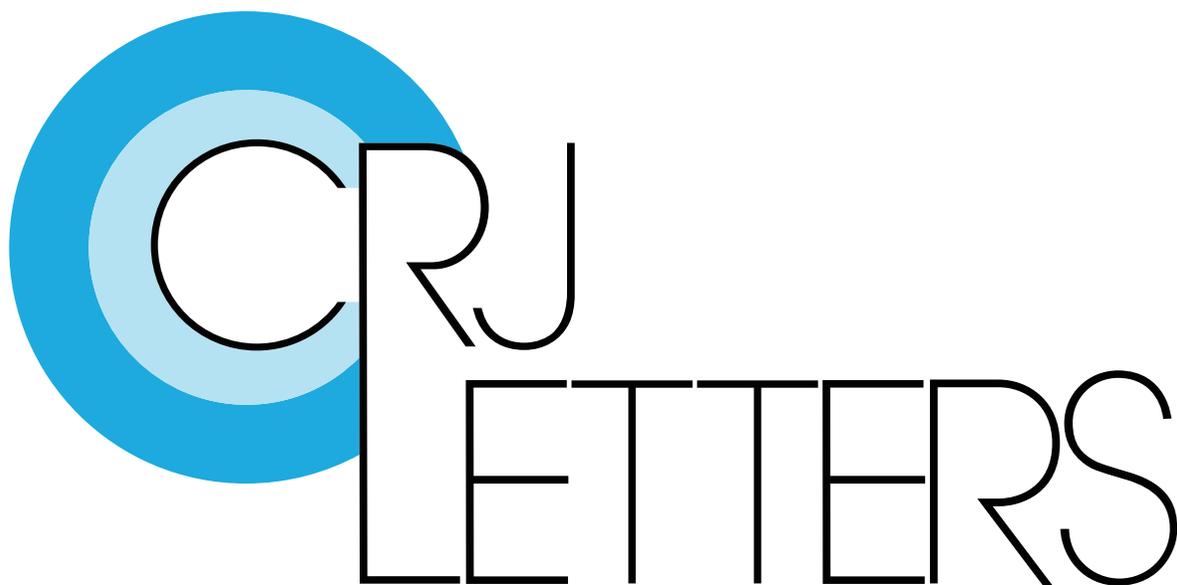


Vol. **21**  
Aug. 2021

The logo features the letters 'CRJ' in a large, bold, black outline font. The 'C' is partially enclosed by a blue circular graphic consisting of two concentric rings. Below 'CRJ', the word 'LETTERS' is written in a smaller, black outline font. A thin black line extends from the bottom right of the 'S' in 'LETTERS' towards the bottom right corner of the page.

# CRJ LETTERS

おとり動物を用いない微生物モニタリング方法の導入について

げっ歯類実験動物施設の微生物管理とモニタリング手法の進歩

日本チャールス・リバー株式会社

# おとり動物を用いない微生物モニタリング方法の導入について

兵庫医科大学 病態モデル研究センター 佐加良 英治

兵庫医科大学病態モデル研究センター（以下「病態研」という。）では、2020年4月から、微生物モニタリングの方法を、おとり（モニター）動物を用いない、飼育ラックの排気ダストを用いたPCR(Polymerase Chain Reaction) 試験に全面的に切り替えた。その切替えの動機と経緯、導入までの道筋と導入後のメリットについてまとめた。

## はじめに

実験動物の飼養及び保管並びに苦痛の軽減に関する基準(以下「飼養保管基準」という。)では、「実験動物が実験等の目的に係る疾病以外の疾病にかかることを予防する等必要な健康管理を行うこと」を定めている。飼養保管基準は環境省の告示であり、遵守しなければならないが、2019年に改正された動物愛護及び管理に関する法律（以下「動愛法」という。）の第七条においても、動物の所有者又は占有者の責務等として、「動物の飼養及び保管については、飼養保管基準によるものとする」と規定している。すなわち、実験のため動物を飼養及び保管する者は、疾病予防のための健康管理を行わなければならないことを、法律や告示で定めていることになる。実験動物の健康管理は、予防衛生に重点がおかれる。日常的な健康管理は、適切に給餌・給水を行い、温・湿度、換気、照明、騒音等の環境要因の適切な統御、ケージや床敷等の衛生維持が行われているかを確認することが基本であるが、特に感染症の発生予防は、動物や人への影響、実験成績等への影響から、実験動物の健康管理として極めて重要である<sup>[1]</sup>。実験動物の感染症予防としては、前述の日常的な健康管理に加えて、導入動物の検疫や飼養動物の微生物モニタリングが広く行われている。微生物モニタリングの目的は、飼養保管中の実験

動物が病原体に感染していないことを定期的な検査で確認することにより、微生物統御状態を把握し、動物実験の信頼性を微生物学的側面から保証することである<sup>[1]</sup>。特に症状を現さずに実験成績に影響を及ぼす、不顕性感染を摘発するためには、微生物モニタリングは必要不可欠である<sup>[1]</sup>。そのため、大学や研究機関等の系統維持や繁殖を行う飼養保管施設では、微生物モニタリングを実施しているが、その多くはおとり動物や抽出動物等の生きた動物を用いる検査方法である。

その一方で、飼養保管基準には3Rの原則が記されている。実験動物を科学上の利用に供する者は、疾病予防のための健康管理を行わなければならないが、同時に3Rの原則に基づき、科学上の利用の目的を達することができる範囲において、実験動物を適正に利用することが求められている。義務であるRefinement（苦痛の軽減）は言うに及ばず、努力義務であるReplacement（代替法の利用）やReduction（使用数の削減）をいかに実践できるかが、実験動物を用いる我々の課題でもある。

## 動機と経緯

兵庫医科大学では、旧動物実験施設において、2000年よりおとり動物を用いる微生物モニタリングを開始した。2018年4月に開設した病態研は、実験動物アレルギー対策をコンセプトモデルとしており<sup>[2]</sup>、設置している飼育ラックは、ほとんどがIVC (Individually Ventilated Cages) 用であり、一部は一方向気流制御のラックである。病態研においても、旧動物実験施設の微生物モニタリング方法を踏襲していたため、飼育ラック単位でおとり動物を配置した。IVCの場合、1ラックあたりのケージ数が多いため、すべてのケージの汚染床敷を、均等におとり動物のケージに曝露させるには、汚染床敷の採取や曝露方法に工夫が必要であり、相応の手間がかかっていた。後述するが、病態研では飼養保管業務を外部に委託しており、その作業の手間は、作業時間を増やし、業務委託の費用を押し上げていた。また、病態研では、IVCや一方向気流制御のラックを導入していたため、飼育ラックからの排気をフィルターでトラップして行う検査方法も実施可能であった。2018年4月に旧動物実験施設から病態研に移転する際に、微生物コントロールの観点から生体での移動は行わなかった。飼養保管中だった多数の遺伝子改変動物は、生殖工学技術によるクリーニングを行い、日本チャールス・リバー社に依頼し、PRIA (PCR Rodent Infectious Agent) 試験を実施した。このPCR試験により、迅速に清浄化が確認された遺伝子改変動物のみが病態研内に移設された。この時に行ったPRIA試験は、微生物モニタリング方法を全面的にPCR試験に切り替える一つの試金石となった。

兵庫医科大学が2000年に微生物モニタリングを開始した当時は、実験動物の飼養保管も微

生物モニタリングも、その後に行うようになったマウスの生殖工学も、すべて職員が行っており、洗浄作業のみ外部の職員が行っていた。顧みると、職員は飼養保管作業や微生物モニタリング業務に注力し、研究支援業務については、十分に対応できていなかった。そこで、飼養保管作業の業務委託化を試みた。様々な障害があり、業務委託化は容易に進められなかったが、病態研の開設前には何とか業務委託にこぎつけた。その代わり、当然のこととして、病態研の職員数は大幅に削減された。2018年に病態研を開設した当時は、専任教員である私とその少なくなった職員で病態研の立ち上げを行った。生殖工学技術による遺伝子改変動物のクリーニング、利用ルール等の策定、新規導入された様々な機器や建物の初期不良への対応、利用者講習と確認試験の実施、入退管理システムの登録等を含めた管理、その他、全く新しくなったため、一から様々なことを行い、その間を縫って、微生物モニタリングを行った。その当時は多忙を極め、産業医から勤務時間が大幅に超過していると勧告を受けた。そんな時期ではあったが、ゲノム編集技術が広く浸透してきたので、研究支援の一環として、ゲノム編集技術を用いて病態モデル動物を作製し、研究者に提供することを検討しはじめた。様々な方の指導とサポートにより、何とか病態モデル動物の提供という、研究支援を拡張する目処はついた。しかし、その当時の微生物モニタリング業務は年間に少なくとも丸10週間、65日の勤務時間を消費していた。この日数は、年間の労働日を260日とすると、1/4もの日数を微生物モニタリング業務に充てていたことになる。よって、今後の研究支援業務の拡張を考えるにあたり、微生物モニタリング業務の見直しが最優先課題となった。

2019年6月に改正された動愛法が公布された。この動愛法の附則第九条の第3項で「国は、動物が科学上の利用に供される場合における動物を供する方法に代わり得るものを利用すること、その利用に供される動物の数を少なくすること等による動物の適切な利用の在り方について検討を加え、必要があると認めるときは、その結果に基づいて所要の措置を講ずるものとする。」と規定したので、これまで努力義務であった Replacement や Reduction の在り方についても、改めて検討を行う必要がでてきた。このことにより、次の動愛法改正の議論が始まる、この先の5年間に、何らかの形で適正に、かつ具体的に 3R の実践を推し進める必要があった。動物実験計画の審査で Replacement や Reduction が実践できるように指導することや、実際の動物実験の現場で、実験実施者を指導することなども 3R の実践に役立つが、具体的な目に見える形で Replacement や Reduction の実践を行えることとして考えついたのが、微生物モニタリング業務において、おとり動物を使用しないこと、すなわち EAD (Exhaust Air Dust) による PCR 試験の導入であった。

以上、飼養保管の業務委託により職員数が減少し、従来の微生物モニタリングの方法が研究支援業務に影響を与えていたこと、そんな中でも、更に病態研の研究支援を充実させ、研究を推進させることを模索していたこと、動愛法の改正を受けて 3R の実践を目に見える形で行う必要があったこと、過去に PRIA による PCR の試験を行い、その利点を理解していたこと、すべての飼育ラックが排気ダストをトラップできるものであったこと等が、PCR 試験導入の動機と経緯である。

## 導入までの道筋

これらの経緯等により、従来の微生物モニタリングの方法から、全面的に PCR 試験に切り替える検討を開始した。まず、検討したのは、これまで積み上げてきた微生物モニタリングの方法と PCR 法の比較である。一般的に考えて、PCR 法の精度が高いことは自明であるが、慎重な者であれば、従来の方法と PCR 法を1年間程度併用して、その差や問題がないことを確認してから、全面的に切替えを行うものである。

鍵山によれば<sup>[3]</sup>、1つの飼育室が100匹以上の母集団であれば、感染率10%の病原体を99%検出するのに必要な採取検体数は44匹であるという。病態研の従来方法でのおとり動物数は、1飼育室あたり最大でも18匹であり、鍵山の必要検体数に比べ半数以下である。また、IVCでは正しく使用している限り、空気を介したケージ間での感染が起こる可能性は低く、検出される病原体は汚染床敷に依存する。さらに、*Mycoplasma pulmonis* や *Rodentibacter pneumotropicus*、*Rodentibacter heyltii* のような、おとり動物では検出しにくい病原体もある<sup>[4]</sup>。よって、従来のおとり動物を使用する微生物モニタリング方法では、特にIVCでの検査精度を考えた場合に、経費と手間をかけてPCR法と比較する必要はないと考えた。PCR試験における非特異反応(偽陽性)の可能性は非常に低いと思われるが、PCR試験で陽性となった場合は、当然再検査を行うが、それでも陽性となった場合には、当該ラックの全ケージからサンプルを取り再確認する。その手順により、非特異反応の問題はクリアになると考えた。よって、従来方法からPCR法に切り換えた場合、検査精度等に起因する支障等は少ないと考えた。

費用等について、従来の微生物モニタリング方法では、試薬、おとり動物、外部検査費等を合計して、その費用は年間数百万円程度であった。今回、EAD による PCR 試験を行うとした場合、トラップ（フィルター）等の購入を含めたイニシャルコストは、数十万円であったが、PCR 試験費用は検査項目数にもよるが、それ相応の価格である。よって、PCR 試験に切り換えた場合に、現状の微生物モニタリング程度の費用は必要であった。次に、自家検査を行わずに、

おとり動物を用いて、すべての検査を外注した場合の検討を行った。この場合、病態モデル動物の作製等、研究支援業務にかかる時間を増やすことはできるが、飼養保管作業の効率化による業務委託費の見直しや、目に見える形で 3R 原則を実践することは達成できなくなり、その外注コストもそれ相応の試算結果であった。以上より、費用面については、飼養保管作業の効率化により業務委託費が削減されれば、PCR 試験を導入するメリットはあると判断した。

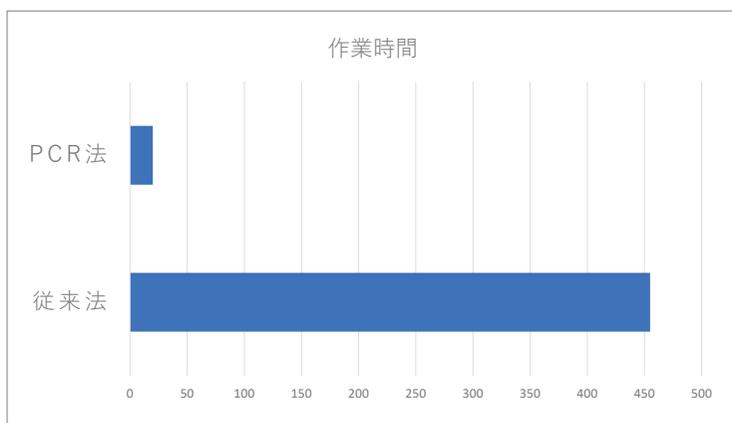


表 1：年間で微生物モニタリング業務に要した作業時間

## 導入のメリット

まず、PCR 試験の導入開始がコロナ禍の始まりと同時期であり、病態研のスタッフや利用者に新型コロナウイルスの感染が起これば、病態研の業務が停止するという時期であった。そのため、万が一を考え、飼養保管に係る作業を大幅に削減し、業務委託者の出勤を交替勤務制としたが、PCR 試験に切り替えていたため、時間を要する汚染床敷の曝露といった作業はなく、交替勤務制は支障なく継続できた。

既述のように、当時の微生物モニタリング業

務は年間に少なくとも 455 時間の勤務時間を消費したが、それに対して PCR 法に変更した場合の勤務時間は年間でも約 20 時間であり（表 1）、この差は非常に大きかった。コロナ禍ではあったが、本学では研究をすぐに止めることはせず、感染防御対策を行いながら研究を継続させた。人と人との接触を減らすために動物実験に関する教育訓練などは動画とし、オンデマンド配信としたが、その様な対応に十分な時間をかけることができた。その上で、さらに病態モデル動物の作出や生殖工学技術の提供等の研究支援を十分に行うこともできた。その他の業務につい

ても、リモートで丁寧に時間をかけて対応することができた。これらは PCR 試験に切り替えていなければ、できなかったことである。

また、目に見える形で 3R を実践できたことが大きなメリットである。これまでの具体的な、おとり動物使用数の公表は控えるが、決して少なくない。その使用数を代替法である PCR 試

験の導入により削減できたことは大きい。病態研のホームページには、おとり動物を用いない微生物モニタリング方法を導入して、3R を実践していることを記載している（図 1）。このことにより、兵庫医科大学が適正な動物実験の実施体制を構築していることを、世間に示すことができた。

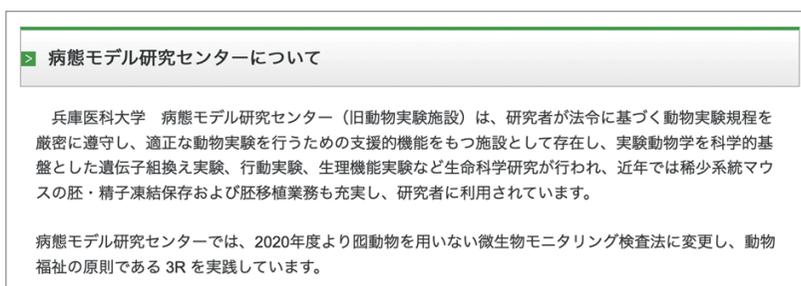


図 1：兵庫医科大学病態モデル研究センターの HP

## さいごに

PCR 試験は確かにすぐれた検査方法であるが、導入を考える際にコストの問題がでてくる。ただ、このコストについては、経験上、PCR 試験を導入して得られるメリットも勘案して、経費のみならず管理運営全体のこととして考えた方がよい。この先、多くの研究機関で、おとり動物を使用しない PCR 法による微生物モニタリングが普及すれば、このコストは下がるかもしれない。また、コストが下がれば、PCR 法による微生物モニタリングはますます広がりを見せる可能性がある。そうなった場合、おとり動物の使用数は削減され、日本全体で 3R の実践が進むことになる。動愛法の次の改正を見据えて、そうなることを期待したい。

## 謝辞

微生物モニタリングの関連資料を提供していただいた、本学学務部研究技術課の永田大典課長補佐に感謝する。

## 引用文献

- [1] 実験動物飼養保管等基準解説書研究会. 動物の健康及び安全の保持. 環境省自然環境局総務課動物愛護管理室編集. 実験動物の飼養及び保管並びに苦痛の軽減に関する基準の解説. 東京：アドスリー. 2017. 38-40.
- [2] 佐加良英治. 実験動物アレルギー予防を目指した兵庫医科大学病態モデル研究センターの紹介. 岡山実験動物研究会報. 2019. 35 : 29-37.
- [3] 鍵山直子. 動物実験施設ぐるみの予防対策. 前島一淑監修. 実験動物感染症の対応マニュアル. 東京：アドスリー. 2000. 39-41.
- [4] 丸山 滋. 現代の創薬における実験動物施設の微生物管理. 九州実験動物雑誌. 2020. 36 : 9-12.

## 著者プロフィール



さがら えいじ  
佐加良 英治

### 【学歴】

山口大学農学部獣医学科卒業  
山口大学大学院農学研究科獣医学専攻修了

### 【職歴】

Bristol-Myers Research Institute 研究員  
九州歯科大学 動物実験施設 助手  
九州歯科大学 動物実験施設 講師  
兵庫医科大学 動物実験施設 准教授  
兵庫医科大学 病態モデル研究センター 副センター長、准教授

### 【所属学会での役職】

日本実験動物学会（理事、動物福祉・倫理委員会委員長）  
日本獣医学会（評議委員）  
日本実験動物環境研究会（副会長）  
関西実験動物研究会（幹事、評議員）  
九州実験動物研究会（評議員）

### 【社会活動】

公私立大学実験動物施設協議会：副会長、常任幹事、動物実験適正化委員会委員長  
国立大学法人九州工業大学：動物実験専門部会外部委員  
武庫川女子大学：動物実験委員会外部委員  
（公財）東洋食品研究所：動物実験委員会外部委員  
国際電気通信技術研究所：動物実験委員会、遺伝子組換え生物等安全管理委員会外部委員  
（公財）神戸医療産業都市推進機構：動物実験委員会外部委員

### 【研究テーマ】

実験動物アレルギー  
動物福祉

# げっ歯類実験動物施設の微生物管理とモニタリング手法の進歩

日本チャールス・リバー株式会社 丸山 滋

## はじめに

実験動物の健康状態は、試験研究の結果に影響を与えることから、その健康管理は実験動物を使用する者にとって最も重要な事項の一つである。実験動物が健康を損ねる大きな要因の一つは微生物感染であり、試験研究データの信頼性、動物福祉、実験動物施設管理などの面から、微生物学的評価により感染の有無を把握し適切な微生物統御を行うことは非常に重要である。臨床的な兆候がなくても感染状態が試験研究データに影響を与える可能性もあることから、多くの書物や報告が微生物統御の重要性を説いている<sup>[1,2,3,4,5,6]</sup>。

適切な微生物学的評価方法はそれぞれの動物管理体制により異なるため、自施設の管理体制の特徴を理解した上で評価システムを構築することが肝要である。本稿では、施設の適切な微生物統御のために行うべき微生物モニタリングについて、基本的な考え方から近年注目欧米を中心に注目されている新しい手法まで、その概要を紹介する。

## 微生物モニタリングプログラム

微生物モニタリングは、実験動物施設の品質管理の一端として微生物学的なステータスの確認を目的に行う、実験動物のための健康チェックである。施設運用上の微生物学的状況の維持確認として定期的に行うものを指すことが多いが、外部からの動物導入の際に行う検疫のための微生物学的評価も広い意味での微生物モニタリングである。

微生物モニタリングプログラムは、万が一混入した汚染物質を高感度に検出でき、かつ、管理者にとってコスト面でも妥当である必要がある。施設に見合ったプログラムを構築する上で重要となる一般的なポイントは以下の通りである。

### ◆ 監視する項目

ー 動物種、免疫状態、飼育システム、実験内容などを考慮し設定

### ◆ モニタリングの手法

### ◆ 供試サンプルの種類

### ◆ サンプル数

### ◆ 実施頻度

ー 項目ごとに流行性や過去の汚染事故などを考慮し設定

施設の利用状況や使用動物種、飼育システム、動物の特性など、プログラムに影響する施設内の変更があった場合には、その都度微生物モニタリングプログラムの見直しを行うことが推奨される。また、病原微生物の流行性やモニタリング手法など、施設状況に依らない変化も考慮すると、定期的な検証スパンを設定しておくことが望ましい。

日本国内で現在一般的に行われている微生物モニタリングは、評価対象となる動物群の代表としてモニター動物（おとり動物）を用いる方法である。おとり動物は、対象動物群と一定の期間同一環境で飼育すること、および、期間内に対象動物群から出される使用済みの廃棄床敷を定期的におとり動物飼育ケージに混入させること（おとり飼育）により、空気中あるいは廃棄床敷中に含まれる評価対象動物群由来の微生物を獲得する。おとり動物を用いた微生物モニタリング方法は、群全体を網羅的に監視でき、

かつ、遺伝子組換え動物や抗体産生能力のない免疫不全動物など、直接的に微生物モニタリング対象とすることが困難な動物の代替という意味においても有用である。おとり動物数を評価対象群の大きさに比例させる必要がないという点も含めて多くの利点があり、広く利用されている。

モニタリング対象群を代表するおとり動物を設置せず、群内の動物をランダムに抜き取り供試する方法もまた、一般的な選択肢のひとつである。抜き取り法におけるサンプル数（使用動

物数）の決定には、理論的に適切な実施数を推定する二項分布を利用した ILAR formula が広く用いられている<sup>[6,7,8,9]</sup>。ただし、この計算に則ると、ある病原微生物が陽性率 10% で存在する場合、95% の確率で検出するためには微生物モニタリングに供試する動物は 30 匹が、陽性率 1% の場合には 300 匹が必要となるなど、低陽性率の感染を検出するためには現実的な設定が困難である。このため、早期発見を特に重視する施設では抜き取り法を選択することは難しく、多くの場合おとり動物を使用している。

## 従来のモニタリング方法の弱点

おとり動物による微生物モニタリング方法は、評価対象の動物群が病原微生物を保有していた場合、排出された病原微生物が確実におとり動物に伝播するという仮定に基づいている。一方で、おとり飼育時に混入する廃棄床敷量や

その中に含まれる糞尿量などにより、おとり動物への病原微生物の伝播成立が左右されること、監視対象となる病原微生物の中には廃棄床敷中では生存状態を保てず、おとり動物への伝播が難しいものがあること、などが近年わかってきている<sup>[10, 11, 12]</sup>（表 1 参照<sup>[11]</sup>）。

項目名	試験方法	陽性率 <sup>*1</sup>	おとり動物で検出できる？
Mouse Parvovirus/Minute Virus of Mice	MFIA <sup>*2</sup>	~1%	
Mouse Hepatitis Virus	MFIA	0.10%	確実に検出
Epizootic Diarrhea of Infant Mice Virus	MFIA	0.30%	
<i>Helicobacter</i>	PRIA <sup>*3</sup>	31.13%	
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	PRIA	4.50%	
Theiler's Murine Encephalomyelitis Virus	MFIA	0.10%	検出が疑わしい、あるいは確実な検出はできない
Murine Norovirus	MFIA	40.00%	
被毛ダニ	PRIA	1.09%	
蟻虫	PRIA	1.46%	
Adenovirus	PRIA	0.15%	
<i>Mycoplasma pulmonis</i>	PRIA	0.12%	
<i>Pasteurella pneumotropica</i> <sup>*4</sup>	Culture, PRIA	4.80%, > 0.25%	ほとんど検出できない、あるいは検出できない
<i>Cryptosporidium</i>	PRIA	0.13%	
<i>Giardia</i>	PRIA	0.04%	
<i>Spiroplasma</i>	PRIA	1.56%	

(訳注) \*1 米国内データ  
 \*2 MFIA = Multiplexed Fluorometric ImmunoAssay<sup>®</sup>、抗体試験手法のひとつである蛍光ビーズ法  
 \*3 PRIA = PCR Rodent Infectious Agent<sup>®</sup>、PCRを用いた微生物モニタリング  
 \*4 2017年にHeyl株は*Rodentibacter heylii*に、Jawetz株は*Rodentibacter pneumotropicus*にそれぞれ分類された

表 1：汚染床敷利用のおとり飼育における項目ごとの検出のしやすさ

また、バイオセキュリティへの意識の高まりから、作業ごとの手指消毒徹底や効果的な消毒薬の導入など、各施設における作業線の分断により、ケアテーカーや研究者等を介した微生物拡散が効果的に抑えられるようになったこともまた、おとり動物への伝播が成立しない遠因となっている。

近年、免疫不全動物や各種病態モデル動物の多様化、遺伝子改変技術の進歩などにより、実験用げっ歯類が適切な管理下で健康に維持されるための飼育システムもまた多様化している。多くの施設では、複数の飼育システムを目的に応じ利用している状況にある。使用施設が年々増加している一方向気流ラックや個別換気飼育ケージ（IVC）ラックは、部屋全体で空気を共有しているオープンケージラックとは異なり、ラック、柵、ケージなどの小単位で微生物統御が可能であり、リスクコントロールの実践を容易にする。反面、従来の廃棄床敷によるおとり動物を用いた方法では空気を介して伝播する病原微生物を適切に検出できないという問題点を把握し、設備に見合った適切な微生物統御の監視方法を採択せねばならないことも理解しておく必要がある。

## 微生物モニタリングの手法

微生物モニタリングで利用される検査方法には、病原微生物そのものの検出を目的とした方法（以下、直接法）と病原微生物に対する抗体の検出を目的とした方法（以下、間接法）に大別される。直接法には培養検査、寄生虫検査、Polymerase Chain Reaction（PCR）などが、間接法には抗体試験が含まれる。

直接法では、供試動物の現在の感染を検出する。抗体を産生できない免疫不全動物や抗体産

生能力が不明な遺伝子改変動物を含め、あらゆる動物のスクリーニングが可能である。培養検査は人工培地で培養可能な細菌、真菌などが対象となる。寄生虫検査は外部寄生虫、および、消化管内原虫や蟯虫などの内部寄生虫の検出を行うもので、光学顕微鏡や実体顕微鏡を用いて行うことから、鏡検を寄生虫検査の同義語として表現されることも多い。PCRは、別項にてその特徴は後述するが、厳しい培養条件が求められる細菌やウイルス、様々な事情により血清学的な検査方法が利用できない病原微生物を含め、げっ歯類の病原微生物のほとんどに対して広く利用できる。

間接法である抗体試験は、培養検査や寄生虫検査など直接法では実施が難しいウイルスや一部の細菌を対象とすることが多いが、直接法と組み合わせて行う場合もある。過去の病原微生物の感染履歴を確認できるという点から、監視対象としている病原微生物に感染した形跡がないかを確認するための広範なスクリーニングにおいて特に推奨される方法である。なお、抗体を産生できない免疫不全動物や抗体産生能力が不明な遺伝子改変動物では使用できないことに留意が必要である。血清あるいは血漿1サンプルで複数の病原微生物の確認ができ、実施のための市販試薬を入手しやすく、比較的安価に実施できるなど利点が多く、これまで微生物モニタリングの主要な方法として位置づけられてきた。日本チャールス・リバー（CRJ）ではスクリーニングを目的とした抗体試験手法の一つである蛍光ビーズ法、MFIA<sup>®</sup>（Multiplexed Fluorometric ImmunoAssay<sup>®</sup>）も導入している。MFIA<sup>®</sup>は、一般に利用されているスクリーニング手法のELISA（Enzyme-linked Immunosorbent Assay）と比較し、より微量なサンプル量で、より多くの病原微生物検出を、より確実に行うことができる<sup>[13]</sup>。

## 微生物モニタリングへの PCR 活用

PCR は感度・特異性が高く、短時間で結果が得られるだけでなく分離困難な病原体の検出も可能な技術として急速に発展してきた技術である。PCR の特性を生かし、近年の実験動物の微生物学的評価において、おとり動物を介さずに評価対象動物から直接採材により病原微生物の評価が可能であることが注目されている。すなわち、解剖による被検動物から血液や臓器の採取を必要とせず、非侵襲的に採取可能な糞便、口腔・体表の拭き取りなどの材料で基本的なモニタリング項目のほとんどを実施することができる<sup>[14,15]</sup>。

PCR による微生物モニタリングは感染初期

や不顕性感染における有効な評価手法であり、導入動物の検疫やバリアのリーク評価などに適用することにより、検疫期間を大幅に短縮できる。加えて、従来は抗体の存在確認という二次的な検出方法に頼らざるを得なかったウイルスや培養困難な細菌などに関し、抗原そのものの検出を行うため検出感度においても従来方と比べ優位性がある。さらに、免疫不全動物や遺伝子組換え動物など、抗体利用による評価が困難な動物の直接評価が可能である。おとり動物を用いずに済むことは、おとり飼育に係る手間や経費の削減にもつながる。このように PCR が有する多くの特徴は実験者、飼育管理者の双方にとって非常に有用である。

## Exhaust Air Dust (EAD<sup>®</sup>)

排気口等に集積するケージ由来の埃を材料とする微生物モニタリングは、主に空気を介してのケージ間伝播がない IVC のために考案された、PCR 利用による新しい微生物学的評価方法である。チャールス・リバーグループではこれを EAD<sup>®</sup> (Exhaust Air Dust) と名付け 2012 年より提案している。微生物学的評価のための IVC フィルター活用は 2000 年代初頭から報告があるが<sup>[16]</sup>、その後の PCR 技術革新により微生物の検出感度および精度が大きく向上したこ

とで、フィルターを含む EAD<sup>®</sup> はより現実的かつ有用な評価材料となった。

IVC における EAD<sup>®</sup> の代表的な材料は、収容されるケージが個別にフィルターを有するか否かで異なる。ケージごとの排気フィルターがないタイプのラックでは、プレフィルター前の排気口が最も適したサンプリング場所となる。微生物モニタリング用に開発されたトラップ (フィルター) を設置することができるタイプでは、専用フィルターの使用が最も効果的である (表 2 参照、社内データ) が、プレフィルター、

項目	陽性率	
	廃棄床敷を用いたおとり動物試験	EAD <sup>®</sup> (PCR試験)
消化管内原虫	10.0%	100.0%
被毛ダニ&蟻虫	6.3%	100.0%
細菌	21.4%	85.7%
ウイルス	6.3%	100.0%

80ケージ中4ケージ (5%) で感染動物を飼育

表 2：ケージに排気フィルターを備えていない IVC ラックにおける病原微生物の検出率

プレフィルタースワブ、プレナムの拭き取り材料なども利用できる<sup>[17]</sup>。ケージが排気フィルターを備えているタイプのラックは、排気中のホコリがケージフィルターに捕集されることから、排気口におけるサンプリングでは効果的な微生物検出が期待できない。その場合はおとりケージを設置し、評価対象ケージからの廃棄床敷混入およびおとりケージ内での動物飼育が必要となる。ただし、おとりケージ内の動物飼育はケージ内でホコリを立ててもらおうことが目的であり、動物自体は微生物モニタリング対象ではないことから、動物淘汰はもちろん、動物からの材料採取も必要ない<sup>[18]</sup>。

EAD<sup>®</sup>では、廃棄床敷によるおとり動物への伝播が困難な病原微生物も検出することができ<sup>[19]</sup>、欧米のIVCラック使用の施設では利用が広がっている。前述した従来方法の欠点を補い不用意な病原微生物の施設内拡散を防ぎ、無駄な動物淘汰を避けることができる。おとり動物の必要性を低減・排除でき、動物愛護管理法における3Rsの原則に貢献することに加え、作業や動物飼育費用の削減<sup>[20]</sup>という点からも優れた方法である。

## さいごに

実験動物の多様化、飼育システムの多様化に同調するように、実験用マウス・ラットの監視すべき病原微生物も変化してきている。正確な研究実験データを得るための品質管理として、微生物モニタリングプログラムもまた時代とともに変化していく必要がある。本稿で紹介したホコリを活用した微生物モニタリングは、欧米では利用施設の増加とともに有用性を証明する

## ホコリを用いた微生物モニタリングの今後

EAD<sup>®</sup>は前述の通りIVCのために考案された微生物モニタリング方法であるが、環境材料(ホコリ)の微生物モニタリング材料としての活用は一方向気流ラックやオープンケージ使用のバリア飼育室にも応用が始まっている。バリア飼育室はIVCや一方向気流ラックと異なり、室内で発生したホコリを排気口で効率的に収集できる構造でないことから、バリア飼育室への環境PCR適用にあたっては採取箇所の選定に注意を要する。また、動物飼育ケージから採取した糞便など動物由来材料も併用し、検出感度を上げる工夫も効果的である。

CRJでは2019年に生産動物の微生物モニタリングプログラムを大きく変更し、環境PCRもその一部に加えた。病原微生物をいち早く検出できるというPCRの長所を最大限に生かし、複数手法・複数サンプルで複合的に病原微生物を監視する極めて効率的な内容となった。北米およびヨーロッパのチャールス・リバーグループ施設ではCRJに先んじてバリア施設生産動物の微生物モニタリングに環境PCRを導入しており、CRJを含めたこれまでの実績が、このモニタリングプログラムの有効性を実証していると考えられる。

データが充実してきている。また日本国内においても、この数年で従来のモニタリング方法からの切り替えを検討あるいは実践した施設が増加しており、自施設への導入を目指した検討についての論文発表も散見されるようになってきた<sup>[21,22]</sup>。今後ますます国内での貴重なデータの公表が進み、あらゆる意味において動物福祉に貢献するこの画期的な方法を選択する施設のさらなる増加が望まれる。

## 引用文献

- [1] Baker D.G. Natural pathogens of laboratory mice, rats, and rabbits and their effect on research. *Clin Microbiol Rev.* 1998. 231–266.
- [2] 公益社団法人日本実験動物学会監修．実験動物としてのマウス・ラットの感染症対策と予防．東京：アドスリー．2011.
- [3] 公益社団法人日本実験動物協会編．実験動物の感染症と微生物モニタリング．東京：アドスリー．2015.
- [4] Marx, J.O., Gaertner, D.J., and Smith, A.L. Results of Survey Regarding Prevalence of Adventitious Infections in Mice and Rats at Biomedical Research Facilities. *J Am Assoc Lab Anim Sci.* 2017. **56**(5):527-533.
- [5] Pritchett-Corning, K.R., Shek, W.R., Henderson, K.S., Clifford, C.B., and Warren, S.K. Companion Guide to Rodent Health Surveillance for Research Facilities. USA: Charles River. 2010.
- [6] Selwyn, M.R. and Shek, W.R. Sample sizes and frequency of testing for health monitoring in barrier rooms and isolators. *Contemp Top Lab Anim Sci.* 1994. **33**, 56-60.
- [7] Clifford, C.B. Samples, sample selection, and statistics: living with uncertainty. *Lab Anim (NY).* 2001. **30**(10):26-31.
- [8] ILAR. Long-term holding of laboratory rodents. *ILAR News.* 1976. **19**:L1-L25.
- [9] Shek, W. R. Role of housing modalities on management and surveillance strategies for adventitious agents of rodents. *ILAR J.* 2008. **49**(3):316-25.
- [10] Bruin, W.C.C., Ven, E.M.E., and Hooijmans, C.R. Efficacy of Soiled Bedding Transfer for Transmission of Mouse and Rat Infections to Sentinels: A Systematic Review. *PLoS ONE.* 2016. 11(8).
- [11] Charles River technical sheet. Limitations of Detection Using Soiled-Bedding Sentinels. USA: Charles River Laboratories. 2017.
- [12] Manuel, C.A., Hsu, C.C., Riley, L.K., and Livingston, R.S. Soiled-bedding Sentinel Detection of Murine Norovirus 4. *J Am Assoc Lab Anim Sci.* 2008. **47**(3): 31–36.
- [13] Wunderlich, M. L., Dodge, M.E., Dhawan, R.K., and Shek, W.R. Multiplexed fluorometric immunoassay testing methodology and troubleshooting. *J Vis Exp.* 2011. 2(58):3715.
- [14] Henderson, K.S. and Shek, W.R. Comparison of Charles River PCR Rodent Infectious Agent (PRIA) Panels to Standard Diagnostic Methodologies. USA: Charles River Laboratories. 2012.
- [15] Henderson, K.S., Perkins, C.L., Havens, R.B., Kelly, M.E., Francis, B.C., Dole, V.S., and Shek, W.R. Efficacy of direct detection of pathogens in naturally infected mice by using a high-density PCR array. *J Am Assoc Lab Anim Sci.* 2013. **52**(6):763-72.
- [16] Compton, S.R., Homberger, F.R., Paturzo, F.X., and Clark, J.M. Efficacy of three microbiological monitoring methods in a ventilated cage rack. *Comp Med.* 2004. **54**(4):382-92.
- [17] Mahabir, E., Durand, S., Henderson, K.S., and Hardy, P. Comparison of two prevalent individually ventilated caging systems for detection of murine infectious agents via exhaust air particles. *Lab Anim.* 2018. **53**(1):84-88.
- [18] Dubelko, A.R., Zuwannin, M., McIntee, S.C., Livingston, R.S., and Foley, P.L. PCR Testing of Filter Material from IVC Lids for Microbial Monitoring of Mouse Colonies. *J Am Assoc Lab Anim Sci.* 2018. **57**(5):477-482.
- [19] Miller, M., Ritter, B., Zorn, J., and Brielmeier, M. Exhaust Air Dust Monitoring is Superior to Soiled Bedding Sentinels for the Detection of *Pasteurella pneumotropica* in Individually Ventilated Cage Systems. *J Am Assoc Lab Anim Sci.* 2016. **55**(6):775-781.
- [20] Luchins, K.R., Bowers, C.J., Mailhiot, D., Theriault, B.R., and Langan, G.P. Cost Comparison of Rodent Soiled Bedding Sentinel and Exhaust Air Dust Health-Monitoring Programs. *J Am Assoc Lab Anim Sci.* 2020. **511**(5):508-511.

- 
- [21] Niimi, K.; Maruyama, S.; Sako, N.; Miyata, K.; Yoshimoto, T.; Bilecki, B.; Henderson, K. S., and Takahashi, E. The sentinel™ EADR program can detect more microorganisms than bedding sentinel animals. *Japanese Journal of veterinary research*, 2018. **66**(2):125-129.
- [22] 山田梓, 山本英作, 森井清志, 小山公成. 実験用マウス・ラット室における *Corynebacterium bovis* と *Staphylococcus aureus* 検査のための床敷および排気フィルターサンプルの有用性の検証. *実験動物技術*. 2020. **55**(2): 45-56

※ 本稿は九州実験動物雑誌 . No.36, October. 2020. 掲載の寄稿文『現代の創薬における実験動物施設の微生物管理』を基に、新情報を含め一部再編集したものである。

## 著者プロフィール



まるやま しげり

**丸山 滋**

### 【学歴】

北海道大学理学部生物学科 卒業

鹿児島大学農学部獣医学科 卒業

### 【職歴】

日本チャールス・リバー株式会社 モニタリングセンター

日本チャールス・リバー株式会社 モニタリングセンター長

日本チャールス・リバー株式会社 生産部 マイクロバイオロジカルスペシャリスト

### 【所属学協会での役職】

(公財) 日本実験動物学会 (実験動物感染症対策委員)

---

CRJ LETTERS この小冊子に関するご意見、ご要望を下記までお寄せください。

発行日：2021年8月

発行所：日本チャールス・リバー株式会社

〒222-0033 横浜市港北区新横浜 3-17-6 イノテックビル11階

電話 045(474)9340 email AskCRJ@crl.com

企画・編集：日本チャールス・リバー株式会社 制作：株式会社アドスリー

Copyright© 2021 Charles River Laboratories Japan Inc. All Rights Reserved.

本書の無断複写複製および転載は、特定の場合を除き、著作者、出版社の権利侵害になります。

---

# 日本チャールス・リバー株式会社

Charles River Laboratories Japan, Inc.

---

本 社（代表）	〒 222-0033 横浜市港北区新横浜 3-17-6 イノテックビル 11 階	TEL 045-474-9330	FAX 045-474-9331
カスタマーサポートセンター（受注窓口）	〒 222-0033 横浜市港北区新横浜 3-17-6 イノテックビル 11 階	TEL 045-474-9350	FAX 045-474-9351
営業本部（東日本）	〒 222-0033 横浜市港北区新横浜 3-17-6 イノテックビル 11 階	TEL 045-474-9340	FAX 045-474-9341
営業本部（西日本）	〒 569-0803 大阪府高槻市高槻町 5-25 北本ビル 1 階 C 号室	TEL 072-686-6651	FAX 072-686-6652

ホームページ <http://www.crj.co.jp>

お問い合わせ先 [AskCRJ@crl.com](mailto:AskCRJ@crl.com)