

## 微生物モニタリング日動協メニューの改訂

(平成 23 年 4 月 1 日発行、平成 27 年 4 月 1 日一部変更)

(公社)日本実験動物協会(日動協)の微生物モニタリングのための日動協メニューは、ICLAS モニタリングセンター(MC)の検査項目と連動し、かつ各微生物の病原性のカテゴリーを念頭に置くこと。国内の動物実験施設における現状の微生物の汚染率を考慮すること。そして自家検査が実施可能な項目を組込むなどを基本的な考えとして設定されている。また見直しは、MC の検査項目改訂に合わせ実施している。

LABIO21 No.42、10 月号において、MC からマウス・ラット用の新しい検査項目コアセットを設定し、2011 年 4 月から運用開始することが示された。それを受け日動協モニタリング技術専門委員会(現モニタリング技術委員会)では、マウス・ラットの日動協メニュー改定に関する検討を重ねてきた。その結果、今後の日動協メニューとして、MC が新たに設定した通常動物用コアセットおよび免疫不全動物用コアセットを取り入れることとし、不足する検査項目は各実験動物施設の微生物管理体制に合わせ、オプション項目から選択する内容に改訂することにした。

以下、その背景と内容を解説する。

### 1. 日動協メニュー改訂の背景

#### ①微生物の病原性別カテゴリーの見直し

まず *Pasteurella pneumotoropica*(Pp)と *Citrobacter rodentium*(Cr)の病原性を見直し、Pp のカテゴリーを C から D へ、Cr を B から C 変更することにしたことが挙げられる。Pp をカテゴリーC から D に変更した理由は、本菌はわが国のマウス動物実験施設における汚染率は高いが、文献的にも単独感染で肺炎起こすことが報告されていないこと。そして免疫機能が正常な自然感染マウス・ラットには、解剖所見において病原性が無いことが確認されていることから、免疫機能正常マウス・ラットにおいては、カテゴリーC から除外すべきと考えた。一方において免疫不全マウス・ラットには病原性があることが報告されていることから、日和見病原体と位置付けカテゴリーD にすべきと考えた。つぎに Cr は、哺乳マウス感染では致死性であるが、離乳後のマウスでは不顕性感染であること、過去 30 年間わが国において感染報告が無く、汚染率が低いことからカテゴリーを B から C に変更した。

#### ②動物実験の目的の変化

遺伝子改変技術の進歩により、多くの動物実験施設実験目的がその技術を用いた疾患モデルマウスの作出、解析に移行している。その中でも、特に免疫系を操作した遺伝子改変マウスが多く作出されており、それらへの日和見病原体に対する微生物コントロールは重要であると考え、免疫不全マウス・ラット用の検査項目コアセットを設定した。

#### ③動物福祉への対応

動物愛護法が改正され、3R への配慮が動物実験にも求められるようになり、動物実験施設の微生物コントロールにおいても配慮が必要であると考えた。たとえば、免疫機能正常動物に病原性が無い日和見病原体の感染が起きた場合、それらが実験自体に影響を及ぼさなくても、施設全体の微生物コントロールが優先され、動物の淘汰が過去実施されてきたことがある。このような不幸な事態を防止するためにも、施設の微生物コントロールを免疫正常動物と免疫不全動物（実験目的別）に分けるべきであると考えた。

## 2. 日動協メニュー（通常動物コアセット、免疫不全動物コアセット）

日動協メニュー改訂の目的は、免疫機能正常マウス・ラット（通常動物）と免疫不全マウス・ラットの微生物コントロールを分けることにある。そのため日動協メニューは、それぞれの動物の微生物コントロールに最低限必要な検査項目が組込まれたセットとして設定し、それぞれに最低限必要な検査項目が一括で検査できるようにした。一方、各施設の微生物コントロールにおいてコアセットでは検査項目が不足する場合は、実験目的に応じオプション項目から選択できるようにした。

### ① 通常動物コアセット

マウスでは、現状の日動協メニューにある培養 I から Pp と Cr を除外し、ラットでは Pp と *Streptococcus pneumonia* (Sp) を除外した。Pp と Cr を除外した理由は、カテゴリーの変更が主な理由である。つぎにラットにおいて Sp を除外した。その理由は、MC において過去 20 年検出されたことが無いこと、そして感染しても不顕性感染にて推移し、病原性が低いことである。

なお血清反応および鏡検にある検査項目は変更せず、現状のままとした。

### ② 免疫不全動物コアセット(表 1)

マウスでは、上記の通常動物コアセットの培養検査に Cr と免疫不全マウスの微生物コントロールに必須な日和見病原体である Pp、*Staphylococcus aureus* (Sa)、*Pseudomonas aeruginosa* (Pa) および *Pneumocystis spp.*を加えた。つぎに免疫不全マウスが感染した場合、重症化する恐れがある *Helicobacter hepaticus* と *Helicobacter bilis* も必須検査項目として加えた。

ラットでは、通常動物コアセットの培養に Sp と日和見病原体である Pp、Sa、Pa および *Pneumocystis spp.*を加えたセットとした。

なお血清反応にある検査項目は変更せず、現状のままとした。

### ③ オプション項目(表 2)

オプション項目には、従来の日動協メニューから除外した検査項目、従来からのオプション検査項目に加え、MC が実施しているオプションとして実施している項目も組み込み、必要に応じ、コアセットに追加できるようにした。

## 3. 免疫不全動物コアセットに対応したサンプリング

本コアセットへの対応において、苦慮するのは通常動物と免疫不全動物の区分であると思われる。ヌードや scid のような市販されている既存の免疫不全動物においては判断に迷うことはないが、遺伝子改変技術により免疫系が操作された開発途上の動物をどの様に取り扱うかは迷うところである。しかしこれら動物も、基本的には免疫不全動物候補であると考え、微生物コントロールには本コアセットを適用すべきであると考え。

つぎに本コアセットに適した検査対象動物には、免疫不全動物と同じ環境で飼育された動物（例えば nu/+ など）が適している。しかし、免疫機能正常動物であることから、*Pneumocystis* spp. の検出感度は低下する。それを防ぎ、本病原体の検査精度向上を目指すのであれば、コアセットの培養、鏡検、PCR 検査には免疫不全動物、抗体検査には上記動物を組み合わせて検査対象動物とするのも選択肢のひとつである。

#### 「参考文献」

1. 川本英一他「*Pasteurella pneumotropica* の免疫不全および免疫正常マウスに対する病原性」日本実験動物科学技術 2008 抄録。
2. 日動協編「実験動物の微生物モニタリングマニュアル」、2005 年、アドスリー
3. Hayashimoto, N., Aiba, T., Itoh, K., Kato, M., Kawamoto, E., Kiyokawa, S., Morichika, Y., Muraguchi, T., Narita, T., Okajima, Y., Takakura, A., Itoh, T. 2005. Identification procedure for *Pasteurella pneumotropica* in microbiologic monitoring of laboratory animals. *Exp. Anim.* 54: 123-129.
4. Hayashimoto, N., Yasuda, M., Goto, K., Takakura, A. 2008. Experimental infection studies of *Pasteurella pneumotropica* and V-factor dependent *Pasteurellaceae* for F344-rnu rats. *Exp. Anim.* 57: 57-63.
5. 高倉 彰「新マウス・ラット微生物検査項目の設定と日動協メニュー」LABIO 21, No.42, Oct.

表1. 日動協メニュー(マウス・ラット)

微生物	検査法	マウス		ラット	
		通常動物 コアセット	免疫不全 動物コア セット	通常動物 コアセット	免疫不全 動物コア セット
<i>Bordetella bronchiseptica</i>	培養			○	○
<i>Citrobacter rodentium</i>			○		
<i>Corynebacterium kutscheri</i>		○	○	○	○
<i>Mycoplasma pulmonis</i>		○	○	○	○
<i>Pasteurella pneumotropica</i>			○		○
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>			○		○
<i>Salmonella</i> spp.		○	○	○	○
<i>Staphylococcus aureus</i>			○		○
<i>Streptococcus pneumoniae</i>					○
<i>Clostridium piliforme</i> (Tyzzer 菌)	血清反応	○	○	○	○
Ectromelia virus		○	○		
Hantavirus				○	○
LCM virus		○	○		
Mouse hepatitis virus		○	○		
<i>Mycoplasma pulmonis</i>		○	○	○	○
Sendai virus		○	○	○	○
Sialodacryoadenitis virus (SDAV)				○	○
消化管内原虫	鏡検	○	○	○	○
外部寄生虫		○	○	○	○
蟻虫		○	○	○	○
<i>Pneumocystis</i> spp.	PCR		○		○
<i>Helicobacter hepaticus</i>			○		
<i>Helicobacter bilis</i>			○		

*Pneumocystis* spp. (マウスでは *murina*、ラットでは *carinii*、旧検査法: 鏡検、平成 27 年 4 月 1 日検査実施分より変更)

表2. 日動協メニュー(マウス・ラット)

【オプション項目】

検査法	微生物	マウス	ラット
培養	<i>Bordetella hinzii</i>	○	
	<i>Citrobacter rodentium</i>	○	
	Dermatophytes (皮膚糸状菌)	○	○
	<i>Pasteurella pneumotropica</i>	○	○
	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> (緑膿菌)	○	○
	<i>Staphylococcus aureus</i>	○	○
	<i>Streptococcus pneumoniae</i>		○
血清反応	Cilia-associated respiratory (CAR) baillus	○	
	EDIM (Rota) virus	○	
	H-1 virus		○
	Kilham rat virus		○
	Mouse minute virus	○	○
	Mouse adenovirus	○	○
	Mouse cytomegalovirus	○	
	Mouse encephalomyelitis virus (GDVII)	○	○
	Mouse parvovirus	○	
	Pneumonia virus of mice	○	○
	Polyomavirus	○	
	Reovirus type 3	○	○
PCR	<i>Pneumocystis</i> spp.	○	○
	Cilia-associated respiratory (CAR) baillus	○	○
	<i>Clostridium piliforme</i> (Tyzzer 菌)	○	○
	<i>Helicobacter hepaticus</i>	○	
	<i>Helicobacter bilis</i>	○	
	Lactate dehydrogenase-elevating virus	○	
	Mouse hepatitis virus	○	
	Murine norovirus	○	

*Pneumocystis* spp. (マウスでは *murina*、ラットでは *carinii*、旧検査法: 鏡検、平成 27 年 4 月 1 日検査実施分より変更)