

## マウスの微生物モニタリングに関する見直し —大阪大学医学部附属動物実験施設の事例紹介—

山田 梓

大阪大学大学院医学系研究科

### 要 約

大阪大学医学部附属動物実験施設では老朽化した施設の一部を改修することを機に、げっ歯類における微生物モニタリングについて見直しを行った。本文ではマウスを例に紹介を行う。SPF 項目及びモニター運用計画（検査頻度、検査方法、検査動物の種類とその飼育期間及び検体数、床敷暴露方法）の2点を中心に見直しを行い、最適化を図った。これにより動物及び実験に影響を及ぼすような微生物が万が一にも混入した際には、より一層それらを適確に検出することを期待する。しかしながら動物に影響しうる微生物を施設内に混入させないことが最も重要であり、そのためには施設職員及び利用者一人一人の高い危機意識と責任感を維持する事が大切であると考えられる。

### 1. はじめに

信頼性の高い実験結果を得るために、適正な微生物学的品質を保証することは重要である。加えて、実験のストレス下にある動物や免疫不全動物等においては感染症の顕性化がより顕著となる事が報告されている [1]。よって不顕性感染の確認も含めた定期的な微生物モニタリングは動物施設における SPF を担保するのみに留まらず、特定の病原体の侵入を早期に発見してその拡大を抑制する手段を考察するためには極めて大事となる。

大阪大学医学部附属動物実験施設では老朽化した一部分を改修し、2022年1月には一新を計った開設を予定している。本文では実験動物として最も多く使用されるマウスを例に、これまで行ってきた従来の取組みと新施設の開設に向けて行った微生物モニタリングの見直しについて SPF 項目及びモニター運用計画の2点を中心に紹介する。

### 2. 従来の SPF 項目

当施設では学生の研究も含め、幅広い研究目的によって様々な実験が行われている。それに伴い豊富な種類の野生型及び変異マウスが利用され、その中には免疫不全動物も多く含まれる。よってこれまでは全ての飼育室を対象に公益財団法人実験動物中央研究所 ICLAS モニタリングセンター（実中研）がカテゴリ化した微生物項目に連動して国立大学法人動物実験施設協議会（国動協）及び公益社団法人日

本実験動物協会（日動協）より示された「定期」[2]及び免疫不全を対象とした「コアセット」[3]項目のうち、*Staphylococcus aureus* / *Pseudomonas aeruginosa* / *Pneumocystis* spp. を除いたものを SPF 項目の基本としていた。更に SPF 項目の設定当時には胚や細胞からの感染の疑いが拭いきれなかった Mouse parvovirus (MVM/MPV) と Mouse adenovirus や、国内でも陽性が検出され、これまでも施設内で陽性歴のあった Murine norovirus の3つを独自に追加した18種類をこれまでの SPF 項目としていた（表 1-a.-SPF）。

### 3. 従来のモニター運用計画

#### （従来）検査頻度及び検査方法

当施設では日本チャールス・リバー株式会社（CRL社）に定期の微生物検査を依頼している。これまでは年1回の頻度でモニター動物を直接送り、MFIA®Assessment Plus セット [4]、セットに含まれない4項目の培養検査、*Helicobacter* 属菌2種の PCR 検査、そして動物解剖と共に各項目の鏡検を依頼していた（表 1-a.-CRL 依頼）。加えて自家で年3回の動物解剖と、口腔スワブ（*P. pneumotropica* 検査用）／血液／盲腸や十二指腸からの内容物／糞便の採取を行って各検査を実施していた（表 1-a.-自家）[5-9]。採取した血液は血清にして CRL 社の MFIA®Tracking セット [4] 及び Tracking セットに含まれない2項目の ELISA 検査を依頼していた。糞便材料を利用した自家での各 PCR 検査は CRL 社に動物を直接送付した際にも行う一方で、外部寄生虫の鏡検等は自家で行って

いなかった。つまり日動協が示す免疫不全動物の「コアセット」項目 (*S. aureus* / *P. aeruginosa* / *Pneumocystis* spp. を除く) のうち培養検査のみの3項目 (*Salmonella* spp., *Corynebacterium kutscheri*, *Citrobacter rodentium*) と外部寄生虫の鏡検は年1回の頻度での検査となり、その他の項目はCRL社への依頼分と自家検査分とを併せて年4回以上の頻度での検査としていた。

#### (従来) 検査動物とその飼育期間及び検体数

6週齢のICRマウスをブリーダーから購入してモニター動物として配置していた。これは免疫不全動物を含む全ての飼育室において同様であった。飼育期間を約半年とするモニター動物を3か月毎に用意し、重複期間を約3か月としていた。この重複期間中における各期間のモニター動物を同じケージ内で同居して飼育する事はなかった。検体数としては各飼育室の飼育装置数に準じ、1飼育室あたり最大3匹のモニター動物を用意していた。同じ期間のモニター動物であっても、それぞれ個別に飼育していた。

#### (従来) 床敷の添加方法

任意のケージより月1回の頻度で使用済み床敷を一定量集め、各モニター動物ケージに添加していた。モニター動物の飼育期間が約半年であったため、計6回の添加作業を行っていた。

#### 4. 新施設開設に伴う飼育装置とケージ及びその収容数の変更について

これまでオープンラック及びオープンケージを基本使用としていたが、新施設では一方向気流型の個別換気ケージに仕様変更予定である。これにより従来では“1飼育室あたり最大500ケージ”であったのが、新たに“1飼育室あたり最大1,000ケージ”となり収容数が約2倍となる予定である。

#### 5. 新SPF項目案

新しいSPF項目としては日動協が示す通常動物及び免疫不全動物対象の各「コアセット」を基本とし、それぞれの項目で管理する飼育室を明確に区分けする事を予定している。免疫不全動物対象の飼育室では、これまでSPF項目としていなかった *S. aureus* / *P. aeruginosa* / *Pneumocystis* spp. と更には平成30年より実中研が「監視項目」とした CAR bacillus (*Filobacterium rodentium*) [10] をSPF項目に追加する事も考えている。

また当施設及び国内におけるここ数年の陽性例を考慮の上、これまで独自に追加していた Mouse parvovirus (MVM/MPV) と Mouse adenovirus はSPF項目の対象外とする。ただし海外からの動物個体導入の際には確認項目としての監視は継続的に行う。Murine norovirus は最近でも国内で陽性が度々報告さ

れている事により、新しい施設でも継続してSPF項目に含める事とする。以上、通常動物対象に14種類、免疫不全動物対象に20種類を新施設のSPF項目とする事を考えた(表1-b.-SPF)。

#### 6. 新モニター運用計画案

4. に示した飼育装置とケージ及びその収容数の変更に加え、5. に示した新SPF項目を考慮して新施設におけるモニター運用計画を以下のように見直した。

##### (新) 検査頻度と検査方法

CRL社に動物を直接送付する頻度を年2回とし、これは国動協のガイドライン [2] にある「定期検査とは6か月に1度以上の頻度で行われる検査を意味している」という記載を参考にした。検査の組み合わせとしては生体試験セット [4] に Murine norovirus 及び CAR bacillus (*Filobacterium rodentium*) 検査の追加を予定している(表1-b.-CRL依頼)。ただし年4回の検査を推奨するガイドラインもある事から [1], 年2回の自家検査を行う事で多くの項目を補う事とする(表1-b.-自家)。自家検査時に得た血清はCRL社に MFIA<sup>®</sup>Tracking セット検査を依頼し、Mouse parvovirus (MVM/MPV) 等といった新SPF項目の対象外の微生物であってもセットに含まれる場合には検査対象とする。

##### (新) 検査動物とその飼育期間及び検体数

通常動物対象の飼育室には4週齢のICRマウスをブリーダーから購入し、免疫不全動物対象の飼育室にはクリーン化した動物やヘテロ型の免疫不全動物等といった免疫不全動物と同じ微生物環境下で管理された動物をモニター動物として配置することを予定している。飼育期間を約3か月とするモニター動物を3か月毎に用意し、重複期間を2週間以上とする。この重複期間中における各期間のモニター動物を同じケージ内で同居して飼育する事は行わない。動物が高齢であるほど抗体検査において結果が疑陽性となる可能性を懸念し、若い週齢での飼育開始を考えた。また飼育開始初期の感染に対して様々な検査法でも一定の感度が得られるような飼育期間を考えた。更には新仕様の個別換気ケージではケージ交換や動物の使用等で蓋を開ける時以外、別のケージ間でエアロゾル等による飛沫感染が発生する可能性はないと想定している事から最短の抗体価上昇期間を考慮して重複期間を設定した。

検体数としては約500ケージあたり3匹のモニター動物を配置して同じケージ内で飼育する予定である。1飼育室最大1,000ケージの収容を想定するため、3か月毎に1飼育室あたり最大6匹のモニター動物を用意する事となる。検査費を考慮して初回検査時には2匹のみを供試し、問題があった場合または追加

表 1 大阪大学医学部附属動物実験施設における SPF 項目とモニター検査頻度及び検査方法

微生物名	*1	a. 従来の運用										b. 新施設での運用 (案)							
		SPF		CRL 依頼					自家			SPF		CRL 依頼			自家		
		検査頻度 [回数/年]		A Plus	培養	PCR	鏡検	Track	ELISA	PCR	鏡検	Track	PCR	鏡検	生体	生体検査に追加	Track	PCR	鏡検
		SPF	自家																
Mouse hepatitis virus	○	✓	1			3		4					✓	2	2				
Sendai virus (HV1), <i>Clostridium piliforme</i> (Tyzzer's organism)	○	✓	1			3							✓	2	2				
<i>Mycoplasma pulmonis</i>	○	✓	1			3							✓	2	2				
Ectromelia virus, Lymphocytic choriomeningitis virus	○	✓	1				3						✓	2					
<i>Salmonella</i> spp., <i>Corynebacterium kutscheri</i> , <i>Citrobacter rodentium</i>	○	✓	1										✓	2					
Pintworms, Intestinal protozoa	○	✓		1						3			✓	2				2	
Ectoparasites	○	✓		1									✓	2				2	
Murine norovirus		✓	1			3		4					✓		2	2			
CAR bacillus ( <i>Filobacterium rodentium</i> )			1										✓		2				
Mouse parvovirus (MVM/MPV)		✓	1			3										2			
Mouse adenovirus		✓	1																
<i>Helicobacter hepaticus</i> , <i>Helicobacter bilis</i>	○	✓		1				4					✓(免)	2				2	
<i>Pasteurella pneumotropica</i>	○	✓		1				3					✓(免)	2				2	
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> , <i>Staphylococcus aureus</i>	○												✓(免)	2					
<i>Pneumocystis</i> spp.	○												✓(免)	2					
Mouse encephalomyelitis virus (TMEV), Reovirus type 3, Mouse rotavirus (EDIMV), Pneumonia virus of mice (PVM)			1			3										2			
その他 7 項目			1																

A Plus : MFIA®Assessment Plus セット, Track : MFIA®Tracking セット, 生体 : 生体検査セット, 免 : 免疫不全動物用飼育室のみ対象, \*1 : 国動協または日動協において「定期」または免疫不全対象「コアセット」に含まれる項目.

の不定期検査が必要になった場合には3匹目を供試する。追加検査が無かった際には、技術及び教育訓練用としての使用を考える。

#### (新) 床敷の添加方法

任意のケージより月2回以上の頻度で使用済み床敷を一定量集め、各モニター動物ケージに添加する。これまでは利用者によってケージ交換が行われていたが、新施設においては施設職員主体で行う予定である。これにより従来の運用では使用済み床敷の集め作業を別途設ける必要があったが、ケージ交換作業中に実施できるようになる。またモニター動物の飼育期間を3か月と計画するため、これまでと同等の計6回以上の添加作業となる。そして1か月あたりの頻度が2回以上に増えた事により、実験が短期間で終了するケージのモニタリングが可能となる。施設職員主体のケージ交換に完全移行すれば、CRL社のPRIA®法を選択肢とする事を次の計画として考えたい[11]。

#### 7. 最後に

以上、2022年の新施設開設に向けてSPF項目及びモニター運用計画の見直しを行った。当施設の改修工事が終了して新施設を開設する際には、胚操作に関する運用も見直す予定である。生殖工学技術を駆使することで外部研究機関からの動物個体の授受や施設内での繁殖において大幅な効率化が生まれると共に、導入動物審査の単純化と汚染リスクの低下及び排除を期待する。また新型のラック及びケージに関しては、既に改修期間中に稼働している代替施設にて利用を開始している。これに伴い幾つかのモニター運用計画案も既に始動しており、概ね問題ない状況である。これから決定するその他の運用と合わせながら、新しい施設でのSPF項目及びモニター運用計画を最終決定していきたい。

またこの度、微生物モニタリングの見直しと共に過去の汚染事例に関する振り返りも行った。適切な微生物学的環境を維持するため、これまで各運用の適正化に向けて多くの検討を重ねてきた。それでも汚染が発生する要因として残るのは個々の慣れによる些細な見落としや注意不足の連続ではないかと考える。特に汚染履歴がある場合にはそれらを風化させない為にも、汚染発生時の情報整理と適切な記録が重要となってくる。これらを材料にして教育訓練等で汚染の経緯やその後の対応について継続的な紹介を行う事により、施設担当者利用者双方における危機意識と各々の責任感を持続させる事が大切であるように思う。

#### 8. 謝辞

本文内において過去10数年前からの状況や設定された運用を述べさせて頂いたが、この度は先人の先生

方の貴重な礎を知る事ができる機会となった。本文作成や情報収集にご協力くださいました中尾和貴教授や田島優先生はじめ、当施設の微生物統御にご尽力頂いております施設職員の皆様方に深謝申し上げます。

#### 参考文献

1. 公益社団法人日本実験動物協会, 2017, 実験動物の感染症と微生物モニタリング, 初版, 1-24, アドスリー, 東京.
2. 国立大学法人動物実験施設協議会, 実験動物の譲受に関するガイドライン, 表1 実験用マウス及びラットの授受における検査対象微生物等について. [https://www.kokudoukyou.org/pdf/kankoku/juju/juju\\_hyou1\\_121221.pdf](https://www.kokudoukyou.org/pdf/kankoku/juju/juju_hyou1_121221.pdf) (Cited: March 17, 2021).
3. 公益社団法人日本実験動物協会, 実験動物生産関連, 微生物モニタリング, 微生物モニタリング日動協メニューの改定. [http://www.nichidokyo.or.jp/pdf/production/monitoring\\_3.pdf](http://www.nichidokyo.or.jp/pdf/production/monitoring_3.pdf) (Cited: March 17, 2021).
4. 日本チャールス・リバー株式会社, RADS Catalog. [https://www.crj.co.jp/cms/crj/pdf/service/rads/RADS\\_Catalog\\_2020.pdf](https://www.crj.co.jp/cms/crj/pdf/service/rads/RADS_Catalog_2020.pdf) (Cited: March 17, 2021).
5. Nozu R, Goto K, Ohashi H, Takakura A, Itoh T. 1999. Evaluation of PCR as a Means of Identification of *Pasteurella pneumotropica*. *Exp. Anim.*, 48(1): 51-54.
6. 田島 優, 林 貴代, 鍵山壮一郎, 黒澤 努. 2003. SPF室で検出された *Pasteurella pneumotropica* 菌株の由来. *Laboratory animal and environment*, 11(1): 60-63.
7. 小谷祐子, 太田晶子, 小沢康彦, 愛原勝巳, 河合澄子, 鍵山壮一郎, 田島 優, 黒澤 努. コンベンショナルマウスから検出されるMHV N蛋白遺伝子塩基配列の多様性. 2010. 関西実験動物研究会第108回研究会.
8. Tajima M, Kotani Y, Kurosawa T, Miyasaka M. A Pitfall in Mouse Norovirus (MNV) Detection in Fecal Samples Using RT-PCR, and Construction of New MNV-Specific Primers. 2013. *Exp. Anim.* 62(2): 127-135.
9. Goto K, Ohashi H, Takakura A, Itoh T. Current Status of *Helicobacter* Contamination of Laboratory Mice, Rats, Gerbils, and House Musk Shrews in Japan. 2000. *Current microbiology*, 41: 161-166.
10. 公益財団法人実験動物中央研究所, ICLAS モニタリングセンター, 監視項目の設定について. [https://www.iclasmonic.jp/topics/check\\_list.html](https://www.iclasmonic.jp/topics/check_list.html) (Cited: March 17, 2021).
11. Yamada A, Yamamoto E, Morii K, Koyama H. Detection study of *Corynebacterium bovis* and *Staphylococcus aureus* using bedding material and exhaust air filter samples from rooms for laboratory rodents. 2020. *J. Exp. Anim. Technol.*, 55(2): 45-56.