



EAD (排気ダスト) PCR試験による 新しい病原微生物の検出手法

概要

生物医学研究では、実験動物が特定の病原微生物に感染していないことをモニタリングして確認する必要があります。これには複数の理由があります。例えば、ある病原微生物がたとえ病気を引き起こすことはめったにない場合でも、実験における反応を変えてしまったり、生物製剤を汚染してしまったりすることによって研究を妨げる可能性があります。さらに、常に最新のヘルスレポートを作成して共同研究機関との動物の移動を容易にするためにもモニタリングは必要です。また、さらなる例では、IACUCなどの機関および/または運営組織が定期的なモニタリングの実施を要求するケースが多くあります。

状況

病原性微生物を排除する際、通常、実験動物は体外受精によるクリーン化または投薬治療が施された後、より厳密な生物学的管理下にある部屋単位あるいはケージ単位のバリア環境に収容されます。

このようなマイクロアイソレーションケージシステムは、マウスやラットなどの動物の維持と検疫に広く採用されています。これらのシステムが提供するケージレベルのバリアが、偶発的な病原微生物の拡散の排除および阻止に非常に効果的であることが証明されているからです¹。ただし、100%侵入できないバリアというものはありません。

したがって、マイクロアイソレーション環境であっても、繁殖コロニーおよび研究コロニーならびに検疫中の輸入動物のSPF (Specific Pathogen Free) 状況を確認するには、定期的なヘルスマニタリング (HM) が必要です。しかし、実験動物 (例: 研究コロニーのげっ歯類) に対して、動物を出血させるか安楽死させる必要がある従来のHMを実施することは、多くの場合、非現実的です。

この代替策として代表的なのが、廃床敷おとり動物 (SBS : Soiled Bedding Sentinels) により間接的に動物をモニタリングすることです²。この手法では、おとり動物は実験動物とは別のケージに収容され、実験動物のケージからプールされた廃床敷を、おとり動物のケージに定期的に供給します。時間の経過とともに、実験動物が持つ感染性病原微生物は、プールされた床敷に移り、次におとり動物に移ることが期待されています。したがって、SBSによる定期的なスクリーニング (例: 病理、寄生虫、細菌、血清など) は、間接的ではありますが、実験動物の健康状態のモニタリングを提供してくれます。

課題

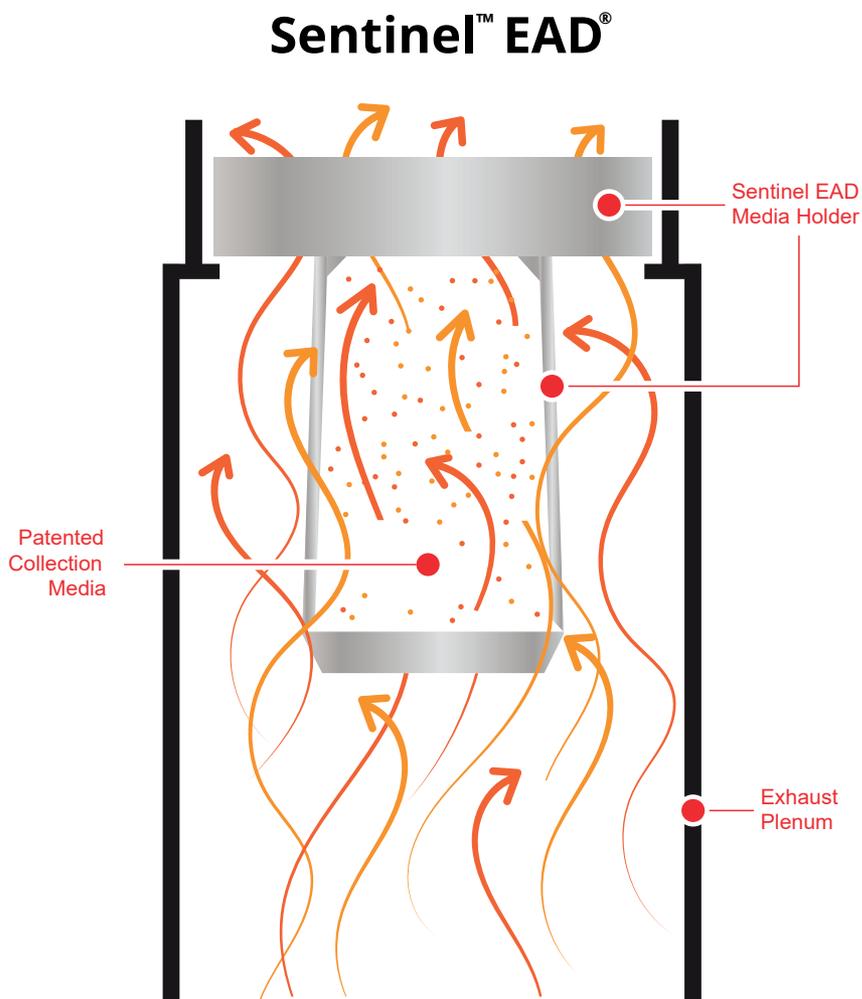
しかし最近では、SBSを定期的なヘルスマニタリングに使用することについて、その有効性が疑問視されています³。マイクロアイソレーターケージへの切り替えは病原微生物の伝播を抑えるのに役立ちましたが、ヘルスマニタリングにとっては不十分な環境を提供することになります。注目すべきなのは、実験動物から多くの病原微生物が廃床敷を介しておとり動物にうまく移らないことが度々あり、もしくは移ったとしても伝播に一貫性がないということです⁴。さらに、マイクロアイソレーターケージ内での感染率が低下するほど、プールされた床敷内の病原微生物の量が動物に感染するには不十分になるリスクが高くなります。

解決策

SBSの代替手段となるのが、排気ダスト (EAD : Exhaust Air Dust) によるPCR試験です。この手法は20年以上使用されており、実験動物のコロニーにおいて病原微生物を検出する手段として注目を集めています。研究によると、EADはSBSと比較して有効性が高く、廃床敷では伝播が不十分な細菌を検出する一方で、費用効率が高く、3R^{2,3,5}のミッションにも準拠しています。

しかしながら、標準的なEADが、特にSBSと比較して勢いを増している一方で、まだ改善の余地があります。EADのポテンシャルを最大限に伸ばして最適化するために、チャールス・リバーはアレンタウン社と提携して、個別換気ケージラック (IVR : Individually Ventilated cage Rack) の排気プレナム内の気流から捕捉された環境ダストから病原微生物を検出する独自のシステムを開発して特許を取得しました⁶。アレンタウン社が焦点を当てたのは、特殊な排

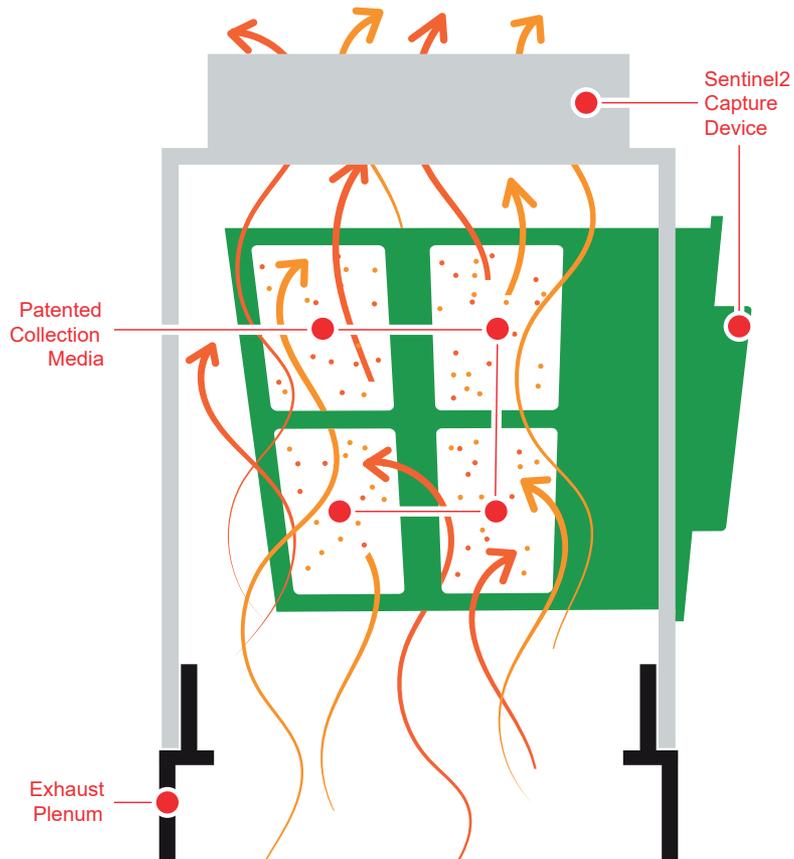
気ダスト（EAD）収集用メディアを排気流内で適切な方向に保持する機器（デバイス）、およびチャールス・リバーによって開発された、排気流中に設置されたメディアから核酸を回収し、核酸検出技術を用いた分析で病原微生物を検出する手法でした。（図1）。



特許取得済みのセンチネル EAD 収集用メディアと特別に設計されたメディアホルダーは、縦型排気プレナムの上部に設置されます。

収集用メディアは、排気はその周りを旋回する時に微粒子を引き付けますが、フィルターのように「(気流への) 抵抗」を与えることはありません。

Sentinel2™



センチネル 2 は、排気流内に配置されるものの排気プレナム内部には設置されない捕捉デバイスを採用する、代替システムです。代わりに、排気ブローアもしくはプレナムの上部に取り付けられ、プレナムを開くことなく収集用メディア（こちらは 2 つの個別のメディア）の取り付け・取り外しが可能です。収集用メディアは、排気がその周りを旋回する時に微粒子を引き付けますが、フィルターのように「(気流への) 抵抗」を与えることはありません。

Figures 1 & 2 courtesy of Allentown, LLC Sentinel™ EAD®: US Patent 10,575,495 B2, Canadian Patent 2,987,625. Sentinel2™: Patent Pending. Sentinel is a trademark of Allentown, LLC. EAD is a registered trademark of Charles River Laboratories, Inc.

特許の基礎となるデータは、2015 年の NAALAS で発表されました。この研究では、ウイルス、細菌、原虫、ダニ、蟻虫などの病原微生物のサンプルが収集され、試験が行われました。収集方法および試験方法は、おとりケージフィルターの PCR 試験、血清・細菌・寄生虫および PCR を含む床敷おとり動物の試験、プレナムもしくは排気ホースのスワブ PCR 試験（「古典的な」EAD）、チャールス・リバーとアレントアウン社によって開発された新しい試験方法（インライン集塵メディア PCR）が含まれていました。低い感染率の状況をシミュレートするために、20 項目の感染性病原

微生物に感染していることが事前に判明している 8 匹のペットショップのマウス（1 ケージあたり 2 匹のマウス）が使用されました。表 1a から 1d に示すように、EAD は全般的におとり動物よりも優れていることが証明されました。なお、試験を行った EAD の中でも、チャールス・リバーとアレントアウン社の試験方法（19 項目）は、従来の試験方法（プレナムおよび排気ホースのそれぞれ 13 項目、両方を合計した病原微生物で 15 項目）よりも病原微生物の検出により高い効果を示しました⁷。

結論

実験動物のコロニーの病原微生物を検出する効果的な手法として、廃床敷を用いたおとり動物による試験に対する信頼性が低下しつつあるなか、その代替手段は排気ダストによる試験であるのは明らかです。ただしデータが示すように、すべての EAD 試験が同じように開発されているわけではありません。従来のスワブ法は SBS よりは優れていますが、動物のコロニーの健康に悪影響を与える可能性の

ある病原微生物を見逃しています。このような見逃しに対応できるのが、チャールス・リバーとアレンタウン社によって実証された試験方法と機器（デバイス）の組み合わせです。

EAD ヘルスモニタリング試験方法のライセンス条項の詳細につきましては、LabServices@crl.com にお問い合わせください。

Results for Viruses: % Positive*

Agent	Sentinel		Sentinel Cage Filter		Exhaust Air Dust		
	Traditional	PCR	no Sent	w/ Sent	Hose Swabs	Plenum Swabs	Media
Adenovirus	0	0	0	1	0	0	1
Coronavirus	1	0	0	4	1	1	1
Mouse Parvoviruses	4	1	0	4	1	1	1
Theilovirus	0	0	1	2	1	1	1
Total % Positive	31.3%	6.3%	6.3%	68.8%	75.0%	75.05%	100.0%

Table 1a. Results for Viruses.

Results for Bacteria: % Positive*

Agent	Sentinel		Sentinel Cage Filter		Exhaust Air Dust		
	Traditional	PCR	no Sent	w/ Sent	Hose Swabs	Plenum Swabs	Media
Beta Strep Group B	0	0	0	0	0	0	1
<i>Helicobacter</i>	N/A	0	2	4	1	1	1
<i>M. Pulmonis</i>	0	3	0	2	1	1	1
<i>P. mirabilis</i>	0	0	2	3	1	0	0
<i>P. multocida</i>	0	0	0	1	0	0	1
<i>P. pneumotropica</i>	0	3	1	4	1	1	1
<i>S. aureus</i>	0	0	0	0	0	0	1
Total % Positive	0.0%	21.4%	17.9%	50.0%	57.1%	42.9%	85.7%

Table 1b. Results for Bacteria.

Results for Protozoa: % Positive*

Agent	Sentinel		Sentinel Cage Filter		Exhaust Air Dust		
	Traditional	PCR	no Sent	w/ Sent	Hose Swabs	Plenum Swabs	Media
<i>Cryptosporidium</i>	0	0	0	2	1	1	1
<i>Entamoeba</i>	2	2	0	4	1	1	1
<i>Giardia</i>	0	0	0	1	0	0	1
<i>Spironucleus muris</i>	0	0	0	2	1	0	1
<i>Tritrichomonas</i>	0	0	4	4	1	1	1
Total % Positive	10.0%	10.0%	20.0%	65.0%	80.0%	60.0%	100.0%

Table 1c. Results for Protozoa.

Results for Mites and Pinworms: % Positive*

Agent	Sentinel		Sentinel Cage Filter		Exhaust Air Dust		
	Traditional	PCR	no Sent	w/ Sent	Hose Swabs	Plenum Swabs	Media
<i>Demodex</i>	0	0	0	1	0	1	1
<i>Myobia/Radfordia</i>	0	1	0	2	1	1	1
<i>Myocoptes</i>	0	0	0	0	1	1	1
<i>Pinworms</i>	0	0	0	4	0	1	1
Total % Positive	0.0%	6.3%	0.0%	43.8%	50.0%	100.0%	100.0%

Table 1b. Results for Mites and Pinworms.

*for sentinel cages and sentinel cage filters n=4, and EAD plenum and media samples n=1

文献

1. Dillehay DL, Lehner ND, Huerkamp MJ. The effectiveness of a microisolator cage system and sentinel mice for controlling and detecting MHV and Sendai virus infections. *Lab Anim Sci.* 1990;40(4):367-70. Epub 1990/07/01. PubMed PMID:2166862.
2. Luchins KR, Bowers CJ, Mailhiot D, Theriault BR, Langan GP. Cost Comparison of Rodent Soiled Bedding Sentinel and Exhaust Air Dust Health-Monitoring Programs. *J Am Assoc Lab Anim Sci.* 2020;59(5):508-11. Epub 2020/06/28. doi:10.30802/AALAS-JAALAS-20-000003. PubMed PMID: 32591028; PMCID: PMC7479769.
3. Mailhiot D, Ostdiek AM, Luchins KR, Bowers CJ, Theriault BR, Langan GP. Comparing Mouse Health Monitoring Between Soiled-bedding Sentinel and Exhaust Air Dust Surveillance Programs. *J Am Assoc Lab Anim Sci.* 2020;59(1):58-66. Epub 2019/12/22. doi: 10.30802/AALAS-JAALAS-19-000061. PubMed PMID: 1862019; PMCID: PMC6978580.
4. Henderson KS, Perkins CL, Havens RB, Kelly MJ, Francis BC, Dole VS, Shek WR. 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. Epub 2013/12/20. PubMed PMID: 24351765; PMCID: PMC3838611.
5. Mahabir E, Durand S, Henderson KS, Hardy P. Comparison of two prevalent individually ventilated caging systems for detection of murine infectious agents via exhaust air particles. *Lab Anim.* 2019;53(1):84-8. Epub 2018/07/18. doi:10.1177/0023677218785929. PubMed PMID: 30012043.
6. Henderson KS, Coiro JM, Bilecki BM, Schupsky TP, inventors; Charles River Laboratories International, Inc., assignee. United States Patent: 10954573 - Detection of infectious agents from environmental air dust patent 10954573. March 23,2021.
7. Abstracts of Scientific Presentations: 2015 AALAS National Meeting Phoenix, Arizona. *Journal of the American Association for Laboratory Animal Science : JAALAS.* 2015;54(5):568-668. Epub 2015/09/; PMCID: PMC4587627.