

[別紙 2]

論文審査の結果の要旨

申請者氏名 滝本 一広

Studies on control measures for viral contamination in a laboratory animal facility

(動物実験施設におけるウイルス汚染の防除対策に関する研究)

実験動物の微生物汚染は動物の健康のみならず動物実験結果に影響を及ぼすことが知られており、実験動物の微生物学的品質は極めて重要である。動物実験では、特定の病原微生物を持っていない SPF 動物の使用が推奨されているが、それを維持する設備や技術がなければ微生物汚染は容易に起こる。実験動物の微生物汚染を防止するための方策、すなわち、微生物学的コントロールには検疫や微生物モニタリング、またそれらで用いられる検査システム、日常の衛生管理など多様な要素が含まれる。加えて、動物実験施設（施設）の微生物学的コントロールは各施設の構造や目的などにより異なり、決して1つの解しか無い類の問題ではない。むしろ、多種多様なケーススタディの知識や技術の積み重ねから最良の解が見出せるものである。本研究は国立感染症研究所（感染研）動物実験施設で申請者が現場の要請に応えるべく行ってきたウイルス汚染の防除対策に関する複数の研究から構成されている。

第 1 章では、バキュロウイルス発現ベクターシステムを用いて作製された組換えリンパ球性脈絡髄膜炎ウイルス（LCMV）核タンパク質抗原を用いた ELISA システムの有用性について検討した。ELISA の抗原は感染性ウイルスを利用することが多いが、実験室や施設の汚染のリスクがあるため、近年組換え抗原の開発が多くなった。組換えバキュロウイルス発現 LCMV-NP を高濃度の尿素で精製し、抗原として用いた。陰性抗原にはポリヘドリン欠損バキュロウイルス感染昆虫細胞溶解液を用いた。本 ELISA では LCMV 感染マウス血清及び非感染マウス血清は、それぞれ全例が抗 LCMV 抗体陽性及び陰性であった。また、LCMV 感染ハムスター、マストミス、スナネズミでも全例で抗 LCMV 抗体が検出され、非感染動物の血清はすべて陰性であった。さらに、これらの結果は蛍光抗体法による結果と一致し、本 ELISA が蛍光抗体法と同程度に高感度かつ特異的であることが示された。本 ELISA システムの確立により、ヒトや実験動物に対する LCMV 汚染リスクを伴わない抗 LCMV 抗体検出系作製に成功した。

Hemagglutinating virus of Japan (HVJ) はマウスの呼吸器疾患の原因ウイルスである。第 2 章では感染研で発生した HVJ 汚染事故の原因究明と HVJ 排除の経緯について詳述し、動物実験に用いられる生物材料の検疫の重要性を示した。感染研の施設内のマウス馴化インフルエンザウイルス株の感染実験が行われているラック内で、マウスが突然死亡した。ラック内のマウスの検査を行ったところ、抗 HVJ 抗体が検出された。消毒・滅菌作業後しばらくして、再度同様の感染実験を行ったところ、再度 HVJ 汚染が発生した。これらの経緯からインフルエンザウイルスが HVJ の汚染源ではないかと疑い、実験に使用した 3 種のインフルエンザウイルス株を用いて検証実験を行った。その結果、インフルエンザ A/Yamagata 株に HVJ が混入していたことが判明した。本ウイルス株の馴化・継代に使用したマウスの HVJ 汚染が原因ではないかと考えられ、また HVJ 汚染インフルエンザウイルス株を抗 HVJ マウス血清で 4 回処理することにより、HVJ 非汚染インフルエンザウイルス株を調整することができた。これ以降、感染研の施設では HVJ 汚染事故は発生していない。

第 3 章では、マウスノロウイルス (MNV) に対する弱酸性次亜塩素酸水 (WAHS) の消毒効果を次亜塩素酸ナトリウム溶液 (商品名: Purelox)、70%エタノールと比較した。30 秒の *in vitro* 反応で、WAHS、70%エタノール、Purelox 希釈液は MNV を不活化した。有機物混入の影響を調べるためにマウス糞便乳剤存在下で MNV の不活化試験を行ったところ、30 秒の反応では WAHS と Purelox 希釈液の不活化作用は限定的だったが、5 分間の反応では十分な不活化作用が認められた。次に、WAHS を飲水としてマウスに与えることによって、マウスからの MNV 排除およびマウスの MNV 感染防御ができるか検討した。MNV 感染 1 週後に飲水を WAHS に変更し 4 週間与え続けたところ、盲腸や糞便から MNV が検出された。マウスに WAHS または Purelox 希釈液を飲用させながら、MNV 感染マウスと同居させたところ、同居 1 週間後には全マウスの糞便から MNV が検出され、飲水として WAHS を与えても MNV 排除および MNV 感染防御ができないことが示された。

これらの成果はいずれも施設における微生物コントロールの有効な技術基盤となるもので、極めて重要な知見である。したがって、これらの研究成果は獣医学および実験動物学の学術上貢献するところが少なくない。よって、審査委員一同は、本論文が博士 (獣医学) の学位論文として価値のあるものと認めた。