

## 医科学研究用サル類の検査とバイオリスクマネジメント

濱野正敬

一般社団法人予防衛生協会 試験検査部

### 要 約

一般社団法人予防衛生協会は1978年に設立された。主な業務は、国立研究開発法人医薬基盤・健康・栄養研究所 霊長類医科学研究センターで医科学研究用サル類の飼育・繁殖育成を行うことであるが、近年では、サル類を対象とした動物技術者や獣医師を外部機関動物施設へ派遣する事業ならびに年に数回、各種講習会や教育セミナーを実施し、啓蒙活動事業も行っている。

もう一つの柱として、予防衛生協会 試験検査部では国内の医科学研究用サル類を飼育する施設より、血液、血清（血漿）、糞便などの検査材料を受け付け、血液一般・血清生化学検査およびウイルス、細菌、寄生虫・原虫の定期的モニタリング検査を実施している。中でもウイルス検査では、日本国内で調整困難な抗原試薬類が必要になるため、我々は1993年にアメリカ Micro Biological Associates 社（現・VRL 社）と業務提携しウイルス検査系の開発を行い、それ以後、本格的にサル類の外部検査受託事業を開始した。

サル類の検査検体を扱う上でバイオリスクを常に意識し、行動することはとても重要である。本稿では、予防衛生協会におけるサル類の検体を取り扱う上での検査の実際とバイオリスク管理について述べる。

### 1. 一般社団法人予防衛生協会の活動紹介

一般社団法人予防衛生協会は、旧・国立予防衛生研究所（予研、現・国立感染症研究所）附属研究施設であった、筑波霊長類医科学研究センター（Tsukuba Primate Research Center; TPRC）での動物管理委託業務を遂行するために1978年4月に設立された。その後、TPRCは国立感染症研究所、独立行政法人医薬基盤研究所、国立研究開発法人医薬基盤・健康・栄養研究所と所属を変え、現在に至っている。

予防衛生協会は1978年に設立されたが、当時予研では、カンクイザルを用いて弱毒生ワクチンの国家検定を行っており、良質なサル類の安定供給が必要とされていた。TPRC設立に当たっては、海外から野生のサルを輸入しなくてはならず、ワクチン検定にはその中でも健康なサルを用いることが必須であった。そのため微生物学的に感染の危険がない安全なサルを選別するためにサル類の健康状態を把握するための検査方法の確立が急務となり、予研と予防衛生協会が各種検査系の開発を行った。中でもウイルス検査を実施するためには抗原試薬類が必要となるが、当時Bウイルスなど日本国内で調整不可能なものをアメリカ Micro Biological Associates 社（現・VRL 社）と業務提携し、ウイルス検査系の開発を進め、確立することができた。一方で、サル類の利用者にも広

く検査サービスを還元する目的で外部検査受託事業を始めることとなった。その後動物愛護の観点からサル類を使用したワクチン検定の規模が縮小され、サル類の使用は医学研究実験用途が主となった[4]。現在、TPRCでは約2,000頭のカンクイザルが飼育され、繁殖や研究に用いられており、毎年約150頭のカンクイザルが生産されている。予防衛生協会 検査部門は、TPRCをはじめとして外部機関からサル類の検査を請け負う委託事業と外部機関からの検査を随時受け付ける受託検査事業の二種類から成り立っている。

まとめると予防衛生協会の主な業務は、TPRCでのカンクイザル、アカゲザルなど医科学研究用サル類の飼育、繁殖、健康管理およびそれらを用いた研究支援事業の他、動物技術者、獣医師を全国のサル飼育施設へ派遣する、派遣事業である。また、2016年からは新規事業として出張健康診断サービスを始め、サル類の定期健康診断に慣れていない研究者等から好評を得ている。年に数回、つくば市内で予防衛生協会セミナー、予防衛生協会講習会、サル類の人形モデルを用いた技術講習会を実施し、サル類に関する取扱いや感染症に関する情報などを提供し、啓蒙活動にも力を入れている。

## 2. 医学研究用サル類の使用状況と検査受託

医学研究用サル類は、感染症、生理学、脳科学、行動学などの分野で広く研究に利用されている。主なものとして、旧世界ザルでは、カニクイザル、アカゲザル、ニホンザルが、新世界ザルでは、マーモセット、リスザルが利用されている。

また、予防衛生協会 試験検査部では全国からサルの検査を受け付けているが、主な利用者はTPRCをはじめとした国公立研究機関の動物管理施設、国公立、私立大学の動物管理施設、製薬など民間企業の動物管理施設である。他に実験動物としてのサル類ではないが、動物園、動物公園、動物病院などからサル類の検査依頼を受けることもある。なお、試験検査部では、一般の個人オーナーから直接の検査依頼は受け付けていない。

## 3. サル類の検体の取り扱いと検査

サル類の検査を実施するに当たり、検査項目に対応して適切な検査材料の提供を受けなくてはならない。予防衛生協会 試験検査部では、ウイルス、細菌、寄生虫・原虫、血液一般、血清生化学検査を実施している（図1, 2）。主な検査材料として、血液や血清（血漿）、糞便、直腸スワブ、膿、尿、臓器小片などが対象となる。また、試験検査部では、検査の概要をまとめた「検査のしおり」を発行しており、その中で検査項目や検査の依頼方法を記載しているので、利用に際しては熟読されたい[1]。

微生物学的モニタリングは、サルコロニーの微生物学的汚染状況を調べるために実施される。検査対象となる病原体は、実験の目的に合わせて選定されなくてはならない。そこで、TPRCではサル類に関する病原体の検査対象カテゴリーを、(A) 人獣共通感染症に関わるもの、(B) サルに対して致死的であり、感染力の強いもの、(C) サルに対して致死的ではない

### ウイルス検査： ELISA (Enzyme-Linked Immuno Sorbent Assay), IFA (Indirect Immunofluorescence Assay), WB (Western Blotting), HI (Hemagglutination Inhibition), PCR (Polymerase Chain Reaction)

- ◆ ELISA: BV, SVV, SRV, STLV, SIV, FiloV, CMV, MV, HEV
- ◆ IFA: SVV, FoamyV, EBV, HerpesV-*Tamarinus*, *Saimili*
- ◆ WB: SRV, STLV
- ◆ HI: MV
- ◆ PCR: SRV



図1 病原体と検査の種類

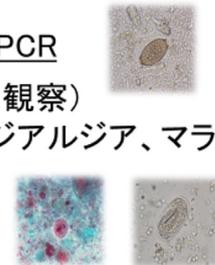
### 細菌検査：細菌培養、性状解析、PCR



- ◆ 赤痢菌、サルモネラ、病原性大腸菌を中心に同定、性状検査を実施する。API system の利用
- ◆ 特異的遺伝子配列をターゲットとしたPCRによる確認検査

### 寄生虫・原虫検査：塗抹、染色など顕微鏡検査、PCR

- ◆ 蠕虫類(鞭虫卵、双口吸虫卵、糞線虫卵などの観察)
- ◆ 原虫類(大腸バランチジウム、腸トリコモナス、ジアルジア、マラリアの観察)、赤痢アメーバ(観察とPCR)



### 血液、血清生化学検査：血球、血清成分解析

図2 病原体と検査の種類

が、発病の可能性があり実験に影響を及ぼし得るもの、(D)病原性はないが、実験の種類によっては日和見感染となるもの、に分類し管理している(表1)[4]。

3-1. ウイルス検査

実験用サル類のウイルス検査は、カテゴリー(A)ではBウイルス(B virus), Filo virus, 麻疹ウイルス(MV), (B)ではサル水痘ウイルス(SVV), ニホンザルが感染した場合のサルレトロウイルス(SRV), マカク属サルが感染した場合のサル免疫不全ウイルス(SIV), (C)ではサルTリンパ球好性ウイルス(STLV-1), ニホンザル感染以外のサルレトロウイルス(SRV), (D)ではサルEBウイルス(S-EBV), サルフォーミーウイルス(SFV), サルサイトメガロウイルス(S-CMV)に分類される。また、新世界ザルではタマリン, マーモセット, リスザルなどで、ヘルペスウイルスタマリヌス・サイミリイ(Herpesvirus tamarinus, saimili)が検査対象に加わる。検査方法として、ELISA, 間接蛍光抗体法(IFA), 赤血球凝集抑制試験(HI)が主となる。さらに、二次鑑別法としてPCRやウエスタンブロットティング(WB)を実施し、確定診断に利用している。S-EBVやSTLV-1は抗原性がヒトの当該ウイルスに類似しているため、ヒト用の診断キットを利用している(図1)。さらに、時間を要し実用的ではないが、それぞれのウイルスに対応した感受性細胞を利用して細胞変性効果(cytopathic effect: CPE)を観察しウイルスの存在を直に確認する、ウイルス分離を行うことも鑑別に有効である。ウイルス遺伝子(DNAまたはRNA)を抽出することに成功すれば、適切なプライマーを用いることでPCRを実施することも可能であるが、迅速な鑑別法としては非実用的であると言える。

3-2. 細菌検査

医学研究用サル類の細菌検査では、赤痢菌, サルモネラ, 病原性大腸菌が主な対象となる。赤痢菌,

サルモネラはカテゴリー(A)に属している。中でも細菌性赤痢は感染症法の三類感染症に指定されており、人獣共通感染症として特に重要である。検査により赤痢菌の感染が確認されたら、サルの所有者は獣医師を通して管轄の保健所に速やかに報告する義務がある[2]。細菌検査では、選択培地を利用した細菌培養が基本となり、更なる性状解析により菌株の同定を行う。また、二次鑑別法としてPCRを実施し鑑別を行っている(図2)。赤痢菌では、プラスミド中の*invE*, *ipaH* 遺伝子を、サルモネラでは、プラスミド中の*invA* およびエンテロトキシン遺伝子を特異的に検出する[5-8]。

なお、人獣共通感染症として重要な結核については、基本的にサル個体へのツベルクリン接種による反応の観察を行う[4]。試験検査部ではP3実験室を備えていないため、結核菌培養等の追加検査は行わない。疑陽性反応が出た場合は、サル個体へのツベルクリン再接種により再検査を実施する。二次鑑別法としてヒトの検査キットであるインターフェロノンγ測定法があるが、サルの分野では検証が必要のため、現時点で試験検査部では採用していない。

3-3. 寄生虫・原虫検査

医学研究用サル類の寄生虫・原虫検査は、糞便中の集卵や糞便の直接塗抹染色後の顕微鏡観察が基本となる(図2)。サル類の寄生虫検査でよく観察されるのは、鞭虫卵, 糞線虫卵, 双口吸虫卵である。寄生虫の寄生によりサル個体から栄養分が失われ、元気消失, 下痢, 削瘦といった症状が現れるため、寄生虫管理は重要である。原虫では、赤痢アメーバ, 大腸バランチジウム, 腸トリコモナス, ジアルジア, マラリアなどが対象となる。感染症法の五類感染症である赤痢アメーバはカテゴリー(A)に、他原虫類はカテゴリー(D)に分類される。サル類では、非病原性とされる赤痢アメーバが自然感染しており、病原性種, 非病原性種の鑑別が肉眼では難しい

表1 サル類における微生物モニタリング対象となる病原体のカテゴリー分類

カテゴリー	ウイルス	細菌	寄生虫・原虫	
A	Bウイルス フィロウイルス 麻疹ウイルス	赤痢菌 サルモネラ 結核	赤痢アメーバ マラリア	蠕虫類
B	サル水痘ウイルス サルレトロウイルス(ニホンザル) サル免疫不全ウイルス(マカク)			
C	サルTリンパ球好性ウイルス サルレトロウイルス(ニホンザル以外)			
D	サルEBウイルス サルフォーミーウイルス サルサイトメガロウイルス		大腸バランチジウム 腸トリコモナス ジアルジア	

ため、PCR を利用した二次鑑別法を行っている。大腸バランチジウム、腸トリコモナス、ジアルジアは日和見感染をし、腸内で爆発的に増殖した場合に下痢を引き起こし、サル個体から栄養などを奪い弱らせるため、日頃のモニタリングが重要である。マラリアは血液塗抹を引き、アクリジンオレンジ染色やギムザ染色を行い、顕微鏡下で観察する。前者は蛍光顕微鏡下での観察となるが、簡便で有効な手技である。

### 3-4. 血液一般・血清生化学検査

実験用サル類の血液や血清の解析は、日常におけるサル個体の健康状態の把握に有効な手段である。血液一般性状や血清生化学検査には自動解析装置が使用され、試験検査部では専門の手技や知識を習得したオペレーターにより検査が実施されている。

## 4. サル類の検体輸送と取り扱い上のバイオリスク管理

サル類の検査検体はバイオセーフティ管理の元、慎重に取り扱われなくてはならない。予防衛生協会

では、検体の輸送に専用輸送箱を用意している。採材された検査材料は、市販の適当な外ねじ式滅菌チューブ類（一次容器）、耐圧、耐衝撃性の密閉性の高いプラスチック容器（二次容器）、発泡スチロール製の箱（三次容器）に収納され輸送される。二次、三次容器に収納される時に吸収紙などを同梱して頂き、万一の材料の漏洩事故に備えている（図3）。また、二次容器は密閉性が高いため、中にドライアイスを入れないように注意喚起している。ドライアイスは二酸化炭素で出来ているので、温度による溶解で気体になり内圧が上昇するため危険である。過去に、他機関での事例だが、検体の入った輸送容器が郵便局の倉庫で破裂し、検体が飛散したという事故も報告されている。

試験検査部の P2 実験室内には、安全キャビネット、オートクレーブなどバイオセーフティ管理上必須となる機器が設置されている。検査材料は実験室内で取り出され、室内の安全キャビネット内で取り扱われる。また、検体を取り扱う検査職員は個人防護具（personal protective equipment: PPE）を身に付け、病原体の暴露に備えている（図4）。



図3 サル類の検体輸送、取り扱い上のバイオリスク管理



検査実験室内では、突発的な事故による検査材料の飛散や暴露に備えるため、個人防護具を着用する。

#### 必要最低限の装備

- 白衣
- ゴーグル
- マスク
- 手袋
- 腕カバー など

いずれも Disposable。使用後、滅菌廃棄する。

図4 個人防護具（P.P.E.）の着用

実験室から出されるゴミや排水にも配慮しなくてはならない。ゴミであるが、実験室内のすべての物はオートクレーブによる滅菌後、専用ペール缶に密閉され室外に出される。ペール缶は鍵のかかる廃棄物倉庫に一旦置かれ、一定量溜まると医療廃棄物として専門業者に引き取られ、処理される。また、排水は屋外にある専用の貯水槽に一時貯められ、一定量に達すると pH 処理消毒装置によって汲み上げられ、消毒後、pH 調整処理されてから一般排水として流される仕組みになっている（図 5）[3]。

検査検体を取り扱う上では、バイオセーフティ管理上のリスクを常に認識しておかなくてはならない。どのような時にどのような危険が考えられるか、検体を取り扱う際に注意が必要である（図 6）。いくつか注意事項を挙げると、検体（血液、血清、血漿、糞便）の入っている容器を開ける際に、材料がふたに付着していることがあり、指に付着することがある。検体（血液、血清、血漿）を収容している一次容器に内ねじ式チューブが使用されている場合、フタの開閉時に検体が滲み出ることがある。糞便の入っている一次容器では、ガス産生菌により内圧が高まっ

ていることがあり、フタを開ける際に材料が飛び出ることがある。実験室内では、PPE を身に着け、安全キャビネット内で検体の処理をする。また、操作時には操作に集中し、緊張感を維持することも重要である。検査終了後、確実に滅菌処理を行い廃棄すること、誤って材料を排水と共に流してしまうことも考えられるため、可能な限り屋外に排水処理装置を設置しておくことも重要である。

### 5. おわりに

医学研究用サル類の検査の実際と検体を取り扱う上でのバイオリスク管理について述べた。一般社団法人予防衛生協会は 40 年以上にわたりサル類を専門に扱ってきた。ウイルス、細菌、寄生虫や原虫類について、サル特有の病原体が存在し、中にはヒトに感染した場合、重篤化するものも含まれている。最近、B ウイルス感染患者の発生が、厚生労働省より公表された。サルの飼育現場はもちろん、検体を取り扱う検査室でも取り扱いには十分注意しなくてはならない。今一度、現場の環境を見直し、バイオ



廃棄物回収用ペール缶



pH処理消毒装置

実験室から出るゴミはすべてオートクレーブ後、ペール缶に入れられ室外に出される。廃棄物倉庫に一時貯められ、業者に引き取られる。排水は、専用の貯水槽に一時貯められ、一定量を超すと装置によって消毒されると同時に pH 調整を受け、一般排水として流される。

図 5 実験室のゴミの廃棄と排水

危害を発生し得るタイミングや状況	考えられるバイオリスク	対策
検体輸送	箱や容器の破損（材料の飛散と暴露）	衝撃に耐えうる容器の利用、漏洩への配慮
検査実施時	容器のふたなどへの付着、容器内圧の上昇（材料の飛散と暴露）	安全キャビネット内での操作、P.P.E.の装着、集中力の維持
検査実施後	検査材料の紛失や容器の破損（材料の飛散と暴露）、排水への混入	P.P.E.の装着、集中力の維持、確実な滅菌処理、消毒槽の設置

図 6 検査室におけるバイオリスクと管理

リスクについて考え、対策を講じて頂きたい。本稿が参考になれば、筆者としては幸いである。

#### 参考文献

1. 一般社団法人予防衛生協会 試験検査部. 「検査のしおり」 <https://www.primate.or.jp/shikenkensa/>
2. 厚生労働省. 細菌性赤痢対策ガイドライン. 1–31. <https://www.mhlw.go.jp/file/06-Seisakujouhou-10900000-Kenkoukyoku/0000155024.pdf>
3. 濱野正敬, 藤本浩二, 北林厚生. 2019. 医学研究用サル類の健康管理と検査環境整備. 実験動物と環境 27(1): 65–68.
4. 吉田高志, 藤本浩二編. 2006. 医科学研究資源としてのカニクイザル—霊長類医科学研究センター 30年の集積—. シュプリンガー・ジャパン.
5. Chopra, A.K., Peterson, J.W., Chary, P. and Prasad, R. 1994. Molecular characterization of an enterotoxin from *Salmonella typhimurium*. *Microb. Pathog.* 16(2): 85–98.
6. Galan, J.E., Ginocchio, C. and Costeas, P. 1992. Molecular and functional characterization of the *Salmonella* invasion gene *invA*: Homology of InvA to members of a new protein family. *J. Bacteriol.* 174(13): 4338–4349.
7. Hartman, A. B., Venkatesan, M., Oaks, E. V. and Buysse, J. M. 1990. Sequence and molecular characterization of a multicopy invasion plasmid antigen gene, *ipaH*, of *Shigella flexneri*. *J. Bacteriol.* 172 (4): 1905–1915.
8. Watanabe, H., Arakawa, E., Ito, K., Kato, J. and Nakamura, A. 1990. Genetic analysis of an invasion region by use of a Tn3-*lac* transposon and identification of a second positive regulator gene, *invE*, for cell invasion of *Shigella sonnei*: Significant homology of InvE with ParB of plasmid P1. *J. Bacteriol.* 172(2): 619–629.