

第 34 回東北動物実験研究会 講演要旨集

日 時：令和 5 年 10 月 21 日（土） 13:20～15:20

場 所：コラッセふくしま 4 階 多目的ホール



上野恩賜公園の野口英世像（photoAC フリー写真素材より）

主 催：東北動物実験研究会

共 催：日本実験動物技術者協会

主 管：山形大学医学部メディカルサイエンス推進研究所

動物実験センター

第 34 回東北動物実験研究会プログラム

共催 日本実験動物技術者協会

日 時：令和 5 年 10 月 21 日（土） 13：20～15：20

場 所：コラッセふくしま 4 階 多目的ホール（福島県福島市三河南町 1-20）

1. 役員会（5 階 研修室（C 会場）） 11：30～12：30
2. 総 会（5 階 研修室（C 会場）） 12：40～13：10
3. 研究会（4 階 多目的ホール（A 会場）） 13：20～15：20
 - 1) 開会の辞 13：20～13：25
 - 2) 講演会

シンポジウム：テーマ「我が国における微生物モニタリング検査の将来像」

座長：伊藤 恒賢（山形大学）

成田 浩司（弘前大学）

講演 1 13：25～14：00

「実験動物における微生物モニタリングの世界的動向」

石田 智子 先生（（公財）実験動物中央研究所 ICLAS モニタリングセンター）

講演 2 14：00～14：35

「動物福祉に貢献する現代の微生物モニタリング」

丸山 滋 先生（ジャクソン・ラボラトリー・ジャパン株式会社）

講演 3 14：35～15：10

「クリーンアップや除染作業視点での環境モニタリング」

伊藤 由広 先生（ハムリー株式会社）

総合討論 15：10～15：15

3) 閉会の辞 15：15～15：20

4. 情報交換会（12 階 展望レストラン「Ki-ichigo（きいちご）」 17：00～

（東北動物実験研究会、日本実験動物技術者協会奥羽・東北支部合同）

会費：4,000 円

講演 1

実験動物における微生物モニタリングの世界的動向

石田 智子

公益財団法人 実験動物中央研究所 ICLAS モニタリングセンター

わが国の微生物モニタリングの概念が確立してから 50 年近く経過した。確立初期のモニタリングでは検査動物の微生物学的検査には解剖、鏡検、培養、抗体検査、病理検査が主要な手法として使用されていた。この考え方は基本的に変わっていないが、技術の進歩と共に、検査方法は変化してきた。現在ではさまざまな検査用キットや分析装置が開発・販売されており、迅速かつ簡便に検査が可能となっている。例えば、細菌培養検査では、20 種ほどの生化学的性状の陽性・陰性のパターンを利用し、同定を行うキット（ID テスト 日水製薬株式会社）（API®シスメックス・バイオメリュー株式会社）などが広く使用されている。また、最近では質量分析装置（MALDI Biotyper）を使用して菌の同定を行う手法や、さらに菌株を識別する質量分析装置（IR Biotyper）も用いられることがある。抗体検査では、ELISA 法を用いた検査キット（モニライザ®わかもと製薬株式会社）などが広く使用されている。また近年では、よりハイスループットな装置（Luminex®ルミネックス・ジャパン株式会社）も開発されている。これらの技術の導入により、より効率的かつ正確な微生物モニタリングが可能となった。

さらに、1980 年代に PCR が開発され、その後、90 年代に入り、PCR などの手法を使用した検査方法が微生物モニタリングに広く活用されるようになった。PCR 法は、簡便かつ迅速に特定の DNA 配列を増幅させることができるため、微量の DNA サンプルでも検査が可能であり、培養が困難なウイルスをはじめ、多くの微生物検査に使用されている。PCR は生体検体のみでなく、糞便や環境中のサンプルでの検査も可能である。最近では、Individually Ventilated Cage Rack（IVC ラック）の集塵フィルターやケージ内のぬぐいをサンプルとした PCR 検査が行われることもある。IVC ラックは、動物の福祉の向上、感染リスクの低減、飼育環境の一貫性の確保などの利点がある。また、環境への微生物の拡散を最小限に抑えるため、実験結果の信頼性を高めるとともに、飼育者・実験者の動物アレルギーの抑制効果も期待されている。IVC ラックを使用する機関は増加しており、特に、海外（主にアメリカやヨーロッパ）では、IVC ラック派生サンプルを中心に検査を実施している機関が存在してい

る。

PCR 検査は主に IVC ラックの検査の選択肢の一つとして有効とされており、多くの研究論文がその有効性を報告している。しかし、ウイルス、細菌、真菌、寄生虫など、病原体による検出感度が異なることや、母集団(IVC ラック全体)における感染率が低い場合の検出感度など、その実態はまだ不明な点も多い。実験動物の微生物学的品質を維持していく為には、さらなる検討が必要不可欠である。

本講演では、ICLAS モニタリングセンターで実施した日本における実験動物施設および研究施設の微生物汚染状況に関する報告を行う。現在の日本では、過去に流行したセンダイウイルスのような動物に致死性の微生物や、重篤な症状を引き起こす微生物の流行は認められていない。代わりに、主に日和見病原体が微生物汚染の中心である。例えば 2022 年の調査結果によれば、マウスの場合、*Staphylococcus aureus* (カテゴリーD：日和見病原体)、*Octomitus* sp. (カテゴリーE：通常は病原性はないが、飼育環境の指標になる微生物)、*Amoebas* (カテゴリーE) が最も高い陽性率を示した。ラットでは *Staphylococcus aureus* (カテゴリーD)、*Pasteurella pneumotropica* (カテゴリーD)、*Syphacia* sp. (カテゴリーE) が最も高い陽性率を示した。

さらに、今回は海外の検査機関が行っている検査項目や手法を紹介し、それらと日本の検査方法の違いについて報告する。また、私たちが実施した IVC ラックのフィルターを用いた PCR 検査の感染実験の結果についても紹介する。

そして今後の実験動物の微生物学的品質を守るための検査手法について皆さんと一緒に考えていきたい。

講演 2

動物福祉に貢献する現代の微生物モニタリング

丸山 滋

ジャクソン・ラボラトリー・ジャパン株式会社

実験動物施設における微生物統御の目的は、動物を用いた試験・研究において適正かつ再現性の高い結果を得ることにある。適切な動物実験データの取得により、生命科学の発展のために無くすことのできない動物実験を最小限にすることができる。加えて、意図せぬ感染症の流行を未然に防ぐことは、本来の存在価値を全うできないまま安楽死処置に至る動物を削減することにもつながる。このように、わずかな微生物を適切に検出できる微生物モニタリングプログラムの構築は、動物福祉への貢献に直結している。本講演は、動物福祉に配慮した微生物モニタリング方法、すなわち環境材料を用いた PCR 法（環境 PCR / Exhaust Air Dust、以下 EAD）とは何かを知ってもらうことを目的としている。

微生物モニタリングは、実験動物施設の品質管理の一端として微生物学的なステータスの確認を目的に行う、いわば実験に使用する動物の健康チェックである。モニタリングプログラムは、万が一侵入した病原微生物を高感度に検出でき、かつ、施設にとってコスト面でも妥当な内容であることが求められる。従って、適切な微生物モニタリングプログラムは施設ごとの事情や特徴などを踏まえて構築するものであり、施設により異なるものであるとも言える。

小型げっ歯類の実験動物施設では、現在、おとり動物（モニター動物）を用いた微生物モニタリングが広く利用されている。対象となる動物室で維持している全動物の微生物学的な状況をおとり動物に代表させる、間接的な方法である。中でも定期的な微生物モニタリングにおいては、評価対象の動物ケージから得た廃床敷をおとり動物ケージに一定の頻度および量で混入し、廃床敷内の微生物をおとり動物に感染させる「廃床敷おとり」法の利用が主流である。飼育動物数が多くても適用可能な点で廃床敷おとり法は採用しやすく、飼育設備としてオープンケージラックが中心であったこれまでの SPF 施設では空気を介しての感染も期待ができたことから、長らく微生物モニタリング方法の主軸として用いられてきた実績ある方法である。一方、現在の動物飼育室を取り巻く環境は、飼育設備の複雑化、飼育作業時

のバイオセキュリティ意識の向上（消毒や PPE の徹底）、衛生管理の徹底など、近年大きく変化しており、これまでの方法が見合わない状況に陥っている可能性を考える時期に差し掛かっている。マウス・ラットの病原微生物の中には廃床敷利用では伝播が見込めないものがあるとわかってきたこともあり、これまでの微生物モニタリングプログラムに問題意識を持つ施設が増えている。

「環境 PCR / EAD」は、動物飼育環境中のホコリが付着したフィルター、綿棒などを材料とし、PCR により病原微生物の検出を行う微生物モニタリング方法である。微生物モニタリングに環境材料を用いる試みは 1990 年代から報告があるが、機器の進歩や試薬の開発などに後押しされ、この 10 年程で現実的に活用可能な感度の高い微生物モニタリング方法に成長した。廃床敷おとり法では確実な病原微生物検出が困難な個別換気ケージシステム

(Individually Ventilated Cage System、以下 IVC) のための微生物モニタリング方法として開発が進み、近年はオープンケージラック飼育室など IVC 以外の飼育設備にも使用されている。

環境 PCR / EAD は環境材料があれば微生物モニタリングを行うことができるため、おとり動物など生体を供試する必要がない。また、おとり動物に感染が成立しないような微量な汚染源や、環境中では速やかに失活してしまう微生物も検出することができる。つまり環境 PCR / EAD は、微生物モニタリングのための動物使用数を減らし (Reduction および Replacement)、微生物モニタリング感度の向上により感染拡大を未然に防ぐことで不要な安楽死動物を削減する (Reduction および Refinement)、動物福祉に貢献する方法である。生体供試が不要なため、モニター期間を通じて動物を維持しなければならない管理側のリスク・負担を減らし、材料採取のための特別な技術や手間を必要としないことから、飼育に携わる技術者の時間も削減する。環境 PCR / EAD は、実験動物に携わる者全体に利点の多い方法である。

国内での環境 PCR / EAD の認知度はこの 1～2 年で飛躍的に向上した。しかし、欧米での普及に比較し、定期微生物モニタリングに実装している国内施設はまだまだ少ない。各施設に見合った微生物モニタリングプログラムを振り返る上で環境 PCR / EAD を有用な選択肢の一つとしてもらえるよう、我々がこの 5 年で得た IVC、一方向気流ラック、オープンケージラックなどの検証データを紹介する。その特徴や利点を知り、関心を持ってもらえたら何よりである。

講演 3

クリーンアップや除染作業視点での環境モニタリング

伊藤 由広

ハムリー株式会社

私たちは委託者様の依頼により消毒・殺菌作業を実施しているが、相談の多くはクリーンアップと言う大きな括りで言葉にしているものの、実際には年一回の定期的な清掃消毒、新規施設の清浄化、カニクイザル飼育エリアの除染、遺伝子組換え実験施設での機器移動や汚染機器の除染に加え、クリーンエリアへの機器搬入における高水準消毒など、求められる作業は様々である。

これらクリーンアップや除染の成否を判定する指標として、落下菌検査、空中浮遊菌検査、バイオロジカルインジケーターなどを用いた微生物の検出もしくは殺滅の確認を行うことが多いが、この判定方法だけでは不完全となる可能性がある。

そこで、今回はテーマにある適切な環境モニタリング結果を得るために必要な前処理としてのクリーンアップや除染作業について私たちの知見をもとに紹介する。

クリーンアップの目的は清浄度を高めたクリーン環境を作り上げることであるが、その基本的な作業は清掃にあり、先ずは室内の汚れを除去することが重要で、その後の消毒作業の効果にも影響を及ぼす可能性がある。

しかし、この清掃が不十分な場合でも消毒作業後の落下菌検査や燻蒸後のバイオロジカルインジケーター判定では基準を満たしてしまう可能性が高い。

落下菌検査において、この事象が起こり得る原因は単純に実験動物施設の換気回数にあり、1時間当たり10回の換気回数であれば、6分間で室内容積分の空気が殆ど塵埃を含まない清浄空気に置換される。加えて、落下菌検査直前の作業などで室内の塵埃を巻き上げて攪乱していない限りは、検出すべき塵埃（微生物）は既に沈降し、床面に落ちている状態となる。

バイオロジカルインジケーターにおいては、適切な殺菌ガス濃度で適切な暴露時間が条件になるため、対象室内の清掃が不十分であっても陰性となる。

また、微生物汚染や遺伝子組換え生物による汚染に対する除染作業はクリーンアップ作業の手順とは異なり、先ずは高水準消毒を行い、汚染拡大を抑制することが重要である。この除染における成否判定は対象となる微生物の検出になるが、多くはバイオロジカルインジケ

ーターによる 6log 殺菌の担保となる。この担保が得られた後に、施設の使用目的に応じてクリーンアップを行う事となるので、環境モニタリングの捉え方が異なると考えている。

一方、クリーンアップにおいて適切な清掃や消毒を行っていても、施設の経年変化によりコーキングに欠損が生じた天井や壁面の隙間から環境統御が行われていない外気が流入し、落下菌検査で異常検出が生じる事がある。

このように、クリーンアップや除染では微生物学的な判定により成否を決定することが多いが、適切な成否判定を行うには、清掃作業の成否確認として ATP 拭き取り検査、噴霧消毒作業の成否確認として付着菌検査、燻蒸による高水準消毒の成否確認としてバイオロジカルインジケーターやケミカルインジケーターの判定を行う必要がある。これらに加えて施設としての環境モニタリングとして、塵埃測定、空中浮遊菌検査などを組み合わせることが重要と考えている。

[illegible]

第34回東北動物実験研究会実行委員会

委員長	伊藤 恒賢（山形大学医学部 MS 推進研究所動物実験センター）		
事務局長	尾崎 順子（	同上	）
委員	房 知輝（	同上	）
	福田 直樹（	同上	）
	須藤まゆみ（	同上	）
	野原 豪和（	同上	）
	井上 歩（	同上	）