

## 免疫不全動物の感染症と微生物学的管理

中村紳一郎<sup>1</sup>

田中美有<sup>2</sup>

<sup>1</sup> 麻布大学獣医学部実験動物学研究室

<sup>2</sup> 大阪公立大学獣医学部獣医病理学研究室

(実験動物ニュース 2024 Vol. 73 No. 4, p. 141-143.)

### 1. はじめに

実験動物感染症対策委員会では、総会毎にシンポジウムを企画している。課題は委員会内で討議し、新しい感染症の情報、動物種に則した感染症情報、過去アウトブレイクの振り返り、など様々な側面からトピックを取り上げている。第71回日本実験動物学会総会（2024年5月30日）では「免疫不全動物の感染症と微生物学的管理」と題しシンポジウムを行った。本シンポジウムにおいて、各演者から免疫不全動物を適切に飼育管理するための有用な情報が提供されたので、その概要を報告する。

現在、多様な免疫不全動物、特にマウスとラットが開発され、がん細胞、幹細胞等の移植、感染症研究などに用いられ、多くの施設で汎用されている。一方で、免疫能を欠くため易感染性であり、各系統の特徴、実験内容と期間などを考慮するとともに、日和見感染などが起こらないように厳密な管理を実施することは、研究のために利用する立場、現場での飼育管理する立場、いずれであっても必要なことである。このことから、すべての従事者への情報提供のため、第71回総会・シンポジウムの課題として取り上げた。免疫不全動物（げっ歯類）の総論、感染事故の事例報告、新しい日和見感染症、微生物モニタリング、適切な飼育管理について、それぞれの専門家に講演していただいた。

### 2. 免疫不全動物の歴史・開発・応用

高橋武司（公益財団法人実中研）

免疫不全マウスの総論として、開発の歴史、応用について実中研での事例を軸に講演していただいた。免疫不全動物とは何らかの遺伝子異常によって免疫が正常に機能しない動物のことで、古くから知られるヌードマウス、*scid* マウスなどは、それらの原因遺伝子が知られる前から免疫学、がん研究、移植研究で用いられ、学問の発展に寄与した。1980年代には分子生物学の進歩によってES細胞を用いた遺伝子の相同組換えによるマウスの遺伝子破壊技術の開発

により、免疫不全マウスの網羅的作製とも言える状態が引き起こされた。血球系、免疫系に関わる様々な遺伝子が同定され、それらが破壊された多種多様な免疫不全マウスが作製され、一部は重篤な免疫不全症状の表現型を得た。この中で特に、X-SCID（X連鎖重症免疫不全症）の原因遺伝子であるIL-2受容体 $\gamma$ 鎖欠損マウスでは、ヒトの病態を模倣し、B細胞欠損、T細胞機能不全、NK細胞欠損している。さらにNOD-*scid*にIL-2受容体 $\gamma$ 鎖欠損を併せ持つNOGマウスを開発した。B、T、NK細胞の欠損、樹状細胞、マクロファージの機能低下、補体反応の欠損、SCIDマウスでは加齢に伴って発生する機能性B、T細胞のLeakinessを認めないなど、他の系統よりも重度の免疫不全の表現型を示している。その結果、従来は生着が難しかったヒト正常細胞、血液・免疫細胞の再構築、マウス肝臓のヒト肝細胞への置換などが可能となり、ヒト化マウスとしての応用の幅が広がった。今後、遺伝子操作の改良によって、より免疫不全度の更新した系統が開発され、再生医療、医薬品開発への応用が進むと考えられる。

### 3. 免疫不全マウス飼育室で発生したニューモシチス感染事例

中村紳一郎ら（麻布大学獣医学部・滋賀医科大学動物生命科学センター）

RAG2欠損マウスが飼育されていた免疫不全マウスの飼育室で発生した*Pneumocystis*感染アウトブレイクの事例と飼育管理に関わる問題点についての報告である。RAG2欠損マウスは陽圧SPF飼育室で陽圧一方向気流ラック内にて自家繁殖されており、ケージ交換を含む飼育管理は利用者が週に一度行っていた。微生物モニタリングはBALB/c *nu/nu*, BALB/c *nu/+*, C57BL/6Jを各4匹ずつ設置し、2匹を3か月、2匹を6か月目に外部委託検査する予定だった。3か月の検査予定日前からRAG2欠損マウスの死亡例が散発し、6か月の検査予定日を前にした5か月の時点で、BALB/c *nu/nu*に死亡例と著しい消瘦による人道的エンドポイント該当例が確認された。

いずれの死亡例も塗抹標本、PCR または病理組織学的検査にて *Pneumocystis* 陽性となった。*Pneumocystis* の蔓延には施設のハードウェア、飼育管理の手法（床敷き換えのスキップ、産子離乳の遅延）の問題が考えられ、生殖補助技術による微生物クリーニングで実験を再開した後も再発した。最終的に3回目の微生物クリーニング直後、人事異動で主たる利用者が別の研究者に変わってから、発生は起こらなかった。

アカデミア施設では、飼育管理手法が研究室あるいは個々の研究者によって異なることが多々あるが、免疫不全動物の管理においては、施設管理者または実験動物管理者が適切な飼育方法などを利用者へ教育した上で飼育に関与させるなど、介入が必要である。その他にも、飼育室、ラック共に陽圧環境では、飼育室外に向けて微生物が大量に拡散される点（飼育室、ラックのより適切な気流方向）、微生物モニタリングマウスが微生物に曝露されるまで5か月も要する点（困動物の感度）は、いかに改善すべきか、など議論された。

#### 4. 免疫不全ラットにおける

##### ラットポリオマウイルス2 感染症

田中美有（大阪公立大学獣医学部獣医病理学研究室・京都大学大学院医学研究科附属動物実験施設）

Polyomavirus (PyV) の発生時における、原因微生物の同定に至るまでの事例を詳細に報告していただいた。PyV は幅広い動物種に感染し、哺乳類の PyV の多くは不顕性感染症を引き起こす。本講演では、2016年に新たに同定された、免疫不全ラットにおける Rat Polyomavirus-2 (RatPyV2) 感染症の臨床徴候、病変（解剖所見・病理組織学的所見）、診断方法、日本における感染状況などについての知見が紹介された。

RatPyV2 の発見は、米国の X 連鎖重症複合免疫不全症ラット (XSCID-TALEN ラット) コロニーにおいて、呼吸異常を呈する個体が出現したことに端を発する。微生物学的検査で *Pneumocystis carinii* (*P. carinii*) 陽性が確認されたが、*P. carinii* 清浄化後にも呼吸異常や繁殖障害を呈する個体が出現したため、肺の病理組織学的検査を実施したところ、ウイルス感染症が示唆された。その後、Rigatti らの詳細な病理学的検査・ウイルスゲノム解析・系統樹解析により、RatPyV2 が同定されるに至った。国内においても、京都大学で維持されていた XSCID-TALEN ラットコロニーを中心に、演者が RatPyV2 感染症例の詳細な病態解析や PCR 検査を実施し、その詳細を報告した。RatPyV2 は “epitheliotropic (上皮親和性) polyomavirus” であり、唾液腺（中でも耳下腺）に対する親和性が特に高いため、RatPyV2 感染症が疑われる際には、耳下腺を含む唾液腺組織またはハーダー腺組織を用いた PCR 検査が必須である。演者らは、

迅速で正確、簡便、低侵襲な PCR 検査法として、唾液検体（口腔内スワブ）を用いた FTA-Amp 法 (FTA カードと Ampdirect バッファーを用いた PCR) を確立している。また、日本の免疫正常ラット系統コロニー中にも、RatPyV2 不顕性感染個体が一定の割合で存在することが情報共有され、免疫不全ラット系統の作出、ラットを用いた免疫抑制処置を要する研究や毒性試験などの実施の際には注意が必要である旨が周知された。

#### 5. Murine Chapparovirus (MuCPV)

##### —免疫不全マウスに腎疾患を引き起こすウイルス

丸山 滋（ジャクソン・ラボラトリー・ジャパン株式会社）

免疫不全動物の飼育管理の際、新たな日和見感染症の微生物には、常に注意を払うべきである。近年、実験動物の日和見感染の微生物として正確な情報が知られるようになった MuCPV (別称 Mouse Kidney Parvovirus (MKPV)) に関して報告していただいた。ただし MuCPV は海外由来マウスのヘルスレポートでは目にするところがあるが、国内のレポートで目にするのは少ない。しかし、40年以上前から知られていた腎尿管上皮細胞の核内封入体形成の起因となるウイルスが、実は MuCPV であることが2018年に改めて報告された。免疫機能障害の程度に応じ、封入体腎症、尿管変性・壊死など様々な症状を呈し、重篤例では腎不全で斃死することもある。尿や糞中に排泄されたウイルスによる水平感染が主な感染経路であり、哺乳中に産子へ感染するケースが多いが、母乳や胎盤を介した胎子への垂直感染はないとされている。また免疫正常動物での感染では、ウイルスに曝露して検出されるまでに要する時間が十数か月と長く、微生物モニタリングで検出するならば、ルーチンの方法とは異なる手法が必要となる。海外ではオーストラリア、北米の施設では報告があるが、日本での報告はない。一方、飼育現場では時代と共に、より程度の高い免疫不全動物を管理する状況にあり、日本では発生していない海外の日和見感染症微生物の情報を視野に入れる必要がある。

#### 6. 免疫不全マウスの微生物学的品質管理

林元展人（公益財団法人実中研 ICLAS モニタリングセンター）

免疫不全動物は易感染性であり、厳密な微生物学的管理が要求される飼育維持、微生物モニタリングの背景にある考え方、実際の感染症例を報告していただいた。重要な2つの視点として、「微生物を捕まえる能力」と「微生物を増殖させる能力」が取り上げられた。前者は免疫不全動物の免疫不全の程度が大きく関連し、環境中のあらゆる微生物が偶発的に感染し、病変を形成する可能性を示している。後者

は疎かにされがちな視点であるが、免疫不全動物の体内で微生物が著しく増殖すると、周囲への感染源となり、ひいては感染の急激な拡大の可能性を示している。実中研 ICLAS モニタリングセンターでの実例として、マウスの系統と発生しやすい日和見感染症の組み合わせ (*Pneumocystis muria* / Rag2 KO マウス, *Staphylococcus aureus* / MyD88 KO マウス, *Staphylococcus sciuri* · *Corynebacterium bovis* · *Helicobacter* MIT-016451 / NOG マウス) の実例をふまえて、それぞれの微生物の病態を紹介していただいた。さらに重度免疫不全動物である NOG マウスでの感染事故を防ぐための飼育に関わる注意点、バイオマテリアル使用実験におけるマイコプラズマの陽性率について報告していただいた。

## 7. 日本クレアにおける重度免疫不全マウスの

### 飼育管理について

西脇 恵 (日本クレア株式会社)

免疫不全動物を生産するブリーダーは、各種実験動物施設の中でも最も厳密な飼育管理体制を施しており、各研究施設での運用の参考にしていただく意味から、その取り組みを紹介していただいた。日本クレア株式会社富士山生育場では重度免疫不全の NOG マウス、さらに重度の免疫不全を示す次世代 NOG マウス、そして NOG マウスにヒト幹細胞を移植したヒト化マウスを生産している。

これらを安定・安全に生産するため、飼育室内に病原微生物を持ち込まないように物品の滅菌、飼育者の入退室・動線管理を厳密にしている。原則としてオートクレーブ滅菌後の物品を持ち込むが、高圧高温に不溶性の物品は過酸化水素ガス滅菌を施し、持ち込んでいる。いずれの滅菌法も使用できない、ヒト化マウス等を作製するために必要な細胞は、提供元施設の清浄度と微生物レベルを調査、微生物検査成績書の確認、さらに *in vitro* での無菌検査などを経て、施設への受け入れ可否を判断する。

飼育管理の従事者は、以前は温水シャワー浴後に個人用防護衣 (PPE) を着用していたが、現在はシールドシステム (頭部を含む全身を覆う PPE を着用、PPE 内へフィルター濾過空気を供給) を採用し、従事者の常在菌などが飼育室内へ曝露しないようにした。

安定した飼育環境を維持するための空調管理・差圧の設定のために導入された、露点浴式空調機である AQUA-CLEAN 空調システムのメリットを紹介いただいた。一般的に外気を実験動物施設へ給気する際、最初に粗フィルターなどで塵埃を除去し、熱交換システムで適切な温度調整を行う。一方、AQUA-CLEAN では水を用いることで外気温の影響を受けづらい為、熱交換効率が高く、塵埃の除去効率が高く、この工程後の中性能または HEPA フィルターの寿命が延長し、さらに脱臭効果がある、といったメリットを有する。

以上のような設備投資が必要な厳密な管理は、一般的な研究施設での導入が困難であるため、同社でも採用している、新しい免疫不全動物用飼育室を提案していただいた。一般居住空間、一般飼育室の空調であっても、bioBubble, AQUA-CLEAN 空調システム、IVC ラックを組み合わせることで、大規模な施設改修を行わずとも、重度免疫不全動物を長期間、安定かつ安全に飼育する実績を得ている。

## 8. まとめ

免疫不全動物を適切に飼育するためには、使用する各系統の特徴 (免疫不全の程度、感染しやすい微生物) を知り、最善の飼育方法を理解した上で、それぞれの実験動物施設にアレンジした最良の SOP 等を設定する必要があるだろう。また、施設管理者と利用者との間には免疫不全動物に対する相互理解が必要であり、利用者への適切な教育体制を構築すべきである。また微生物管理においては、実中研 ICLAS モニタリングセンターで提供している免疫不全コアセットを実施することは必須だが、飼育する動物に応じて飼育動物として使用する系統への配慮、免疫不全の程度が重度になるに従って、検査項目のリストにアがらない微生物に感染する可能性を視野に入れ、最新の情報を入手する必要がある。また何らかの感染事故を想定した、微生物学的検査の専門機関、専門家との連携を踏っておく必要があるだろう。本シンポジウムの情報を元に、免疫不全動物の適切な微生物学的品質管理および品質管理についての理解を深めていただき、現場に還元していただくと幸いである。