

マウス肝炎ウイルス

山田靖子
国立感染症研究所 動物管理室

要 約

マウス肝炎ウイルスは過去のものではない！

1960年代より、日本の実験動物界の先達の諸先生方が、国内 SPF 動物の確立に努力された。その当時の実験用マウスにはマウス肝炎ウイルス (MHV) の感染が高い確率で認められ、MHV は最も排除すべき病原体の一つであった。現在では SPF マウスが普及し、他の SPF 対象の感染症と同様に、MHV も国内の実験動物から排除されるだろうと考えられた。しかし、期待に反して、今だに MHV の根絶に至っていない。国内の実験動物生産業者では汚染の報告はほとんどなく、また管理が行き届いた動物実験施設でも汚染の頻度はかなり低くなっている。一方、微生物モニタリングなどの管理を行っていない動物実験施設では汚染が潜在化している可能性があり、MHV の汚染状況は二極化していると考えられる。

1. ウイルス

MHV はコロナウイルス科に属するエンベロープを有する positive strand 1 本鎖の RNA ウイルスである。ウイルスゲノムは約 30 kb と非常に大きく、7~8 本ある mRNA は nested set というコロナウイルス独特のユニークな構造を持つ。コロナウイルスという科名は、ウイルス粒子表面に特徴的なスパイク状の構造蛋白があり、これが太陽のコロナに似ていることから命名された。2002年に発生した新興感染症 SARS の病原体がいち早くコロナウイルスと同定されたのは、電顕写真でこのスパイクが認められたからであった。構造蛋白は Spike (S), Envelope (E), Membrane (M), Nucleocapsid (N) で、Hemagglutinin-esterase (HE) 蛋白は株によって有無が異なる。非構造蛋白が複数あるが、2つの RNA polymerase が含まれる。

2. 株と病原性

マウス「肝炎」ウイルスという名前から肝臓の病気と思っている人が多いかもしれない。しかし、MHV には多くの株があり、肝臓、脳、腸管など様々な臓器に感染する。病原性に関しても、非常に強いものから弱いものまでさまざまである。強毒なものは微量のウイルスの侵入でも数日で死に至るが、弱毒なものは軽症で経過する。

現在、実験動物で汚染が確認されるのは、主に腸管系に感染するタイプである。このタイプは病原性が弱く、免疫機能が正常な成熟マウスでは不顕性感染が多い。免疫が正常なマウスでは症状や剖検所見が乏しいため、抗体検査で初めて汚染を知ることが多い。しかし、免疫不全マウスでは長期に渡って感染が持続し、衰弱して死に至る。幼仔では下痢を起し、死に至る場合もある。

3. 感受性動物

MHV はマウスにのみ感染する。多くのマウスの系統は MHV に高感受性であるが、SJL は抵抗性である。マウス体内における MHV の受容体は murine carcinoembryonic antigen-related cell adhesion molecule 1 (mCEACAM1) というイムノグロブリンスーパーファミリーに属する蛋白であることが判明している。SJL が抵抗性であるのは、この蛋白が高感受性のマウス系統と異なるため、MHV との結合が著しく低下することによる [1]。

ラットのコロナウイルスは唾液腺涙腺炎ウイルス (SDAV) であるが、抗体は MHV と交差する。MHV の抗原で検出されるラットの抗体は抗 SDAV である。脳に指向性のある MHV 株を実験的にラットに脳内接種すれば増殖は可能であるが、自然界の MHV 感受性動物はマウスに限定される。

4. 感染経路

主に腸管系に感染するタイプは、ウイルスは糞便中に排出され、同一ケージ内の動物に容易に経口感染する。また、筆者は、汚染された糞塊や床敷が飛散することにより、隣接のケージに感染が容易に広がることを経験している。飼育ケージや飼育室空調排気ダクトのフィルターダストから、PCRによりウイルス遺伝子が検出されることも報告されている [2, 3]。

マウス由来材料を接種する動物実験では、MHVに汚染した材料を接種したマウスで汚染が発生する可能性がある。例えば、ES細胞はMHVに汚染されていても細胞変性を起こすことなく持続感染することが報告されているので、汚染に気付かずに接種してしまう事例もあるであろう [4]。

5. 検査法

1) 抗体

MHVの汚染検出方法で最も一般的なのは抗体検査である。免疫機能が正常であれば、感染した動物は1~2週間で抗体を産生し、この抗体はかなり長期に渡って血清中に存在する。血清中の抗体を検出することにより、マウスが感染していたかを知ることが出来る。取りこぼしが少ないので、汚染のスクリーニングには最も有効である。最も一般的なELISA法のキットが市販されている。ELISA法によるスクリーニングで陽性反応を示した場合、蛍光抗体法 (IFA) などで確定診断する必要がある。

2) ウイルス分離

感染初期でまだ十分に抗体が産生されていない動物や免疫機能が不全な動物では、汚染を抗体検査では検出できない。このような場合は、ウイルスそのもの、またはウイルス遺伝子を検出する必要がある。感染性ウイルスを検出するにはウイルス分離を行う。日本ではMHV感受性細胞としてDBT細胞が使われている。MHVが細胞に感染すると細胞同士が融合し巨細胞を作るので、検体をDBT細胞に撒いて巨細胞が出現するか、で判定する。マウスが感染後、感染性ウイルスを検出できる時期と材料は限定されるので、ウイルス分離は汚染検出というより、分離したウイルスをその後の研究に使うということを目的とする場合が多い。

3) PCR

自然感染では腸管系に感染するタイプが多いので、

糞便を材料としたPCRが有効である。プライマーについて、論文 [5] で示したセットは非特異的な反応が出ることがあるので、論文 [6] で示したN蛋白コード領域全域を増幅するセットを推奨する。N蛋白の遺伝子配列を比較することで、株の同定がある程度可能となる [3, 6]。また、MHVはRNAウイルスであるため変異が起こりやすい。汚染が始まってから検出までの期間が短ければ遺伝子配列はほぼ同一であるが、汚染期間が長いと同じ汚染源であっても複数の検体間で遺伝子配列に相違が認められる場合がある。そのような場合は、系統樹を作成すると同一の汚染源であるか、を識別することができる。

4) 病理

肝臓に感染している場合は、剖検時、肝臓に白色斑点の散在が見られ、病理組織で壊死巣及び細胞融合した巨細胞の形成が見られる。腸管に感染している場合は、腸管上皮細胞が融合して巨細胞を形成する。免疫染色により、感染細胞内にウイルス抗原が検出される。

6. 汚染状況

国内の検査施設2箇所 [ICLAS モニタリングセンター、株式会社メルシャンクリンテック環境検査センター (MEC)] から、最近の抗体検査結果を掲載する許可をいただいた。MHV抗体陽性率 (全検査匹数における割合) を2社の比較ができる2006年と2009年について示すと、2006年ICLASの結果:製薬・企業2.8%, 大学・研究所2.7%, MECの結果:1.5%, 2009年ICLASの結果:製薬・企業0.0%, 大学・研究所1.3%, MECの結果:0.4%である。2006年に比べて2009年はMHV陽性率が一段と低下している。2社の検査結果から見る限りではMHVの汚染はほとんどなくなっているように見受けられる。しかし、一部の実験動物関係者からの情報によれば、大学などで管理の不十分な小規模施設で、特に施設間での動物授受や自家繁殖を行なっている場合、MHVの検査を行なうと汚染が摘発されるケースが多いという。また、筆者の施設でも大学からのマウス導入前検査でMHV汚染が発覚した経験がある。国内の汚染状況は、十分な管理を行なっている施設は日常的にモニタリング検査をしていて、そのような施設はほとんど清浄、一方で管理の不十分な施設ではモニタリングを実施していないため潜在的な汚染が多い、という2極化の状況と考えられる。

日本のみならず、欧米においてもMHVは根絶されていない。10年ほど前のMHV陽性率は北米、ヨー

ロッパともに12%程度であった。2009年のデータでは北米1.57% (過去5年間の集計), ヨーロッパ3.25% (過去3年間の集計) となっている [7]。

7. 実験に及ぼす影響と対策

免疫が正常な成熟マウスでは病原性が弱いタイプの自然感染が多いので、汚染があっても構わないという研究者はいるだろう。しかし、MHVに汚染された動物を使用した実験結果の信頼性は確保できるだろうか？多臓器に感染する株の一つであるJHM株を実験的に感染させたマウスでは、免疫反応に影響があることが報告されている [8]。また、感染は容易に広がるため、他の飼育マウス、特に幼仔や免疫不全系統への汚染拡大、あるいは免疫抑制処置による発症の懸念は大きい。管理のしっかりした施設ではMHV陰性が通常概念である。

MHVによる汚染を防ぐ対策は、まずウイルスを施設に入れないことである。導入動物およびマウス由来材料を接種する実験では抗体検査やPCRなどで事前にチェックする。それでも万一汚染が発生してしまった場合、対応は施設の状況によって管理者が判断することになる。汚染が発覚した場合、汚染動物の安楽死処置をすることが多いが、重要なマウスであれば帝王切開や胚の移植で清浄化が可能である。ケージごとの陰圧個別換気システムなどで感染動物を封じ込めることができる施設であれば、飼育管理などの作業手順を強化した上で、実験終了まで飼育を続けることも選択肢の一つである。

国立感染症研究所の病原体等安全管理規程で、MHVの病原体としてのバイオセーフティレベルは2、動物実験を行う場合は他のマウスへの感染を防御するため、アニマルバイオセーフティレベルを3としている。

MHVに対して、通常の消毒薬は十分な効果がある。汚染動物を排除した後の施設のクリーニングはアルコール系、塩素系、過酢酸系など種類の異なった薬液を噴霧することで効果が得られる。

謝辞

情報提供にご協力いただいた久和 茂先生 (東京大学), 國田 智先生 (筑波大学), 笠井 憲雪先生 (東北大学), 池 郁生先生 (理研バイオリソースセン

ター), 高倉 彰先生 (ICLAS モニタリングセンター), 久保村 華子先生 (株式会社メルシャンクリンテック環境検査センター) に深謝いたします。

引用文献

- Hirai, A., Ohtsuka, N., Ikeda, T., Taniguchi, R., Nakagaki, K., Miura, H.S., Ami, Y., Yamada, Y.K., Itohara, S., Holmes, K.V., and Taguchi, F. 2010. Role of mouse hepatitis virus (MHV) receptor mCEACAM1 in the resistance of mice to MHV infection: Study on mice with chimeric mCEACAM1a and 1b. *J. Virol.* 84: 6654–6666.
- 渡辺洋二, 大沢一貴, 宅島めぐみ, 坂本雅志, 佐藤 浩. 2001. ケージダストを使用した新しいマウス肝炎ウイルスモニタリング法の開発—遺伝子検出法の応用—. *実験動物技術* 36: 35–40.
- Oyanagi, M., Kato, A., Yamada, Y.K., and Sato, N.L. 2004. Detection of MHV-RNAs in mouse intestines and in filter dust in mouse room ventilation duct by modified RT-nested PCR. *Exp. Anim.* 53: 37–41.
- Okumura, A., Machii, K., Azuma, S., Toyoda, Y., and Kyuwa, S. 1996. Maintenance of pluripotency in mouse embryonic stem cells persistently infected with murine coronavirus. *J. Virol.* 70: 4146–4149.
- Yamada, Y.K., Yabe, M., Takimoto, K., Nakayama, K., and Saitoh, M. 1998. Application of nested polymerase chain reaction to detection of mouse hepatitis virus in fecal specimens during a natural outbreak in an immunodeficient mouse colony. *Exp. Anim.* 47: 261–264.
- Yamada, Y.K., Yabe, M., Kyuwa, S., Nakamura, N., Takimoto, K., and Urano, T. 2001. Differentiation of mouse hepatitis viruses in animal facilities in Japan by use of nucleotide analysis of the nucleocapsid gene. *Com. Med.* 51: 319–325.
- Pritchett-Corning, K.R., Cosentino, J. and Clifford, C.B. 2009. Contemporary prevalence of infectious agents in laboratory mice and rats. *Lab. Anim.* 43: 165–173.
- Kyuwa, S., Yamaguchi, K., Toyoda, Y., and Fujiwara, K. 1991. Induction of self-reactive T cells after murine coronavirus infection. *J. Virol.* 65: 1789–1795.