

日本実験動物技術者協会
平成24年度 奥羽・東北支部合同勉強会
講演要旨集



日 時：平成24年11月17日（土）9:00～15:00
場 所：岩手医科大学内丸キャンパス循環器医療センター9階講義室

主 催：日本実験動物技術者協会奥羽支部・東北支部
共 催：東北動物実験研究会
主 管：岩手医科大学医歯薬総合研究所動物研究センター

日本実験動物技術者協会

平成24年度 奥羽・東北支部合同勉強会

プログラム

日時：平成24年11月17日（土）9:00～15:00

場所：岩手医科大学内丸キャンパス循環器医療センター9階講義室

共催：東北動物実験研究会

□ 8:30～8:55 受付

□ 8:55～9:00 開会挨拶 伊藤恒賢（東北支部長）

◎ 特別講演 9:00～10:00

□ 9:00～10:00 特別講演 司会 伊藤恒賢（山形大・医・動物実験施設）

テーマ：「岩手医科大学医歯薬総合研究所動物研究センターの概要

－移転準備～運用開始～現在－」

演者：高橋智輝先生（岩手医科大学医歯薬総合研究所動物研究センター）

□ 10:00～10:15 休憩

◎ 一般講演（1）10:15～11:39（講演10分／討論2分）

□ 10:15～11:03 座長 池田たま子（秋田大学バイオサイエンス教育・研究センター）

1. 顔面静脈と腹部後大静脈からの採血による血球数の差異についての検討

○遊佐寿恵¹、弓田周平¹、丹治静保¹、若井 淳¹、関口美穂¹、片平清昭²

（¹福島医大・実験動物研究施設、²福島医大・創薬関連 TR 部門）

2. 免疫不全マウスの白血球分画について

○弓田周平¹、遊佐寿恵¹、若井 淳¹、関口美穂¹、片平清昭²

（¹福島医大・実験動物研究施設、²福島医大・創薬関連 TR 部門）

3. X線TVシステムおよびX線CTを用いた“腰抜け”ウサギの腰部画像解析

○若井 淳¹・片平清昭²・遊佐寿恵¹・関口美穂¹

（¹福島医大・実験動物研究施設、²福島医大・創薬関連 TR 部門）

4. 7テスラMRIによるマウス・ラットの脳アトラス作成研究

○高橋智輝¹、目時 毅²、花木賢一³

（岩手医大・医歯薬総合研究所¹動物研究センター、²超高磁場先端MRI研究センター、

³実験動物医学研究部門）

□ 11:03～11:39 座長 深澤貴史（岩手医大・医歯薬総合研究所・動物研究センター）

5. Webカメラを用いた妊娠コモンマーモセットの観察

○畠山莉加¹、花木賢一¹、遠山稿二郎²

（岩手医科大学・医歯薬総合研究所・¹動物研究センター、²超微形態科学研究部門）

6. セリウスソフト水の長期摂取がB6マウスの繁殖等に及ぼす影響について

川越政美、○小畑孝弘、戸井田和実、九島秀美、柴田淑子、池田勝久、佐藤政義、
二部恒美、池田たま子、松田幸久

（秋田大学バイオサイエンス教育・研究センター動物実験部門）

7. 給水方法の違いによる成長曲線と繁殖成績—ネガティブブラックにおける給水瓶飼育と自動給水飼育の比較

○丹治静保¹・遊佐寿恵¹・弓田周平¹・関口美穂¹・片平清昭²

（¹福島医大・医学部・実験動物、²福島医大・創薬関連 TR 部門）

◎ ランチョンセミナー 12:00～13:00（セミナー30分／休憩30分）

セミナー名：「実験動物を取り巻く環境と欧米での器材動向」

永沼勇人（テクノプラスト・ジャパン株式会社）

◎ 一般講演（2） 13:00～14:24（講演10分／討論2分）

□ 13:00～13:36 座長 福田直樹（山形大・医・動物実験施設）

8. 動物実験施設におけるスチームクリーナーの有用性

○馬場秀明、工藤 均、今井信子、白濱育美、友木光子、成田浩司、上野伸哉

（弘前大学大学院医学研究科附属動物実験施設）

9. 酸性水およびエンロフロキサシン投与によるマウス緑膿菌の除去効果

○石橋 崇¹、飛内章子²、伊藤由美²、工藤洋平¹、井上吉浩¹

（¹東北大学加齢医学研究所・実験動物管理室、²同・遺伝子導入研究分野）

10. 秋田大学動物実験部門での蟻虫感染についての事例

助川康子¹、○二部恒美¹、川越政美¹、柴田淑子¹、池田勝久¹、佐藤政義¹、
小畑孝弘¹、戸井田和実¹、鈴木美帆子¹、九島秀美¹、津谷優子²、池田たま子¹、
松田幸久¹

（¹秋田大学バイオサイエンス教育・研究センター動物実験部門、²株式会社 JAC）

□ 13:36～14:24 座長 石橋 崇（東北大・加齢医学研究所）

11. 山形大学医学部附属動物実験施設における病原性を持たない原虫感染の対応

○尾崎順子、時田芹奈、甲斐賢人、伊藤恒賢、大和田一雄

（山形大学医学部附属動物実験施設）

12. 東北大学動物実験センターの活動報告～微生物モニタリング業務について～

○吉田弥生、末田輝子、笠井憲雪（東北大学動物実験センター）

13. マウス帝王切開における分娩遅延を目的としたプロゲステロンの単回投与容量と投与時期の検討

○伊藤恒賢¹、鈴木沙知^{1,2}、正脇健次^{1,2}、尾崎順子¹、福田直樹¹、大和田一雄¹
(¹山形大・医・動物実験施設、²株式会社ジェー・エー・シー)

14. 災害時におけるマウス胚及び精子の凍結保存サービスについて

○西尾啓輔、笠井憲雪（東北大学大学院医学系研究科附属動物実験施設）

□ 14:25～14:30 閉会挨拶 高橋智輝（奥羽支部長）



教育講演

岩手医科大学医歯薬総合研究所動物研究センターの概要
－移転準備～運用開始～現在－

高橋 智輝

岩手医科大学医歯薬総合研究所動物研究センター

顔面静脈と腹部後大静脈からの採血による血球数の差異についての検討

○遊佐寿恵¹、弓田周平¹、丹治静保¹、若井 淳¹、関口美穂¹、片平清昭²
(¹福島医大・実験動物研究施設、²福島医大・創薬関連 TR 部門)

【背景と目的】マウスからの部分採血方法として眼窩静脈叢採血が汎用されていた。しかし、眼球からの出血により血腫が形成され、過度の圧力が加わる。また、止血のために圧力を加えたり、血腫の形成によって圧力が加わると角膜潰瘍や角膜炎等の眼球の損傷を生じるなどの有害な副作用が引き起こされる場合がある。無麻酔での眼窩静脈叢からの採血は、それぞれの研究機関の動物実験委員会により判断されるが、SCAW のカテゴリーでは「C」か「D」に該当する。動物に苦痛を与えることから、この採血法は現在では推奨されていない。長崎大学の山本らが、苦痛の少ない頬部の顔面静脈からの採血（カテゴリー「B」か「C」相当）について報告している。今回、我々は同一個体を用いて、顔面静脈と腹部後大静脈から採血し、採血部位による血球数の相違を比較したので報告する。

【方法】供試動物は、8~12 週齢 B6J マウスで、雌 8 匹と雄 8 匹である。顔面静脈からの採血は、マウスをイソフルラン吸入麻酔下に頬部を剃毛後に、22G の注射針にて穿刺し、EDTA 入り毛細管に採血した。穿刺部位は、目尻と下顎骨の下端を結ぶ直線と、口角から頬部の小突起状の分泌腺の延長線の交点とした。腹部後大静脈からの採血は、ペントバルビタール腹腔内投与麻酔後に、開腹し後大静脈より EDTA 入りシリンジで採血した。測定には、全自動血球計数装置 (XT-1800、シスメックス社製) を用いた。また、血液塗抹標本を作製しギムザ染色後に鏡顕して白血球分画を算定した。統計学的検討には、SPSS スタティクスを用いた。

【結果】メスでは、顔面静脈からの採血で赤血球数、白血球数、リンパ球数および単球数において腹部後大静脈と比較して有意に高値であった ($p < 0.05$)。オスでは白血球分画はメスと同様の結果であった ($p < 0.05$)。しかし、赤血球数は採血部位による差異はなかった。一方、好中球数は、メスとオスともに腹部後大静脈が有意に高値であった ($p < 0.05$)。2 例であるが、顔面採血 5 日後の後大静脈の好中球数は高値とならなかった。

【まとめ】採血部位による血球数に相違が認められた。腹部後大静脈のみの採血では好中球の値が異なっていた。このことから後大静脈の好中球が顔面静脈より高値であるのは、顔面静脈からの採血に引き続いて、注射麻酔下で開腹して採血したことによるストレスが要因とも考えられる。今後ストレスに伴う血球数への影響を検討する予定である。

免疫不全マウスの白血球分画について

○弓田周平¹、遊佐寿恵¹、若井 淳¹、関口美穂¹、片平清昭²
(¹福島医大・実験動物研究施設、²福島医大・創薬関連 TR 部門)

【背景・目的】現在、福島県立医科大学では免疫不全マウスにヒト癌組織を移植する担がんマウスの作製を進めている。しかし、未移植の免疫不全マウスのベースラインとなる血液データの詳細については必ずしも十分ではない。最近、免疫機能が最も影響する白血球分画の測定可能な自動血球装置が市販されている。今回我々は、免疫不全マウスの血球構成の基礎的データを得る目的で、免疫不全マウスと正常マウスについて、白血球分画の比較検討を行った。

【方法】供試動物は3群を設定した。免疫学的に正常なマウスとして、B6 マウス(C57BL/6NJcl, 雄, 9~12 週齢, 8 匹)、免疫不全マウスとして、Nude マウス(BALB/cAJcl-nu/nu, 雄, 9~12 週齢, 7 匹)、および SCID マウス(C.B-17/lcr-scid/scidJcl, 雄, 9~12 週齢, 10 匹)の2系統を使用した。ペントバルビタールの腹腔内麻酔下で腹部後大静脈から採血を行い、多項目自動血球分析装置(XT-1800iV, シスメックス社)により白血球分画の測定を行った。また、白血球分画の整合性を確認するために、血液塗抹標本を作成し、ギムザ染色を行い、顕微鏡で観察を行った。統計学的解析には SPSS Statistics Ver.17 を用いて、一元配置分散分析、多重比較を行った。

【結果】白血球数は、B6 マウスと比較して Nude マウスで、やや減少したが有意な差はなかった。一方、SCID マウスでは、B6 マウスと Nude マウスと比較して白血球数が有意に減少していた($p<0.01$)。SCID マウスでは、好中球、リンパ球、単球の3つの白血球分画ともに、B6 マウスと Nude マウスと比較して有意に低下していた。また、B6 マウスと Nude マウスでは、リンパ球優勢であったのに対して、SCID マウスは好中球優勢であった。血液塗抹標本の所見では、分析装置の測定結果と同様に、B6 マウスと Nude マウスではリンパ球が優勢であり、SCID マウスでは好中球が優勢であった。また3系統とも好塩基球は検出されなかった。

【考察】Nude マウスは、解剖学的に胸腺がなく、T 細胞機能が欠如している。そのため、免疫学的に正常な B6 マウスと比較して、白血球、特にリンパ球が減少していると考えられるが、今回の結果では、有意な差は見られなかった。また、SCID マウスでは、B6 マウスと比較してリンパ球、好中球、および単球が有意に減少していたのは、T 細胞と、B 細胞の両機能が欠如しているというマウスの特性から妥当な結果であると考えられる。

【まとめ】今回の結果から、2系統の免疫不全マウスと、B6 マウスには、白血球分画に相違点があった。特に SCID マウスでは、B6 マウスと Nude マウスに比べ、白血球分画が著しく減少しているという特徴があった。当該自動血球装置の結果は、血液塗抹標本の白血球分画と比較しても整合性が得られた。本研究の結果は、今後担がんマウスの評価において基礎データとして活用することとなる。

X線TVシステムおよびX線CTを用いた“腰抜け”ウサギの腰部画像解析

○若井 淳¹・片平清昭²・遊佐寿恵¹・関口美穂¹
(¹福島医大・実験動物研究施設、²福島医大・創薬関連TR部門)

序文

ウサギは臆病な性質であり、飼育管理の際にしばしば興奮し暴れた際に、腰椎の脱臼や骨折が生じ、下半身麻痺が生じることがある。これが俗に言う「腰抜け」と呼ばれるものである。当施設において、飼育作業中にウサギが興奮し、ケージ内で暴れた結果、「腰抜け」が発生した。今回、我々は腰抜け状態の障害機序を解明する目的で、X線TVシステムおよび小動物用X線CTを用いて画像撮影を行い、その解析を行った。

材料・方法

腰抜けになった雄ウサギ(Japanese White, 14カ月齢)一羽を用いた。画像診断を行う前に炭酸ガスを用いてウサギを安楽死させた。X線TVシステム(Plessart Zero, 東芝)を用いて、伏臥位、仰臥位、右側臥位、左側臥位の4方向から腰部の単純X線撮影を行った。単純X線撮影後に腰椎部周辺組織を採取し、小動物用X線CT(Latheta LCT-200, ALOKA)で撮影を行った。得られたCT画像から、3D画像作成ソフトを用いてパーソナルコンピュータ上で3D画像を作成し、解析を行った。

結果

無麻酔下でウサギの後肢をピンセットで刺激したが、深部痛覚まで消失していた。また、安楽死後、大量の排尿が観察された。これは、本事例は後肢麻痺だけではなく膀胱麻痺も併発していたことを示す所見である。単純X線撮影像の結果より、第7腰椎が腹側へずれ、第6腰椎の腹側に骨片が観察されたことから脱臼骨折が起きていることが明らかとなった。また、X線CTの画像から、単純X線撮影像より鮮明な第6腰椎の後方脱臼骨折の所見が認められた。

考察

画像所見から、今回の腰抜けは、第6腰椎の後方脱臼骨折に起因する脊髄損傷による後躯麻痺であることが示唆された。ウサギの骨は薄く脆い構造で、骨/体重比がネコは13%であるのに対し、ウサギは8%である。一方で、大腿筋などの筋肉が強靭であるため、瞬間的な筋肉の運動が腰椎に負荷を与える。飼育管理下では、ケージ内のスペースに制限があるため、ウサギが飛び上がった際に、腰椎が耐えられず骨折や脱臼が発生する。本施設において、ウサギの飼育を行う際には、飼育室内に入室する際にはロックをする、ケージを清掃する際にはケージを軽く叩くことで合図を送るなど、ウサギを興奮させないように努めてきた。しかしながら、今回の事例が発生したことから、より一層の注意が必要であると考えた。そこで、我々は飼育管理の際に今まで以上に、以下の点について徹底することを決定した。まずは、普段からヒトに慣れさせるために、声かけをおこなう、体を優しく撫でることで馴化を促すことである。ヒトは怖くないということをウサギに学習させ、興奮しにくくすることが目的である。さらに、保定が必要な際は、背中を丸めた上で腰をしっかりと支えることで下半身の運動を制限し、腰に負担がかかることを防ぐことができる。以上のことは、ウサギの飼育管理上で基本的なことであるが、本事例からこれらの事項がいかに大切であるかを改めて認識された。小動物の臨床の現場においては、ウサギの診療時に不

十分な保定が原因で、腰抜け状態にさせてしまうことで、訴訟に発展することがある。我々実験動物技術者も、貴重な研究用の動物を預かっているということを再確認し、より安全で丁寧な飼育管理を心掛けることが重要である。

7テスラMRIによるマウス・ラットの脳アトラス作成研究

○高橋智輝¹、目時 毅²、花木賢一³

(岩手医大・医歯薬総合研究所¹動物研究センター、
²超高磁場先端MRI研究センター、³実験動物医学研究部門)

【目的】

実験動物に関する磁気共鳴画像 (MRI) 脳アトラスは「カニクイザルのMRI脳アトラス」と「マーモセットMRアトラス」が発刊されている。しかし、実験動物として最も利用されているマウスとラットについてはMRI脳アトラスがない。

本学ではヒト用7テスラMRI装置の研究運用が開始されており、小動物用コイルの用意もある。そこで、マウスとラットの脳アトラスを作成することを目的として、マウスとラットの脳をヒト用7テスラMRI装置で撮像し、アトラスを完成させる。

【方法】

6～10週齢のマウス・ラットを深麻酔下でアルデヒドによる全身の灌流固定を行う。灌流固定したマウス・ラットは、超高磁場先端MRI研究所の協力を得て7テスラMRI装置による撮像を行う。

MR撮像後、開頭して脳を摘出して水平断・冠状断・矢状断を作製し、デジタルカメラで撮像する。

アトラスの構成は「カニクイザルのMRI脳アトラス」(社団法人予防衛生協会)を参考にし、MR画像と脳の割断面像は各部の名称と解説を入れる。

【経過報告】

現在アトラス作成途中ではあるが、進捗状況を含め灌流固定方法、固定の工夫・問題点、7テスラMRI装置の概要、撮像条件・撮像画像等を紹介する。

Web カメラを用いた妊娠コモンマーモセットの観察

○畠山莉加¹、花木賢一¹、遠山稿二郎²

(岩手医科大学・医歯薬総合研究所・¹動物研究センター、²超微形態科学研究部門)

【目的】

コモンマーモセット (*Callithrix jacchus*;以下マーモセット) の出産は通常、夜半から明け方にかけて行われる¹⁾。産子数は2～3子が一般的であるが、適正な哺育能力は2子であるため、3子以上の出産の場合、全ての個体は育たないことが多い。当施設では「補助授乳方式²⁾」により人工哺育で3子の育成に成功している。この方法は、体力の劣る子が親にしがみつげずに床に落ち、衰弱してしまう前に実施する必要がある。そこで、出産と産子数の早期把握のため、妊娠個体のいるケージにネットワークカメラ (Panasonic ; 以下 Web カメラとする) を取り付け観察した。

【方法】

妊娠マーモセットのケージに Web カメラを設置した。Web カメラは特注ケージの天井に設置し、天井部からケージ内の床全体が見えるようにした。Web カメラによる観察は主に、平日の夜間と休日、職員がセンターにいない時間帯に随時行った。また、SD メモリカード録画にて経時的に撮影も行った。

【結果・まとめ】

Web カメラ設置後、1匹の妊娠マーモセットが3子を出産した。平日深夜であったため、タイムリーな観察は出来なかったが、出産の様子を撮影することに成功した。出産後も撮影を続け、弱って床に落ちている個体がいなか観察した。Web カメラでの観察と人工哺育を続け、3子とも離乳することに成功した。

出産時～人工哺育中、Web カメラによって弱っている個体の有無を観察する事で、補助授乳方式の成功率をより高いものにできたと考えられる。今後も妊娠・人工哺育時には Web カメラを活用していきたい。

1) 「マーモセットの飼育繁殖・実験手技・解剖組織」谷岡功邦：アドスリー；2002

2) 「新生コモンマーモセットの新たな人工哺育法—「補助授乳方式」の試み」佐藤綾子：岩手医科大学；日本実験動物技術者協会第45回全国総会；2011

セリウスソフト水の長期摂取がB6マウスの繁殖等に及ぼす影響について

川越政美、○小畑孝弘、戸井田和実、九島秀美、柴田淑子、池田勝久、
佐藤政義、二部恒美、池田たま子、松田幸久

(秋田大学バイオサイエンス教育・研究センター動物実験部門)

【緒言】

当部門において、SPFのマウス・ラットの給水には「オートクレーブ滅菌水道水」(滅菌水)を用いている。これは、水由来の微生物汚染や藻類が混入する問題を防止できる。しかし、加熱過程で残留塩素が消失した水は、一般的な水道水よりも微生物が繁殖しやすいという欠点がある。

それゆえ、塩素を含有し一定の品質が期待される「セリウスソフト水」を給水に用いることが可能であれば、この問題が解決するのではないかと我々は考えた。依って、3年前、当部門の施設増改築に伴い、セリウスソフト水生成装置(株式会社オーク)の設置と全館配管が行われた。

当部門で飼育される実験動物の大半は、遺伝子改変マウスである。遺伝子改変マウスは、様々な疾患・症状がある個体が多い。それ故、セリウスソフト水の塩素濃度(5 ppm)が、マウスの健康状態に影響を及ぼす可能性があれば、日常業務に使用する事はできない。そこで本研究では、一般的な遺伝子改変マウス作製に用いられ、当施設で最も使用量が多い系統と思われる「C57BL/6マウス」を用いて、セリウスソフト水の長期摂取における影響および繁殖成績等について検討した。

【実験方法】

雌雄C57BL/6マウス(3又は4週齢)を、“対照群(水道水)”及び“セリウスソフト水群”の二群に分け、自由飲水・自由摂餌させ、それらの成育の状態を観察した。次に、これらのマウスが20又は25週齢時に達した時点で、“対照群”及び“セリウスソフト水群”ごとに、任意選択した雌雄を同居させ、数回の出産・仔育て経過を観察した。

【結果および考察】

本発表では、対照群及びセリウスソフト水群の親マウスの成育状態(体重・摂水量・摂餌量の経時変化)および、雌親マウスの妊娠数、妊娠回数、産児数及び雌雄比、哺乳・生育・離乳状態等を報告する。そして、これらの結果からセリウスソフト水のC57BL/6マウスに対する影響について考察したい。

給水方法の違いによる成長曲線と繁殖成績 —ネガティブラックにおける給水瓶飼育と自動給水飼育の比較

○丹治静保¹・遊佐寿恵¹・弓田周平¹・関口美穂¹・片平清昭²
(¹福島医大・医学部・実験動物、²福島医大・創薬関連 TR 部門)

【背景】

我々の施設でのマウスは SPF 環境下でステンレス架台を使用して飼育してきた。貴重な研究資源である遺伝子組換えマウスの導入に伴い、相互感染症の発生や水漏れによる溺死等のリスク回避のために、旧来からのチューブ方式の自動給水方式から 100mL 給水瓶 (週 2 回交換) に変更した経緯がある。一方で、花粉症にみられるようにアレルギー傾向の関係者が増加していることから、多くの施設で一方向気流方式が普及しつつある。我々の施設でも、労働安全衛生と省力化の観点から一部の飼育室にネガティブラックの導入を行った。ネガティブラックの供用に際し、この装置の自動給水システムによるマウスへの影響について従来の給水瓶による場合と比較検討をした。

【目的】

本研究の目的は、給水方法による飼育環境の相違から、マウスの成長や繁殖成績に影響があるか否かについて明らかにすることである。

【方法】

供試マウスは C57BL/6NJel、6 週齢オス 10 匹、メス 10 匹を使用した。性別毎にランダムに自動給水群と給水瓶群 (各群 5 匹) に分けた。給水方式は自動給水群では、減圧後水道水にフィルターカートリッジ (25 μ m) を介して濾過し、丸型ステンレスパイプの配管によりネガティブラックの自動給水バルブ (CGV-40) に接続されている (残留塩素濃度 0.00~0.04ppm)。給水瓶群では、スクリー式先管付 100ml 給水瓶 (日本クリア製, CK-100S) を高圧蒸気滅菌し、限外濾過水 (残留塩素濃度 3ppm) を充填して使用した。交換頻度は 1 週間に 2 回とした。交配開始から 2 週ごとに体重測定を行った。2 世代目の仔のオス (n=20) とメス (n=20) は、生後 6 週目から 2 週毎に体重測定を行った。妊娠までの期間、産仔数、離乳数、離乳率の繁殖成績を 4 産目までについて比較した。試験終了時にオス 10 匹の微生物検査を行った。

【結果】

オスの成長曲線では、給水瓶群が自動給水群のマウスより体重が増加していた。特に 20 週、22 週、26 週において給水瓶群で有意に体重が高値であった (P<0.05)。体重の増加率においても有意差が認められた。メスの成長曲線は、妊娠、出産、授乳、離乳時期によって体重変動があり、経過観察期間の 6 ヶ月間で体重増加率には 2 群間で有意な差はなかった。2 世代目では、オス・メスともに自動給水群の増加率が高い傾向があったが 2 群間に有意な差はなかった。妊娠までの期間は約 20~25 日間であった。給水瓶群は、出産を重ねるごとに、妊娠までの期間の日数が長くなる傾向がみられた。1 産目は平均 21.6 日であったのに対し、4 産目は平均 24.2 日であった。自動給水群は、妊娠を重ねるごとに、妊娠までの期間が短くなった。1 産目は平均 25.6 日であったのに対し、4 産目は平均 21.8 日であった。しかし、これらの妊娠までの期間には、2 群間で有意な差はなかった。自動給水群の 2 産目の産仔数と離乳率は高かった。これらのマウスにおける

微生物検査結果は、当施設で実施している全ての項目が陰性であった。

【考察】

当該ネガティブラックの自動給水システムの特長は、自動給水バルブ CGV-40 が、ケージ内床面に対して30度の角度で設置され、配管には、ワンタッチカップラーソケットが設置されている。そのためデットスペースが少なく、清潔に管理できる利点がある。給水瓶の利点としては相互感染症発生や水漏れによる溺死等のリスク回避と、個別飼育の際に、飲水量が確認できることである。短所は労力を要することである。

【まとめ】

今回の C57BL/6NJcl を用いた検討結果から、自動給水付のネガティブラックによるマウスの飼育に大きな問題はないものと考えられた。労働安全衛生と省力化の観点からネガティブラックを設置した飼育室で、遺伝子組換えマウスの飼育を開始することとした。

動物実験施設におけるスチームクリーナーの有用性

○馬場秀明、工藤 均、今井信子、白濱育美、友木光子、成田浩司、上野伸哉
(弘前大学大学院医学研究科附属動物実験施設)

【目的】当施設では飼育室の定期的な消毒に次亜塩素酸ナトリウム、エタノール等の消毒薬を使用している。一方、蟻虫感染が発生した場合、殺卵には通常使用される消毒薬は無効なため、熱水処理後雑巾やモップなどでラック、床、壁を清掃して物理的な虫卵の除去を行っている。最近、一般家庭用スチームクリーナーがマスコミ等で紹介され、手軽な操作で高い汚染除去効果が得られるだけでなく、100℃付近の蒸気による強い殺菌効果がうたわれている。そこでスチームクリーナーによる施設内の床面、クリーンラック内部等の殺菌・消毒効果、及び蟻虫卵の殺卵効果を調べ、動物実験施設におけるスチームクリーナーの有用性について検討した。

【方法】スチームクリーナーはI社製の一般家庭用を使用した。殺菌効果を調べるために、飼育室床面、洗浄室床面、クリーンラックの棚、スリッパの底面をスチームクリーナーで蒸気噴霧しながら3往復後、滅菌綿棒でふき取り普通寒天培地に塗抹、培養した。蟻虫卵に対する殺卵効果を調べるために、マウス大腸蟻虫感染マウスをケージで1週間飼育しケージ内に蟻虫卵が存在していることを確認後、ケージ内に6秒、24秒、60秒間蒸気を噴霧した。蒸気を噴霧したケージに蟻虫非感染マウスを入れ4週間飼育し、蟻虫に感染したか否かを糞便中の大腸蟻虫卵の有無で調べた。

【結果】未処理で菌を採取、培養した培地上のコロニー数と比較すると、蒸気噴霧後のコロニー数は減少していた。また、次亜塩素酸またはエタノール消毒後と比較した場合、同等以上の殺菌効果が見られた。一方、マウス大腸蟻虫に感染しているマウスを飼育したケージから回収した糞便には、浮遊法で平均1～5コ/視野の蟻虫卵が見られた。ケージ内に6秒、24秒、60秒間蒸気噴霧したケージで飼育したいずれの蟻虫非感染のマウスも4週間後にはマウス大腸蟻虫に感染していた。

【考察】スチームクリーナーは殺菌、消毒に対しては有効と考えられた。しかし、30分程度で給水が必要となり1台では長時間の作業ができない等の問題点が明らかになった。一方、マウス大腸蟻虫卵の殺卵には60秒間の蒸気噴霧でも効果は見られなかった。より長時間の蒸気噴霧により殺卵効果が得られる可能性があるが、クリーンラックの隅々まで噴霧することを考えた場合、時間も手間もがかかり実用的ではないと考えられる。今後、1回で広い面積に蒸気噴霧可能なノズルを作製するなどの改良を行いスチームクリーナーによる簡便な殺卵法を検討する予定である。

酸性水およびエンロフロキサシン投与によるマウス緑膿菌の除去効果

○石橋 崇¹、飛内章子²、伊藤由美²、工藤洋平¹、井上吉浩¹

(¹東北大学加齢医学研究所・実験動物管理室、²同・遺伝子導入研究分野)

【背景と目的】 緑膿菌 (*Pseudomonas aeruginosa*) は、1本の鞭毛を有し運動性のあるグラム陰性の無芽胞桿菌であり、動物実験への影響からみた微生物カテゴリーではDに区分される日和見病原体である。通常、健常系のマウスでは病原性はないが、X線照射や免疫抑制剤の投与などの免疫不全処置により本菌症が誘発される場合がある。また、ヌードマウスやSCIDマウス等の免疫不全動物では本菌に感染すると敗血症により死亡することがあり、排除対象病原菌とされる。当施設における微生物モニタリングでは、免疫不全マウスを保有する飼育室については緑膿菌を検査し(実中研:免疫不全動物コアセット)、その清浄度を確認しているが、その他の通常のマウス飼育室では緑膿菌の検査は行っていない(同:通常動物コアセット)。動物個体から緑膿菌を除去するためには、主たる感染部位が消化管であることからゲンタマイシン (*gentamicin*) を飲水に添加して投与する方法(浦野)、受精卵移植等の生殖工学的的手法および帝王切開法があり、後者は微生物クリーニング(SPF化)としてマウスコロニー全体を再立上げする場合に有効である。しかしながら、動物施設から緑膿菌を除去するためには、飼育室だけでなく洗浄室を含めた建物全域について対策を講じる必要があり、感染個体の導入阻止や徹底した衛生管理が極めて重要になる。当施設も例外ではなく、年間相当数の遺伝子組換えマウスの授受(譲受)があることや、生産施設と同等のバリア管理ができないオープン施設であることの限界もあり、施設全体における緑膿菌の除去は非常に困難であると考えている。

今回、緑膿菌感染が判明している飼育室の遺伝子組換えマウスを外部研究機関に譲渡するにあたり、生殖工学的的手法や帝王切開法を用いずに薬剤投与等の簡便な方法で緑膿菌を除去できないものかと実験者から相談を受けた。そこで我々は、殺菌剤の飲水添加による簡便な給水方法で緑膿菌の除去が可能かどうかを検討した。すなわち、飲水を介する緑膿菌感染の伝播予防として汎用され、グラム陰性菌に殺菌的に作用する酸性水(低pH水)、およびマウス肺パスツレラ菌の駆除薬としても使用され、抗菌スペクトラムが広く、緑膿菌を含むグラム陰性菌やグラム陽性菌、マイコプラズマといった多くの病原細菌に対して殺菌的に作用することが知られているニューキノロン系抗菌剤(作用機序は細菌のDNA合成阻害)であるエンロフロキサシンを用い、感染マウスから緑膿菌の除去が可能かどうか、その効果を検討した。

【材料と方法】

緑膿菌が感染しているA飼育室(約50ケージ収容)の全ケージを対象とし、最初に酸性水投与による除去効果を検討した。酸性水は塩酸(HCl)を水道水でpH2.5に調整し、66日間給水瓶で投与した。ボトル交換は投与開始時と期間中に2回行った。検体は糞便とし、新鮮糞が採取しやすい週1回のケージ交換後に採取した。採取に用いるピンセットはサンプル毎にアルコールを浸したキムワイプで消毒した。採取した新鮮糞3~5個を超純水1mlを入れたエッペンチューブに入れ、約1時間の加温後、攪拌し、滅菌綿棒で培地に塗布した。検査は緑膿菌選択培地であるNAC寒天培地(栄研化学(株)製)を用い、37°C、48時間培養し、青(黄)緑色の色素産生を有

するコロニーを形成したものを陽性と判定した。次に、酸性水投与による実験結果を踏まえ、4週間の通常給水によるインターバル後に、エンロフロキサシン投与による除去効果を検討した。エンロフロキサシンは市販のバイトリル 10%液（バイエル薬品(株)製）を用い、マウス肺パスツレラの除去を実施する場合と同濃度であるエンロフロキサシンとして 170 mg/l の濃度に水道水で希釈し、給水瓶で 28 日間投与した。尚、投与期間中の給水作業において、給水瓶は必ず元のケージにセットすることとし、給水瓶の動線管理を徹底した。

【結果】酸性水投与において、15 ケージについて追跡検査したところ陽性から陰性に転じたとも考えられるケージがごく一部に見られたものの、66 日間の投与期間中、陽性率はほぼ横ばい状態であり、除去効果は殆ど見られなかった。一方、エンロフロキサシン投与において、投与開始日に陽性であった 4 ケージの内 3 ケージが投与 7 日後に陰性に転じるとともに、酸性水投与期間中に陽性を示した 4 ケージにおいても陰性となり、エンロフロキサシンによる緑膿菌の除去効果が確認された。しかしながら、1 ケージにおいて 28 日間の投与でも陽性のままであり、完全に除去することはできなかった。当該ケージ以外にも陽性のケージが残存している可能性が考えられたことから、エンロフロキサシン投与終了後、水道水によるランダム給水に戻して 1 週間後に再検査を行った。その結果、これまで陽性を示さなかったケージや、一度陰性に転じたケージでも陽性が確認された。この結果は緑膿菌の再感染が飲水（給水瓶）を介して容易に起こることを意味しており、伝播予防には給水瓶の動線管理も非常に重要であることが示された。

【まとめ】緑膿菌感染マウス飼育室からの緑膿菌の除去において、簡便な方法として殺菌剤の飲水添加法により検討した。酸性水は緑膿菌や他のグラム陰性菌が水を介して伝播するのを予防できることが知られているが、一度感染したマウスコロニーから緑膿菌を除去することはできないと考えられた。一方、エンロフロキサシン添加水による投与においては一定の除去効果は見られたものの、完全に除去することができなかったことから、緑膿菌の除去薬としては不十分であると考えられた。また、給水瓶によるランダム給水では飲水を介した緑膿菌の再感染が確認できたことから、伝播予防には給水瓶の動線管理が非常に重要であると考えられた。現在、塩素添加水（5～10 ppm）による緑膿菌の除去効果についても検討を進めている。

秋田大学動物実験部門での蟻虫感染についての事例

助川康子¹、○二部恒美¹、川越政美¹、柴田淑子¹、池田勝久¹、
佐藤政義¹、小畑孝弘¹、戸井田和実¹、鈴木美帆子¹、九島秀美¹、
津谷優子²、池田たま子¹、松田幸久¹

(¹秋田大学バイオサイエンス教育・研究センター動物実験部門、²株式会社 JAC)

近年、マウスの遺伝子改変技術の向上に伴い、様々な遺伝子改変マウスが作出されている。当部門でも、飼育数・飼育割合のほとんどがマウスであり、その多くは、遺伝子改変マウスである。遺伝子改変マウスの飼育の場合、長期飼育または、何代にも渡る飼育・繁殖の傾向にある。その為、蟻虫汚染が起こると、感染が慢性化しやすい。

現在、当部門では、他施設から導入する実験動物（ほとんど遺伝子改変マウス）は、検疫検査後、飼育室に導入している。しかし、2005年以前は、書類審査のみで、検疫検査を行っていなかった。その為、ほとんどの蟻虫は、その当時に進入・感染したと思われる。その後、「当部門の承諾なしでの“研究者同士のマウスの授受”あるいは「エリア毎の共通実験室利用」で、広まったと考えられる。

ここ数年間、当部門では、異なる飼育室に年に2-3回程度の蟻虫発生がある。その都度、パモ酸ピランテル入りのエサを用い、多大な労力と経費をかけて、約半年かけて発生飼育室の駆除・治療を試みているが、根絶には至っているとは思えない。

根絶できないと思われる理由として、検疫時に感染を見逃している可能性がある事、蟻虫卵が飼育環境(飼育ラックや飼育室の壁)に飛散しており完全に除去できていない事等が考えられる。

そこで、我々はまず、検疫検査見逃しの可能性を調べてみる事にした。2009年3月の改装工事終了時には、いったんマウス室を空にして、消毒を行った。そして、2009年4月に、2009年以前のSPF室で飼育していたマウスの一部を導入・飼育している。これらの飼育室では、実中研の検査で「蟻虫陰性」の結果が得られている。本発表では、この飼育室の蟻虫全頭検査を行った結果を元に、蟻虫駆除についての考察をおこなう。

以上

山形大学医学部附属動物実験施設における病原性を持たない原虫感染の対応

○尾崎順子、時田芹奈、甲斐賢人、伊藤恒賢、大和田一雄
(山形大学医学部附属動物実験施設)

<背景・目的>

当施設の微生物モニタリング検査項目は国動協で推奨している項目に従い、病原性を持つ微生物を排除対象としている。今年の定期モニタリング検査で SPF エリア内の 2 部屋（飼育室 A,B）で *Tritrichomonas muris*（以下 T.muris）を確認した。この飼育室 A,B では遺伝子改変動物を含むマウスを各系統別にラックを区別し繁殖供給を行っている。T. muris は病原性を持たない原虫であるが、SPF エリア内の感染を放置できないと判断し、以下に示す排除法を試みた。

<経過と検査・排除方法>

- ① 4月の定期モニタリングで飼育室 B のモニター動物 1 匹に T.muris を確認した。飼育室内全体の感染状況を把握するため全てのラックから 2 ケージを選び、ケージ内の 1 匹を検査（抜き取り検査）した。しかし感染動物は見つからず経過観察とした。
- ② 7月の定期モニタリングで飼育室 A と B のモニター動物に T.muris を確認し、①と同様に抜き取り検査を行った。その結果、飼育室 A では 26 ケージ（2 系統）、飼育室 B では 3 ケージ（2 系統）で感染を認めた。
- ③ 感染を確認したケージの同居動物を淘汰または別の飼育室へ移動し、そのラックは水洗・清拭を行った。
- ④ 4週間後に再度抜き取り検査を行い感染状況を調べたところ、飼育室 A で 1 ケージ（1 系統）、飼育室 B で 2 ケージ（1 系統）で感染を確認したため、③と同様の対応を行った。
- ⑤ 1週間後、飼育室内の全ケージから動物を 1 匹ずつ抽出し検査を行い、全てのケージで陰性を確認した。

T.muris の検査は常法に従い直接塗抹法を用いた。

<結果・考察>

以上の経過から、4月には原虫の感染初期と思われ、上記の抜き取り検査では感染動物を確認できなかった。7月には 2 つの飼育室で感染を確認したが室内全体への感染はしておらず、系統ごとに動物淘汰・移動で対応することができた。陽性個体のケージ内同居動物は高い確率で感染しており、感染した親から離乳した幼若マウスでは濃厚感染を認めた。

上記対応後に定期モニタリング検査を行ったが 2 部屋とも原虫は確認していない。清浄化に伴う実験の中断は、実験者への時間的・経済的影響が大きいため、以上の様な排除法を試みたが、今回の経験から T.muris の感染は定期自家検査による早期発見と拡散状況の把握により、汚染動物や同居動物の淘汰・隔離等、適切な対応を行うことで、排除可能であると考えられた。

東北大学動物実験センターの活動報告 ～微生物モニタリング業務について～

○吉田弥生、末田輝子、笠井憲雪（東北大学動物実験センター）

東北大学動物実験センターでは、動物実験計画書に関わる事務的業務の他に、技術的業務を行うことで東北大学全学の動物実験の適法性と動物福祉の推進に努めてきた。今回の発表では、本年度から業務拡張を行った微生物モニタリングについての活動報告を行う。

動物実験センターでは、平成 21 年から微生物モニタリングサービスを行っているが、伝染力の強い感染症に分類されている血清 4 項目のみの検査を行っていた。しかし、本学の多くの飼養保管施設からの検査依頼が増えたこと、従来 16 項目を検査している医学系研究科附属動物実験施設からの検査依頼への対応、また、近年問題となってきた不顕性に推移する感染動物の摘発の重要性から、本年 9 月から検査項目を血清 4 項目から血清 8 項目・培養 9 項目・鏡検 3 項目への拡大を行った。

検査項目の拡大を行うにあたり、公益財団法人 実験動物中央研究所 ICLAS モニタリングセンターにて 2 週間のセンター職員の研修を実施し、検査技術の習得を行った。また、実験動物中央研究所とタイアップし、動物実験センターでは検査できない項目や確定検査を実験動物中央研究所に検査を依頼し信頼性の向上を図っている。実験動物中央研究所に検査を依頼する場合でも、剖検・採材は動物実験センターで行っており、最終判定の報告書を動物実験センターで作成し検査依頼先に提出している。

検査項目は、検査依頼施設に設定して貰っているが、動物実験センターでも実験動物中央研究所のコアセットに準拠した独自のコアセットの提示を行い、推奨している。そして、検査は動物実験センターで行うため動物の搬入を行って貰っているが、検査個体が多く施設が遠方の場合にのみ、顕微鏡などの機器類を準備して貰う事を条件に出張で検査を行っている。また検査費用は、通常動物コアセット内の項目に関しては無料で行っているが、免疫不全コアセットについては PCR および特殊染色の項目のみ検査実費を負担してもらっている。

今年度から拡張したばかりで手探りの状態が続いているが、今後の展望としては PCR や特殊染色の検査まで行い、確定検査まで行えるように業務拡張を勧めて行きたいと考えている。

マウス帝王切開における分娩遅延を目的とした プロゲステロンの単回投与容量と投与時期の検討

○伊藤恒賢¹、鈴木沙知^{1,2}、正脇健次^{1,2}、尾崎順子¹、福田直樹¹、大和田一雄¹
(¹山形大・医・動物実験施設、²株式会社ジェー・エー・シー)

【背景と目的】我々は過去にマウスの肺パスツレラ汚染を経験し、帝王切開法を用いた汚染マウスの大規模クリーニングを行った。その際の帝王切開の成績はドナー107匹（33系統）中、2匹は帝王切開時（妊娠19日目の午前中）に分娩し、残りのドナー105匹から801匹（平均7.63匹）の胎仔を得た。しかし、そのうち正常に蘇生した乳仔は684匹（蘇生率85.4%）、離乳まで生存した乳仔は330匹（里仔成功率48.2%）であった。蘇生や里仔がうまく行かない乳仔は、帝王切開時に体重が小さく、体躯が脆弱なため、我々は帝王切開時期を妊娠19日目から妊娠20日目（Plug確認日を妊娠第1日目）に1日分延長することを計画した。一方、プロゲステロン（P4）は妊娠維持に重要なホルモンであり、マウスの分娩はP4の血中濃度が低下した後に起こるとされている。したがって、妊娠期間を延長するためにはP4を外部から投与する必要がある。そこで今回は、妊娠末期のマウスを用いてプロゲステロンを単回投与し、1回のP4の投与で分娩を遅延出来るか否かを投与量と投与時期を指標に比較検討した。

【材料と方法】8~12週齢のJcl:ICR雌マウス73匹を同系統の雄マウスを用いて妊娠させ、対照群として自然分娩させた群（対照群1）および妊娠19日目の午前中に帝王切開した群（対照群2）を設定した。その他の個体は妊娠15、16、17、18及び19日目の9時（AM）または16時（PM）にプロゲステロン製剤（ルテウム注10、あすか製薬）2mgまたは4mgを頸背部皮下より投与して試験群（13群）とした。各群において妊娠20日目の12時までには妊娠が維持できるか否かを比較検討した。妊娠が維持できた雌マウスは妊娠20日目の午後に胎仔を摘出し、胎仔の生存の有無、体重、蘇生の状況等を確認した。

【結果】対照群のうち、自然分娩させた群は全ての個体が妊娠20日目の9時には娩出されていた。妊娠19日目の午前中に帝王切開された胎仔の重量（1.58g）は自然分娩された乳仔の平均体重（1.82g）よりも0.24g（13.2%）低い値であった。試験群のうち、2mgのP4を投与した群は、P15AM、P16AM、P17AM、P17PM、P18AM、P18PMおよびP19AM群であり、妊娠維持成功率（妊娠20日目の12時まで妊娠が維持できた母数率）はそれぞれ、0,0,40,60,100,100および80%であった。同様に4mgのP4を投与した群は、P16PM、P17AM、P17PM、P18AM、P18PMおよびP19AM群であり、妊娠維持成功率はそれぞれ、75,80,100,100,100および100%であった。

一方、妊娠が維持できた雌マウスの胎仔に0~3.57%の死亡例を認めた。胎児の死亡例は特にP4の効果が不完全であったと思われる群に多く認められた。

以上から、当施設では妊娠が確実に延長でき、胎仔の死亡例が少ない、妊娠17日目の午後から妊娠19日目の午前までの間に、4mgのP4を1回だけ投与する方法を採用している。

災害時におけるマウス胚及び精子の凍結保存サービスについて

○西尾啓輔、笠井憲雪（東北大学大学院医学系研究科附属動物実験施設）

昨年 2011. 3. 11 に起きた東日本大震災では甚大な被害を受けましたが、動物実験施設の復旧作業に職員一丸となって取り組み危機的状況を乗り越えました。しかし、SPF 状態を維持するために計画的削減を行った事もありマウス・ラット等多くの貴重な動物の命が犠牲になりました。

震災直後から、当施設で熊本大学 CARD に緊急支援物資として要請したマウス精子凍結保存キットを用いて「緊急のマウス精子凍結保存サービス」を実施しましたが、思った程利用者の反応が良くありませんでした。当施設では研究支援業務として凍結保存サービスを行っており、災害時ではマウスの胚及び精子の凍結保存は有用であると考えていたため予想しない結果となりました。

震災から 1 年以上が過ぎ震災前の状態に戻りつつある今、貴重な遺伝子改変マウス等を所有していた当施設利用者に凍結保存に関する震災時の対応についてのご意見を伺いたく 11 項目のアンケートを実施しました。

アンケート結果から当施設で研究支援業務として行っているマウス胚凍結保存サービスが、凍結保存業務を行っている理化学研究所や熊本大学 CARD と同等の認知度であった事、実際に凍結保存を行っている利用者が回答者数の半数いる事が分かり、利用者のマウス胚凍結保存についての関心が高い事が伺えました。しかし、今回行なった緊急のマウス精子凍結保存サービスの実施についての情報が伝わっていなかった事が分かり、災害時の情報伝達方法の難しさも伺えました。

今回のアンケート結果は、災害対策に胚や精子の凍結保存の有用性について、研究者の認識はかなり高いものの、実際の保存の実施には、我々技術者の研究者への積極的なアプローチが必要である事が示されました。