

最近の医学実験用カニクイザルの微生物学的管理を考える

中村紳一郎

滋賀医科大学動物生命科学研究センター

要 約

医学実験用カニクイザルの微生物学的管理は、多くの個体が海外から輸入される点、繁殖母群を得る際の発生工学的なクリーニングが困難な点、集団管理ではなく個体ごとに管理される点などから、げっ歯類の管理とは考え方が大きく異なる。実験用イヌやブタで用いられることがあるワクチンによる管理も利用可能なワクチンに限られ困難である。カニクイザルの海外からの導入には我が国における法定輸入検疫を要し、輸出国および各生産施設の衛生管理状況を完全に知ることは難しく、微生物学的管理における不確定要素が多い。国内施設へ導入してからの管理では、標準的な微生物学的基準が存在せず、各施設で他の国内施設の情報、施設内での試験（実験）内容などを考慮しながら決定している状況である。他種実験動物のような集団管理はできず、個別の定期検診による監視は多くの労力を伴う。また研究トレンドの変化によって配慮すべき微生物も変わる。しかしカニクイザルにはこれらの労苦を上回るインパクトのある研究成果が得られるポテンシャルがある。本稿では最近の、カニクイザルの海外からの導入ならびに国内施設内での管理において、考慮すべきカニクイザル微生物学的管理のポイントと主だった微生物について紹介する。

1. 現状に関する総論

感染症を防ぐための基本的な考え方に動物種を超えた共通点が多いが、医学実験用カニクイザルには、げっ歯類などではあまり考慮することの無い特殊事情が存在する。

まず繁殖施設の問題がある。カニクイザルは繁殖母群を起す際に発生工学的手法を用いないため、コンベンショナルな微生物学的レベルで繁殖母群が維持されることになる。生産拠点は国外であり、感染症法に基づく生産国での輸出検疫、そして日本での輸入検疫が必要である。該当する海外繁殖施設は、農林水産省による許認可を受けてはいるが、我々エンドユーザーには詳細な管理体制がわかりにくい。海外繁殖施設の状況は、カニクイザル輸入を取扱う業者が現地視察を行っており、詳しい。一方で、入手可能な各種情報を総合しても監視しきれない部分があり、海外繁殖施設で抗生物質や駆虫剤が投与されてから輸出され、“擬”陰性となり、我が国へ輸入後に再燃といった事例も存在する。

カニクイザルを国内施設へ導入した後は定期健康診断などにより個体ごとに微生物学的検査を行う

必要がある。げっ歯類のようにおとり動物を用いる検査は経済的な観点から、ワクチンによる感染症コントロールは適用可能なワクチンが少ない（麻疹などヒトとの共通感染症では利用可能なものもあり）点から、それぞれ問題があり、サル類では集団を対象とした微生物学的管理は困難である。検査対象とする微生物項目の標準的基準は存在せず、各機関で考えなければならない。感染症法による監視微生物（エボラ出血熱ウイルスとマールブルグ熱ウイルス）は、国内での感染源は考えにくい除外できる（後述）。そこで重要な人獣共通感染症、またはサルコロニーの中で深刻な拡がりを示す感染症などを重点的に考慮して、サルのヘルペス B ウイルス (BV)、サルバリセラウイルス (SVV)、結核、細菌性赤痢、アメーバ赤痢等は必須項目とし、その他の項目（サルレトロウイルス (SRV)、サル免疫不全ウイルス (SIV)、サル T リンパ球白血病ウイルス、E 型肝炎、サルモネラなど）については、各機関での試験（実験）期間、試験（実験）内容に合わせて必要な項目を選択することが多い。試験（実験）内容によりさらに詳細な検査を検討すべき場合は、血液寄生のフィラリアやマラリア、消化管寄生虫（原虫を含む）などを加える。

細菌、原虫で有効な治療薬が存在し、国内施設間で動物を授受する場合は、各機関の検査項目の差異、試験内容を考慮して導入検査を行うこともある。

さて、誰がどのように微生物学的検査をするか、という点では、カニクイザルを含むサル類の管理は貧弱だ。信頼できる外部検査機関は1機関、一般社団法人予防衛生協会（予防衛生協会）だけである。予防衛生協会が提供しているサービスの内訳は基本的に、ウイルス検査として抗原抗体法をベースにした検査、細菌は培養および抗原同定検査、寄生虫では虫体をより良く描出する染色を施しての顕微鏡検査である。一方で各実験動物施設・機関が自前で検査する場合もあり、結核に対するツベルクリン検査、消化管内寄生虫・原虫に対する直接鏡検などが挙げられる。これらのうち、ウイルスの抗原抗体反応およびツベルクリンに対する生体反応は結果のブレに悩むことがある。その不安定さを解消するには、核酸をベースとしたPCR等による補完検査が必要と思われるが、現状では必要時に自施設で行うか、その分野の専門家に依頼することになる。外部検査機関による二次（オプション）検査が提供されれば、適切な評価への手助けとなるだろう。

最近、抗体医薬品、免疫を介在した創薬などの開発、再生医療の前臨床的評価におけるサル類を用いた評価の中で、病原性の低い日和見感染症に関わる微生物のコントロールが必要となってきた。特に消化管内原虫には検査法の検出限界の問題があり、各機関へ導入された個体には一部、見逃された原虫感染があるかもしれない。治療薬がある場合は薬剤を用いた治療と予防を兼ねた処置も必要となってくる。

このように医学実験用カニクイザルを取り巻く微生物学的管理には、様々な制約がある。次項から、現状で私たちが配慮すべきことは何か、すなわち輸入検査、国内施設導入検査と定期健康診断、試験内容のトレンドと日和見感染症の微生物、といった各作業項目別の概説と、それぞれで注意すべき微生物を示していく。

2. 輸入検査

カニクイザルは、我が国の農林水産省に許可された繁殖施設からのみ日本へ輸出され、日本での輸入検査を経て、法令上の対象となるエボラ出血熱ウイルスとマールブルグ熱ウイルスの陰性個体のみが動物実験施設へ導入される。とはいえ、先方施設での運用の実態は、日本国内からは想像できないことも多い。現地での抗生物質、駆虫薬による一時的かつ

不十分な微生物の排除によって、輸入後に国内で再燃する可能性もあり（例えば細菌性赤痢、サルモネラなど）、また不適切な運用あるいは動線などから生じたと思われる事例もある。輸入検査中に考慮すべき病原体を以下に挙げる。

事例1. イヌジステンパーウイルス（CDV）：2008年に中国から輸入したカニクイザルが法定輸入検査中に突然死、あるいは眼漏、鼻漏、食欲不振、発咳、鼻炎、下痢、発熱、全身性の発疹などを呈した。これら症状は麻疹やイヌジステンパーの症状に類似しており、斃死例からはCDV（CYN07-dV株）が分離された。このCYN07-dVは分子遺伝学的に2006年から2008年に中国のアカゲザルで発生したCDV例と近縁であったため[11]、これらアウトブレイクとの関連がSakaiらによって指摘された[10]。

CDVは麻疹ウイルスと同様にSLAM（Signaling lymphocyte activation molecule, CD150）とNectin4（PVRL4; polio virus receptor like molecule 4）を受容体とする。CYN07-dV株はcanine SLAMに加えて、macaque SLAMにも親和性を示したが、human SLAMとの親和性は低く、ヒトへの感染の可能性は低いと考えられた[10]。

霊長類でのCDV感染報告例は多くはないが、ウイルス株と宿主の組合せ、その他の要因によっては感染成立が起こり得る。なお、世界初のサル類のCDV感染報告は、日本のイヌ施設に近接した場所で飼育されていたニホンザルの例である[13]。（結局、カニクイザルではCDVの感染があり得るのか一文欲しい）。国外のサル生産地でのCDV発生状況、国内においても獣医学的な疫学情報には注意を払いたい。

事例2. E型肝炎ウイルス（HEV）：HEVはマカカ属サル類に対して非病原性だが、感染は成立する非病原性キャリアとなる。ヒトのHEV感染が国内で公衆衛生上の話題になった際、実験動物として使用されているブタ、サル類が媒介する本ウイルス感染の可能性が問題となり、2005年に国立大学法人動物実験施設協議会（国動協）会員校施設での調査が行われた。HEV抗原に対するIgG抗体陽性率は、動物実験施設飼育（20施設）のニホンザル13%、アカゲザル10%、カニクイザル8%だった。一方で、野生由来個体を含む野外飼育ニホンザルの調査では36.2%が陽性、またカニクイザルを生産地別に調べた医科学実験施設でのデータで陽性率は中国67%、ベトナム30%、インドネシアとフィリピン、ならびに国内産は陰性だった[12]。

我が国では、衛生的な管理が行われている医学実験用サル類の飼育管理の中でHEV感染が起こること

は考えにくく、国内の野生サル生息地、海外の生産地で感染する可能性が高い。とすると、カニクイザルの場合、もし海外の生産地で感染しても、1) HEVに感染したカニクイザルは無症状キャリアなので発症もウイルス体内再増殖も起こらず [1]、2) 1回の実験的接種では約30日でウイルスは排出されるという報告があり [1]、3) 国内導入の際に行われる合計60日の法定検疫にて衛生的に管理されるため国内でのHEV再暴露の可能性は無い、などのことから、HEVは検疫期間中に消滅することになる。逆にHEVに対する中和抗体は比較的長期間に渡って上昇を維持することから、生産地での感染の足跡として、導入個体の中にはIgG抗体陽性（ウイルス陰性）個体が存在することがある。このことは、もしサル類のHEV抗体価（特にIgG抗体）が高くても適切な検疫を行えば安全であることを意味している [8]。

事例3. 結核：2014年に生産国の輸出検疫を終えて日本で輸入検疫が行われたカニクイザル32例中9例に結核の陽性または擬陽性事例が報告されている。9例中の7例はツベルクリン反応、菌分離、チールネルゼン反応、ラングハンス型巨細胞を伴う壊死性肉芽腫性炎の病理組織所見が見られたことから典型的な結核症例と判断された [10]。このケースでは明確な臨床症状を認めず、ツベルクリン反応擬陽性になる事例もあり、論文によると、輸出国からの日本への輸出に比較的近い時期に結核菌に暴露した場合、我が国での輸入検疫中に十分な細胞性免疫反応が得られなかったことが理由だろうと推測している。実は本件に関し、Exp. Anim. 誌から気になる報告が出ている [3, 6]。2016年、2017年に中国におけるアカゲザルの結核に関する研究報告である。報告としてまとめる時間を考慮すると、2014年の我が国の報告例と結核感染時期が重複しているように思え、同じマカク属サル類の結核の発生として、何らかの関連性を疑わざるを得ない。日本でも近隣国の感染症の発生情報のアンテナを張っておきたい。

3. 国内施設導入検疫と定期健康診断

我が国の多くの機関は、法定輸入検疫の指定係留施設からカニクイザルを導入することとなる。エンドユーザー施設が指定係留施設と連携を取りながら輸入検疫を行った場合は、検疫期間中に並行して自主検査として、エンドユーザー施設で必要とされる微生物に対する検査が可能である。一方、検査をさらに厳密化したい場合は、施設導入検疫を行う場合がある。例えば、消化管内原虫は法定輸入検疫を含

むそれまでの検査内で、排泄物中の嚢子等虫体が分量でない場合は検出できず、国内輸送や環境変化によるストレスで見いだされる可能性がある。また生産国で抗生物質、抗菌剤を投与されて“擬”陰性となっている個体が、薬効が切れて陽性へ転換する可能性もある。再検査や、あらためて適切な抗菌剤の投与後、十分な休薬期間にて再燃のないことを確認したあと、ようやく国内施設への導入となることもある。さらに施設導入後の試験内容や試験期間を想定し、日和見感染症の微生物検査を加える場合がある。

試験（実験）目的によって飼育期間が長期化する場合は、定期的なモニタリングが必要である。その際、げっ歯類の様なカスタマイズされた方法が存在しないため、個体別に必要なサンプルを採取し、検査項目は自らの機関で判断しなければならない。直接鏡検、ツベルクリン反応、一部の細菌培養検査などは自前で可能であるが、その他の検査項目については予防衛生協会に頼ることになる。SRV以外のウイルス検査はほとんど抗原抗体反応で、陰陽判別が困難なケースに対し、予防衛生協会では二次検査としてのPCR検査等が用意されておらず、擬陽性が出た場合などは判断に苦慮することが多い。

私たちの施設はカニクイザルで、発生工学的技術を用いた疾患モデル動物の開発を行っている。そのため、繁殖母群のカニクイザルの飼育期間は数年を超えることが少なくない。そのため1年に1回程度、定期健康診断を行い、その微生物学的項目にはBV、SVV、結核（ツベルクリン）、細菌性赤痢、サルモネラ、消化管内寄生虫・原虫をあげている。

4. 試験内容のトレンドと日和見感染症の微生物

最近の抗体医薬品・免疫を介在した創薬などの開発では、厳密な免疫学的評価が必要とされる。またiPS細胞への応用を睨んだモデル作製の場合は、移植細胞の生着のために免疫抑制剤が使われる。いずれにおいても、病原性の低い日和見感染症の微生物に対するコントロールが必要となる。消化管内原虫は、検査法による検出限界による見逃しの可能性を考慮し、治療薬がある場合は予防を兼ねた投薬も視野に入れる管理が必要となる。一方で、一部のレトロウイルスやヘルペスウイルスの抗原抗体反応による検査で検出限界以下だった個体が、免疫抑制剤によってウイルスの増殖を招く場合がある。また基本は無症状キャリアとして一般的に感染している病原体が、免疫抑制剤によって何らかの病態の標榜に関係する

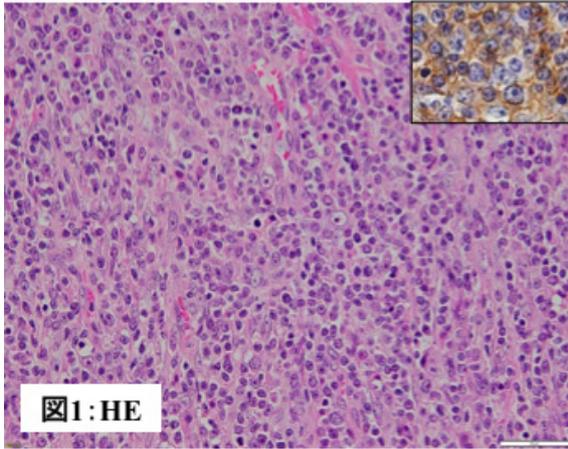


図1 Epstein-Barr ウイルス関与が示唆される、カンクイザルのリンパ腫例。免疫抑制剤を約5か月間投与されたカンクイザルに生じた胸腔縦隔腫瘍のHE染色像。大小不同の円形から多角形の細胞がびまん性に増殖 (Scale Bar; 50 μ m)。腫瘍細胞は免疫染色でCD20陽性のB細胞 (挿入図参照)。

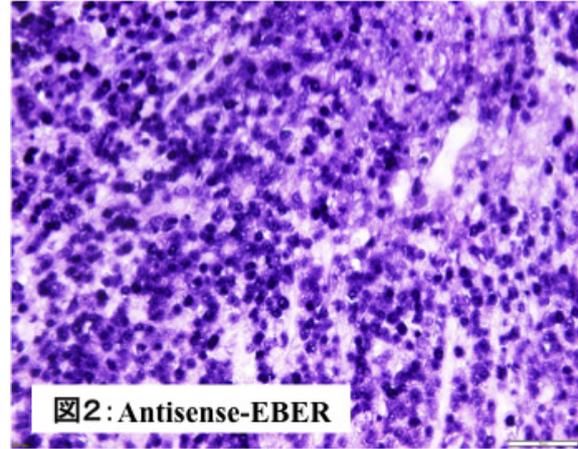


図2 Epstein-Barr ウイルス関与が示唆される、カンクイザルのリンパ腫例。EBV-encoded small RNA (EBER) に対する in situ hybridization (Scale Bar; 50 μ m)。多くの腫瘍細胞が陽性。

こともある。

事例4. 消化管内原虫駆虫の1例 (大腸バラランチジウム): 大腸バラランチジウムの病原性は低いとされ、多くの機関では、導入検疫の検査の対象としない、あるいは陽性個体のみへの駆虫という対応を行っている機関が多いのではないだろうか。

私たちの施設では2011年から2012年の全頭健康診断で大腸バラランチジウムは陰性だったが、2013年から2014年に行った健康診断で、重度の水様下痢を示した1頭に大腸バラランチジウムの濃厚感染が見られ、その後の検査で同室または周囲の飼育室で下痢の有無とは関係なく大腸バラランチジウム陽性個体が多数確認された。現在はパロモマイシン硫酸 (アメパロモ: ファイザー社) を全頭へ投与する予防と治療を兼ねた方法を用い、以後の出現は終息している。排泄されるシストは一般的な消毒薬に抵抗性であるため、濃厚感染に気づかないでいると動物実験従事者が拡散し、結果としてかなりのスピードで蔓延するようだ [7]。

事例5. Epstein-Barr ウイルス (EBV): EBVは、ヒトではホジキンリンパ腫や上部消化器癌の発生の関与が知られている。また移植後リンパ増殖性疾患という、臓器ならびに細胞移植時に免疫抑制剤投与で生じる免疫抑制状態が引き起こす、制御不能なリンパ球増殖性疾患 (特にB細胞) の原因であるこ

とが知られている [2]。

マカカ属サル類ではほとんどの個体が血清EBV抗体陽性であるにも関わらず、病態発生との関連は不明な点が多い。私たちの施設では、免疫抑制剤を必要とする実験操作の中で、ヒトの移植後リンパ増殖性疾患に相当する、全身の腫瘍形成を伴うリンパ腫を2例経験した (未発表データ) (図1)。ともに腫瘍細胞はCD20陽性のB細胞由来で (図1挿入図)、多くがEBV-encoded small RNA (EBER) に対する in situ hybridization で陽性を示した (図2)。両例とも血清EBV抗体陽性だったが、この実験以外で血清EBV抗体陽性カンクイザル2例の脾臓では、EBERは陰性だった。免疫抑制剤を用いる実験の際には、体表リンパ節の腫脹、リンパ球の増殖性変化に注意を払っていただきたい。

5. その他

BVのようにサルからヒトへ感染して問題になる微生物のほかに、実験用サル類の管理の現場ではヒトがサルへうつす微生物が問題になることもある。上述した結核の他に、麻疹もそうである。サル類の微生物学的管理では、BVを排除するために多くの労力が払われ、現在入手可能なほとんどのカンクイザルはBV陰性である。一方で、サルのBVに相当するヒトを宿主とする単純ヘルペスウイルス (HSV) については、筆者も含む多くのサル類実験従事者の

抗体保有状況は全く調べられていないだろう。我々の施設では育仔放棄された仔カニクイザルに対し人工哺育を行うことがある。その取扱いの中で、仔ザルと従事者との接触は一般的な取扱い以上に密になる。密接なサル類との接触が、HSVのサルへの感染のリスクとなることを知っておきたい。

実例6. HSV：主にペットとして飼われているサル類やヒトと濃密に接するサル類（特にマーモセット）でのHSV感染報告が多く、動物実験施設におけるHSV感染成立の可能性は低いが、いったんヒト由来と推定されるHSV感染が成立するとサル類に致死性の脳脊髄炎を起こす[4, 5]。HSV感染はマーモセットからオランウータンまで、霊長類の系統発生の中でも多様に発生しているので、どのサル種でも感染の可能性に注意しなければならない。なお、実験動物として汎用されるマカクザルでの論文ベースの報告例は無い。

また、臨床検査機関などでサル血清のHSV抗体検査を行う際は、他のヘルペスウイルスとの交差性を考慮し、慎重にデータを取り扱うべきである。サル類を扱う動物実験施設では、BVを厳重に管理しているが、HSVの抗体検査をしていないヒトの存在は、サルたちにとって大変な脅威である。

6. 最後に

ここまで公になっているデータと私たちの施設での経験を元に、カニクイザルの微生物学的管理の現状を記してきた。単純にげっ歯類の現状と比べることはできないが、拠り所とする標準的な基準がないことが、現場での管理を困難にしている。げっ歯類では標準的な項目と免疫不全の項目が準備されるように、最近の試験（実験）内容を考えるとサル類でもグレード別の項目が必要かも知れない。またサル類を飼育するためには、ある程度の経済的バックグラウンドが必要だが、情報を表に出しやすいアカデミアの動物施設に大規模なサル類飼育施設が少ないことが、サル類の微生物学的管理に関わる情報の少なさに響いているのかも知れない。民間機関を含めた情報共有があれば、国全体のサル類を用いた研究の質向上に繋がるものとなるであろう。開発途上の試験中には制限も多いと思われるが、ご協力願いたい。

参考文献

1. Clayson, ET, *et al.* 1995. Viremia: fecal shedding, and IgM and IgG responses in patients with hepatitis E. *J. Infect. Dis.* 172: 927–933.
2. Dharnidharka VR *et al.* 2016. Post-transplant lymphoproliferative disorders. *Nat Rev Dis Primers.* 28: 15088.
3. Gong W *et al.* 2017. An alert of *Mycobacterium tuberculosis* infection of rhesus macaques in a wild zoo in China. *Exp Anim.* 66: 357–365.
4. Imura K, *et al.* 2014. Herpes simplex virus type 1 infection in two pet marmosets in Japan. *J Vet Med Sci.* 76: 1667–1670.
5. Kik MJ, *et al.* 2005. Herpes simplex infection in a juvenile orangutan (*Pongo pygmaeus pygmaeus*). *J Zoo Wildl Med.* 36: 131–134.
6. Min F, Pan J, Wu R, *et al.* 2016. Profiling serum antibodies to *Mycobacterium tuberculosis* proteins in rhesus monkeys with nontuberculous Mycobacteria. *Exp Anim.* 65: 11–16.
7. Nakamura S, *et al.* 2019. Paromomycin sulfate is an effective treatment for balantidiasis in captive cynomolgus monkeys. *Exp Anim.* 68: 285–292.
8. Nakamura S, *et al.* 2012. Epidemiology of hepatitis E virus in indoor-captive cynomolgus monkey colony. *J Vet Med Sci.* 74: 279–283.
9. 大江紗希ら. 2018. 輸入カニクイザルにおける結核症の集団発生事例. 日獣会誌. 71: 369–375.
10. Sakai K, *et al.* 2013. Lethal canine distemper virus outbreak in cynomolgus monkeys in Japan in 2008. *J Virol.* 87: 1105–1114.
11. Sun Z, *et al.* 2010. Natural infection with canine distemper virus in hand-feeding Rhesus monkeys in China. *Vet Microbiol.* 141: 374–378.
12. Yamamoto H, *et al.* 2008. Serological evidence for hepatitis E virus infection in laboratory monkeys and pigs in animal facilities in Japan. *Exp Anim.* 57: 367–376.
13. Yoshikawa Y, *et al.* 1989. Natural infection with canine distemper virus in a Japanese monkey (*Macaca fuscata*). *Vet Microbiol.* 20: 193–205.