

報告

Pasteurella pneumotropica 感染後の対応について ーソフト酸化水を使用したクリーニング操作の検討ー

長原美樹¹⁾、松永歩²⁾、藤田芳顕¹⁾、上瀬茉美²⁾、石坂みゆき²⁾、上田潤¹⁾、岩本隆司^{1,2)}

¹⁾中部大学実験動物教育研究センター、²⁾中部大学生命健康科学部生命医科学科

1. はじめに

本学の実験動物教育研究センターは2006年から稼働しており、飼育動物種はマウス、ラットである。外部からの動物搬入は、実験動物専門ブリーダーの動物以外は、本学規定の微生物モニタリング検査項目がすべて陰性である動物のみを搬入している。また、定期的な微生物モニタリング検査の実施(年3回)、クリーンエリア内の動線を一方向にする、定期的な清掃消毒を行うなど、施設職員と利用者双方の努力により施設の清浄度を維持してきた。しかし、2013年11月に実施した外部検査機関による微生物モニタリング検査において、*Pasteurella pneumotropica* (以下 *P.p.*)陽性の動物が検出された。昨今、*P.p.* についてはカテゴリD:日和見病原体に分類され^{1,2)}、微生物モニタリング検査項目から除外している施設が多いが、検討の末、本学では *P.p.* を検査項目から除外しないこととした。今回、*P.p.* 感染動物の帝王切開(子宮切断術)によるクリーニングを、消毒液にソフト酸化水^{1,3)}を用いて実施したので報告する。

2. 動物を搬入する際の規定

1) 外部からの動物搬入

搬入可能な動物は、SPF(Specific Pathogen Free)動物^{4,5)}のみとし、実験動物専門ブリーダーの動物以外は、本学規定の検査項目がすべて陰性である動物のみを搬入する。

2) 事前に必要な書類;

- ①微生物モニタリング検査成績書(3ヶ月以内)
- ②遺伝子組換え動物の場合は情報提供書
- ③本学動物搬入用書式

3) 動物は一旦検疫室へ搬入し一定期間飼育する。再検査後陰性であれば、飼育室へ移動する。

3. 感染状況について

表1: *P.p.* 感染状況について

検査日	検査飼育室	感染飼育室	検査結果 <i>P.p.</i> 陽性/検査匹数	検査機関/ 検査方法
2013年 11月19日	4A, 4D	4A	2 / 4	実中研/ 培養.PCR.生化学
2013年 12月3日	4D	4D	3 / 12	実中研/ 培養.PCR.生化学
2014年 1月16日	4D, 2E	4D	5 / 8	本学センター/ 培養.PCR
2014年 1月31日	1A, 2F, 3A, 3D, 3E, 3H, 4A, 4C, 4D	3A, 4A, 4C	3 / 17	本学センター/ 培養.PCR
2014年 2月18日	4D	なし	0 / 2	実中研/ 培養.PCR.生化学

4. 感染後の対応について

- 1) 感染飼育室から施設内の他飼育室および実験室への動物の移動を原則禁止した。
- 2) 感染の発生した飼育室については、職員、利用者共に入室制限をし、4部屋あった汚染飼育室を1部屋に縮小した。空いた部屋については、ラックおよび壁、床を水洗後、ピューラックスおよびソフト酸化水によって消毒した。
- 3) 他施設を利用する利用者があり、ヒトを介しての感染が疑われたため、アンケート調査を実施し、本センターのルール変更を行った。

①他施設を利用した場合は2日間空けてから本学センターを利用すること、②自宅でげっ歯類やウサギを飼育している者は入室を禁止することを明文化した。

4) 汚染動物は、必要な5系統について、帝王切開法により、クリーニングを実施した。

5. 帝王切開法によるクリーニング

当センターには、クリーニングに通常使用するビニー

ルアイソレーター設備がないため、他の飼育室と隔離され未使用であった P2A 感染実験対応の実験室 4F を再消毒し、ビニールアイソレーターの代替と考えて使用した。そしてすべての作業は実験室に設置されていた安全キャビネット内で行った⁴⁾。動物のクリーニング、実験室、飼育室の消毒にはソフト酸化水を用い、既存の器具器材等を使用した。

1) 使用器具および消毒液

・ハサミ[大直剪刀 B-5、小直剪刀 B-12;(株)夏目製作所]

・ピンセット[中 A-5、尖鋭 A-45;(株)夏目製作所]

・動脈クレンメ、3 個/匹 [C-17 溝付;(株)夏目製作所]

・PP 製フタ付き密封容器[3 個/腹;市販品]

・キムタオル、ティッシュ[市販品]

上記は全てオートクレーブ滅菌後に使用した。

・ホットプレート[(株)日伸理化、NHP-M30N]

・ソフト酸化水[(株)OSG コーポレーション、NDH-65KM-H;50ppm で次亜塩素酸ソーダ 200ppm と同等以上の殺菌効果があり、芽胞菌にも低濃度で効果がある。また pH を微酸性にすることにより安全である³⁾。]

2) 手順(動線)

汚染飼育室(4C)で母体から子宮を取り出し消毒後、子宮の入った容器を、パスボックスから清浄飼育室(4F)へ搬入し、帝王切開の蘇生を行った(図 1)^{4,6)}。

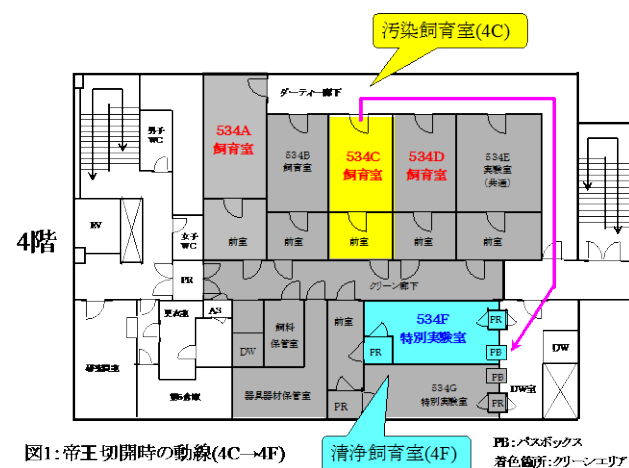


図1: 帝王切開時の動線(4C→4F)

3) 作業手順(方法)

(1) 感染実験室での作業

クリーニング用マウスを交配(-1 日目)、プラグ確認(0 日目)する。妊娠 18 日目の午後(18.5 日目)、汚染飼育室(4C)内で妊娠マウスを頸椎脱臼により安楽死させ、母体体表をソフト酸化水(母体消毒用)で消毒する。母体を消毒液容器から取り出し、開腹、子宮を露出させる。両側の子宮と卵巣の間、膈上部の 3 カ所を動脈クレンメで挟み子宮を摘出する。子宮はソフト酸化水[容器 1]で消毒後、新しいソフト酸化水の入った[容器 2]へ移しフタを閉める。

(2) 汚染室 4C から清浄室 4F への移動

予め 4F パスボックス内へ、ソフト酸化水の入った飼育ケージを入れておき、殺菌灯を点灯しておく。殺菌灯は子宮入り容器を搬入する前に消灯し、4F パスボックス内へ子宮の入った[容器 2]を移動する。[容器 2] をバケツ内のソフト酸化水に浸し、4F の飼育室側から取り出す際に容器を回転させて外装を消毒する(図 2)。



図 2: 飼育室 4F パスボックス内

(3) 清浄実験室 4F での作業

消毒した[容器 2]をパスボックス内のソフト酸化水から取り出し、安全キャビネットへ移す。[容器 2]から子宮を取り出し、新しいソフト酸化水[容器 3]へ移し消毒する。消毒液から子宮を出し、胎児を取り出す(図 3)。体についた血液や羊水、口の中の羊水を慎重に吸い取った後に、37°Cのホットプレート上で蘇生する。蘇生した仔を里親につける。里親の実仔は 1、2 匹残し、他は淘汰する。1 週間程度、定期的に仔マウスの様子を観察する。



図 3: 子宮からの胎児の取り出し

6. 結果

Pp. 感染した飼育室の遺伝子組換えマウス 5 系統について、帝王切開法にてクリーニングを実施し、産仔数と生存数から生存率を算出した(表 2)。

帝王切開に使用した母体数は、系統 A-1 が 5 匹、A-2 が 3 匹、A-3 および B-2 が 1 匹、B-1 が 2 匹であった。

系統 A-1 については、母体 1 匹あたり平均 7.6 匹と産仔数は多かったが生存率は 13.2%と低かった。系統 A-2 は、産仔数が母体 1 匹あたり平均 4.7 匹と少なかったが、生存率は 71.4%と高かった。

帝切仔が離乳後、各ケージの里親を外部機関における微生物モニタリング検査に供したところ、全ての系統で *Pp.*を含む本センター搬入時に必要な検査項目全てが陰性であることが確認できたため、動物は清浄実験室 4F から消毒済み 4A 飼育室へ移動した。移動後、再度実施した微生物モニタリング検査においても、全ての系統の検査結果が陰性であることが確認できた。

表2: 帝王切開により得られた仔について

系統名	産仔数(匹)	生存数(匹)	生存率(%)
系統A-1	38	5	13.2
系統A-2	14	10	71.4
系統A-3	8	6	75.0
系統B-1	16	10	62.5
系統B-2	7	4	57.1

7. 今後について

今回、ソフト酸化水を消毒液として使用した帝王切開によるクリーニング法において、ビニールアイソレーターなどの高価な設備がなくとも、工夫次第で簡便かつ低予

算で汚染動物のクリーニングができることが明らかとなった。しかし、仔の生存率が低いこと、遺伝子組換えマウスのため繁殖が悪い系統もある。今後は、研修で得た技術や情報の収集により、効率良くクリーニングを実施し、必要な匹数が確保された段階で、最終的には汚染動物の安楽死処分をする予定である。

*Pp.*の駆除方法としては、他にフルオロキノロン系抗菌剤であるエンロフロキサシンの経口投与により駆除できたとの報告⁷⁾もあるが、薬剤投与後の追跡調査で、再度 *Pp.*陽性例が確認されたという報告⁸⁾もあるため、本菌の完全な駆除には、抗菌剤の投与だけでは難しく、帝王切開や胚操作によるクリーニングが不可欠であると考ええる。

将来的には、胚操作によるクリーニングの系および胚や精子での凍結融解技術を本センターで確立することを計画している。これによって、継代交配によって起こる突然変異や人為的なミスによる他系統の混入という危険性の回避、微生物感染の防止、動物輸送の際のコスト削減、飼育維持数の縮小などを行えるものと考えている⁵⁾。

謝辞

本研究は中部大学 2015 年度特別研究費助成により実施した。今回のクリーニング操作に関して、公益財団法人実験動物中央研究所 動物資源基盤技術センター後藤元氏をはじめ、多くの方々にご指導、ご協力いただきました。この場を借りて深く御礼申し上げます。

引用文献

- 1) 日本実験動物学会, 実験動物としてのマウス・ラットの感染症対策と予防(2011), アドスリー, 16-25, 78-86, 91-92.
- 2) ICLAS モニタリングセンター, ウェブサイト, http://www.iclasmonic.jp/microbiology/category/category_d.html
- 3) 株式会社 OSG コーポレーション, ウェブサイト, <http://www.osg-nandemonet.co.jp/sanitation/kouka/index.html>
- 4) 日本実験動物技術者協会編, 実験動物技術大系(1998), アドスリー, 209-232, 264-273, 352-354.

- 5) 日本実験動物協会編, 実験動物の技術と応用実践編 (2005), アドスリー, 109, 207.
- 6) 八木健, ジーンターゲットイングの最新技術(2000), 羊土社, 76-77, 205-206.
- 7) 井上吉浩, 他, マウス肺パスツレラ菌感染事故の経過とエンロフロキサシン投与による駆除, 日本実験動物技術者協会 平成 16 年度 奥羽・東北支部プログラム.
- 8) Ueno, Y., *et al.*, (2002) Elimination of *Pasteurella pneumotropica* from a contaminated mouse colony by oral administration of Enrofloxacin, **Exp. Anim.**, 51(4), 401-405.

Title: Correspondence to *Pasteurella pneumotropica* infection: Application of oxidized water for clean-up operation.

Authors: Miki Nagahara¹⁾, Ayumi Matsunaga²⁾, Yoshiaki Fujita¹⁾, Mami Jose²⁾, Miyuki Ishisaka²⁾, Jun Ueda¹⁾ and Takashi Iwamoto^{1, 2)}

Addresses: ¹⁾ The Center for Education in Laboratory Animal Research and ²⁾ Department of Biomedical Sciences, College of Life and Health Sciences, Chubu University, 1200 Matsumoto-cho, Kasugai, Aichi 487-8501, Japan.

Keywords: *Pasteurella pneumotropica*, Specific Pathogen-Free status (SPF), Caesarean section