

# 免疫不全マウスを用いる患者検体移植モデルの取扱い

国立がん研究センター 研究所  
基盤的臨床開発研究コアセンター 動物実験施設  
今井俊夫



# 内容

1. 実験関係者・環境に配慮したバイオセーフティ
  - (1) 関連法令・ガイドライン
  - (2) 管理対象とすべき病原体
  - (3) 動物飼育施設の管理・機器整備
  
2. 重度免疫不全マウスのためのバイオセーフティ
  - (1) ヒト組織から感染する可能性がある病原体
  - (2) 病原体除去対策
  
3. マウスモデル作製・飼育過程における安全管理の実際
  - (1) 動物飼育施設の管理・機器整備
  - (2) ヒト試料の免疫不全マウスへの移植と継代

# 1. 実験関係者・環境を配慮するバイオセーフティ

## (1) 関連法令・ガイドライン

## (2) 管理対象とすべき病原体

ヒトからヒトへの組織移植に関する法令 (参考\*)

「生物由来原料基準」(平成30年2月28日厚生労働省告示第37号)

輸血用血液製剤の原料等として用いる血液については、一の献血者から採取された血液ごとに、少なくとも梅毒トレポネーマ、B型肝炎ウイルス(HBV)、C型肝炎ウイルス(HCV)、ヒト免疫不全ウイルス(HIV-1及びHIV-2)及びヒトTリンパ球向性ウイルス1型(HTLV-1)の血清学的検査を行わなければならない。

「再生医療等製品(ヒト細胞加工製品)の品質、非臨床試験及び臨床試験の実施に関する技術的ガイダンス」(平成28年6月14日 PMDA)

原則事項＋無菌試験及びマイコプラズマ否定試験

\* 生物由来原料基準に規定する「原材料」とは、具体的にはヒト又は動物から採取された組織、体液若しくは組織等の抽出物又はそのプールしたものをいい、それらを出発原材料として医薬品、医療機器、再生医療等製品等の製造に用いる原料又は材料を製するものをいうこと。

# 1. 実験関係者・環境を配慮するバイオセーフティ

## (1) 関連法令・ガイドライン

## (2) 管理対象とすべき病原体

### 研究室でのヒト試料の取扱いに関するガイドライン

「Biosafety in Microbiological and Biomedical Laboratories,  
6th Edition」(2020年6月改定版 NIH)

*Appendix H—Working with Human, Non-Human Primate (NHP) and Other Mammalian Cells and Tissues* -血液感染性および他の感染可能性がある材料

血液に含まれる一般的な例として、**HBV**、**HCV**、**HIV** のほか、肺組織に由来する**結核菌**、急性感染症に関連する**ブドウ球菌**、**プリオン** については、血液よりも神経組織の取扱いに注意が必要。

上皮細胞や線維芽細胞に対して、造血細胞やリンパ組織については、造腫瘍性のリスクを考慮する、など。

(参考) *Human Xenograft Transplantation in Animal Research: Risk Assessment and Hazard Control for Animal Care Workers* by Paul Zel, the director of Environ Health Safety at Memorial Sloan-Kettering Cancer Center in New York, NY; 2003年11月)

# 1. 実験関係者・環境を配慮するバイオセーフティ

## (1) 関連法令・ガイドライン

## (3) 施設の管理・機器整備

「Biosafety in Microbiological and Biomedical Laboratories,  
6th Edition」(2020年6月改定版 NIH)

### *Risk Criteria for Establishing Ascending Levels of Containment*

Biosafety level 1 (BSL-1) : The basic level of protection and is appropriate for defined and characterized strains of viable biological agents that are not known to cause disease in immunocompetent adult humans. (免疫機能が正常な成人に病原性を示さない)

Biosafety level 2 (BSL-2) : Appropriate for handling moderate-risk agents that cause human disease of varying severity by ingestion or through percutaneous or mucous membrane exposure. (経口、経皮、経粘膜的な暴露により、さまざまな病原性を示す)

Biosafety level 3 (BSL-3) : Appropriate for agents with a known potential for aerosol transmission, for agents that may cause serious and potentially lethal infections and that are indigenous or exotic in origin. Exotic agents …(空気感染する、致死性のある病原体)

At a minimum, human and other primate cells should be treated as potentially infectious and handled : ヒト、他の霊長類由来の細胞の取扱い: BSL-2

*Appendix H—Working with Human, NHP and Other Mammalian Cells and Tissues*

# ヒト由来の細胞の取扱いについて

## [医薬基盤研JCRBバンク]

Q. 細胞を取り扱う際のBSLを教えてください。

A. ヒト由来の細胞はすべてBSL2での取り扱いをお願いします。

JCRB細胞バンクにてヒト由来の細胞はウイルス検査を実施するようにしていますが、検査の検出限界、未知なるウイルスが存在する可能性を否定できませんので、基本的にBSL2としての取り扱いをお願いしております。また、他の動物種においても一部のウイルス産生細胞はBSL2での取り扱いが必要になります。

## [理研BRC]

当室で提供している細胞の安全性に関してですが、動物由来細胞に関しましては、特にウイルス検査等は実施しておりません。ヒト由来細胞株に関しましては、全てのヒト由来細胞株に関して全ての感染症検査を実施してはおりません。基本的なスタンスと致しましては、

(1) 肝臓由来細胞に関してはB型及びC型肝炎ウイルスに関する検査を実施する (2) 血液系細胞に関しては、細胞の種類を問わず、HIV、HTLV-1に関する検査を実施する、という方針であります。

「研究用ヒト臍帯血」「研究用ヒト間葉系幹細胞」に関しましては、B型肝炎ウイルス、C型肝炎ウイルス、HIV、HTLV-1、梅毒に関する検査を実施し、全てに関して陰性であった試料です。

しかし、こうした検査には偽陰性の場合もありますし、未知なる感染症の可能性を完全に払拭することも不可能です。従って、BSL2としての取り扱いをお願いします。

# 1. 実験関係者・環境を配慮するバイオセーフティ

## (1) 関連法令・ガイドライン

## (2) 管理対象とすべき病原体

### 研究室でのヒト試料の取扱いに関するガイドライン

「LABORATORY BIOSAFETY MANUAL FOURTH EDITION, WHO」(2020年12月)

Section 2 RISK ASSESSMENT

\* 第3版実験室バイオセーフティ指針(2004年8月)には日本語版あり。



Figure 2.1 The risk assessment framework

# 1. 実験関係者・環境を配慮するバイオセーフティ

## 【小括】

### (1) 関連するガイドライン

- Biosafety in Microbiological and Biomedical Laboratories, 6th Edition  
(2020年6月 NIH)
- LABORATORY BIOSAFETY MANUAL FOURTH EDITION, WHO (2020年8月 WHO)

### (2) 管理対象とすべき病原体

- 施設毎にリスク管理 (例) HBV、HCV、HIV、HTLV、結核菌 など

### (3) 施設の管理・機器整備

手術前の標準的病原体検査



BSL-2



## 2. 重度免疫不全マウスのためのバイオセーフティ

### (1) ヒト組織から感染する可能性がある病原体


人獣共通病原体:

a) SPFマウス施設での管理下にあり、ヒトでも重篤な症状を呈するもの:

- Hantavirus (ハンタウイルス)
- Lymphocytic choriomeningitis virus  
(LCMV: リンパ球性脈絡髄膜炎ウイルス)
- Salmonella spp. (サルモネラ)

b) 通常管理下にはないが、ヒトで重篤な症状を呈するもの:

- Hepatitis E virus (E型肝炎ウイルス)
- Leptospira/Leptonema/Truneria (レプトスピラ)

 患者さんから組織が摘出される際、マウスへの移植に適さないとの判断が可能.

## 2. 重度免疫不全マウスのためのバイオセーフティ

### 【各種免疫不全マウスの特性】

系統名	T細胞	B細胞	NK活性	マクロファージ	樹状細胞	報告者 (年)
Nude	欠	+	+	+	+	Flanagan SP (1966)
Scid	欠	欠	+	+	+	Bosma GC ら (1983)
Scid/beige	欠	欠	↓	+	+	Mosier DE ら (1993)
NOD	欠	欠	↓	↓	↓	Kikutani H、 Makino S (1992)
NOD/Scid	欠	欠	↓	↓	↓	Gerling IC ら (1992)
NOG、NSG、NOJ	欠	欠	欠	↓	↓	Ito M ら、 Shultz LD ら (2002) Okada S ら (2005) (2008)

(Okada S. Cytometry Res 27, 2017 を一部改変)

## 2. 重度免疫不全マウスのためのバイオセーフティ

### (1) ヒト組織から感染する可能性がある病原体

人獣共通病原体:

c) 免疫不全マウスに病原性があり、ヒトでの詳細な感染実態が不明なもの:

- *Corynebacterium bovis*
- *Staphylococcus aureus*

# ヒトにおけるCorynebacterium bovis感染症例について

人工関節(肩)を移植した3か月後に、顕著な炎症反応を伴わない痛みを発症

Achermann, Y. et al.

*Corynebacterium bovis* shoulder prosthetic joint infection: the first reported case.

Diagn Microbiol Infect Dis 64, 213–215 (2009)

動物モデルでの研究ではアトピー性皮膚炎の原因菌である可能性も

Kobayashi, T. et al.

Dysbiosis and Staphylococcus aureus colonization drives inflammation in atopic dermatitis.

Diagn Microbiol Infect Dis 64, 213–215 (2009)

➡ ヒトにおいて重篤な症状を呈さない微生物汚染により、免疫不全マウス飼育施設の衛生環境に重大な影響を及ぼす可能性があることも考慮する。

## 2. 重度免疫不全マウスのためのバイオセーフティ

### (2) 病原体除去対策

- a) 免疫不全マウスにおける継代を経て株化され、微生物学的検査(組織種により懸念される項目など)を行ったものを導入する.
  
- b) 移植時に際しての前処置として抗生物質を含む培地に浸漬する/培養後に移植する方法がある.
  
- c) 患者検体の移植に用いるマウス飼育エリア・架台を独立させ、(重度)免疫不全マウスが感染徴候を呈した場合には、当該マウスを隔離する.

## 2. 重度免疫不全マウスのためのバイオセーフティ 【小括】

### (1) ヒト組織から感染する可能性がある病原体

- ・ ヒトにおいて重篤な症状を呈する病原体については、組織摘出時にマウスへの移植に適さないとの判断が可能。
- ・ ヒトにおいて重篤な症状を呈さない微生物汚染により、免疫不全マウス飼育施設の衛生環境に重大な影響を及ぼす可能性がある。

### (2) 病原体除去対策

- ・ 免疫不全マウスにおける継代を経て株化され、一定の微生物学的検査を行ったものを導入する。
- ・ ヒト組織の移植に用いるマウス飼育エリア・架台を独立させ、感染徴候を呈したマウスを隔離するなど迅速に対応する。

### 3. マウスモデル作製・飼育過程における安全管理の実際

#### (1) 動物飼育施設の管理・機器整備

「Biosafety in Microbiological and Biomedical Laboratories,  
6th Edition」(2020年6月改定版 NIH)

##### a) 免疫不全マウスを対象とするSPF-バリア施設

- ・立ち入り制限 (ABSL1)
- ・保護衣、手袋 (ABSL1)
- ・管理者によるバイオセキュリティ、バイオセーフティ、緊急時対応の方針策定 (ABSL1)

##### b) 排気の管理：飼育室単位でのHEPAを通した換気系 (ABSL2)

- ・必要に応じて個別換気ケージ(陰圧設定)、架台内での内側への気流  
(飼育室を陰圧に設定し、架台単位でHEPAを通した空気で陽圧を維持する方法もある)
- ・ケージ交換ステーション/安全キャビネット
- ・エアロゾルを発生する全作業にクラス I またはクラス II 安全キャビネット (ABSL2)

### 3. マウスモデル作製・飼育過程における安全管理の実際

#### (1) 動物飼育施設の管理・機器整備

「Biosafety in Microbiological and Biomedical Laboratories,  
6th Edition」(2020年6月改定版 NIH)

#### *Standard Microbiological Practices*

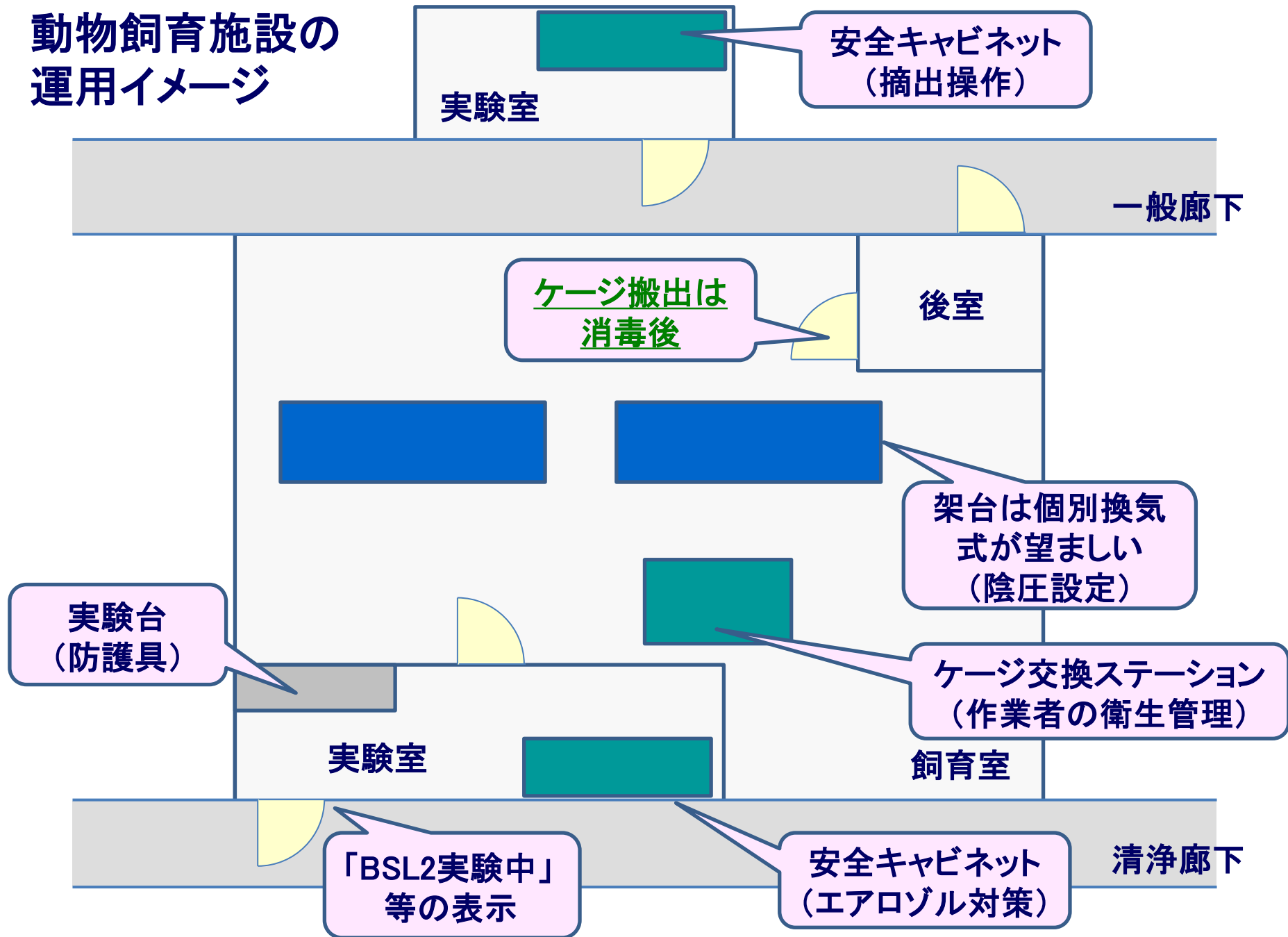
BSL-1とBSL-2共通

動物実験室の管理者は、実験者に**適切な教育訓練**を受けさせる

- ・ 実験者の責務、危険の可能性、病原性のある検体の取扱い、暴露を最小限にするための注意事項、危険性/暴露評価の方法(例;物理的危険性、**飛散, エアロゾル**発生)、適切な記録管理.
- ・ 毎年の教育訓練の更新、機器・手順・ポリシー変更時の教育訓練
- ・ 入室時には危険の可能性があることの忠告を受け、**防護具**を着用するよう指導され、定められた手順・方法を知った上で従う.



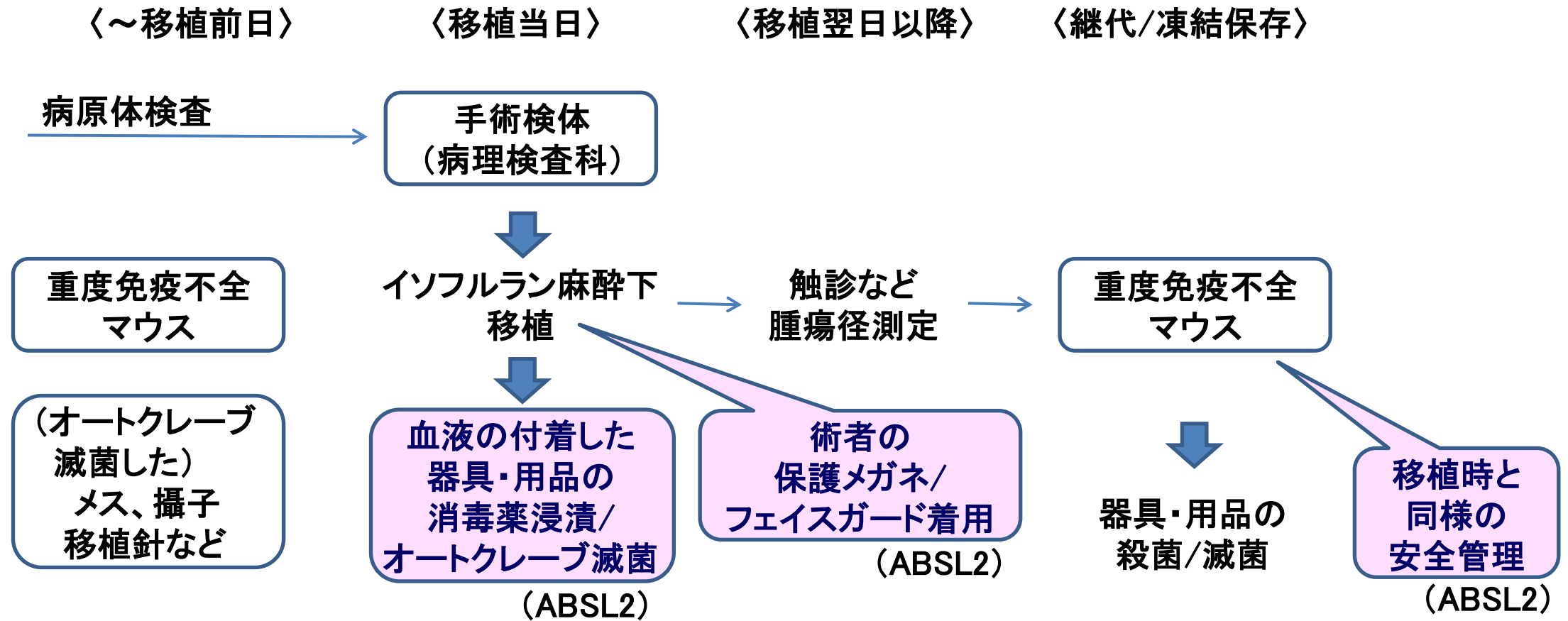
# 動物飼育施設の 運用イメージ



### 3. マウスモデル作製・飼育過程における安全管理の実際

## (2) ヒト試料の免疫不全マウスへの移植と継代

「Biosafety in Microbiological and Biomedical Laboratories,  
6th Edition」(2020年6月改定版 NIH)



# 3. マウスモデル作製・飼育過程における安全管理の実際

## 【小括】

### (1) 動物飼育施設の管理・機器整備

- ・免疫不全マウスを対象とする通常のSPF施設の入りに警告表示をする.
- ・必要に応じて個別換気ケージ架台(陰圧設定)/ケージ交換ステーションと安全キャビネットを設置する.
- ・使用済みケージには消毒薬剤を噴霧後、運搬時は飛散防止処置をとる.
- ・床敷は上記消毒処置後、感染性廃棄物として処理を委託する.
- ・従事者の教育・監督を徹底する.



### (2) ヒト試料の免疫不全マウスへの移植と継代

- ・移植を行う術者は保護メガネ等を着用する.
- ・血液の付着した手袋、実験器具は殺菌/滅菌処理する。  
(手袋は二重にし、汚れたら取り換える)

# 【総括】

## 1. 実験関係者・環境に配慮したバイオセーフティ

(1) 関連ガイドライン:

「Biosafety in Microbiological and Biomedical Laboratories, 6th ed., NIH」

(2) 管理対象とすべき病原体: 手術施行前に主要な病原体検査は実施済

(3) 動物飼育施設の管理・機器整備: BSL2

## 2. 重度免疫不全マウスのためのバイオセーフティ

(1) ヒトにおいて重篤な症状を呈さない微生物汚染により、免疫不全マウス飼育施設の衛生環境に重大な影響を及ぼす可能性がある。

(2) 免疫不全マウスでの継代を経て株化され、検査されたものを導入する。

## 3. マウスモデル作製・飼育過程における安全管理の実際

(1) 免疫不全マウスを対象とする通常のSPF施設に警告表示する。

(2) 排気の管理については、架台の陰圧設定・HEPAの設置を考慮する。

(3) 使用済みケージは搬出前に消毒処置が必要。

(4) 血液の付着した手袋、実験器具は殺菌/滅菌処理する。

(5) 従事者の教育・監督を徹底する。