

生物由来試料等の微生物検査について

大沢一貴¹, 林元展人²

公益財団法人実験動物中央研究所

¹長崎大学先端生命科学研究支援センター比較動物医学分野

²公財) 実験動物中央研究所 ICLAS モニタリングセンター

要約

実験動物にヒトや動物由来の細胞などの移植実験が増加傾向にあり、培養細胞や胚のほか臓器そのもの、さらには脱細胞組織など多様化もめざましい。動物実験施設の管理者として、実験動物や実験実施者・飼養者に加え、これら生物由来試料がSPF動物の微生物汚染のリスク要因となりうるものが徐々に認識されつつある。いっぽう、個別換気ケージの飼育装置が普及し、微生物モニタリング等の検査材料としておとり動物に頼ることに限界が生じている。このような状況で、糞塊片などの生物由来試料が混入する排気系ダストが検査材料として注目され、各飼育装置における検出報告が相次いでいる。高感度の検出法は魅力的ではあるが、検出した場合の準備が欠かせないことはいまでもない。本稿では、細胞の微生物検査結果を紹介することで、今後の動物実験施設の管理計画の参考になればと考えている。

1. はじめに

微生物管理下にある実験動物においては、微生物モニタリングを実施して品質を保証することが一般的である。通常、一定期間おとり動物を設置し、その動物を検査対象とするが、近年、個別換気ケージシステム (Individually ventilated cage-system, IVC-system) を採用する飼育装置が増加し、おとり動物を設置する場所に苦慮することも多い。また、実験動物の健康に影響する可能性のあるものとして、実験動物や実験実施者・飼養者の他に、生物由来試料や環境微生物なども指摘されている。多くの場合、実験動物の検疫及び飼養者への教育訓練等でリスク回避しているものと思われる。今回、検疫の擦り抜けとして問題になり得る、細胞等の生物由来試料や飼育環境の微生物モニタリング用検体として注目されているダストについて解説を試み、国内のサーベイランス結果の一部を紹介することにする。バイオテクノロジー応用医薬品については、国内基準が存在するので、これを拠り所にして判断することも可能かもしれない [12]。

2. 移植用の生物由来試料

実験動物の感染症防止の点で、移植用試料の微生物管理は重要である。動物実験施設の管理者 (以下、施設管理者) は、①関連の管理区域レベルの把握、②由来動物の把握、③微生物混入リスクの把握に努める必要がある。各種生物由来試料が存在するので、特性と問題点を整理する。

1) 臓器の一部

ドナー動物とレシピエント動物が、同じ管理区域に同時に共存し、移植を行う場合は、既存の管理方法で対応可能と思われる。複数の管理区域を行き来する場合、移動中の管理方法 (臨時管理区域の設定) 及び管理レベルが上位の基準に合わせる必要がある。通常、免疫不全状態ないし SPF グレードのマウスやラットを飼養保管する区域は、ヒトの臓器を扱う区域と比較して上位にあると考えられる。

2) 細胞, 細胞シート, 3D 臓器用構造体

細胞を調製・培養する実験室は、管理区域外にあることが多いと思われる。施設管理者は、関連する

管理区域を把握し、培養液等への微生物混入リスクがあることを知る必要がある。微生物の混入リスクは、細胞バンクから購入間もなくの細胞にも包含されている。また、混入リスクは、受容体の有無とは無関係であるので、異種由来細胞を移植する場合にも監視は必要であろう。

3) ヒトを含む霊長類由来細胞

レシピエント動物がコンベンショナルであったとしても、ヒトを含む霊長類に由来する細胞を実験動物に移植する場合、バイオセーフティの視点が不可欠である。施設管理者は、安全を守るべき対象（実験実施者、飼養者、実験動物）及び特定できない病原体を意識することになる。また、一概に実験動物を守るとしても、その範囲は、同ケージ内、同飼育室内、同施設内、さらには施設外の動物にも影響が及ぶ可能性があることを知っておく必要がある。

4) 脱細胞組織

臓器再生の足場として、細胞外マトリックスが応用されつつあり、心臓弁のほか肝臓、血管・気管、皮膚などが知られている。ウイルス受容体がほとんど存在しない可能性はあるが、微生物の混入リスクは包含している。

5) 配偶子や胚

受精卵や胚を卵管・子宮に移植することも多い。適切な管理下であれば経験的に、凍結・融解液が微生物に汚染することはまずないと考えられる。検査対象から外すこともあり得るが、万が一にも仮親・里親の検査結果が陽性（擬陽性）となった場合、原因の切り分けを容易にする意義はあると考える。

6) MAP テスト、RAP テスト、HAP テスト

移植用の生物由来試料を実験動物に接種し、抗体価の上昇を検出する MAP (mouse antibody production)、RAP (rat antibody production)、HAP (hamster antibody production) の各試験法は、今後も必要に応じて実施されると思われる。ただし、本来であれば感受性のある動物種かどうか判明していることが前提となる試験方法であり、感度の点でも自ずと限界がある。未知の病原体の無菌試験を行う場合、重度免疫不全動物ないしヒト化動物を用いるなどして、増殖した病原体を遺伝子検査の方がより高感度の場合もあると推察される。

3. 微生物検査材料としての排気系ダスト

マウスの飼育装置に個別換気ケージシステム (IVC-system) が普及するとともに、従来のおとり動物のあり方が見直されつつある。繁殖群から比較的高週齢の個体を抽出動物とするなどの工夫がされている。一方、排気系ダストから各種病原体の検出報告が徐々に蓄積されてはいるが [2, 3, 4, 5, 8]、IVC 毎に各病原体の検出感度や精度が異なり、負圧型と陽圧型とでは検出された場合の解釈が違はずである。おとり動物の限界に直面し、やむを得ない次善の策として緒に就いたところともいえる。

1) MHV 感染と排気系ダスト

腸管親和性のマウス肝炎ウイルス (Mouse hepatitis virus, MHV) がマウスコロニーに侵入すると、感染性が強く、ケージを超えて水平感染することが知られている [14]。この現象は、多くの MHV 粒子が糞便中に持続的に排泄されることと関係し、この糞便汚染対策が MHV 清浄化の基礎を成している。細かい糞塊片が混入する排気系ダストは、MHV の RT-PCR 検査用検体として多用され、概ね機能しているように思われる [6, 15]。

2) 蟻虫検査とダスト

マウスのネズミ大腸蟻虫 (*Aspicularis tetraptera*) は、マウスやラットの盲腸蟻虫 (*Syphacia* spp) とは異なり、肛門付近に母虫が産卵する特性がないので、腸管内容物や糞便を採取し浮遊法で虫卵を観察することが多い。ある一定濃度のショ糖液では浮遊しない虫卵もあり、より感度を上げるため、PCR 法の併用は効果的かもしれない [10]。環境中の虫卵からの再感染も疑われており、環境モニタリング法のひとつとしても普及する可能性を秘めている [13]。

3) LCMV 感染と排気系ダスト

リンパ球性脈絡髄膜炎ウイルス (Lymphocytic choriomeningitis virus, LCMV) に感染したマウスの飼育ケージダストから検査系の確立を検討したことがある。ウイルス接種量やマウス系統、そしてウイルス分離株によって検出率に一定の傾向が認められず、ネガティブデータとして公表に至っていない。尿や糞に排泄されるとされる LCMV であっても、排気系ダストを検体として用いて PCR 検査をする場合には、検査系の評価が必要である。

4) 排気系ダスト利用の現実的な課題

施設管理者からすると、やや費用が掛かるものの高感度な検出法として魅力的かもしれないが、いざとなると現実的な課題が待ち受けている。すなわち、汚染が検出された後、組織的な対応が可能かどうか問われることになる。飼育装置のクリーニング・消毒法、排気系ダクトのクリーニングをするかしないかの選択、いずれにしても相当の作業量が見込まれる。清浄度がきわめて高く維持されている施設(区域)、あるいは汚染のリスクがほぼゼロの検査項目であれば実用的かもしれない。

排気系ダストの検査結果は、施設の排気に病原体が含まれているかのような誤解を生んでいるとも耳にする。ここでいう排気系ダストは、IVC飼育装置の排気ユニットまでに採取されたものを指しており、さらにその下流にフィルターを備えた空気調和機が存在し、施設の外に病原体が出ないように管理されている。また、PCR陽性は核酸断片の存在を証明しているに過ぎず、ウイルスや蟻虫の空気感染を強く示唆するものではないことも今一度確認しておきたい。

4. 細胞のサーベイランス結果

公財) 実験動物中央研究所 ICLAS モニタリングセンターに検査依頼のあった主な項目を年度毎にまとめた(表1)。依頼件数からは、施設管理者の関心度を窺い知ることができる。さらに、検査結果を表2にまとめた。

1) マウス・ラット由来の細胞

MHV, *Mycoplasma plumonis* (M. p), *Helicobacter hepaticus* (H. h), Sendai virus (SeV), Tyzzer 菌の依頼が順に多く、LCMV, Hantavirus (HTV), *Mycoplasma* spp (M. sp) の依頼も増加傾向にある。

表2より、*Mycoplasma* の検出が継続していることがわかる。その陽性検出率は全検体の約5~6%を推移しており、後藤の報告[11]以降も同様の傾向にある。ブタやヤギなど家畜が保有するとされる種(*M. hyorhinis*, *M. yeatsii*) [1, 7] やヒトに由来すると推定される種が多くを占めるいっぽうで、施設管理者として馴染みのある M. p が検出されていないことは興味深い[9]。細胞培養におけるコンタミナントとしての M. sp の存在が、認知された結果として検査依頼が増加しているのであれば、これまでの取組みの成果といえよう。

2) ヒト由来の細胞

ヒト由来の細胞では、Hepatitis B virus (HBV), Hepatitis C virus (HCV), Human Immunodeficiency Virus (HIV) の3項目に関心が高いようである。HBVについては、陽性検出率が約1~3%であるが、HBVゲノム混入の知られているJHH-7, SNU-475, HuH-1などの細胞の確認検査の意味合いが強い可能性もある。ただ、施設管理者としては、このような培養細胞が存在し、実験動物への移植リスクが内包されていることを十分知っておく必要がある。

3) 長崎大学での細胞検疫事例から

2015年度から、長崎大学でも動物由来の細胞をSPFグレードのマウスやラットに移植する実験計画に限定し、細胞検疫を開始した。この2年半で既に2件の *Mycoplasma* 陽性 (*M. arginini*, *M. hyorhinis*) を確認している。

5. まとめ

細胞などの生物由来試料を移植する実験系は、益々増加し多様化すると予想される。しかも、検出対象となる微生物は、ヒトにとって病原体か環境微生物かの区別すら明確でない場合、あるいは細胞ゲノムに内在性ウイルスとして存在する未知の微生物の場合も想定される。検査系とその検査結果について正しく理解する能力を醸成し、これまでの伝統を受け継いでいくことが欠かせない。

施設管理者は、万能な検査方法が存在しないことを経験的に承知している。検査法がマニュアル化されると、あたかもこの改変は悪で改善の余地すらないかのように思われがちだが、本来であればバリデーションを公表し社会的に評価を受けるまでは提案に過ぎないことを、発表者と読者双方ともに理解していただく必要がある。

ある微生物が検出された場合、排除すべきかどうか議論されることがある。病原性の有無で判断できれば良いが、重度免疫不全動物などの易感染性宿主が施設内で増加すると別の判断基準が必要になる。実験データに影響が生じるかどうかという視点を導入しようとしても、実は「影響するかどうか誰もわからない」ことが多いのかもしれない。そうになると、将来の実験実施者の判断に委ねるしかなく、今を生きている者として可能な限りの微生物情報を提供し、記録として残しておくことが最善の策と考える。メタゲノム解析が実験動物の微生物モニタリングに応用できる時代が到来し、万能な検査方法について再び議論できることを期待したい。

表 1. 細胞の微生物検査依頼件数と主な検査項目

年度	依頼件数			マウス・ラット項目 (PCR)										ヒト項目 (PCR)					
	総数	ヒト	マウス	ラット	その他*	MHV	M.p	H.h	SeV	Tyzzet	LCMV	ECTV	HTV	M.sp	HBV	HCV	HIV	HTLV-1	梅毒
2011	1,059					879	809	480	376	250	31	16	17	68	136	136	149	149	130
2012	1,024					802	650	326	236	171	54	52	20	273	222	225	222	121	120
2013	1,573					1,060	1,010	486	406	333	129	121	30	475	498	498	497	149	145
2014	1,796	1,256	387	15	138	948	903	492	394	281	92	92	28	906	344	344	341	132	127
2015	1,850	1,249	555	16	30	942	816	526	439	346	121	151	19	966	262	345	321	184	131
2016	1,606	1,072	397	7	130	963	795	554	512	443	392	183	222	1,025	477	502	483	316	281

*: 不明も含む, HTLV-1: Human T-cell leukemia virus type 1, その他略称は本文参照.

表 2. 検査結果と陽性判定件数

年度	<i>Mycoplasma</i>						計	HBV
	<i>arginini</i>	<i>hyorhinis fermentans</i>	<i>pirum</i>	<i>orale</i>	<i>yeastii</i>	その他		
2012			49				49	0
2013			116				116	0
2014	18	66	9	2	0	3	98	1
2015	17	67	11	5	7	2	109	4
2016	4	67	1	2	1	0	77	3

参考文献

1. DaMassa, A.J., Tully, J.G., Rose, D.L., Pitcher, D., Leach, R.H., and Cottew, G.S. 1994. *Mycoplasma auris* sp. nov., *Mycoplasma cottewii* sp. nov., and *Mycoplasma yeatsii* sp. nov., new sterol-requiring mollicutes from the external ear canals of goats. *Int. J. Syst. Bacteriol.* 44: 479–484.
2. Kapoor, P., Hayes, Y.O., Jarrell, L.T., Bellinger, D.A., Thomas, R.D., Lawson, G.W., Arkema, J. D., Fletcher, C.A., Nielsen, J.N. 2017. Evaluation of Anthelmintic Resistance and Exhaust Air Dust PCR as a Diagnostic Tool in Mice Enzootically Infected with *Aspiculuris tetraptera*. *J. Am. Assoc. Lab. Anim. Sci.* 56: 273–289.
3. Manuel, C.A., Pugazhenth, U., Leszczynski, J.K. 2016. Surveillance of a Ventilated Rack System for *Corynebacterium bovis* by Sampling Exhaust-Air Manifolds. 2016. *J. Am. Assoc. Lab. Anim. Sci.* 55: 58–65.
4. Miller, M., Ritter, B., Zorn, J., and Brielmeier, M. 2016. Exhaust Air Particle PCR Detects *Helicobacter hepaticus* Infections at Low Prevalence. *J. Vet. Sci. Technol.* 7: 343.
5. Miller, M., Ritter, B., Zorn, J., Brielmeier, M. Exhaust Air Dust Monitoring is Superior to Soiled Bedding Sentinels for the Detection of *Pasteurella pneumotropica* in Individually Ventilated Cage Systems. 2016. *J. Am. Assoc. Lab. Anim. Sci.* 55: 775–781.
6. 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.
7. Switzer, W.P. 1955. Studies on infectious atrophic rhinitis. IV. Characterization of a pleuropneumonia-like organism isolated from the nasal cavities of swine. *Am. J. Vet. Res.* 16: 540–544.
8. Zorn, J., Ritter, B., Miller, M., Kraus, M., Northrup, E., and Brielmeier, M. 2017. Murine norovirus detection in the exhaust air of IVCs is more sensitive than serological analysis of soiled bedding sentinels. *Lab. Anim.* 51: 301–310.
9. 内田立樹, 山本美保, 山本真史, 林元展人. 2017. 培養細胞における *Mycoplasma* 属菌汚染の調査. 第 51 回日本実験動物技術者協会総会 2017 山形大会講演要旨集. 91.
10. 大沢牧子, 久保憲昭, 大沢一貴. 2016. PCR-RFLP 法によるマウス蟯虫の検出について. 九州実験動物雑誌. 32: 13–17.
11. 後藤一雄. 2013. マイコプラズマ属菌. 実験動物ニュース. 62: 37–39.
12. 「ヒト又は動物細胞株をもちいて製造されるバイオテクノロジー応用医薬品のウイルス安全性評価」について (ICHQ5A) 医薬審 329 号 (平成 12 年 2 月 22 日)
13. 藤谷 光, 久保憲昭, 大沢牧子, 山本直土, 山中仁木, 大沢一貴. 2017. マウス導入時検疫における蟯虫検査法の再検討. 第 37 回日本実験動物技術者協会九州支部講演要旨集. 9.
14. 山田靖子. 2011. マウス肝炎ウイルス. 実験動物ニュース. 60: 17–19.
15. 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.