An Attempt of Eradication of Respiratory Diseases in Breeding Mice by Sanitary Improvement of Care

Teruo MAGARIBUCHI*, Taeko FUKUDA, and Kaoru KOSHIMIZU

Division of Animal Research, Faculty of Medicine, University of Tokyo, Hongo, Bunkyo-ku, Tokyo 113, Japan

(Received for publication : April 15, 1981)

An attempt was made to eradicate respiratory diseases developed in about 1,000 mice of 19 congenic inbred strains which were maintained in a mouse breeding room. The contagious diseases with respiratory signs were found to be caused by mixed infections with *Mycoplasma pulmonis* and Sendai virus. The eradication of the diseases was mainly made by sanitary improvement in care of the mice such as intensive disinfection, culling some diseased mice and so on, instead of destroying all colonies. As the result, mycoplasma infection decreased gradually, resulting in a complete eradication about one and half years later and remarkable increases in litter size and weaning rate of mice were obtained. Sendai virus infection failed to be eradicated.

繁殖用マウスの衛生的飼育管理の改善による呼吸器病撲滅の試み

曲淵輝夫・福田妙子・興水 馨

東京大学医学部附属動物実験施設

近年、実験動物の繁殖あるいは実験施設においてバリアシテムなど飼育施設の改善により、感染病を未然に防ぐ努力がはらわれている。しかし、いったん施設内に病原体の侵入をゆるすとその撲滅は甚だ困難であり、コロニーの閉鎖または実験の中止などを余儀なくされているのが現状である。

当施設においてはコンジェニックの近交系マウスが多く使用されているが、1979年1月にこれらのマウスに呼吸器症状を主徴とする感染病が発生した。しかし、貴重なコンジェニック・マウスは入手が困難なため、これらのマウスをすべて淘汰することができなかった。そこで、われわれはマウスの系統維持を続けながらこの感染病を排除することを計画し、徹底した衛生的飼育管理をとることにより清浄化を試みたのでその成績について報告する。

材料および方法

供試マウス：検索に供したマウスは以下に示す19系統のコンベンショナル動物、計1,474匹であった。C3H. SWIg^a (CSW), C3H. SWIg^b (CWB), B10.A (2R), B10.A (3R), B10.A (5R), B10.BR/SgSn, B10.S, A.TH, A.TL, A/Sn, A/J, AKR, BALB/c, C3H/He, CBA, DBA/2N, 129/J, BALB/c×B10.A (3R), CSW×BALB/c。

隔離前の飼育管理：飼育にはアルミニウム製 (17^w×30^d×11^hcm) ケージを使用し、市販固型飼料 CMF, NMF, MF (オリエンタル酵母) および非滅菌水道水を自由に摂取させた。飼育室は面積 21m², 温度 23±1°C, 湿度 55±5% で、平均約1,000匹のマウスが常時

* Present address : Biological Research Laboratories, Sankyo Co. Ltd, No. 2-58, 1-Chome, Hiromachi, Shinagawa-ku, Tokyo 140

繁殖・維持され、これらのマウスの一部を用いて同じ飼育室内で動物実験が行われていた。この飼育室内の入室には特に制限は実施しなかった。

隔離後の飼育管理：1979年の6月末に新しく飼育面積21m²の3室が確保されたのを機会に感染病を排除するため、基本的な衛生管理の徹底に重点をおき飼育環境の整備を実施した。すなわち、1) 温度、湿度は隔離前と同じ条件であるが、系統維持群と実験群を別々の室に完全に隔離した。2) 疾病が疑われるマウスはできるだけ淘汰した。3) 繁殖室の出入りを飼育管理者だけに制限した。4) 入室時には専用の衣服、帽子、手袋、マスクおよびスリッパの使用を励行した。5) 手指の消毒(200倍マイクロカット)、室の消毒(500倍ビューラックス)および清掃を徹底した。6) 殺菌灯(東芝殺菌ランプ10W4個)を作業時以外は常時点灯した。7) マウスの健康状態の観察と記録を徹底した。

分離培地：マイコプラズマの分離用液体培地は、先に報告[9]したように、PPLO broth (Difco) に無菌馬血清を20%, 25% (w/v) イーストエキストラクト(日甜)を10%, 10万単位/mlのペニシリンG(万有製薬)を1%, 2.5% 酢酸タリウム(和光純薬)を1%さらに指示薬として0.2% フェノールレッドを0.5% およびグルコースを0.5%の割合に添加したものを10% NaOHでpH 7.8に調整した。また固形培地は上記液体培地よりフェノールレッドとグルコースを除きBacto agar (Difco)を1.2%の割合に添加した。一般細菌の分離には5%馬血液加トリプティックソイ寒天(Difco)培地を使用した。

分離方法：マイコプラズマの分離には、鼻腔および咽喉頭の粘膜を滅菌スワブによりぬぐい取り、2mlのPPLO brothに接種した。肺は全葉を無菌的に取り出し、病変の有無を肉眼で観察したのち、20倍(v/w)のPPLO brothを加えホモジナイザーで乳剤とし、3,000rpm 5分遠沈後上清0.3mlを10倍段階希釈し前記液体培地2.7mlに接種した。培養は37°Cで7日間行い、pHの変化で培地の色調が黄変した試験管から1白金耳量を固形培地に塗布した。固形培地は湿度を保った条件下で37°C 7日間好気培養を行い、実体顕微鏡によりマイコプラズマ集落発育剤の有無を観察した。一般細菌分離のためには上記材料を直接5%馬血液加トリプティックソイ寒天培地に塗抹接種し37°Cで48時間培養した。

マイコプラズマ株：マイコプラズマは東京大学農学部家畜微生物学教室の尾形学教授より分与を受けた*M. pulmonis* m 53株および*M. neurolyticum* PG 28株

を用いた。

マイコプラズマの同定：m 53ならびにPG 28株に対するウサギ免疫血清を用いディスク法による発育阻止試験[5]によって同定した。

血清反応：*M. pulmonis* 抗体の検索には補体結合(CF)反応を、センダイウイルス抗体の検索には血球凝集阻止(HI)反応を、それぞれマイクロタイター法で実施した。CF反応の抗原は、*M. pulmonis* m 53株の大量培養菌液を9,000rpm 60分遠沈後、得られた沈渣を原菌液量の100倍に濃縮して-20°Cに保存し、使用前に100°C 10分間加熱して使用した。反応はKolmerの変法[14]に準拠した。

HI反応の抗原は実験動物中央研究所の岩井 滋博士より分与をうけたHVJ-MN株感染ふ化鶏卵漿尿液エーテル不活化抗原を用いた。

被検血清は非特異反応を除去するため、Saitoら[12]の方法によりニワトリ血球で処理した後検査に供した。またHI反応に使用した希釈液(PBS)にはニワトリ血漿を56°C 30分加温し、3,000rpm 15分遠沈した上清を1%の割合に加えた。CF反応およびHI反応ともに陽性限界を1:10とした。

産仔数と離乳率：繁殖は雌雄1:1の同居方式で行い産仔は生後18日目に離乳させた。産仔数は出生時確認できた1腹当りの仔数で、離乳率は産仔数に対する離乳仔数の比で表わした。

成 績

1. 疾病の発生状況

1978年の9月から12月の間、繁殖室内マウスについての疾病の検査では、臨床症状および肺の肉眼的病変は認められず、鼻腔、咽喉頭、肺からはマイコプラズマおよび病原細菌が検出されなかった。しかし1979年1月に呼吸器症状を示す個体が発見され、剖検したところ肺の肝変化病変が認められた。鼻腔、咽喉頭、肺の細菌検査の結果マイコプラズマが検出された。

2. 汚染状況

1979年1月から6月までは呼吸器症状が散見され、一部の個体を淘汰した。この期間、主に外見上異常が認められたもの728匹について肺病変の肉眼的観察、肺からのマイコプラズマ分離、*M. pulmonis* に対するCF抗体およびセンダイウイルスに対するHI抗体の検査を実施した。Table 1に示すように肺に肉眼的病変が認められたものは322/728(44.2%)であった。肺病変の大部

Table 1. Detections of gross lung lesion, mycoplasma and antibodies against *M. pulmonis* and Sendai virus in mice from January to June, 1979

Strain of mouse	No. of tested	Gross lung lesion	Mycoplasma isolation	Antibody positive to	
				<i>M. pulmonis</i>	Sendai virus
CSW	103	60	76	9	25
CWB	24	11	23	7	5
B10. A (2 R)	11	7	0	0	9
B10. A (3 R)	10	7	8	6	3
B10. A (5 R)	13	8	1	0	8
B10. BR/Sgsn	4	0	0	0	2
B10. S	19	7	1	0	11
A. TH	7	7	5	1	1
A. TL	7	4	5	0	5
A/Sn	42	34	4	0	13
A/J	23	13	0	5	12
AKR	13	11	0	0	7
BALB/c	25	8	9	2	13
C3H/He	51	11	21	14	44
CBA	289	98	24	21	135
DBA/2N	13	5	12	0	7
129/J	20	11	3	2	3
BALB/c×B10. A (3 R)	29	11	24	0	10
CSW×BALB/c	25	9	18	9	22
Total	728	322 (44.2%)	234 (32.1%)	76 (10.4%)	335 (46%)

Table 2. Isolation rate of mycoplasma from various sites in mice

Site	No. of positive / No. of examined			(%)
Nasal cavity	184	/	728	(25.2)
Oropharynx	141	/	728	(19.4)
Lung	57	/	728	(7.8)

分は一葉または全葉にわたる赤色肝変化病巣で、膿瘍は認められなかった。マイコプラズマは鼻腔、咽喉頭および肺のいずれか1カ所以上から検出されたものを陽性個体とした場合、その分離率は、234/728 (32.1%)であった。そのときの *M. pulmonis* CF 抗体陽性率は76/728 (10.4%)であり、またセンダイウイルス HI 抗体陽性率は335/728 (46%)であった。*Pasteurella* sp., *Corynebacterium kutscheri* およびその他の病原細菌は検出されなかった。

部位別のマイコプラズマ分離率は Table 2 に示すように鼻腔では25.2%、咽喉頭19.4%、肺では7.8%であった。

Table 3. Identification of isolated mycoplasma

Site	<i>M. pulmonis</i>	<i>M. neurolyticum</i>
Nasal cavity	18*	3
Oropharynx	23	3
Lung	13	1
Total	54	7

*: Numbers of strains identified

分離したマイコプラズマのうち61株について発育阻止試験により同定したところ、Table 3 に示すように61株中54株は *M. pulmonis*、残りの7株は *M. neuroly-*

Fig. 1. Sequential changes of detections of gross lung lesions, mycoplasma and *M. pulmonis* and Sendai virus antibodies in breeding mice

ticum と同定された。これらの両菌種は検索したいずれの部位からも分離された。

A) 防除対策前後における汚染度の比較

繁殖群と実験群を隔離し、飼育方法を改善した後も、引き続き繁殖群における疾病の検索を行った。その成績は防除対策前における繁殖群の汚染状況の成績と併せて Fig. 1 に示す。肺病変出現率は、感染が確認された1979年1・2月がもっとも高く12/17 (70%) であり、その後も3・4月は、74/127 (58%), 5・6月は55/86 (63%) と高率であった。しかし、防除対策を開始した1979年6月以降の検査では、7・8月が37/174 (21%), 9・10月が29/96 (30%), 11・12月が13/30 (43%), 1980年1・2月が9/21 (43%) で多少の変動はあるものの防除対策開始前に比べて減少の傾向を示し、さらに同年3・4月には6/141 (4%), 5・6月には23/158 (14%) と減少した。しかし、その後やや増加して7・8月には14/45 (31%), 1981年1・2月には24/81 (30%) であった。

マイコプラズマの分離率は、対策以前の1979年1・2月には16/17 (94%) と高率で、その後85/127 (67%), 22/86 (26%) と多少減少の傾向がみられた。しかし、対策開始後1980年の7・8月までには0/174, 4/96 (4%), 5/30 (17%), 0/21, 1/141 (0.7%), 0/158, 0/45 と極端に減少し、1981年1・2月においてもなお0/81 と陰性であった。

M. pulmonis の CF 抗体陽性率は対策前も全体に高くはなかったが、マイコプラズマが分離されなくなった

1980年5・6月以降は抗体も陰性になり、対策後1年半経過した1981年1・2月の時点でも全く検出されなかった。

Fig. 2 Weaning percent and litter size in breeding mice

センダイウィルの HI 抗体陽性率は経時的に変動がみられた。すなわち肺病変出現率が低いときは抗体の陽性率が高く、肺病変出現率が高いときは抗体陽性率が低かった。

B) 産仔数と離乳率

Fig. 2 に示すように 4 系統のマウスについて産仔数と離乳率を詳細に検討した。産仔数は病気の流行初期には各系統ともに平均約 4 匹であったが、清浄化対策を施してからは徐々に増加し、1980 年 5・6 月になると平均約 7 匹になり、1981 年 1・2 月には CSW, CWB は約 10 匹, B10. A (3 R), B10. A (5 R) は約 8 匹になった。また離乳率は B10. A (3 R) および B10. A (5 R) の 2 系統は 1980 年 5・6 月で 100% に達し、その後継続的に高率であった。CSW の離乳率は流行の初期には 42% とかなり低く、その後一時回復のきざしがみられたが、1980 年の前半には再び低下し、全体的に変動が激しかった。CWB についても初めはかなり変動したが、徐々に回復し 1980 年 5・6 月には 100% になった。

考 察

コンジェニック・マウスの繁殖コロニーにおいて呼吸器症状を主徴とする感染症が発生し、菌および抗体検索の結果、*M. pulmonis* とセンダイウィルスの重複感染によるものであることが判明した。しかしコンジェニック・マウスは入手が困難であり全個体を淘汰し新しい種親を搬入することは実験等の都合上できなかった。そのため感染症防除対策として種親を維持しつつ外見上異常が認められる個体はできるだけ淘汰し、さらに衛生的飼育管理の徹底に重点を置いて飼育方法の改善をはかった。その結果、マイコプラズマ感染に対しては、防除対策前の検査では、94%, 67%, 26% と高率に陽性個体が検出されたが、対策後陽性個体は減少し 1 年半経過した 1981 年 1・2 月の検査では菌分離はもちろん抗体陽性マウスもまったく検出されなくなった。マイコプラズマの感染様式について Atobe ら[1]は ICR 系マウスを用いた *M. pulmonis* の感染実験で接種後 1 年経過した時点においても肺病変および菌の分離が認められ、また CF 抗体についても同様に約 10 ヶ月存続していたと報告している。しかし一方 Brennan ら[4], Nikaido ら[10]の報告のようにマウスの感受性の差あるいは *M. pulmonis* の病原性の強弱によってもその感染様式、病変発現等は異なるものと思われる。今回のマイコプラズマ感染が自然消失したのかあるいはわれわれのとった処置だけ

で消失したのか定かではないが、少なくとも繁殖室内のマウスよりマイコプラズマが消失し、それによって飼育・実験者に衛生的飼育管理の重要性を認識させた事は確かである。

今回の調査では *M. pulmonis* と *M. neurolyticum* の 2 種類のマイコプラズマが鼻腔、咽喉頭、肺より分離された。*M. pulmonis* の肺炎起病性に数多くの報告で明らかにされているが、*M. neurolyticum* に関しては Atobe ら[2]はマウスより分離した株の経鼻接種実験で呼吸器への定着は認められず、肺炎形成と直接的関連はないと記載している。今回、同定した 61 株中 54 株が *M. pulmonis* で *M. neurolyticum* に比べ優位であったことから肺病変形成に関与していた因子はセンダイウィルスともに *M. pulmonis* と考えられる。

マイコプラズマの分離部位は鼻腔がもっとも高く、陽性個体 234 匹中 184 匹 (79%) から検出された。Atobe ら[2]および Saito ら[11]は、鼻腔、気管からのマイコプラズマ分離が口腔、肺などより高率であったと報告している。マイコプラズマ汚染を検索する場合、血清学的検索と併せ、これら部位の菌分離を同時に実施すれば、摘発の効率がよくなると思われる。

センダイウィルス感染はわれわれがとった方法では完全な除去はできず、感染は継続した。Iwai ら[8]は、ICR マウスコロニーのセンダイウィルス感染において離乳マウスや妊娠マウスを感染コロニーから隔離し別の飼育室で管理すると抗体のないマウスが得られたことを報告している。また Saito ら[13]は、ddY マウス繁殖コロニーに発生したセンダイウィルス感染において、ウィルスの排除を試み、感染が確認された時点で 4 週齢以下の離乳仔と哺乳仔を一斉に殺処分し、また新しく生まれた仔と臨床症状を示す種親を淘汰した結果、繁殖コロニーからセンダイウィルスが排除できたことを報告している。われわれは異常個体の殺処分はできるだけ実行したが、ある一定期間繁殖を中止する方法はとることができず、また限られたスペースで多くの系統を維持せざるをえなかったため、センダイウィルス感染の除去ができなかったものと考えられる。

繁殖コロニー内にセンダイウィルス感染が起ると、親マウスによる乳呑みマウスの喰殺が増加し、また妊娠期間の延長、離乳率の低下等のみられることが記載[3, 6, 7, 8]されている。今回、防除対策後における清浄化のひとつの指標として産仔数および離乳率について検討したところ、両者ともに著しく上昇した。このことは飼育環境の改善によるものであろう。

今回の呼吸器病流行における病原体の侵入経路については不明であるが、その推移について考察してみると、はじめに *M. pulmonis* の不顕性感染がマウス繁殖室内で起こり、ついでセンダイウイルスが侵入するとともに病状が顕性化し、爆発的な流行になったものと考えられる。この流行を助長したものは、毎日室内に出入していた不特定多数の実験者による衛生管理面での不徹底さであったことは否定できない。このたび、われわれが経験したマウス呼吸器病の発生は、日常多数の実験者が出入する施設においては常に起こりうる可能性があり、今後とも警戒を怠ってはならないと考える。

要 約

コンジェニック・マウスの繁殖群に呼吸器症状を主徴とする感染病が発生した。そこで、マウスを全群淘汰することなしにこの感染病を防圧するため、徹底した衛生的飼育管理を行いマウスの清浄化を試みた。得られた成績を要約するとつぎのとおりである。1) 呼吸器症状を主徴とする感染病は、*M. pulmonis* とセンダイウイルスの混合感染によることが明らかにされた。2) 徹底した衛生的飼育管理によりマイコプラズマはほぼ完全に撲滅できた。3) センダイウイルス感染は、この方法では完全に排除はできず、感染は継続した。4) 産仔数および離乳率は防除対策実施後著しく上昇した。

本研究において使用したマイコプラズマ菌株の分与を賜った東大農学部尾形学教授ならびにセンダイウイルス株および抗原を分与いただいた実中研の岩井滋博士に謝意を表する。本研究の一部は昭和55年度文部省科学研究費・がん特別研究費 No. 501047 および科学研究費補助金（奨励研究〔B〕）によった。

文 献

[1] Atobe, H., and Ogata, M. (1974). Pneumonitis in mice inoculated with *Mycoplasma pulmonis*: Produc-

tion of pulmonary lesions and persistence of organisms and antibodies. *Jpn. J. Vet. Sci.*, **36**, 495-503.

- [2] 跡部ヒサエ・尾形 学 (1977). マウスからの *Mycoplasma neurolyticum* の分離とその病原性について. *実験動物*, **26**, 301-308.
- [3] Bhatt, P. N., and Jonas, A. M. (1974). An epizootic of Sendai infection with mortality in a barrier-maintained mouse colony. *Amer. J. Epidemiol.*, **100**, 222-229.
- [4] Brennan, P. C., Fritz, T. E., and Flynn, R. J. (1969). Role of *Pasteurella pneumotropica* and *Mycoplasma pulmonis* in murine pneumonia. *J. Bacteriol.*, **97**, 337-349.
- [5] Clyde, W. A. Jr. (1964). *Mycoplasma* species identification based upon growth inhibition by specific antisera. *J. Immunol.*, **92**, 958-965.
- [6] 藤原公策・谷島百合子・田中正志 (1979). わが国におけるマウス・ラットの生産群・実験群の主要病原微生物に対する抗体保有状況. *実験動物*, **28**, 297-306.
- [7] Itoh, T., Kagiya, N., Iwai, H., Okada, O., Takashina, S., and Goto, H. (1978). Sendai virus infection in a small mouse breeding colony. *Jpn. J. Vet. Sci.*, **40**, 615-618.
- [8] Iwai, H., Itoh, T., and Shumiya, S. (1977). Persistence of Sendai virus in a mouse breeder colony and possibility to re-establish the virus free colonies. *Exp. Anim.*, **27**, 17-20.
- [9] 奥水 馨・曲淵輝夫・山本孝史・尾形 学 (1975). 輸入サル類から分離したマイコプラズマの性状. *実験動物*, **24**, 95-101.
- [10] Nikaido, H., and Katagiri, K. (1969). Studies on respiratory infections of mice due to *Mycoplasma pulmonis*: Influence of various factors related to hosts. *Jpn. J. Bacteriol.*, **24**, 579-580.
- [11] Saito, M., Nakayama, K., and Nakagawa, M. (1976). Localization of *Mycoplasma pulmonis* in mice. *Exp. Anim.*, **25**, 265-272.
- [12] Saito, M., Nakagawa, M., Kinoshita, K., and Imaizumi, K. (1978). Etiological studies on natural outbreaks of pneumonia in mice. *Jpn. J. Vet. Sci.*, **40**, 283-290.
- [13] Saito, M., Suzuki, E., Nakayama, K., Matsubara, J., and Nakagawa, M. (1980). An Attempt for eradication of Sendai virus from a mouse breeding colony. *Exp. Anim.*, **29**, 457-460.
- [14] 東京大学医科学研究所学友会 (1971). 補体結合反応. 細菌学実習提要, pp. 256-276. 医科学研究所学友会編, 丸善, 東京.