

科学研究費助成事業 研究成果報告書

令和 4 年 6 月 21 日現在

機関番号：32202

研究種目：若手研究

研究期間：2019～2021

課題番号：19K16028

研究課題名(和文) アイソレーターを使用しないSCIDブタ長期管理技術の開発

研究課題名(英文) Establishment of long-term rearing technology for SCID pigs without isolators

研究代表者

原 弘真 (Hara, Hiromasa)

自治医科大学・医学部・講師

研究者番号：50751244

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,200,000円

研究成果の概要(和文)：免疫不全動物は、腫瘍医学、免疫学、臓器移植など幅広い分野の発展に大きく貢献する。これまでに申請者らの研究室では、独自に免疫不全ブタを作出し、さらにその感染症予防のために無菌飼育技術を確立した。一方で、アイソレーターを使用する無菌飼育下では、大掛かりな外科的処置を施すことができない。そこで本研究では、「無菌アイソレーターを使用しない免疫不全ブタの長期飼育技術」の開発を行った。これに成功した一方で、本技術では感染症発症を完全に予防することは困難だったことから、免疫不全ブタの飼育は可能な限り無菌アイソレーターを用いて行い、必要に応じて「無菌アイソレーターを使用しない飼育」を行うべきと考えられる。

研究成果の学術的意義や社会的意義

トランスレーショナルリサーチが推進されている今日では、生理学的、組織学的な特徴がマウスと比べてよりヒトに近い、「ブタ」における免疫不全モデルが強く求められている。そこで申請者らの研究室では、免疫不全ブタを独自に作出したが、生後1か月以内に全頭が感染症により死亡するため、長期試験に用いることができなかった。本研究により確立した「無菌アイソレーターを使用しない免疫不全ブタの長期飼育技術」および申請者らが以前に確立した「無菌飼育技術」を組み合わせることで、実験に適した飼育方法を選択できるようになった。これにより、免疫不全ブタが新たな前臨床モデルとして幅広い研究分野の発展に貢献すると考えられる。

研究成果の概要(英文)：Immunodeficient animals contribute significantly to the development of a wide range of fields, including oncology, immunology, and organ transplantation. So far, we have independently generated immunodeficient pigs and established germ-free rearing technologies to prevent their infection. On the other hand, it is not possible to perform extensive surgical procedures in isolators. Therefore, in this study, we developed a long-term rearing technologies for immunodeficient pigs without isolators. On the other hand, because it was difficult to completely prevent infection with this technology, it is considered that immunodeficient pigs should be reared using isolators as much as possible, and "rearing without isolators" should be conducted when necessary.

研究分野：ゲノム編集

キーワード：SCIDブタ 無菌飼育 アイソレーター 微生物管理 感染症予防

1. 研究開始当初の背景

免疫不全マウスは、腫瘍医学、免疫学、臓器移植など幅広い分野の発展に大きく貢献してきた。トランスレーショナルリサーチが推進されている今日では、時空間的にヒトに近い、大型動物の免疫不全モデルが強く求められている。大型動物の中でも特にブタは、生理学的、組織学的な特徴がヒトに類似している。申請者らの研究室では、ゲノム編集技術と体細胞核移植技術を用いてブタの IL2RG 遺伝子をノックアウトし、T、B および NK 細胞を欠失する SCID ブタを作成した (Watanabe et al., PLoS One 2013)。しかし、この SCID ブタは、通常飼育下では生後1か月以内に感染症により死亡してしまうため (Matsunari et al., PNAS 2018)、大型動物モデルの大きなメリットの一つである、「長期試験」に用いることができなかった。そこで申請者らは、効率的な無菌ブタ作出技術および無菌管理技術を確立し、その長期フォローアップを可能にした (Hara et al., Exp Anim 2018)。

「ケージ飼育」

メリット
大規模手術が可能。

デメリット
生後1ヶ月以内に死亡。
(Matsunari et al., PNAS 2018)



「無菌飼育(確立済)」
(Hara et al., Exp Anim 2018)

メリット
新規の感染症を確実に防ぐことが可能。

デメリット
大規模手術を伴う試験は不可能。

無菌アイソレーター



目的 無菌アイソレーターを使用しない、SCIDブタの長期管理技術を開発

一方、アイソレーターを使用する無菌飼育下では、大掛かりな外科的処置を行うことができない。申請者が本研究とは別テーマとして実施している実験においても、全身麻酔を必要とする手術を実施するため、SCID ブタを無菌アイソレーターから出さざるを得なかった。術後、清浄度クラス1,000のクリーンブース内で抗生剤を投与しながら飼育を試みたが、術後1.5~3ヶ月で死亡してしまった。

2. 研究の目的

本研究では、死亡した SCID ブタの死因を明らかにし、その対策を講じることで「無菌アイソレーターを使用しない SCID ブタの長期管理技術」を開発する。

3. 研究の方法

死亡した上記2頭の SCID ブタの死因を明らかにするとともに、無菌アイソレーターを使用せずに、SCID ブタを6か月以上飼育できる技術を開発する。

1)、SCID ブタの死因の同定

SCID ブタは全てのリンパ球を欠失するが、好中球数は正常値であることから、細菌感染に対する抵抗力は野生型と大差ないと考えられる。しかし、死亡時または死亡直前にサンプリングした血液の培養検査の結果、多種類の細菌が認められた。検出された細菌のほとんどが腸内常在細菌だったことに加え、剖検時に腸管のうっ滞や壊死が認められたことから、「腸管バリアの破綻に端を発し、多量の細菌が血中に入り敗血症に至った」ことが示唆された。そこで、死因の詳細について調べるため、以下の検査を実施した。

a. 主要臓器の病理検査

主要臓器の病理検査を行い、直接的な死因を同定する。特に、うっ滞や壊死が認められた腸管を重点的に検査する。

b. ウイルス検査

リンパ球の欠損によりウイルス抵抗性が大幅に低下している SCID ブタでは、ウイルス感染が生じた場合、重篤な症状に陥りやすい。既に、PCR 検査によって、死亡した2頭の SCID ブタの血清および腸管から「ウイルス A」が検出された。ウイルス A は腸炎を引き起こすことが知られており、腸管バリアの破壊を引き起こしうる。そこで、ウイルス A について腸管組織の免疫染色を行い、感染の確定診断を行った。また、死亡時までサンプリングした複数の血清について、

ウイルスコピー数の変化をリアルタイム PCR で追跡することで、全身状態との関連や感染したタイミングについて推察した。

加えて、腸炎を引き起こす可能性のある他の6種類のウイルスについてもPCR検査を行い、陽性だった場合は、ウイルスAと同様に免疫染色やリアルタイムPCRを行った。

2)、ウイルス感染経路の同定

ウイルスへの先行感染により引き起こされた腸管バリアの破綻が、敗血症を引き起こした可能性が高いと考えられた。そこで次に、ウイルスへの感染経路について、上記「1」で推察した感染のタイミングをもとに、下記aおよびbを検討した。

a. 母子感染について

母ブタ血清の抗体価検査ならびにPCR検査を行った。

b. 水平感染について

死亡したSCIDブタと同時期に、本学のブタ飼育施設（先端医療技術開発センター、以降ピッグセンターと記載）で飼育していた、他のブタのウイルス検査を行った。

3)、ウイルス感染の予防

SCIDブタがウイルスに感染してしまった場合、治療法はない。そのため、いかにウイルス感染を防ぐかが重要である。上記2)で明らかになったウイルスの感染経路別に、以下のような対策を講じ、無菌アイソレーターを使用せずに6ヶ月間の飼育を目指す。

a. 母子感染の場合

母ブタ飼育農場の清浄度向上、定期的なウイルスモニタリング、および母ブタへのワクチン接種を行う。

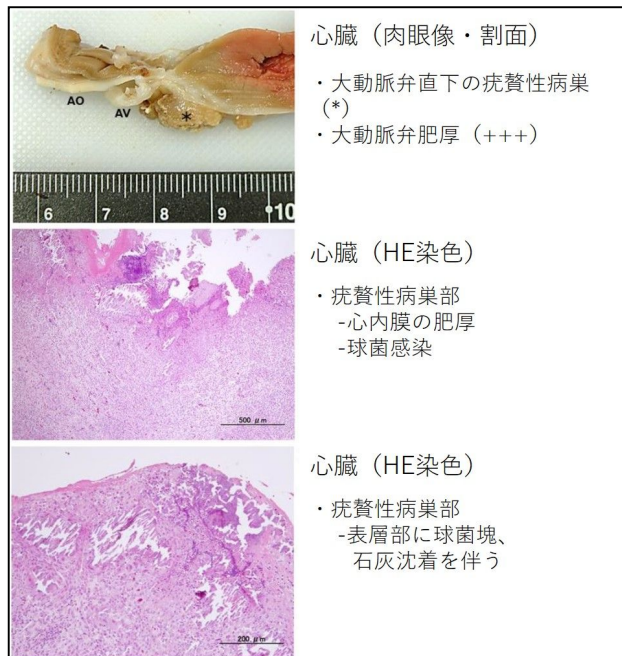
b. 水平感染の場合

ピッグセンターで飼育している通常のブタ（SCIDブタではない）の、定期的なモニタリングを実施する。陽性だった場合、感染経路に応じて、ブタ導入元の再選定、検疫の強化、ピッグセンター利用者の動線の改善・入室制限などを行う。

4. 研究成果

これまでに死亡したSCIDブタの病理解析やPCR検査などを行った結果、仮説通りウイルスAへの感染が腸管バリアの破綻を引き起こし、多量の細菌が血中に入り敗血症に至ったと考えられた。さらに、ウイルスAの感染経路は母子感染であると特定できた。得られた知見をもとにSCIDブタの作出・飼育プロトコルを策定した。具体的には、ウイルスAフリーであることを確認できた母ブタから無菌的に産仔を摘出し、1ヶ月の無菌飼育を行った。その後、定期的な感染モニタリングを行い、その結果に応じた適切な抗生剤の投与を行うことで、「アイソレーターを使用せずにSCIDブタを6か月間飼育する」という本研究課題の最終目標を達成した。一方、飼育試験終了後にサンプリングした組織の病理解析を行ったところ、大動脈弁および大動脈弁直下の心内膜に細菌感染を伴う疣贅性心内膜炎が認められた（右図）。飼育期間中、断続的に血液培養が陽性となっており、病理解析の結果はこの血液培養の結果と一致する。

本研究課題で策定したSCIDブタの作出・飼育プロトコルを用いることで、アイソレーターを使用せずにSCIDブタを長期間飼育できるようになった。つまり、無菌アイソレーター内で実施することができないような大規模手術を伴う試験にも、SCIDブタを使用することができるようになった。これにより、SCIDブタが新たな前臨床モデルとして、幅広い研究分野の発展に大きく貢献すると考えられる。一方、本飼育プロトコルを用いても感染症を完全に予防することは困難だったことから、SCIDブタの飼育は可能な限り無菌アイソレーターを用いて行い、必要に応じて本研究課題で策定したプロトコルを用いて「無菌アイソレーターを使用しない飼育」を行うべきと考えられる。



5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計2件（うち招待講演 1件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 原弘真、花園豊
2. 発表標題 無菌ピッグとその応用
3. 学会等名 第68回日本実験動物学会総会（招待講演）
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 原弘真、伊藤拓哉、菱川修司、中野和明、阿部朋行、柴田宏昭、魚崎英毅、渡邊將人、國田智、長嶋比呂志、花園豊
2. 発表標題 SCIDピッグの長期飼育：再生医療・細胞治療評価系の確立をめざして
3. 学会等名 第46回日本臓器保存生物医学会学術集会
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
---------------------------	-----------------------	----

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------