

Ⅲ．感染動物実験安全対策の現状

Present Status of Biosafety Measures for Infection Experiments.

佐 藤 浩 Hiroshi Sato

Biohazard factors, and biosafety measures including both soft-and hardwares were described for a purpose of infection experiments using laboratory animals, especially small animals.

Tentative standardization, which was proposed National University Laboratory Animal Facility Committee was also referred. In the standard, infection experiments with 3-level of biosafety grade were required physical containment as well as improved safety cabinets (Class I & Class II) or animal isolator (Class A-1, 2, 3, 4).

In conclusion, the most important thing is a inspection whether performing activities meet standard requirement for the physical equipment or not.

1. はじめに

感染動物実験におけるバイオハザード安全対策は、動物を対象とする in vitro の場合と大きく異なって、動物を使用した場合にのみ起こる様々な要素がからみあってその安全対策の面でかなり複雑であろうということは概念的に理解できる。それ故、in vitro の安全対策は、in vitro の場合とは大幅に異なる状況、すなわちハード面も非常に重要ではあるが、それ以上に生きた動物を対象とするためのソフト面もハード面に劣らず重要であり、実験開始に先立った普段の操作技術（一般動物実験における動物実験技術）の習熟が必須である。

2. 動物実験におけるバイオハザード発生要因

現在、動物実験に使用される動物を区分すると、いわゆる実験動物 (laboratory animals)、家畜 (domestic animals) さらに捕獲動物または野性動物 (captured animals or wild animals) が存在する。これらの動物を使用して、一般の動物実験ならびに感染動物実験が遂行される場合のバイオハザード発生要因の由来には下記のものが挙げられる。

- 自然感染動物
- 実験材料

○ 感染実験動物

○ 組換え DNA 動物実験

2.1 一般動物実験にともなうバイオハザード

最初の『自然感染動物』は既知、または未知の人畜共通感染症 (zoonosis) の病原体を保有する国内外からの動物、主として国外からの捕獲動物に多くみられるものである。表1は既知の病原体による人畜共通感染症の一覧であるが、前述の如く人畜共通感染症を引き起こす病原体は、未知と既知の場合に区別される。未知病原体保有動物の代表は国外から輸入される捕獲動物、特に霊長類の仲間に最も注意を要する。国外からのサル類は表1に示すように多数の既知病原体を保有する場合が知られており、寄生虫、原虫、細菌、ウイルス、等と多彩である。

これらの病原性微生物の中でも、特にわが国へ輸入されてくるサルにおいて、汚染の程度やヒトでの病状の重篤性から注意を要するものには、Bウイルス（ヘルペスウイルスの一種）、細菌性赤痢、それに10年程前にヨーロッパで死者を出したことで有名なマールブルグ病（ミドリザル由来のマールブルグウイルス：現在ではこのウイルスの保菌動物は、アフリカの齧歯類といわれている）であろう。特にマールブルグ病は10数年前までは未知の病原体であり、事件以後サル類の検疫期間は W.H.O. の通達により従来の6週間から9週間に延長された。この様

原稿受理 昭和62年10月19日

表1 人畜共通感染症一覧

動物種	疾 病
マウス、ラット、 ハムスター	リンパ球性脈絡髄膜炎 (LCM) 脳心筋炎 (EMC) 腎症候性出血熱 つつがむし病
モルモット	レプトスピラ
ウサギ	野兎病
オポッサム、 スカンク、キツネ	狂犬病 レプトスピラ
ネコ	トキソプラズマ 猫ひっかき病 白癬
イヌ	狂犬病 レプトスピラ イヌ回虫症 ブルセラ
ウシ、ヤギ、 ヒツジ、ブタ	旋回病 Q熱 炭疽 結核 ブルセラ リステリア 伝染性膿胞性皮膚炎 白癬 水胞性口炎 牛痘 豚丹毒 スクレイピー？ レプトスピラ
サル類	結核 ウイルス性肝炎 マールブルグ病 サルモネラ 細菌性赤痢 Bウイルス マラリア ヤバ及びタナボックス 麻疹 アメーバ赤痢 SV40 狂犬病
トリ類	オーム病 ニューカッスル病 サルモネラ ウマ脳炎

に霊長類に関しては、いつ未知病原体の汚染とか、侵入があるかもしれないので、たえず細心の注意を払って扱わなければならない。なお、現在全世界的に大きな問題となっているヒトの AIDS に類似したサル AIDS も発見されており、重大な関心を引きつつある。現状ではほとんど可能性がないと考えられているが、今後の学問の発展によっては霊長類との人畜共通感染症の一つと捉える必要性もできるかも知れない。

次に近交系・非近交系、あるいは飼育環境を問わず実験小動物にみられるものに、既知病原体ではあるが、わが国の SPF 検査項目に入っていない病原体、即ち非 SPF 化病原体感染動物が挙げられる。これらの動物は専門繁殖業者由来や他研究機関由来の分与動物も含まれており、病原体としては腎症候性出血熱 (HFRS) ウイルス、リンパ球性脈絡髄膜炎 (LCM) ウイルス、あるいは最近日本各地で復活しつつあるツツガムシ病もこれらの範疇にはいる。わが国での SPF の現状は、一般的にはその性格上、その動物間での病原性の高いものを専らとりあげており、ヒトに対するバイオハザードという面で、日本と米国で検査項目の内容に差があるのが実情である。表2は米国国立癌研究所が要求している検査項目である。前述の LCM ウイルスの検査は一部米国での依頼検査を除いて、わが国内では組織だてで行われていない。

また、『研究者が動物実験用に施設に持ち込む実験材料』もバイオハザード発生要因となりうる(表3)。材料そのものによるヒトへの直接感染被害というより、むしろ実験動物を介した間接被害を受けるのが通例である。この例として、(a) 継代腫瘍であり、(b) 培養組織である。腫瘍に関してはラット継代 histiocytoma より分離された腎症候性出血熱ウイルス(B-1株)が有名であるし、培養細胞由来では、リンパ球性脈絡髄膜炎ウイルス迷入組織培養細胞や、一方ヒトに対してはハザードにならないが、数年前の米国でのマウスコロニーで大流行したエクトロメリア(マウスボックス)症の場合は、米国外からのウイルス迷入細胞の米国内への持込みが疑われた。

2.2 感染動物実験にともなうバイオハザード

『人為的感染実験動物』は勿論であるが、これから益々盛んになると予想される『組換え DNA 動物実験』も、一部バイオハザード発生要因となる(表4)。感染動物実験に伴って発生するバイオハザードを防ぐ観点から、後に詳述するように、全国国立大学動物実験施設協議会内に動物実験安全対策小委員会が設置され、安全対策基準案ならびにアイソレータ類の現状調査と規格案の作成が進められた。その結果、感染動物実験に用いる病原体の

表2 アメリカ国立癌研究所(NCI)が要求する
マウス、ラットの微生物検査項目

	マウス	ラット
1. 抗体検索		
Ectromelia	○	
K virus	○	
Minute virus of mice (MVM)	○	
Mouse hepatitis virus (MHV)	◎	
Polyoma	○	
Theiler's encephalomyelitis	○	
Adenovirus	◎	
Lymphocytic choriomeningitis (LCM)	○	
Pneumonia virus of mice (PVM)	○	○
Reo 3	○	
HVJ (Sendai)	◎	◎
Kilham rat virus (KRV)		○
Rat coronavirus (SDA)		◎
Toolan H-1		○
2. 培養検査		
Mycoplasma spp.	◎	◎
Corynebacterium spp.	◎	◎
Streptococcus spp.	○	○
Pasteurella spp.	◎	◎
Bordetella bronchiseptica	◎	◎
Strerptobacillus moniliformis	◎	◎
Salmonella spp.	◎	◎
Citrobacter freundii	○	○
Staphylococcus spp.	○	○
Pseudomonas spp.	◎	◎
Klebsiella spp.	○	○
3. 内外寄生虫	◎	◎

◎は日本におけるSPF検査項目

安全度に応じた物理的封じ込め装置の使用が開始されることになった。

一方、最近注目されている組換えDNA動物実験もウイルス全遺伝子の導入ベクターを使った動物実験や、さ

表3 実験材料による汚染

・ 継代腫瘍細胞
HFRS ウイルス (B-1 strain)
histiocytoma
・ 培養細胞自身あるいは産物の動物接種
LCM, ectromelia, LDH

表4 感染動物実験及び組換え動物実験

感染動物実験
組換えDNA動物実験 (in vivo)
発生工学—胚操作
developmental biotechnology
embryo manipulation
トランスジェニックマウス
(外来遺伝子導入マウス)
癌遺伝子 SV40 T-Ag
ras, myc ?
組織適合抗原遺伝子
優性遺伝病の作出
変異遺伝子の導入
組換えワクチン(ベクター)の動物実験

らにトランスジェニック動物作出もそれらの一部についてはバイオハザード発生要因となる可能性があり、上記同様適当な物理的封じ込め装置を使用することが望ましい。

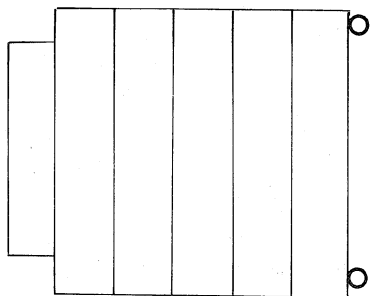
3. 感染動物実験におけるバイオハザード安全対策

3.1 従来の方法

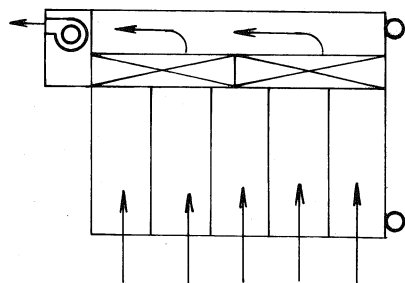
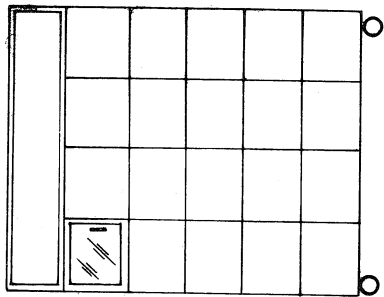
従来、一般の動物実験あるいは感染動物実験の際のバイオハザード対策を考慮するというときは、一般的には動物飼育室を廊下やヒト居住区域より陰圧に保ち、飼育室で発生したエロゾールを外の環境へ出さない構造（ここでいう第3次障壁）や、単に隔離した飼育室を使用するだけだったと云っても過言ではない。

この様な環境の場合、実験者が感染動物飼育室へ一旦入域してしまうと感染動物と実験者の間には有効な物理的障壁が存在せず、実験者にとって極めて危険な状態であり、実験者の犠牲的精神によって研究が完遂されてきた。この状態は安全対策としてまったく不十分であり、これらの問題点を解決すべく、国立大学動物実験施設安

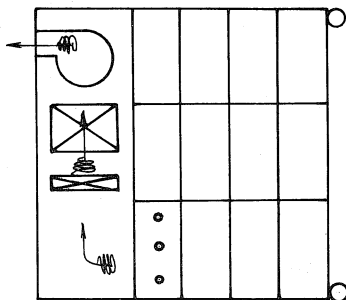
飼育時開放－作業時開放 A1形アイソレータ



飼育時密閉－作業時開放 A3形アイソレータ



飼育時半密閉－作業時開放 A2形アイソレータ



飼育時密閉－作業時密閉 A4形アイソレータ

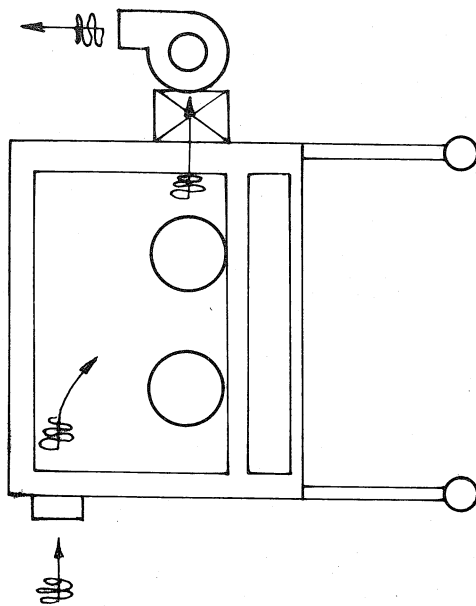
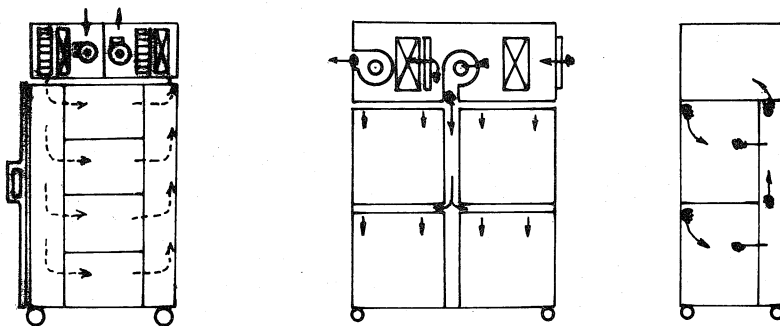


図1 排気形(A形)アイソレータ

飼育時密閉－作業時開放 B形アイソレータ



汚染プレナムの例

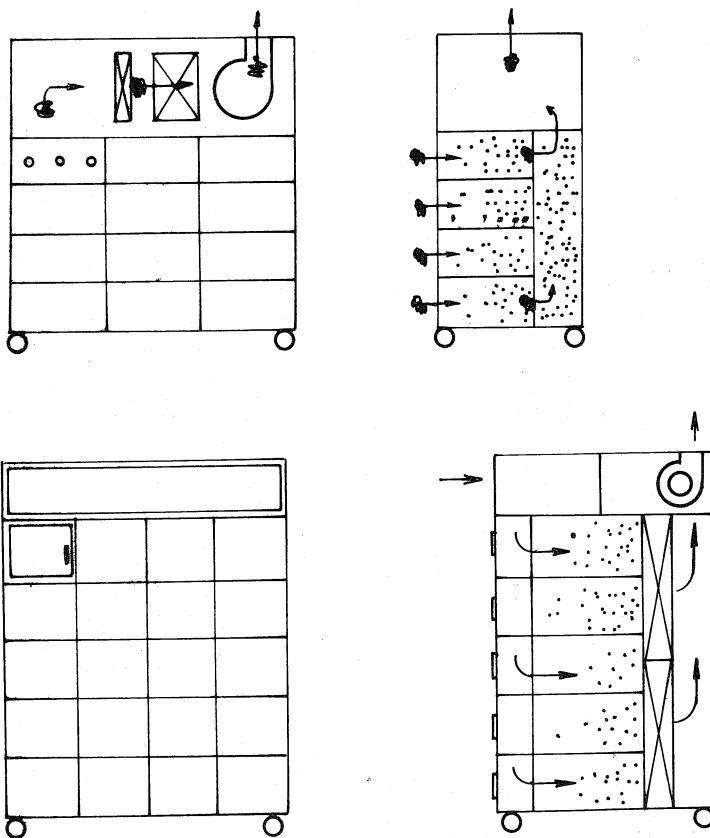


図2 給排気形(B形)アイソレータ

全対策小委員会が設置され、次に述べるように、第1次、第2次障壁、なかでも第2次障壁の基準・規格化が促進されることとなった。

3.2 現状（病原体の安全度基準の設定、物理的封じ込め装置の規格化及び評価）

バイオハザード対策の理想は、表5のように、ハード面では感染動物の物理的封じ込めがあり、ソフト面では実験者及び動物飼育管理者の技術操作レベルの向上・教育が挙げられる。これらの両面が表裏一体になった場合、安全対策を十分に施せることになる。

物理的封じ込め装置の規格を含めた“感染動物実験における安全対策(案)”が国立大学動物実験施設協議会の安全対策小委員会によって提案され、協議会総会において承認された。以下簡単にふれてみたい。

(1) 病原体の安全度分類

感染動物実験に使用する病原体を、ヒトに対する危険性と実験動物間での同居感染の可能性に応じて安全度（予研分類では危険度）を分類した。

安全度1：人に対して病原性をほとんど示さず、人の実験室感染及び実験動物間での同居感染の可能性がほとんど無いもの。

表5 バイオハザード安全対策

ハード面

1. 動物の封じ込め

① 第一次隔離

飼育器材（ケージ、蓋、フィルタ・キャップ）

② 第二次隔離

感染動物用アイソレータ

感染動物用安全キャビネット

③ 第3次隔離

建物（構造、設備）

ソフト面

1. 飼育管理者の教育

① 衛生管理の徹底

② 一般技術の向上

2. 実験者・研究者の教育

① 利用ルールの徹底

② 動物実験技術レベルの向上

③ 実験の試行

安全度2：通常の病原微生物学的設備及び操作手順で実験室感染を防ぐことが可能であるもの。

安全度3：以下の条件の何れかに該当するもの。

1. 通常の病原微生物学的設備及び操作手順で

実験室感染を確実に防ぐことができるが、感染発病した場合には重症になる可能性のあるもの。

2. 実験室感染の可能性が高く、感染した場合、重症になる可能性のあるもので有効な予防法または治療法が存在しないもの。

安全度4：実験室感染の可能性が高く、感染した場合、重症になる可能性のあるもので有効な予防法または治療法が存在しないもの。

上記の安全度に応じて、標準操作手順、ならびに設備基準（安全設備、動物飼育室の構造）が定められた。

ちなみに安全度3における手順及び基準を述べると、

安全度3

標準操作手順

1. 感染実験区域内への飲食物の持込みまたは喫煙を禁じる。

2. 動物飼育室内に手洗い装置を設け、作業後は手指の洗浄消毒を行う。

3. 床敷交換などの作業時のエアロゾル発生を極力防ぐ。

4. 使用済みケージ等汚染器材は消毒または滅菌したのち洗浄する。

5. 汚染床敷や動物由来排泄物は消毒または滅菌したのち廃棄する。

6. 動物死体は焼却する。

7. 動物飼育室内では専用の作業衣、長靴などを着用する。

8. 動物実験関係者以外の立ち入りを制限する。

9. 動物飼育は原則として実験担当者が行う。

安全設備

単純飼育時

1. 動物の飼育は感染動物用安全キャビネットまたは感染動物用アイソレータ（A形）内で行う。

飼育管理作業時及び接種・解剖作業時

1. クラスⅠ、Ⅱ形生物学用安全キャビネット及び感染動物用安全キャビネット、または感染動物用アイソレータ（A形）内で行う。

その他

1. 感染実験区域内に高圧蒸気滅菌装置を設置する。

動物飼育室内の構造

1. 動物飼育室の窓は非開閉式にする。

2. 動物飼育室内は陰圧に保ち、準備室、飼育前室から動物飼育室内へ空気が流入する一定方向気流方式の空調を行う。

3. 停電時対策を考慮する。

4. 動物飼育室からの排気は高性能フィルタで汙過したのち放出する。

5. 感染実験区域の入口にはエアロックまたは二重ドアを設置する。

6. 配管貫通部を塞ぎ、動物飼育室内のホルマリンガスによる燻蒸消毒が可能な構造とする。

となり、安全設備として物理的封じ込め装置の設置が必要とされる。

(2) 物理的封じ込め装置

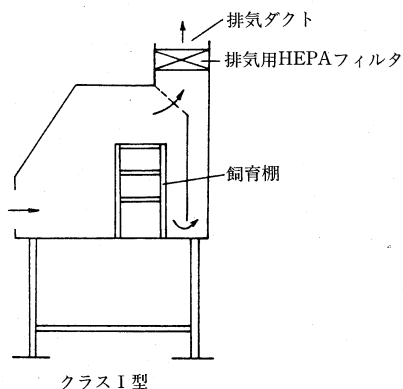
感染動物実験用物理的封じ込め装置には、感染動物用アイソレータ及び感染動物用安全キャビネットがある。またアイソレータをさらに分類すると排気型（A型）アイソレータ、給排気型（B型）アイソレータとなり、このほかにクラスⅠ、Ⅱ型安全キャビネットがある。

図1は各種アイソレータの概観図を示した。

排気型（A型）アイソレータは、通常エアテーク・インレットから流入する空気が感染動物飼育域を通過し、排気は最終的にフィルタで汉過されたのち装置外に出る構造になっている。アイソレータを細分類すると“飼育時開放—作業時開放”（A1型）、“飼育時半密閉—作業時開放”（A2型）、“飼育時密閉—作業時開放”（A3型）、および“飼育時密閉—作業時密閉”（A4型、いわゆるグローブボックス型）の4種に区別される。

排気型アイソレータの特徴は、動物飼育室内設置のアイソレータに対して、空気が清浄化されずにアイソレータ内動物飼育区域へ導入されるので、SPF動物などを使った感染動物実験を長期間行う際には、動物飼育室への給気を清浄化しておく必要がある。

給排気型（B型）アイソレータ（図2）は、A型と異なり流入空気もフィルタ処理される性能を有する。現在この構造を持つアイソレータは2社より販売されているが、機能上の問題点を抱えているように思われるので安全度2までの病原体に限った方がよいであろう。



安全キャビネット型感染動物飼育装置（図3）は、生物学用安全キャビネットを動物飼育用に用途を転換させたものである。そのため、生物学用安全キャビネットと同様、クラスⅠおよびクラスⅡに分けられる。キャビネットの中は実験領域と飼育ケージを置く棚スペースの両方を保有する構造になっている。一般的に云って安全キャビネット型感染動物飼育装置の方がアイソレータ型に比較して、危険性の高い病原体を使用した実験および動物飼育に適しているようである。

これら3種の感染動物飼育装置に関する詳細な規格（案）は本協会誌の25巻第3号に掲載されているので、ここでは繰り返さないが、要は如何に性能を評価するかにかかっているといえよう。

3.3 展望

感染動物用物理的封じ込め装置は、生物学用安全キャビネットに対して求められているような安全面での規格を先ずクリアし、その上さらに動物の生理学的正常値を乱す様々な要因（騒音、温度、照度、風速および長期の振動等）の吟味、動物の逃亡防止、昆虫侵入の防止などを考慮していかなければならない。これらを今後順次解決し、よりヒトに安全で、より動物に快適な飼育環境を提供する感染動物用物理的封じ込め装置を目指すことになろう。

まとめ

以上、包括的に動物実験（一般動物実験、感染動物実験）に伴うバイオハザード発生要因とそれらに対するハード・ソフト両面における安全対策の現状、進行中の作業等について記した。

益々進展するハード面とそれらを如何にコントロールし、ヒトに対する安全性を高めるかの運用面の充実に今後の課題が残されている。

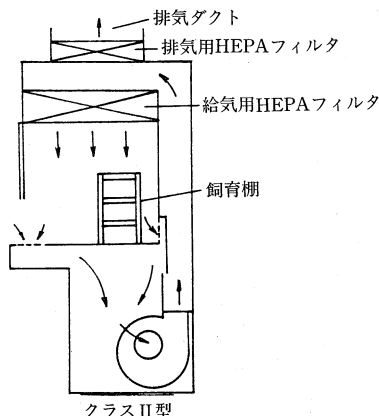


図3 安全キャビネット型感染動物飼育装置