

新たな無菌動物飼育技術の開発と感染実験への応用

何 裕遥

公益財団法人実中研

(実験動物ニュース 2025 Vol. 74 No. 2, p. 47-53)

1. はじめに

実験動物を用いた感染症研究には無菌 (GF : Germ-free) マウスがしばしば用いられている。無菌マウスは他の微生物の干渉を受けないため、病原体がどの組織に集まるか、どのように免疫応答を回避するかなどの感染動態を調査することで病原体の純粋な挙動を観察することができる。また、無菌マウスに腸内細菌叢のような微生物群を移植して、その微生物群の有無あるいは構成により感染症の進行に与える影響を解析することで、微生物間の相互作用や宿主-微生物-病原体の関係を明確にすることができる。このように無菌マウスは特定の感染症研究において非常に有用なツールとなっている。本稿においては、旧来より無菌マウスの飼育・実験環境で使用されていたビニールアイソレータ (VI : Vinyl isolator) から、より利便性の高い飼育・実験環境の構築を目指し、バイオバブル (bB : bioBUBBLE) と個別換気ケージ (IVC : Individually Ventilated Cage) を組み合わせた先進的飼育環境の開発とマイクロバイオーム実験への応用方法について報告する。本企画は感染症の内容が主だが、無菌マウスをより簡便に実験する方法は微生物をコントロールする点で感染症研究にも応用できると考え紹介する。

2. 新しい無菌マウスの飼育方法

無菌マウスや微生物叢関連マウスの飼育・実験にはアイソレーターシステムである VI が採用されている。VI は 1957 年に開発された、外界と内部を隔離して動物を飼育できる特殊な装置である [1]。無菌動物を長期に安定して飼育することができるだけでなく、感染実験やマイクロバイオーム実験に用いられている。しかし、VI は管理が煩雑であるとともに、操作を習熟するのに長期間の訓練が必要となる。また、厚い手袋を着用する必要があるため、熟練した作業員であっても尾静脈投与や開腹手術のような繊細な実験操作を行うことは困難である。さらに、無菌マウスを使用した実験を開始する前には、VI を滅菌し無菌検査を行う必要があり、これには検査結果を得るまでに 20 日以上かかる場合がある。

近年、実験用げっ歯類施設では、IVC ラックシステムの使用が増加している。IVC ラックシステムは、病原体に感染したマウスと感染していないマウスを同一のラック内のケージ間で微生物汚染を起こさずに飼育することができる [2]。過去の研究では、IVC システムで無菌マウスとノトバイオート (GB : gnotobiotic) マウスの両方を最大 12 週間飼育できることが示されている [3-5]。bB は HEPA フィルターでろ過された大量の空気を吹き込むことで、クリーンルーム内の清浄度を高く維持できる陽圧の筐体である。

本研究では IVC と bB を組み合わせることで、実用性の高いヒト微生物叢関連マウスの飼育・実験システムを構築した。まず、本システムをコンベンショナル動物室に導入し、無菌マウスの飼育を試みた。次に、本システムを用いて IVC 間で微生物汚染することなく GB マウスを飼育できるかを検証した。最後に、本システムが BSL2 のマイクロバイオーム動物実験に使用できるかを検証した。

3.1 材料と方法

動物は、CIEM (Central Institute for Experimental Medicine and Life Science : 公益社団法人実中研で繁殖、飼育された無菌および ASF (Altered Schaedler Flora) [6] 定着 GB マウスの微生物グレードである、ICR 由来の近交系 IQI/Jic マウスを使用した。すべての動物は、12 時間の明暗サイクル (午前 7 時に点灯、午後 7 時に消灯) の環境で飼育した。マウスは群飼育 (3 ~ 5 匹 / ケージ) で飼育を行い、自由給餌とした。水道水、飼料、ウッドチップはオートクレーブ滅菌して使用した。すべての動物実験は、CIEM の動物実験委員会による審査をへて、機関長に承認され (承認番号 : 19045)、機関内で定めたガイドラインに従って実施した。

器材は、ソフレッシュケアラック : CL-5900 およびソフレッシュケアケージ : CL-5902 (日本クレア株式会社, 東京) (Fig. 1a-d) と bB (bioBUBBLE Inc., Fort Collins, CO, USA) を使用した。IVC ラックは bB 内に配置し、IVC ラックを含む bB はコンベンショナル動物室に設置した (Fig. 2a)。bB は前室と本室で

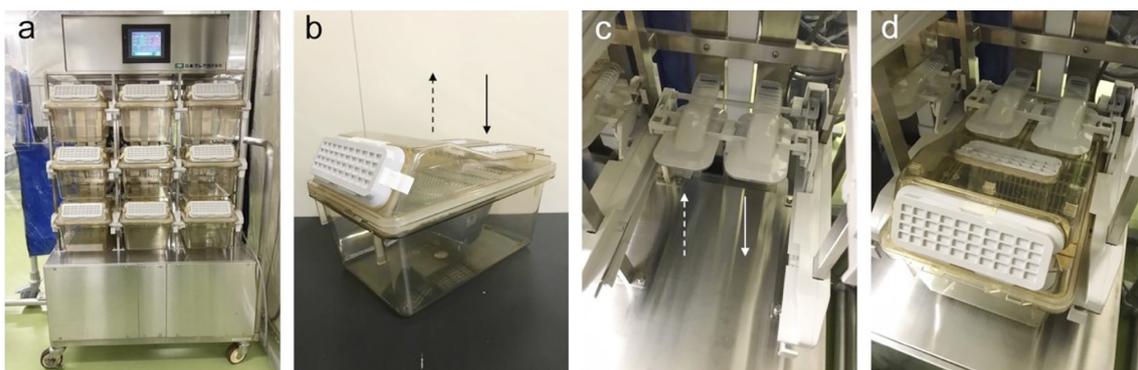


Fig. 1. 可動式個別換気ケージ (IVC) システム

(a) 陽圧および陰圧制御式 IVC ハウジング。(b) IVC ケージ。直線矢印は給気, 点線矢印は排気を示す。(c) ケージ設置前の吸排気ダクト。矢印はパネル b と同じ内容を示す。(d) 設置後の IVC ケージ。

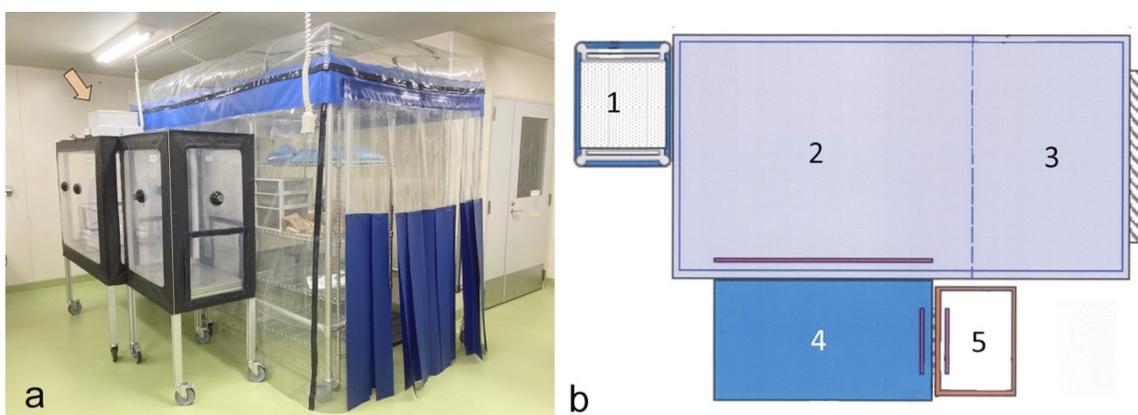


Fig. 2. コンベンショナル動物飼育室に設置された bioBUBBLE (bB)

(a, b) bB は 5 つの部分から構成される。(1) HEPA フィルター付き電源ユニット, (2) クリーンルーム (W3,200 × D1,700 × H2,100 mm), (3) クリーンルームをカーテン (点線で示す) で仕切った更衣室, (4) 個別給気の実作業ステーション (W1,430 × D860 × H1,000 mm) (a の矢印は電源ユニットを示す), (5) 作業ステーションにマジックテープで接続されたパスボックス (W860 × D600 × H1,000 mm)。

構成され, WS (Working Station) (W1,430 × D860 × H1,000 mm) とパスボックスが接続されている (Fig. 2b)。また, IVC と bB は, 陰圧で制御された BSL2 動物室にも設置した。bB 立ち上げ時には内部をピューラックス (600 ppm, 株式会社オーヤラックス, 東京) による噴き上げおよび, MB-10 (500 ppm, Quip Labs, Wilmington, DE, USA) の空間噴霧による消毒を行った。bB と WS のサイズは, 飼育室に合わせてカスタマイズすることが可能である。IVC とバイオセーフティキャビネット (SCV-1309EC IIA2, 株式会社日立産機システム, 東京) は bB 内に設置した (Fig. 3a-b)。

器材の準備では, 飼育ケージ, 給水ボトル, 餌はオートクレーブで滅菌した。それらの配置を Fig. 4a に示す。ケージ内を滅菌温度まで上げるため, 蓋は半分開けた状態で準備し, 2 枚の滅菌バッグを用いて二

重包装した状態で滅菌した (Fig. 4b)。これらの梱包条件で予備試験を実施し, データロガーの温度データをもとに, 滅菌条件を 127℃, 40 分とした (Fig. 4c)。水の滅菌については, 熱湯を満たした耐熱容器 (Fig. 4d) を滅菌バッグで二重に包装し, 上記と同じ予備試験に基づいて, 滅菌条件を 127℃, 90 分に設定した (Fig. 4e)。滅菌した器具をパスボックスに入れ, MB-10 (500 ppm) を噴霧し, 使用するまでパスボックス内で一晩保管した (Fig. 4f)。無塵衣, マスク, 手袋はケージと同じ条件で滅菌・殺菌した。作業者は, bB の前室で着替えてから, 本室に入る前に二重手袋を着用し, 肌の露出を防ぐために最初の手袋は手首をテープで留めた。

VI 内の無菌マウスと GB マウスを移送するときは, 輸送用コンテナ (W181 × D253 × H83 mm; 富士東海資材株式会社, 静岡) に入れ, 滅菌した紙袋で二

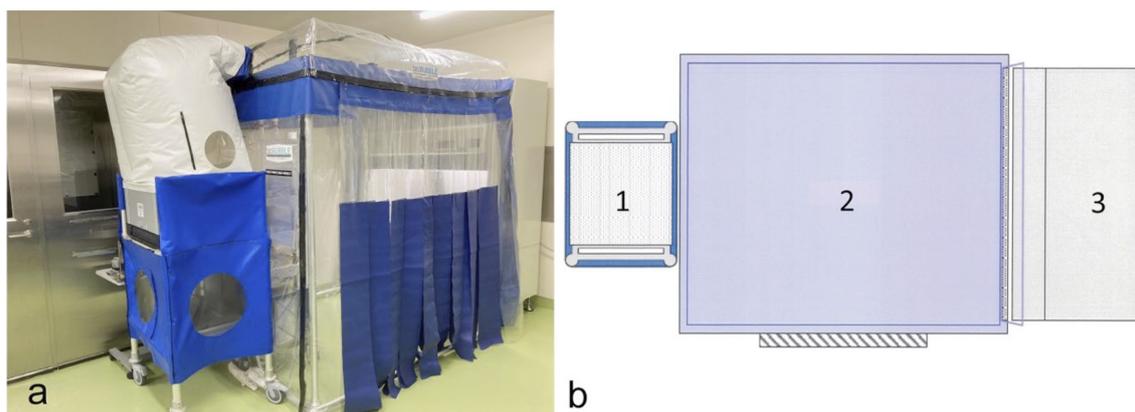


Fig. 3. バイオセーフティレベル2の動物飼育室に設置されたbB
 (a, b) bBは、(1) HEPA フィルター付き電源ユニット, (2) クリーンルーム (W1,960 × D1,660 × H1,950 mm), (3) 安全キャビネット (W1,500 × D780 × H2,035 mm) の3つで構成され、安全キャビネットはマジックテープでbBに接続した。

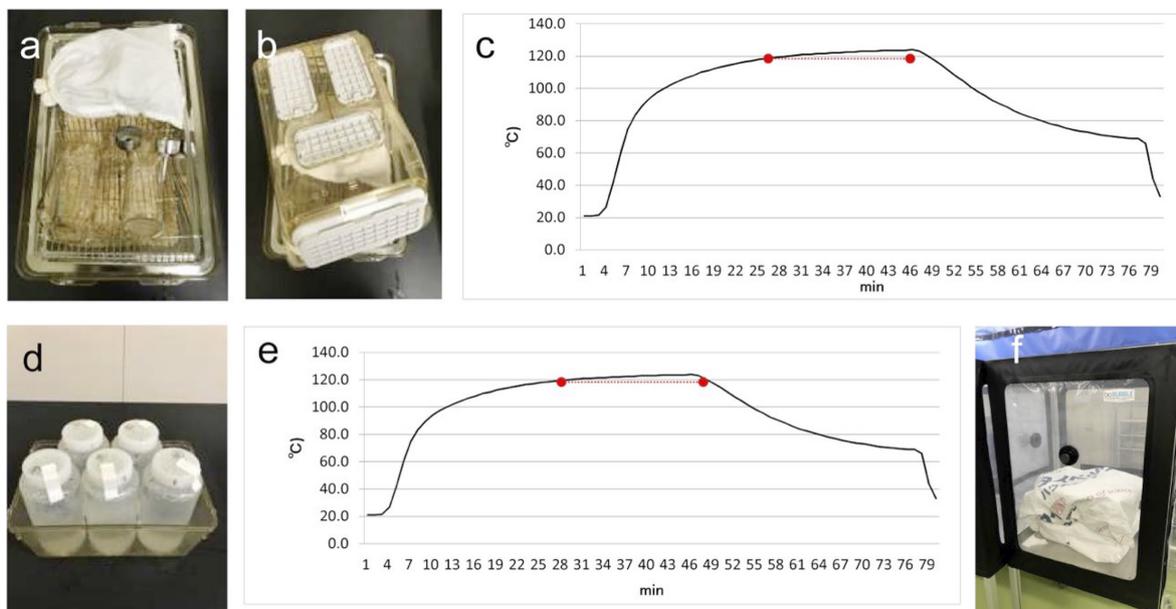


Fig. 4. 飼育器具の滅菌
 (a) IVCには床材、空の給水ボトル、小分けした飼料を入れた。(b) 滅菌条件をよくするため、IVCの蓋はケージに対して意図的にずらし、滅菌バッグに入れた。(c) ケージ内に設置した温度計でオートクレーブの状態をモニターし、滅菌条件を設定した。赤線は滅菌温度を示す。(d) 500 mlのオートクレーブ対応ボトルに熱湯を注ぎ、滅菌バッグに入れた。(e) 水の滅菌条件の設定も(c)と同様であった。(f) 滅菌済みの飼育器具はパスボックスから搬入した。

重に包み、ロックを通して搬出した。bBへ持ち込む際には外側の紙袋を取り外し、MB-10を噴霧してからパスボックスに搬入した。搬入して10分経過後、内側の紙袋を取り外し、輸送用コンテナのみをWSに搬入した。マウスは鑷子を使用してコンテナからIVCに移動した。これらの方法で準備した器材を用いて、3つの評価を行った。

3.2 評価1：無菌環境の維持期間

IVCとbBの飼育環境をコンベンショナル動物飼育室に設置し、無菌マウスを無菌状態でどのくらいの期間飼育できるかを評価した。本実験では、WSに一度に収容可能なケージ数としてIVCを3ケージ使用した。ケージ交換を行う前には、WSにMB-10を噴霧した (Fig. 5a)。また、IVCを搬入する前にも、MB-10でIVCの周囲を噴霧滅菌した (Fig. 5b)。WS

にMB-10を空間噴霧し (Fig. 5c), 5分後に新しい滅菌済みのIVCをパスボックスからWSに移した (Fig. 5d)。汚染を避けるため, 使用中のIVCと未使用のIVCの置く場所を明確に区別した。使用済みのケージと新しいケージは, それぞれ棚下段の左側と右側に置き, 使用済みの蓋と新しい蓋は, それぞれ棚中段の左側と右側に置いた。新しいケージは棚上段に置いた (Fig. 6a)。マウスを新しいIVCに移動する時は鑷子を使用した。鑷子は70%エタノールに浸漬して消毒し, ケージごとに交換した (Fig. 6b)。無菌検査では, マウスを手で保定し糞便を採取した。また, ケージ交換は週に1回実施した。

3.3 評価2: 同一IVCラック内におけるケージ間交差汚染

次にマイクロバイオーム実験を想定し, 無菌マウスとGBマウスを交差汚染なく同一ラックで飼育できるかを検討した。GBマウスにはASF定着マウスを使用した。本研究では, 6つのIVC (無菌マウス

飼育用に2ケージ, GBマウス飼育用に4ケージ)を使用し, ケージ交換は評価1と同じ手順で実施した。ケージ交換時に微生物汚染が生じた場合の原因を検証するために, 上段の3ケージにはGBマウスを飼育し, その後交換する下段の3ケージにはそれぞれGB, 無菌マウスを飼育した (Fig. 7)。GBマウスのケージ交換をした後に, 無菌マウスのケージを交換する時は, 外側の手袋を新しいものに交換した。

3.4 評価3: 安全キャビネットを用いた場合の無菌環境維持

BSL2マイクロバイオーム実験を想定し, 陰圧制御の飼育室にクラスIIAタイプの安全キャビネットを用いて無菌マウスが感染せずに飼育できるかを検討した。IVCとbBはBSL2動物飼育室に設置した。マイクロバイオーム実験の一般的な試験期間を考慮し, 目標飼育期間は4週間とした。本試験ではIVCを2ケージ (Fig. 8) 使用し, ケージ交換は評価1と同様の手順で実施した。

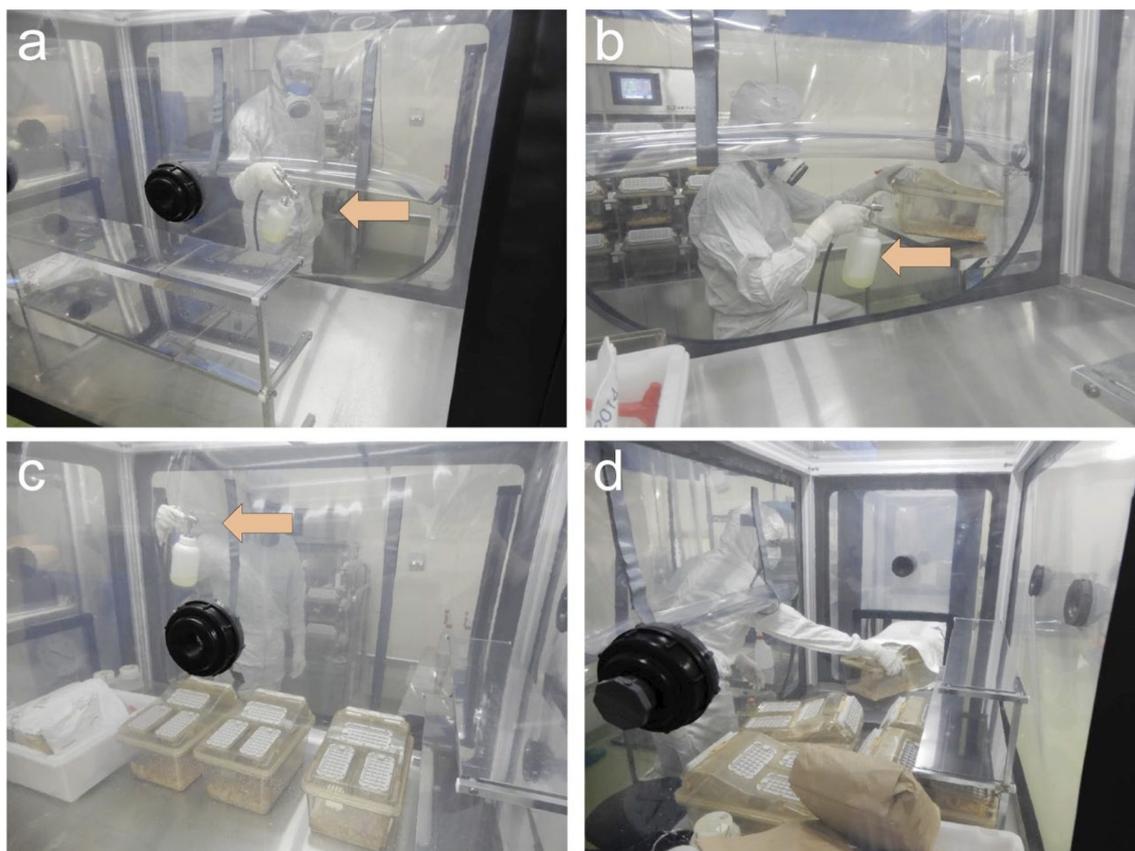


Fig. 5. ケージ交換の準備

(a) 使用前にワーキングステーション (WS) の消毒を行った。(b) 使用中の個別換気ケージ (IVC) をWSに搬入する際に消毒剤を噴霧した。(c) その後, 使用前にWS内を5分間消毒した。矢印はジッパーの隙間からMB-10を噴霧しているところを示す。(d) 滅菌された器具はパスボックスからWSに移した。このWSには使用中のケージ3個と交換用のケージ3個を入れることができる。無菌マウスか否かにかかわらず, ケージ交換の際にはここに示した手順を繰り返した。この方法は評価1と評価2で用いた。

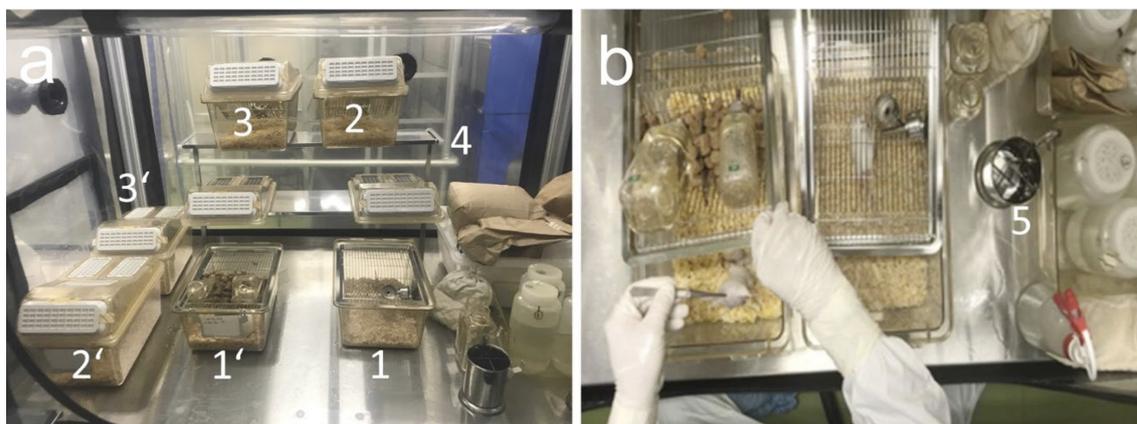


Fig. 6. WSにおけるケージ交換手順

(a) WSには3つの使用中のケージ (1'-3'), 3つの交換用のケージ (1-3) および棚 (4) があり, 図のように配置した。(b) マウスの移動は70%アルコールに浸したピンセット (5) を用いた。ピンセットはケージごとに交換した。

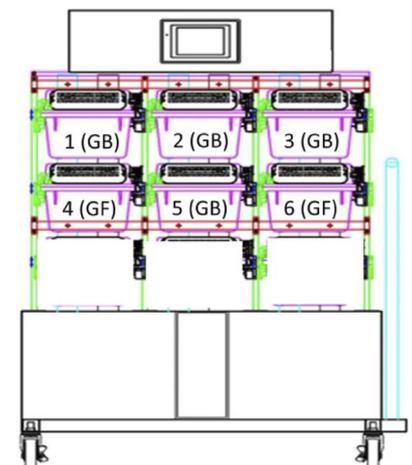


Fig. 7. 同一ラックでの無菌 (GF) マウスとノトバイオート (GB) マウスの飼育実験

評価2では, 以下の順序でケージ交換作業を行った。まず, 上段の3ケージ (1, GB; 2, GB; 3, GB) を交換し, 続いて下段の3ケージ (4, GF; 5, GB; 6, GF) を交換した。ケージ交換の際は, GF マウス, GB マウスにかかわらず, Fig. 5 の手順を繰り返した。GF マウスのケージを交換する前に, 外側の手袋を新しいものに交換した。

また, 評価1-3において作業時間を評価した。各実験において作業者が本室に入ってからケージ交換が完了するまでの時間を測定した。

作業後はbB内部のWS, 作業台, 床は, 70%エタノールと滅菌したタオルを使用して消毒した。bBの外側部分の床は, 200 ppmの塩素水でモップがけして消毒した。無菌マウスとGBマウスの微生物学的検査ではCIEMの無菌検査は少なくとも月に1回, 無菌マウスを飼育しているIVCで実施した。臨床用



Fig. 8. 安全キャビネット内におけるケージ交換手順
安全キャビネットでは, 2つの使用中のケージ (1', 2') と2つの交換用のケージ (1, 2) を設置した。マウスの移動はFig. 6 (b) の手順に従った。この方法は評価3で用いた。

チオグリコレート培地 (栄研化学株式会社, 東京) を用い, 新鮮糞便と汚れた床敷きから収集した検体を, それぞれ37℃と室温で2週間培養した。また, ポテトデキストロース寒天培地 (PDA, 栄研化学株式会社, 東京) を用い, 室温で2週間培養した。さらに, 各IVCをスワブで拭き取り, スワブをPDAで2週間培養した [7]。

GBマウスの微生物学的検査は, 少なくとも月に1回, GBマウスを飼育しているIVCで実施した。新鮮糞便は馬血液寒天培地 (栄研化学株式会社, 東京) およびDHL寒天培地 (栄研化学株式会社, 東京) を

用い、好気条件下、37℃で2日間培養した。また、5%馬血液を含むブルセラ寒天培地 (Becton, Dickinson and Co., Franklin Lakes, NJ, USA) を用い、嫌気条件下、37℃で3日間培養した。さらにPDAを用い、好気条件下、37℃で1週間培養した。微生物学的汚染の有無はコロニーと細胞の形態によって特定した。

4. 評価結果

評価1では無菌マウスは、陽圧制御されたコンベンショナル動物飼育室で38週間継続飼育された。この期間中、ケージ交換は114回、無菌検査は117回実施した (Table. 1)。

3ケージを交換する所要時間は、ケージの搬入から完了までに約20分であった。評価2では無菌マウスとGBマウスは、陽圧制御されたコンベンショナル動物飼育室で、交差汚染せずに29週間継続飼育された。この期間中、ケージ交換は174回、無菌検査は48回、ASFの汚染確認検査は68回実施した。3ケージ、2サイクルのケージを交換する所要時間は、ケージの搬入から完了までに約40分であった。評価3では陰圧制御された安全キャビネット内の飼育環境で、無菌マウスは感染せずに14週間継続飼育された。この期間中、ケージ交換は28回、無菌検査は32回実施した。2ケージを交換する所要時間は、ケージ搬入から完了するまでに約15分であった。

5. まとめ

本研究ではIVCとbBを組み合わせることにより、無菌マウスを用いた実用的な実験環境を構築した。

IVCを用いて無菌マウスとGBマウスを飼育する時は通常、SPFバリア室内にIVCを設置する[2, 4, 8]。本研究の結果より、IVCラックと任意のサイズに設計できるbBを組み合わせることで、作業効率を向上させ、コンベンショナル環境下であっても簡便に飼育や実験を実施できることが明らかとなった。また、既報では2人で作業を行うことが前提とされているが本研究で確立したシステムではすべての操作を1人で行うことができる。ケージの消毒方法は従来殺菌剤への浸漬で行われていたが、噴霧に変更したことによって作業が簡便化された。VIを使用したマイクロバイオーム動物実験では、試験群ごとにVI

を設置するため作業空間を確保する必要がある。IVCはVIと比較し試験群の多い動物実験においてより狭い作業空間で実験を実施することができる。さらに、作業期間を比較すると、VIはVIの滅菌と無菌検査判定に約20日間かかるが、IVCの機材準備は高圧蒸気滅菌が可能のため1日で完結する。また、試験後もVIは薬剤による不活化を行うため、本実験環境はVI使用時よりも準備時間を大幅に短縮させることが可能となる (Fig. 9a)。そして、VIでは必須となる飼育機材や動物の搬出入時の滅菌缶の接続や外キャップの開閉、滅菌などの特殊操作が不要な点も大きな利点である。

本研究で構築したシステムは、実験作業の効率化だけでなく、実験用途の拡大にも寄与する。まず、VIのゴム手袋の厚さは約0.6mmであるのに対し、本実験環境で用いたゴム手袋の厚さは約0.1mmであるため、厚いゴム手袋越しの操作が不要になったことで、繊細な操作が可能となった。これにより開腹手術や尾静脈投与のような針を用いた繊細な作業がしやすくなった。さらに作業空間の比較ではWSの床面積は約1.23m²、高さは1mであるのに対し、VIの床面積は約0.58m²、高さは0.45mであるため、WSはVIの約4.7倍の体積を有している (Fig. 9b)。そのため行動解析装置のようなVIでは使用できなかった機器を設置することが可能となった。これらのことは、無菌・GBマウスを用いた各種研究の進展に大きな利益をもたらすと考えられる。

評価2では、無菌マウスとGBマウスを1つのIVCラックで同時に飼育した。ケージ交換時には同一のWS内で無菌マウスとGBマウスのケージ交換を連続的に実施したが、微生物汚染を認めず安定して飼育することができた。本システムで使用したWSの換気回数は1時間あたり100回転以上であるため、WS内の空気は36秒ごとに入れ替わる。ケージ交換を行う際、ケージの蓋を閉めてから次のケージの蓋を開けるまでに通常1分以上かかることから、その間にWS内の空気は清浄な空気と入れ替わる。その結果、IVC毎に異なる菌叢が定着したマウスを飼育して運用することができたと考えられた。本研究ではデータロガーを用いて飼育器具、水、飼料などの温度を計測し、それぞれの滅菌条件を設定した。

Table 1. GFおよびGBマウスの微生物学的検査結果

	マウスの 微生物学的グレード	ケージ数	実施期間 (週)	ケージ 交換回数	回数		
					無菌検査	汚染確認検査	陽性
評価1	GF	3	38	114	117	ND	0
評価2	GF+GB	2+4	29	174	48	68	0
評価3	GF	2	14	28	32	ND	0

ND: 未実施

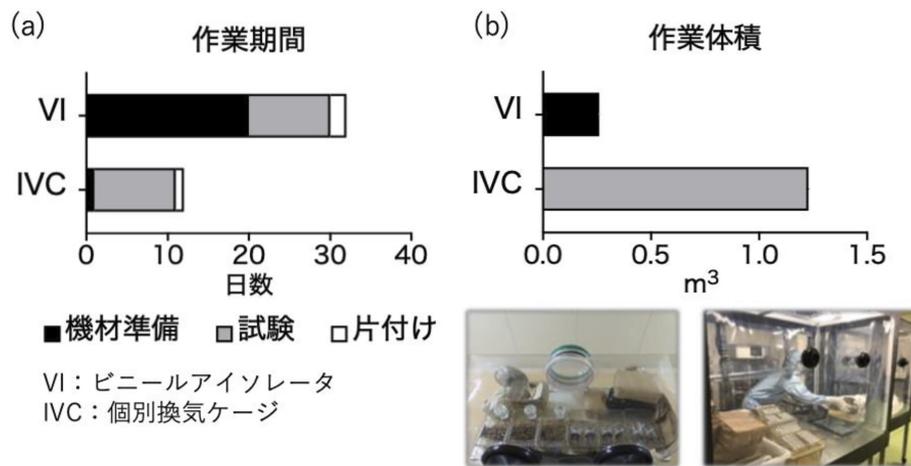


Fig. 9. 作業の期間ならびに体積の比較
 (a) 10日間の実験を行った場合の作業スケジュール例。(b) VIとWSの体積比較。

滅菌対象物ごとに滅菌条件を設定したことは、微生物汚染のリスクの軽減に寄与したと考えられる。本研究では、8種類の細菌が定着したASFマウスを評価した。本研究を踏まえ、今後は他の細菌株でも検証することが望まれる。

BSL2細菌を使用する場合、拡散防止や作業員保護のために、陰圧制御の飼育室や安全キャビネット内で作業を行う必要がある。評価3の実験環境は、BSL2細菌の使用または糞便をマウスに投与することを想定して設計された。安全キャビネットは陰圧制御の飼育室に設置されているため、環境中の細菌が開口部から内部に流入することが危惧されるが、開口部をbBで囲むことで細菌の流入を防ぎ、無菌マウスの微生物汚染を防ぐことが可能となった。これにより、マウスに定着させた菌叢を維持しながら、人が菌に曝露しない運用ができると考えられた。さらに、複数のケージが1台に収容されるVIと比較して、ケージごとに管理されるIVCでは微生物汚染の拡大を低減することができる。したがって、本システムは環境細菌による汚染リスクを最小限に抑え、高い精度でBSL2微生物の接種実験ができると考えられた。

本稿では無菌マウスの飼育とマイクロバイオーム研究を効率的に実施するための新しい実験技術に関する我々の取り組みについて紹介した。最後に補足となるが、無菌マウスの飼育装置の全てを本システムに置き換えることを推奨しているわけではない。VIにはVIの利点があり、優れた飼育装置であることは変わらない。また、感染症研究では取り扱う菌種によっては、本システムが適さない場合もあるだろう。実験内容、期間、規模等を考慮し適切な飼育・実験装置を選択することが重要であり、本システムが選択肢の一つとして研究発展の一助となれば幸いである。

引用文献

1. REYNIERS JA, TREXLER PC, ERVIN RF. Rearing germ-free albino rats. *Lobund reports*. 1946(1): 1-84.
2. Brielmeier M, Mahabir E, Needham JR, Lengger C, Wilhelm P, Schmidt J. Microbiological monitoring of laboratory mice and biocontainment in individually ventilated cages: a field study. *Lab Anim*. 2006; 40(3): 247-60.
3. Hecht G, Bar-Nathan C, Milite G, Alon I, Moshe Y, Greenfeld L, et al. A simple cage-autonomous method for the maintenance of the barrier status of germ-free mice during experimentation. *Lab Anim*. 2014; 48(4): 292-7.
4. Lange ME, Uwiera RRE, Inglis GD. Housing Gnotobiotic Mice in Conventional Animal Facilities. *Curr Protoc Mouse Biol*. 2019; 9(1): e59.
5. Paik J, Pershutkina O, Meeker S, Yi JJ, Dowling S, Hsu C, et al. Potential for using a hermetically-sealed, positive-pressured isocage system for studies involving germ-free mice outside a flexible-film isolator. *Gut Microbes*. 2015; 6(4): 255-65.
6. Wymore Brand M, Wannemuehler MJ, Phillips GJ, Proctor A, Overstreet AM, Jergens AE, et al. The Altered Schaedler Flora: Continued Applications of a Defined Murine Microbial Community. *ILAR J*. 2015; 56(2): 169-78.
7. [Sterility test for germ-free animals]. *Jikken Dobutsu*. 1972; 21(1): 35-8.
8. *Zentralbl Bakteriell Orig A*. 1975; 232(4): 499-511.