」という言い方は、特別の意味を指すことが多く、広い意味での動物実験に使用される動物全般を指すからである。それについて書くようにと云う意味であろう。日常的な狭義の“実験動物”から野性捕獲動物、さらに北米でよく使用され、わが国では余り未だ使用されていないエキゾチックアニマル等々の人獣共通感染症、特にウイルス性のものも含めた？

1. 微生物学的品質の定義：さて、そもそも改めて我々が日常的に使用している実験（用）動物の品質、特に微生物学的品質、例えば SPF というものは何か、定義のようなものがいつ頃出来たのか？と考えると、まずこれからもう少し勉強し直す必要があると思ひ、周りの成書たるものを引っぱり出してみた。

まず、わが国実験動物学関係のバイブルというべき田嶋嘉雄編集の「実験動物学—総論—」を見ると、SPF とは ICLA（国際実験動物委員会）が1965年頃に“帝王切開由来の、特定の環境で維持されている、指定病原体のない動物群”に対して付けられた用語となっている。また、少々古いが、The UFAW Handbook on the Care and Management of Laboratory Animalsの第5版（1976）でも、“SPF動物とは子宮切断術で得られ、病原体フリーの飼育器材・飼料でもってバリア内で維持され、専門の技術者で管理されたものである”と定義している。これらは正に我々が今日通常良く使う意味で、やはり caesarian-derived の冠は今もはずされていないようである。

米国の公的機関であるアメリカ実験動物資源協会（ILAR）の委員会から1991年に出版されている *Infectious Diseases of Mice and Rats/Committee on Infectious Diseases of Mice and Rats* を手にすると [Objectives, Terminology, and Overview of Pathogen Status] の章があり、さらに「Terminology of Microbial and Pathogen Status」があつて、西洋各国では微生物学的品質を表す専門術語システムとして6種類

(英国だけは術語の代わりにカテゴリー；****，***，**，*の4方式，場合によっては5方式を採用)があるが，それらは維持方法によってA，B，Cの3グループに統一できるという(表1)。

表1 西洋五カ国及び一般的にその他の国で使用されている微生物学的品質を表す専門術語とグループ名

専門術語システム	グループ名
1) Germfree (or axenic, keimfrei, axenique) animal 2) Gnotobiotic animal	A) Isokator maintained アイソレータ 内維持 germ- free (微生物 は全部駄目)
3) Defined flora (or defined moicrobially associ- ated, gnotobiotisch assoziiert, gonotoxenique) animal 4) Pathogen-free (PF) animal 7) Specific pathogen free (SPF) (or barrier main- tained, EOPS) animal 6) virus antibody-free animal 7) Monitored (or clean conventional, heterox- enique) animal	A) Barrier maintained バリア内維持 (病原菌 「pathogen」 は駄目)
8) Coventional (or konventionell, holoxenique) animal	B) No containment 封込め無し (コンベンショ ナル)

2. 諸外国の状況：それでは具体的に米国の統一基準的なものとしてどのような項目を SPF として挙げているかであるが，残念ながらこの成書には触れられていない。ILAR としては統一的なものを出さないで，各生産業者，研究機関が作成していると考えられる。しかしながら，もう少しキチツとしたものが無いかと探したところ，九州では私と熊本大学の浦野氏が共著のメンバーになっていて，実中研が主体となり米国 NIH と日米共同作業で作成したマニュアルがあるのを思い出した。それが表2である。このマニュアルはそれほど普及しているとは思えないが，ここで示し，お知らせしておく価値があると判断した。

一方，ヨーロッパでは下記二つの FELASA リコメンデーション (ヨーロッパ実験動物 連合推奨)・メニューなるものがある。すなわち，一つはブリーダー向けの「*Recommendations for the health monitoring of mouse, rat, hamster, guineapig and rabbit breeding colonies. -Report of the Federation of European Laboratory Animal Science Associations (FELASA) Working Group on animal health accepted by the FELASA Board of Management, November 1992*」*Laboratory Animals* : 28, 1-12, 1994」で，片や，ユーザー向けの「*FELASA recommendations for the health*

表2 日米共同作業によるモニタリングのための微生物名選択
 (Manual of Microbiologic Monitoring of Laboratory Animals, 2nd Edition, NIH, 1994)

カテゴリー ¹⁾	微生物名	マウス	ラット
A	ハンタウイルス		X
	リンパ球性脈絡髄膜炎ウイルス	X	
	サルモネラ	X	X
	皮膚糸状菌	X	X
B	センダイウイルス	X	X
	エクトロメリア	X	
	マウス肝炎ウイルス	X	
C	唾液腺涙腺炎ウイルス		X
	マウス肺炎ウイルス	X	X
	マウス脳脊髄炎ウイルス	X	
	マウス微小ウイルス	X	
	肺マイコプラズマ	X	X
	キルハム・ラットウイルス		X
	CAR パチルス	X	X
	ティーザー菌	X	X
	ネズミコリネ菌	X	X
	パスツレラ		X
	気管支敗血症菌		X
	肺炎球菌	X	X
	ネズミスピロヌクレウス	X	X
	ネズミジアルジア	X	
D	カリニ原虫	X	X
	緑膿菌	X	X
	黄色ブドウ球菌	X	X
E	盲腸蟻虫	X	X

1) カテゴリー：モニタリングのための微生物名選択基準

A：人獣共通感染症、及び人に病原性を示す微生物

B：実験動物に致命的な病原体

C：実験動物に致命的ではないが、生理学的影響をもたらす病原体

D：日和見感染を起こす病原体

E：単独または実験動物コロニーの微生物学的状態を示す指標

monitoring of mouse, rat, hamster, gerbil, guineapig and rabbit experimental units. -Report of the Federation of European Laboratory Animal Science Associations (FELASA) Working Group on animal health accepted by the FELASA Board of Management, November 1995] Laboratory Animals: 30, 193-208, 1996] である。これらがヨーロッパ諸国では統一基準的なりコメンテーション（推奨）として使用されている。故に、例えば、米国やわが国からヨーロッパへ動物を分与する時は、受入国側の検疫に関する法律を先ずクリアーし、さらにこのリコメンテーションをクリアーしなければならないことになる（受入側がこの基準の項目について検査書を要求するので）。そのメニューは表3に示した。

表3. FELASAJIコメンデーション・メニュー(生産コロニー)

●マウス (ウイルズ性)	15. **マウス胸腺ウイルス	●ラット (ウイルズ性)	8. 溶レン菌	2. パズツレラ	1. 気管支敗血症菌	4. ウサギロタウイルス
1. マウス微小ウイルス (MVM)	16. **マウスサイトメガロウイルス (バクテリア性)	1. ハンタウイルス	9. 肺炎球菌	3. サルモネラ	2. 皮膚糸状菌	5. センダイウイルス
2. マウス肝炎ウイルス (MHV)	1. ウイルス	2. キルハムラットウイルス	10. **CARパチルス	4. テイザー菌	3. パズツレラ	6. 5型シミアンウイルス (SV5)
3. マウス肺炎ウイルス (PVM)	1. 気管支敗血症菌	3. マウス肺炎ウイルス (PVM)	11. **皮膚糸状菌	5. **クロストリジウム菌	4. サルモネラ	(バクテリア性)
4. 3型レオウイルス (Reo3)	2. シトロバクター	4. 3型レオウイルス (Reo3)	12. **大腸菌	6. **皮膚糸状菌	5. テイザー菌	1. 気管支敗血症菌
5. センダイウイルス	3. ネズミコリネ菌	5. センダイウイルス	13. **肺炎球菌	7. **大腸菌	6. 溶レン菌	2. パズツレラ
6. マウス脳脊髄炎ウイルス	4. レプトスピラ	6. センダイウイルス	14. **カリニ原虫	8. **肺炎球菌	7. 肺炎球菌	3. サルモネラ
7. **エクトロメリアウイルス	5. 肺炎球菌	7. 唾液腺腺炎	15. **変形菌	9. **変形菌	8. 仮性結核菌	4. 溶レン菌
8. **ハンタウイルス	6. パズツレラ	●ハムスター (ウイルズ性)	16. **緑膿菌	10. **緑膿菌	9. **カンジダ	5. テイザー菌
9. **乳酸脱水素酵素	7. サルモネラ	1. (SDA)/ラットコロナウイルス(RCV)	17. **黄色ブドウ球菌	11. **黄色ブドウ球菌	10. **クラミジア	6. **クロストリジウム
10. 上昇ウイルス	8. 溶レン菌	2. マウス脳脊髄炎ウイルス(TIMEV)	18. **仮性結核菌	●モルモット (ウイルズ性)	11. **クロストリジウム	7. **皮膚糸状菌
11. **リンパ球性脈絡髄膜炎ウイルス	9. 肺炎球菌	3. ツーラン(H-1) (バクテリア性)	●ハムスター (ウイルズ性)	1. アデノウイルス (GpAd)	12. **大腸菌	8. **大腸菌
12. 膜炎ウイルス(LCM)	10. **CARパチルス	4. 気管支敗血症菌	1. リンパ球性脈絡髄膜炎ウイルス(LCM)	2. リンパ球性脈絡髄膜炎ウイルス(LCM)	13. **肺炎球菌	9. **肺炎球菌
13. **マウスアデノウイルス	11. **皮膚糸状菌	5. ネズミコリネ菌	2. マウス肺炎ウイルス (PVM)	3. マウス肺炎ウイルス (PVM)	14. **変形菌	10. **緑膿菌
14. **マウスアデノウイルス	12. **皮膚糸状菌	6. レプトスピラ	3. 3型レオウイルス (Reo3)	4. 3型レオウイルス (Reo3)	15. **緑膿菌	11. **黄色ブドウ球菌
15. **マウスアデノウイルス	13. **大腸菌	7. 肺炎球菌	4. センダイウイルス	5. センダイウイルス	16. **黄色ブドウ球菌	●ウサギ (ウイルズ性)
16. **マウスアデノウイルス	14. **肺炎球菌	8. 肺マイクプラズマ	5. 5型シミアンウイルス (SV5)	6. 5型シミアンウイルス (SV5)	1. マウス肺炎ウイルス (PVM)	13. **黄色ブドウ球菌
17. **マウスアデノウイルス	15. **カリニ原虫	9. パズツレラ	(バクテリア性)	1. 気管支敗血症菌	2. ウサギ出血病ウイルス (RHDV)	14. **レボネーマ
18. **マウスアデノウイルス	16. **変形菌	5. パズツレラ	1. 気管支敗血症菌	2. ウサギ出血病ウイルス (Myxomatosis)	3. ウサギボツクス	15. **仮性結核菌
19. **ポリオマウイルス	17. **緑膿菌	6. サルモネラ				
	18. **黄色ブドウ球菌	7. テイザー菌				
	19. **Yersinia					

**はオープンメニュー

これを見るとリコメンデーションといえど、ブリーダーサイドにいずれの動物種においてもかなりの項目につき検査を行うよう要求していることがわかる。またこれらウイルス、細菌以外にも寄生虫等についても触れられている。また、研究機関の施設等向けのリコメンデーションでは、ブリーダーサイド以上に感染事故が起きる危険性が高いことを考慮し、例えば施設における検査頻度をブリーダーサイド以上に高めるよう論じている²¹⁾。

これに対し、わが国の日本実験動物協会（日動協）が1993年に作成した日動協メニュー（微生物学的品質表示法）がある（表3¹⁾）。この微生物メニューに対し、検査条件、検査頻度によってグレードA、B、Cの三つに区別しようというものである（表4²⁾）。少々複雑なことなのであるが、SPFという言葉は商標に転用されている面もあるのでグレードという用語が使用されている。しかし、作成されてすでに4～5年経ている筈であるが、我々ユーザーサイドの耳には日常的にこの言葉はほとんど入ってきていない。折角、日動協という日本を代表する機関で作成したのだから、今後、ユーザー側とブリーダーの方々にこれらの言葉の遵守、あるいは普及を計っていかねばならない。なお、メニューの内容がヨーロッパメニューに比較して今後増強する必要があるように思えるのは私だけであろうか。項目を増やすことはブリーダー側に経費的な負担が増えることが明らかであるが、昨今、世界的なハーモナイゼーションが求められつつある現状、そちらに対する考慮・検討も必要と思われる。

表4 日動協微生物メニュー
（ファームテックジャパン、9巻、12号、1383-1386、1993）

マウス	モルモット
1. センダイウイルス	1. センダイウイルス
2. 肺マイコプラズマ	2. 気管支敗血症菌
3. ネズミコリネ菌	3. サルモネラ
4. マウス肺炎ウイルス	4. 肺炎球菌
5. ティーザー菌	5. 溶レン菌
6. サルモネラ	6. コクシジウム
7. エクトロメリアウイルス	
ラット	ウサギ
1. センダイウイルス	1. パスツレラ
2. 肺マイコプラズマ	2. 気管支敗血症菌
3. ネズミコリネ菌	3. サルモネラ
4. 唾液腺涙腺炎ウイルス	4. コクシジウム
5. ティーザー菌	5. 耳疥癬ダニ
6. サルモネラ	
7. 気管支敗血症菌	

¹⁾ブリーダーサイドでは3ヶ月に一度10匹以上の動物を検査するよう推奨しているが、研究機関等の施設ではさらにそれ以上の頻度を推奨している。

表5 日動協微生物メニューとグレーディング

<p>グレードA：すべての微生物検査が、1) 高感度の検査法、2) 適正サンプリング、3) 定期検査、の3条件を満たして実施され、その結果、日動協メニューの微生物はすべて陰性であることが証明されている。</p> <p>グレードB：すべての微生物検査が、1) 高感度の検査法、2) 適正サンプリング、3) 定期検査、の3条件を満たして実施され、その結果、日動協メニューの微生物について、陽性、陰性の別が明らかにされている。</p> <p>グレードC：微生物検査は実施されているが、1) 高感度の検査法、2) 適正サンプリング、3) 定期検査、の3条件を満たしていない。または、検査を実施していない。</p>
--

3. 実験動物の授受：昨今、Tg マウス等を始めとする遺伝子改変系統維持動物の授受が国内、国外間で激しくなっている。これらの事情から、ユーザーサイド（研究者間、動物実験施設間）の微生物検査項目をある程度統一しないと動物の授受（exchange）がスムーズに出来ないことが憂慮されている。事実、ある程度そのような事例も増えているようである。授受がスムーズに行かないと研究の遅滞も招きかねない。

国立大学動物実験施設協議会（国動協）では昭和59年5月31日作成され、平成5年5月20日に改訂された「一動物実験施設間における系統動物の分与に関するガイドライン」がある。このガイドライン（GL）はTgA 関係の研究が世界的に今のように活発になる前に作成されたもので、現在のような授受の激増を想像できなかった頃のものであり、GLの微生物検査項目はほぼ理想的なものである。しかしながら、現在となってはこれら項目が全部陰性（微生物を保有しない）であることを原則とする動物の授受は、非現実的な面もあり、研究の遅滞を招いているという意見が、特に研究者サイドから聞かれるようになってきている。確かに特殊な条件以外では動物実験反応を歪めないものもあるように思える。

このような背景から、昨年国動協幹事会では「バイオハザード対策小委員会（BHC）」に上記GLの見直し作業を命じ、また国動協の「トランスジェニック動物の取扱いに関する小委員会（TgAC）」も授受の際の統一基準的なものを作成し、授受をスムーズにした旨の要望が出されている。さらに、実験動物学会でも今後わが国の微生物学的検査を如何にするか、あるいは国際的調和をどうするかについて関心がにわかに高まってきており、今年の実験動物学会ではこれに関するシンポジウムが開催される予定である。

国動協におけるGLの見直し作業は現在進行中であるが、近々見直し案を示し、総会の了承を得ることになる。

4. 微生物検査体制の充実：今後わが国でも諸外国並のSPF項目を検査できる体制の充実が必要である。当面必要な検査項目は、マウス、ラットのバルボウイルス関係とマウス

のロタウイルス関係であろう。

なお、これまではほとんど血清学的手法や培養に頼る検査体制であったが、免疫不全動物種や使用数の増加、あるいは遺伝子改変動物（例えば免疫関係遺伝子のノックアウト、それもダブルノックアウト等）が増える傾向にあるので、遺伝子検出等の方法論の開発・解決が必要である。これらの開発には特に若い研究者の活躍が望まれる次第である。皆さんの研究参加とご活躍を切に祈り、－その1－を終わる。

－つづく－

その他の参考資料

1. Diagnostic Microbiology for Laboratory Animals, edit., Ivo Kunstyr, GV-SOLAS Vol. 11, Gustav Fisher Verlag, 1992.
2. Principles of Laboratory Animal Science-A contribution to the humane use and care of animals and to the quality of experimental results, edit., L. F. M. Van Zutphen, V. Baumans, A. C. Beynen, Elsevier, 1993.
3. Rodents/Committee on Rodents, ILAR, National Academy Press, 1996.
4. Handbook of Laboratory Animal Science, Vol. 1, Selection and Handling of Animals in Biomedical Research, edit., Per Svendsen and Jann Hau, CRC Press, 1994.
5. The UFAW Handbook on the Care and Management of Laboratory Animals, 6th edition, edit., T. B. Poole, Longman Scientific & Technical, 1987.
6. The importance of health monitoring in laboratory animals, Scandinavian J. Laboratory Animal Science, Vol. 20, 1993.