

令和 2 年 6 月 10 日現在

機関番号：24403

研究種目：若手研究

研究期間：2018～2019

課題番号：18K14610

研究課題名(和文)国内の実験用ラットコロニーにおけるラットポリオーマウイルス2の汚染状況調査

研究課題名(英文)A survey for Rat polyomavirus 2 in laboratory rats in Japan

研究代表者

田中 美有 (Tanaka, Miyuu)

大阪府立大学・生命環境科学研究科・特任助教

研究者番号：00756893

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,100,000円

研究成果の概要(和文)：XSCIDラットでのRat polyomavirus 2 (RatPyV2) 感染症の詳細な病変評価の結果、唾液腺、ハーダー腺、眼窩外涙腺、呼吸器、生殖/副生殖器の上皮細胞に、好塩基性核内封入体が認められた。RatPyV2は唾液腺(中でも耳下腺)に対する親和性が特に高いことが示された。免疫正常ラット系統対象の調査では、血清検査で37.7%(46/121個体)、PCR検査で41.1%(37/90個体)が陽性となり、RatPyV2不顕性感染個体が一定の割合で存在していた。また、本感染症の簡便・迅速な診断法として、口腔内スワブを用いたFTA-Amp法によるPCR検査やLAMP法の有用性を初めて示した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

現在、がん研究や再生医療研究、移植研究、創薬研究など医学・生命科学分野の研究を推進する上で、免疫不全ラットは必要不可欠なツールとなっている。一方で、日本の免疫正常ラット系統コロニー中には、RatPyV2不顕性感染個体が一定の割合で存在することが明らかとなり、免疫不全ラットを用いた研究への影響が懸念される。我々が確立した、口腔内スワブを用いたFTA-Amp法は、RatPyV2感染症の簡便かつ迅速な診断法として有用であるのみならず、RatPyV2不顕性感染個体を確実に検出する上でも、検査法としての有用性が期待される。

研究成果の概要(英文)：We revealed detailed pathology of Rat polyomavirus 2 (RatPyV2) in XSCID rats: histologically, we observed basophilic intranuclear inclusion bodies within epithelial cells in the salivary, Harderian, and extraorbital lacrimal glands, and in respiratory and reproductive tissues. It was suggested that the salivary glands were the most highly susceptible tissue to RatPyV2. In serological test, 46 in 121 immunocompetent rats (37.7%) were positive for RatPyV2. PCR test revealed that 41.1% (37/90 rats) immunocompetent rats were positive for RatPyV2 genes. Our survey for RatPyV2 revealed relatively widespread RatPyV2 infection in immunocompetent laboratory rat populations in Japan. We detected RatPyV2 genes in DNA samples including buccal swabs or blood smeared on the FTA cards (FTA-Amp method). The LAMP method could also detect RatPyV2 gene in XSCID rats. The FTA-Amp and LAMP method using buccal swabs could be useful for the rapid diagnosis of RatPyV2 infection.

研究分野：獣医病理学

キーワード：ラットポリオーマウイルス2 感染症 病理学 実験動物学 免疫不全ラット

様式 C-19、F-19-1、Z-19（共通）

1. 研究開始当初の背景

ポリオマウイルス (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。ヒトでは免疫不全患者において、腎炎、脳症、肺炎、腫瘍など様々な PyV 関連疾患が報告されており、重大な問題となっている。PyV は不顕性感染することから、実験動物においても、PyV 感染症の制御は非常に重要である。ラットでは、ウイルスゲノムの配列は未同定ではあるが、ヌードラットに唾液腺炎、気管・気管支・細気管支炎、肺炎を引き起こす PyV 感染症が 1984 年に報告された (Ward et al. 1984)。また、2015 年には、野生・野生由来ラットコロニーから Rat PyV1 が同定された (Ehlers et al. 2015) が、その病原性を含めた詳細は不明である。

XSCID-TALEN ラットは、京都大学で開発された X 連鎖重症複合免疫不全症のモデルラットであり (Mashimo et al. 2010, 2012)、がん研究、幹細胞研究、移植研究、創薬研究などに幅広く利用可能なモデル動物である。2016 年、米国の XSCID ラットコロニーにおいて、新規のラットポリオマウイルス 2 (*Rattus norvegicus polyomavirus 2*: RatPyV2) 感染症が報告された (Rigatti et al. 2016)。この報告を受け、実験動物学分野では、Rat PyV2 感染症への関心が世界的に高まっている。日本でも、研究代表者の当時の所属施設を含めて、複数の XSCID ラットコロニーにおいて RatPyV2 感染症の発症が証明された。RatPyV2 は免疫正常個体では不顕性感染するが、北米での汚染状況調査では、免疫正常ラット系統の 32% が血清検査陽性であったと報告されている。免疫抑制剤を用いた慢性毒性試験での Rat PyV2 感染例も報告された (Masek-Hammerman et al. 2017)。また、数種の免疫正常ラットを対象に事前の血清学的検査を行ったところ、一部で陽性個体を検出した。そのため、研究に利用されるラット系統コロニーに、Rat PyV2 がすでに一定の割合で浸潤していることが懸念されている。

2. 研究の目的

RatPyV2 は免疫正常個体では不顕性感染するが、日本で研究に利用される免疫正常ラットコロニー中にも、すでに一定の割合で浸潤していると懸念される。本研究では、(1) 免疫不全系統での RatPyV2 感染症の詳細な病変評価と、(2) 確実かつ迅速な RatPyV2 の診断方法 (RatPyV2 の遺伝子検出法) の確立、(3) 日本の免疫正常ラットコロニーでの RatPyV2 の汚染状況調査を目的とした。

3. 研究の方法

(1) 免疫不全系統での RatPyV2 感染症の詳細な病変評価

1~8.5 ヶ月齢の XSCID-TALEN ラット (計 25 匹) を対象に、全身諸臓器の病理組織学的検査を実施した。RatPyV2 のウイルス抗原は、抗 SV40 large T antigen 抗体 (clone PAb416) を用いた免疫組織化学染色により検出した。

(2) 確実かつ迅速な RatPyV2 の遺伝子検出法の確立

免疫不全系統の凍結臓器やパラフィン包埋組織、糞便等から抽出した DNA、FTA card に塗布した口腔内スワブ・血液を用いて (FTA-Amp 法)、RatPyV2 特異的プライマーによる PCR 検査を行った。FTA-Amp 法は、PCR 阻害物質を中和する PCR 緩衝液 Ampdirect Plus (島津製作所) と FTA カード技術を組み合わせた PCR 法である (Nakanishi et al. 2009)。FTA-Amp 法による RatPyV2 遺伝子の検出手順の概要は図 1 に示すとおりである。

また、LAMP 法 (Loop-Mediated Isothermal Amplification: ループ介在等温増幅法) の有用性も検討した。肺や唾液腺組織から抽出した DNA、口腔内スワブ検体と、DNA 増幅試薬キットおよび蛍光・目視検出試薬 (栄研化学) を用いて遺伝子を増幅後、蛍光目視検出による判定を行った。

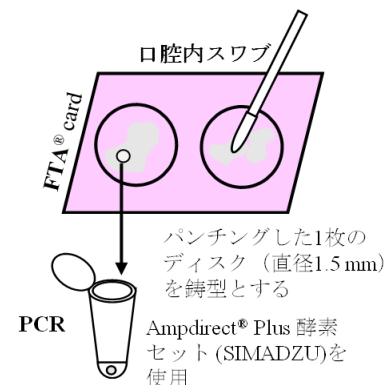


図1. 口腔内スワブを用いたFTA-Amp法によるRatPyV2遺伝子の検出

(3) 日本の免疫正常ラットコロニーでの RatPyV2 の汚染状況調査

計 121 匹 (37 系統) の免疫正常ラット系統を対象に、RatPyV2 の血清学的検査 (米国 IDEXX 社に依頼) と口腔内スワブを用いた PCR 検査 (FTA-Amp 法) を行った。また、RatPyV2 の標的臓器を中心に病理組織学的検査を実施した。

4. 研究成果

(1) 免疫不全系統での RatPyV2 感染症の詳細な病変評価

A. 臨床兆候: RatPyV2 に感染した免疫不全ラットは、衰弱および消瘦、呼吸器症状、雌の繁殖率低下や紅涙/色素涙を呈し、6 か月齢以降で死に至る個体が増える傾向にあった。臨床兆候の程度は、ラットの月齢や個体によって様々であり、特に若齢個体では、RatPyV2 に感染していても明らかな臨床兆候を示さないことが多いと考えられた。

B. 病理学的所見：剖検時には、唾液腺やハーダー腺、眼窩外涙腺の様々な程度の萎縮が観察された。特に、耳下腺とハーダー腺の萎縮は、1~3 か月齢の時点でも明らかであった。さらに、呼吸器症状のある高齢ラットでは、肺において、様々な程度の暗赤色の硬化・充実性病巣が観察された。

病理組織学的には、主に唾液腺、ハーダー腺、眼窩外涙腺、呼吸器、生殖器/副生殖器（子宮、前立腺と精巣上部、精管）において病変が認められた。病変の形成時期や程度（重篤度と範囲）は、標的臓器により異なっていた。標的臓器の中でも、耳下腺における病変が最も顕著であり、1ヶ月齢の時点で、組織の広範囲において重篤な病変が観察された。RatPyV2 感染症における最も特徴的な所見は、過形成または異形成（dysplasia）を呈する標的上皮細胞における、大型で好塩基性~両染色核内封入体の形成である（図2）。核内封入体には、その周囲にハローを有するもの（Cowdry A型）と有さないもの（full型）とが認められた。唾液腺やハーダー腺、眼窩外涙腺では、線維化や単核球浸潤を伴う腺組織の萎縮や消失、変性および壊死も観察された。

RatPyV2 のウイルス抗原は、抗 SV40 large T antigen 抗体で検出可能であり、免疫組織化学染色では、標的上皮細胞の核において強い陽性所見を確認できた。ウイルス抗原が確認された組織としては、唾液腺、ハーダー腺、眼窩外涙腺、気管粘膜上皮、肺（気管支/細気管支粘膜上皮および肺胞上皮）、子宮内膜、前立腺、精巣上部尾部、精管などが挙げられる。さらに、透過型電子顕微鏡観察では、ウイルス感染細胞の核内において、約 40~50 nm の正二十面体のウイルス粒子が多数観察された。

なお現在、XSCID-TALEN ラット以外の免疫不全系統（XSCID-TALEN ラットと同様、*Il2rg* 遺伝子がノックアウトされた別系統）についても、病理組織学的解析が進行中である。

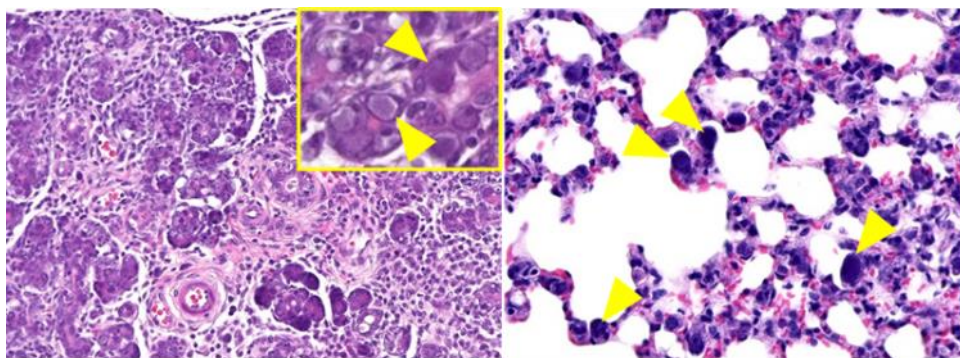


図2. RatPyV2に感染したXSCID-TALENラットの病理組織像（左：耳下腺、1か月齢、右：肺、7か月齢）

(2) 確実かつ迅速な RatPyV2 の遺伝子検出法の確立

PCR 検査では、検索した免疫不全ラットの全症例で RatPyV2 遺伝子が検出された。RatPyV2 の標的臓器（唾液腺やハーダー腺、肺）の新鮮組織、凍結組織やパラフィン包埋組織、または糞便から抽出したゲノム DNA が検体として利用可能であった。

より迅速で正確、簡便、低侵襲な PCR 検査法として、唾液検体（口腔内スワブ）と FTA-Amp 法に着目して、検索を進めた。FTA-Amp 法は、免疫不全ラットでの RatPyV2 感染症の診断法として有用であるだけでなく、RatPyV2 不顕性感染個体も安定して検出することが可能であった。さらに、FTA カードに塗布した免疫不全ラットの血液検体でも、RatPyV2 の DNA が検出できることも確認した。

LAMP 法については、XSCID ラットの肺や唾液腺組織から抽出した DNA を用いた検索にて、RatPyV2 遺伝子の増幅が確認された。引き続き、FTA カードに塗布した口腔内スワブ検体を用いた安定した検出系の検討や、免疫正常ラット検体での検索を行っている。

(3) 日本の免疫正常ラットコロニーでの RatPyV2 の汚染状況調査

血清学的検査では、121 匹の免疫正常ラットのうち 46 匹が陽性（陽性率 37.7%）であった。PCR 検査では、90 匹の免疫正常ラットのうち 37 匹が陽性（陽性率 41.1%）であった。RatPyV2 陽性となったラット系統には、一部の F344、Wistar や SD 系統のほか、いくつかの疾患モデル系統が含まれていた。また、今回の調査で RatPyV2 陽性となった免疫正常ラットでは、肉眼的および病理組織学的に、明らかな異常は検出されなかった。

RatPyV2 は、標的上皮組織の中でも、唾液腺（中でも耳下腺）に対する親和性が特に高いことが示唆され、RatPyV2 感染症が疑われた際には、耳下腺を含む唾液腺組織を用いた検索が必須と考える。現在、がん研究や再生医療研究、移植研究、創薬研究など医学・生命科学分野の研究を推進する上で、免疫不全ラットは必要不可欠なツールとなっている。一方で、日本の免疫正常ラット系統コロニー中には、RatPyV2 不顕性感染個体が一定の割合で存在することが明らかとなり、免疫不全ラットを用いた研究への影響が懸念される。我々が確立した、口腔内スワブを用い

た FTA-Amp 法は、RatPyV2 感染症の簡便かつ迅速な診断法として有用であるのみならず、RatPyV2 不顕性感染個体を確実に検出する上でも、検査法としての有用性が期待される。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計1件（うち査読付論文 1件 / うち国際共著 0件 / うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Tanaka M, Kuramochi M, Nakanishi S, Kuwamura M, Kuramoto T.	4. 巻 80
2. 論文標題 Rat polyomavirus 2 infection in a colony of X-linked severe combined immunodeficiency rats in Japan.	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Journal of Veterinary Medical Science	6. 最初と最後の頁 1400-1406
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1292/jvms.18-0107	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

〔学会発表〕 計2件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 田中美有、中西 聡、桑村 充、庫本高志
2. 発表標題 国内の実験用ラットコロニーにおけるRat polyomavirus 2の汚染状況調査
3. 学会等名 第67回日本実験動物学会（誌上開催）
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 田中美有、桑村 充、庫本高志
2. 発表標題 国内の実験用ラットコロニーにおけるラットポリオマウイルス2の汚染状況調査
3. 学会等名 第144回関西実験動物研究会
4. 発表年 2019年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

6. 研究組織

氏名 （ローマ字氏名） （研究者番号）	所属研究機関・部局・職 （機関番号）	備考
---------------------------	-----------------------	----