

日本実験動物技術者協会  
第1回実験動物技術研究交流大会  
講演要旨集



日 時：平成 27 年 11 月 21 日（土）9:00～14:55  
場 所：東北薬科大学 中央棟 2F 2B 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  
後 援：東北薬科大学  
主 管：東北薬科大学 実験動物センター



日本実験動物技術者協会  
第1回実験動物技術研究交流大会  
プログラム

日 時：平成27年11月21日（土）9:00～14:55

場 所：東北薬科大学 中央棟 2F 2B講義室

〒981-8558 仙台市青葉区小松島4-4-1 Tel:022-234-4181(代表)

大会長：小島修樹（東北薬科大学 実験動物センター）

共 催：東北動物実験研究会

- 8:30～9:00 受 付
- 9:00～9:05 開会挨拶 伊藤 恒賢（東北支部長 山形大学）
- 9:05～9:10 大会長挨拶 小島 修樹（大会長 東北薬科大学）

◎ 教育講演 9:10～11:00（講演50分／討論5分）

- 9:10～10:05

教育講演Ⅰ：「実験動物棟建設に係る諸問題と対応-東北薬科大学実験動物センターの例-」

（日本実験動物技術者協会 第374回本部共催講演会）

安藤 隆一郎 先生（東北薬科大学 実験動物センター）

座長 若井 淳（福島医大医学部・実験動物研究施設）

- 10:05～11:00

教育講演Ⅱ：「新潟大学脳研究所動物実験施設の改修工事 -施設運用開始と問題点-」

（日本実験動物技術者協会 第373回本部共催講演会）

前田 宜俊 先生（新潟大学脳研究所 生命科学リソース研究センター）

座長 小島 修樹（東北薬科大学 実験動物センター）

- 11:00～11:15 休憩・フロアディスカッション

◎ 一般講演（1）（講演10分／討論2分）

- 11:15～11:51 座長 西尾 啓輔（東北大・動物実験施設）

1. 原虫感染マウスに対するメトロニダゾールによる駆除効果の検討（第2報）

○井上 吉浩<sup>1</sup>、飛内 章子<sup>2</sup>、石橋 崇<sup>1</sup>、工藤 洋平<sup>1</sup>、松居 靖久<sup>1</sup>

（<sup>1</sup>東北大・加齢研・実験動物管理室、<sup>2</sup>同 遺伝子導入研究分野）

## 2. 微小昆虫チャタテムシの発生から駆除対応について

○小島 修樹<sup>1</sup>、阿部 祐子<sup>2</sup>、遠藤 愛美<sup>2</sup>、菱沼 美紀子<sup>2</sup>、狛守 理江<sup>2</sup>、大久保 均<sup>3</sup>、  
安藤 隆一郎<sup>1</sup>

(<sup>1</sup>東北薬科大学 実験動物センター、<sup>2</sup>株式会社ジェー・エー・シー、<sup>3</sup>日本クレア株式会社)

## 3. 免疫不全動物エリアのニューモシスチス感染再発とその対応

○HAO YIN、白濱 育美、今井 信子、工藤 均、太田 昌江、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)

□ 11:51~13:00 昼食・休憩

## ◎ 一般講演 (2) (講演 10 分/討論 2 分)

□ 13:00~13:36 座長 鈴木 悦子 (株式会社ジェー・エー・シー 東北大・動物実験施設)

## 4. 環境モニタリングの実践と活用について

○阿部 祐子<sup>1</sup>、小島 修樹<sup>2</sup>、遠藤 愛美<sup>1</sup>、菱沼 美紀子<sup>1</sup>、狛守 理江<sup>1</sup>、安藤 隆一郎<sup>2</sup>  
(<sup>1</sup>株式会社ジェー・エー・シー、<sup>2</sup>東北薬科大学 実験動物センター)

## 5. 微生物モニタリング検査における MHV 確定診断キットの導入

○安野 航、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)

## 6. 福島医大における微生物モニタリングを振り返って

○遊佐 寿恵<sup>1</sup>、丹治 静保<sup>1</sup>、若井 淳<sup>1</sup>、関口 美穂<sup>1、2</sup>、片平 清昭<sup>2</sup>  
(<sup>1</sup>福島医大医学部・実験動物研究施設、<sup>2</sup>福島医大・医療-産業 TR センター・動物実験分野)

## ◎ 一般講演 (3) (講演 10 分/討論 2 分)

□ 13:36~14:12 座長 小畑 孝弘 (秋田大学・医・バイオサイエンス教育・研究センター  
動物実験部門)

## 7. 感染実験域の使用について

○森川 正喜、三好 一郎  
(東北大・動物実験施設)

## 8. 当センターにおけるミニブタ飼育の実際 -飼育室の仕様変更と技術支援の紹介-

○尾崎 順子、伊藤 恒賢  
(山形大学・医・MS 推進研究所・動物実験センター)

## 9. ウサギにおける3種混合麻酔薬の検討

○福田 直樹<sup>1</sup>、水野 祐之介<sup>2</sup>、伊藤 恒賢<sup>1</sup>

(<sup>1</sup>山形大学・医・MS推進研究所・動物実験センター、<sup>2</sup>山形大学・医)

□ 14:12~14:25 休憩・フロアディスカッション

## ◎ 一般講演(4) (講演10分/討論2分)

□ 14:25~14:49 座長 深澤 貴史 (岩手医科大学医歯薬総合研究所 動物研究センター)

## 10. 実験者へのマウス胚移植技術における指導経験

○石橋 崇、井上 吉浩

(東北大学加齢医学研究所実験動物管理室)

## 11. BMY法を用いたC57BL/6系マウスの繁殖コントロールについて

○伊藤 恒賢<sup>1</sup>、白井 千緒海<sup>2</sup>、芳賀 博凱<sup>2</sup>、水野 祐之介<sup>2</sup>、尾崎 順子<sup>1</sup>、福田 直樹<sup>1</sup>、  
須藤 まゆみ<sup>1</sup>、田中 大資<sup>1</sup>

(<sup>1</sup>山形大学・医・MS推進研究所・動物実験センター、<sup>2</sup>山形大学・医)

□ 14:49~14:55 閉会挨拶 高橋 智輝 (奥羽支部長 岩手医科大)



## 実験動物棟建設に係る諸問題と対応 — 東北薬科大学実験動物センターの例 —

安藤 隆一郎

東北薬科大学 実験動物センター

実験動物棟（以下、「施設」）の建設にあたっては、施設が抱える多くのソフト上、ハード上の諸問題について計画段階から十分な検討を加えることが重要である。演者らは本学薬学部が6年生新学部へ移行する時期に、新キャンパス建設に伴う施設の新築工事に携わる機会があった。今回は、新築工事計画直後から竣工まで施設が持つ諸問題の拾い上げと対応について検討を重ねてきた3年間の経験を報告したい。

1) ソフト上の諸問題：一般的に大学における施設は、企業等の施設と異なり、多数の実験者が多種類の動物実験を行う流動的な「多目的施設」である。したがって、基本設計以前に予想される実験内容、使用動物の種類、実験者の質（学部学生・大学院生・職員等）ならびに従前の実績や将来的な内容も含む形で調査を実施し、施設に求められる実像を把握しなければならない。これらの結果から、実験室および飼育動物室の種類と数、配置、施設内動線などを決定する。また、施設の管理体制も考慮する必要がある。本学の特徴として、実験者の8割以上が学部学生であり、飼育管理（ケージ交換・清掃消毒作業）もセルフサービスに近い管理方式をとっていたのでこの点を設計に十分反映させる必要があった。

2) ハード上の諸問題：施設にとって最大の課題は、限られたコストおよび建築上の法規制の範囲内で、いかに動愛法等の実験動物関連法規による動物実験倫理、動物福祉などにも配慮した適正な生物学的、化学的、物理学的環境を、安定的かつハイレベルに維持するかであろう。当施設では、生物学的には施設全体をバイオクリーンルームと捉え、実験者のアレルギー対策も含めて空調と飼育装置を一体化させるシステムを設計に反映させた。化学的には施設内外の臭気問題である。特に敷地は、第二種住居専用地域に属しており、対策として施設特有の臭気を個々の室内で処理するシステムを採用している。物理学的には特に施設内の温・湿度の変動幅を最小限にすることと、維持費も勘案してシンプルな露点浴空調機を用いた1系統給気システムを採用し、関連機器・補機類もメンテナンス時にノンストップで運転可能な方式にした。さらに、メンテナンス性を向上させる為、各階に外部から進入できる天井階（Interstitial space）を設けた。また、建築的には外部からの熱負荷を確実に軽減する目的で、外断熱方式を用いている。

以上、上述の諸問題への対応例について具体的な事例を交えて紹介する。

## 新潟大学脳研究所動物実験施設の改修工事 －施設運用開始と問題点－

前田 宜俊

新潟大学脳研究所 生命科学リソース研究センター  
動物資源開発研究分野

我々の施設は、新潟大学医学部附属動物実験施設として1980年に開業し、33年を経た2013年1月より大規模改修工事を行った。これまで空調機の入替えや施設内の床工事等の部分的工事は何回か行ってきたが、今回のように耐震強化や間取りの変更を含む大規模改修は初めての経験であった。工事期間は約7か月を要し、2013年7月末に完成した。工事は、同じ脳研究所内の特殊動物施設(以下、C棟)の改修工事も含めた予算のため、移転先の確保の都合から先にC棟の改修を行い、その後に当施設の工事を行った。

改修工事は、間取り変更などの設計や設備の要望の詳細な取りまとめ、C棟を含めた移転先を飼育室や実験室に改修するための作業、移転規模の割り当てなどの作業から始まった。その後、移転作業、移転先での飼育室の立上げ、動物の移転と管理運営、工事と並行して施設部から提案される改修計画図面の確認作業などに追われた。

改修工事完了後は、引き渡し前の確認と補修・修正工事や変更依頼、大型飼育機器の再設置、新しい管理方式のSOP作成と周知徹底のための利用者講習会や現地講習会を実施した。さらに施設職員が利用方法に関するビデオを作製し、学内専用ではあるがホームページで公開した。

順調に収容数が増え続け、現在はマウスの収容可能ケージ数の60%程度(飼育室平均)まで回復している。改修工事後、医学部教授の新旧交代が多くあり、これまで使用していなかった講座が新たに参入するなど、スペースの配分で既に厳しい状況になりつつある。

設備全体では、これまでに致命的なトラブルは発生していないが、空調系のトラブルとして、今年の1月末に起きた全熱交換機の給気圧力低下とモーターの発熱があった。当初、原因がわからず全熱交換機の給気側を一時停止するなどの対応を取った。最終的に原因はファンベルトの滑りであることがわかり、テンションメーターを使って調整することで解決した。

改修工事終了後に改良工事を行ったものとしては、窓の2重サッシ化がある。これは冬季に一般廊下や居室系、実験室系の室内温度が低くなるため、断熱対策として実施した。外気温の違いなどで根拠を示すことはできないが、体感温度としては十分に効果を感じている。また自家発電時の使用電力量が確認できないため、電力メーターを設置した。

まだ設備的に不満な点多々あり、現在改修を計画中のものがある。現在抱えている問題点は、動物実験施設が「管理する立場」として設備面で希望したものが削られてしまったことに起因するものが多い。これらは施設部に動物実験施設側の意図が十分に伝わらなかったことや、予算的に不可能とされたことが原因であろう。一方で工事業者の技術レベルが大きく影響していると思われる施工不良と言えるような例もある。

再稼働から2年が経過しても、いまだに「立ち上げ途中」という感が強い。工事による空調停止や停電作業等の度に何らかの問題が出て対応するという状況がある。これらの問題点も含めたお話をしたい。



## 原虫感染マウスに対するメトロニダゾールによる駆除効果の検討 (第2報)

○井上 吉浩<sup>1</sup>、飛内 章子<sup>2</sup>、石橋 崇<sup>1</sup>、工藤 洋平<sup>1</sup>、松居 靖久<sup>1</sup>

<sup>1</sup> 東北大学加齢医学研究所実験動物管理室、<sup>2</sup> 同 遺伝子導入研究分野

### 【背景と目的】

マウスにおける消化管内原虫 (*Chilomastix bettencourti*, *Octomitus intestinalis*, *Tritrichomonas muris*, および *Amoebas*) は、微生物カテゴリーEにランクされ、通常、病原性はなく、飼育環境の指標になる微生物とされる。当施設の微生物モニタリングにおいて、いくつかの飼育室ではこれらの原虫感染が見受けられる。しかしながら、免疫不全動物では発病する可能性もあり、動物施設内での伝播予防管理は重要である。また、共同研究のために他の研究機関にマウスを譲渡する際に感染の事実が支障になるケースもある。原虫駆除の方法として、生殖工学的手法によるクリーニングや帝王切開法などがあるが、いずれもマウスを多かれ少なかれ処分しなければならず現実的な方法ではない。一方、抗原虫薬であるメトロニダゾールを水に溶かして給水する方法で駆除効果が試されているが、嗜好性 (摂水性) が良くないことや、沈殿してしまうことなどにより、十分な駆除効果は得られていない。本研究において、第1報 (日本実験動物科学技術さっぽろ 2014) では、摂取率が期待されるメトロニダゾール 0.1%添加飼料を給餌した場合と、メトロニダゾールは酸性水に良く溶けることが解っているため、メトロニダゾール 0.025%酸性水溶液を給水した場合の2群を設定し検討したが、原虫感染マウスにおける駆除効果は認められなかった (駆除率 0%)。そこで今回、添加濃度を見直し、メトロニダゾール 0.5%および 1.0%添加飼料を用い、原虫感染マウスにおける駆除効果を検討したので報告する。

### 【材料と方法】

原虫感染マウスの作製は、原虫陽性飼育室から原虫陽性マウスを選別し、その盲腸内容を生食で懸濁液にし、5週齢のICRマウスに0.1ml/回/週×4回を経口投与した。一部のマウスで原虫が感染 (生着) したことを確認し、残りのマウスを実験に用いた。実験群としてメトロニダゾール 0.5%および 1.0%添加飼料投与群を設定し、それぞれ4週間投薬群 (2週間投薬、1週間休薬、2週間投薬) および3週間投薬群の投薬期間を設定した。各群5匹とし、投薬後の原虫駆除効果を判定した。投薬期間中、各群の体重、摂餌量、摂水量を測定し、比較検討した。

### 【結果と考察】

メトロニダゾール 0.5%添加飼料における嗜好性は対照群に比べて劣るものの、2週間程で摂餌量は増加し、摂食率は同等となる。その結果、メトロニダゾール 0.5%添加飼料投与群 (4週間投薬群) では原虫は検出されず、明らかに駆除効果が認められた。一方、同群の3週間連続投薬群では原虫が残存する個体が見られた。駆除効果が不十分な要因として原虫のライフサイクルに関与していると考えられた。また、メトロニダゾール 1.0%添加飼料投与群でも駆除効果が認められたものの、嗜好性に劣り、投薬期間中の体重減少への影響が大きく、動物への負荷が大きいと考えられた。以上のことから、メトロニダゾール 0.5%添加飼料投与群 (4週間投薬群) では、より安全に駆除効果が期待できると考えられた。本研究では健常系マウスを用いた検討結果であり、実用化に向けては生理的活性の低い遺伝子組換えマウスや繁殖コロニーなど、安全性の観点からより詳細に検討を行う必要があると考えられた。

## 微小昆虫チャタテムシの発生から駆除対応について

○小島 修樹<sup>1</sup>、阿部 祐子<sup>2</sup>、遠藤 愛美<sup>2</sup>、菱沼 美紀子<sup>2</sup>、  
 伏守 理江<sup>2</sup>、大久保 均<sup>3</sup>、安藤 隆一郎<sup>1</sup>

<sup>1</sup>東北薬科大学実験動物センター、<sup>2</sup>株式会社ジェー・エー・シー、  
<sup>3</sup>日本クレア株式会社

### 【背景】

近年、動物施設は、SPF 動物の飼育が通例となり環境を一定の基準に維持する事は非常に重要である。一度感染事故が発生すれば、実験の中断、動物の処分あるいはクリーニング、施設のクリーニング等、多くの時間と労力、更にコストが係わる。2014年に当施設でマウス飼育室並びにラット飼育室から微小昆虫チャタテムシの発生が2件確認された。チャタテムシについては、病原性は無いものの施設の清浄度・飼育環境の微生物統御良否を判定する指標の一つとしている。主な生息場所は屋内とされており、主にカビ等の菌類、穀粉やその加工品、皮膚落屑、書籍の糊など多様な有機物を食べると言われている。また消化管内には、多くのカビの胞子を有している事が確認されている事から、最近チャタテムシの死骸による人へのアレルギー原因物質としても多く知られて来ている。当施設でのチャタテムシ発生から駆除対応について報告する。

### 【管理】

当施設は、延べ床面積 1,972 m<sup>2</sup>の地下1階、地上4階の建物で2006年2月に竣工し10年目の施設である。施設内は、気密性を高めた使用とするとともに、内装・照明設備等は、洗浄消毒可能な材質としている。空調は、露点浴空調式の単一ダクト再熱方式を採用、HEPA フィルターを介した清浄空気による第1種換気を行い、温湿度も通年一定に保たれている。飼育器材は、感染事故の拡散防止を想定し室内排気を行う一方向気流方式を採用し、施設内の清掃消毒作業としては、床及び飼育ラック等をクリーンルーム用掃除機で除塵後、微酸性次亜塩素酸水（遊離塩素 20ppm）による拭取り消毒を常用としている。動物の飼育管理は、研究者が行う事としている。

### 【対応および考察】

駆除作業については、飼育ラックの形状から2つの方法で行った。マウス室は、燻煙殺虫剤と高温蒸気による駆除。ラット室は、燻煙殺虫剤と殺虫薬剤噴霧による駆除である。いずれの方法も駆除後、セロファンテープを用いたスタンプ検査を実施し経過を観察しているが、チャタテムシ生息は確認されなかった。

施設への侵入は、いずれの飼育室も研究者並びに動物の出入りが関係する事は無く、種々の物品や人に付着して個々に外部から侵入生息したものと考えられる。また、飼育管理、清掃消毒作業方法などを調査した結果、ケージ交換サイクルや飼育ラック内の清掃消毒作業法について適正な作業法を行っていなかったことが判明し、このことが主たる原因とも判断した。施設の清浄度・飼育環境の微生物統御を維持するためには、適切な方法での飼育管理、清掃消毒作業を行う事が最も重要である。今後、研究者に飼育管理、清掃消毒作業方法について充実した指導を行いたいと考えている。

## 免疫不全動物エリアのニューモシスチス感染再発とその対応

○HAO YIN、白濱 育美、今井 信子、工藤 均、  
太田 昌江、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

### 【はじめに】

昨年当施設では、免疫不全マウスにニューモシスチス感染が発生したことから、免疫不全動物用のエリアを設置、稼働した。ところが、稼働して半年を経過した頃、免疫不全動物エリア内で再度ニューモシスチスの感染が確認された。今回は再発の原因、及び対策について報告する。

### 【再発原因の考察】

ニューモシスチスは空気中に常在するため、まず考えられたのは空調設備についてだった。調査の結果、いくつかの飼養室でヘパフィルターの漏えいが認められた。

環境検査も行ったところ、落下細菌試験では基準値以下のコロニー数だったのだが、ドアノブや蛇口の拭い検査では基準値以上のコロニー数が確認され、利用法の改善、利用法の指導が必要と考えられた。

### 【現在行っている感染防止対策】

ヘパフィルターの漏えいが認められた免疫不全動物エリアの飼養室にはヘパフィルター付きのクリーンブースを設置し、その中で免疫不全マウスを飼養するようにした。それに伴い利用方法を見直し、新たな利用法を制定した。利用者会議を開催し、経緯と今後の対応について報告した。また、監視カメラを設置し、予防衣も足元が露出するガウンではなく、全身を覆う作業衣に変更した。

### 【免疫不全動物のクリーン化】

ニューモシスチス感染マウスを飼養していた部屋全ての遺伝子改変マウスを体外受精法によりクリーン化し、再感染の有無の確認後、クリーンブース内のラックへ移動させる方法で、現在作業を進めている。また、今後感染が再発した場合に備え、受精卵や精子を凍結保存することにした。

## 環境モニタリングの実践と活用について

○阿部 祐子<sup>1</sup>、小島 修樹<sup>2</sup>、遠藤 愛美<sup>1</sup>、菱沼 美紀子<sup>1</sup>、  
 狛守 理江<sup>1</sup>、安藤 隆一郎<sup>2</sup>

<sup>1</sup>株式会社ジェー・エー・シー、<sup>2</sup>東北薬科大学実験動物センター

### 【目的】

動物施設の環境モニタリングの目的は施設内環境が適切に管理され、一定レベルの範囲内で維持されているかを確認することである。また、動物飼育下環境が定められた基準値内にあるかどうかをモニタリングすることにより微生物汚染リスクを評価することができる。必要性は十分に認識されているものの、その確認行為である測定・評価方法について確立されていないのが実際である。当施設では動物飼育下で施設内 23 区域の床の清掃消毒作業後に実施した。測定の事例及び評価基準を定め、過去 3 年間の測定結果並びにその測定結果の活用方法について報告する。

### 【方法】

施設の微生物学的清浄度を知る指標として当施設では空中落下菌測定法を定法により実施した。測定中、利用者の入室制限はしなかった。なお、一部を除いた区域は HEPA フィルターを介した清浄空気による第 1 種換気が行われており、清掃消毒作業として床をクリーンルーム用清掃掃除機で除塵後、微酸性次亜塩素酸水（遊離塩素濃度 20ppm）による拭取りを実施した。

### 【結果・まとめ】

落下菌（一般細菌/真菌）コロニー検出数について SPF 飼育室では平均：0.3/0.0 CFU となり、バリア区域としての清浄度が適切に管理されていることが認められた。マウス飼育室では平均：0.5/0.1 CFU、ラット飼育室では平均：0.3/0.0 CFU、実験室区域では平均：0.3/0.1 CFU、移動区域（廊下・階段・E V・トイレ）では平均：1.1/0.2 CFU であった。このことから上記区域は、バリア区域に近い清浄度で維持されていることが認められた。また、同区域洗浄室では平均：3.2/1.5 CFU、エントランスでは平均：5.2/2.3 CFU であったことから、清浄度が適切に管理されていることが認められた。なお、イヌ室については、コンベンショナル区域及び飼育ラックの形状から平均：35.9/9.6 CFU と多く検出された。

以上のことから当施設は、イヌ室を除き基準値内にあり、高いグレードの清浄度を維持できている。その要因として、適切な清掃・消毒作業、空調設備および一方向性気流方式の飼育設備の効果があつたと推測される。今後も環境モニタリングを継続しながら施設内清浄度の維持・向上に活用していきたい。

## 微生物モニタリング検査における MHV 確定診断キットの導入

○安野 航、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

### 【目的】

実験動物施設における微生物感染は、動物実験の精度・信頼性を低下させるだけでなく、貴重な実験動物の損失や施設閉鎖による研究の停滞を招く恐れがある。その対策として、岩手医科大学動物研究センターでは3ヶ月に1度の頻度で微生物モニタリング検査を行っている。検査の一つとして公益社団法人実験動物中央研究所が頒布している検査キット「モニライザ®」を使用しての抗体検査を実施している。モニライザ®は酵素抗体法を利用した市販キットであり高い抗体検出感度を有するが、その高感度から偽陽性がみられることがある。モニライザ®による抗体検査で陽性反応がみられた場合には、ICLAS モニタリングセンターへの依頼検査による確定診断を行うが、依頼検査は結果がわかるまでに多少の時間がかかり、結果が出るまでに感染が拡大する恐れがある。そのため本センターでは迅速に確定検査までの検査結果を得ることを目的に、株式会社 AVSS より販売されている MHV-IF-Slide の導入を試みたため報告する。

### 【方法】

(1) モニライザ®IV<sub>A</sub>によるスクリーニング検査 おとり動物として ICR マウス雌 (6 週齢、合計 37 匹)を施設内の各飼育ラックで 12 週間飼育した。おとり動物は週 1 回のケージ交換時に、各実験用マウスケージより汚染床敷をひとつまみ混入する方式で飼育した。12 週間後にイソフルラン麻酔下で腋窩動静脈より採血し、遠心分離をかけ、血清サンプルとした。上記血清サンプルを用い、モニライザ®IV<sub>A</sub>の操作手順に従って抗体検査を実施した。(2) MHV-IF-Slide を用いた確定検査 モニライザ®IV<sub>A</sub>で MHV 陽性反応がみられた血清を使用して、間接蛍光抗体法による確定検査を行った。検査キットとして MHV-IF-Slide(株式会社 AVSS)を使用した。MHV-IF-Slide はスライドグラス上に MHV 感染細胞が固定化されている間接蛍光抗体法キットである。蛍光標識 2 次抗体には Goat Anti-Mouse IgG H&L Alexa Fluor® 488 (アブカム株式会社)を使用した。ブロッキング剤には 5%スキムミルク、封入剤には 90%グリセロールを使用した。操作手順：① 5%スキムミルクを添加し 30 分間静置 ②PBS 洗浄 ③マウス血清およびポジティブコントロール血清をそれぞれ添加し 60 分間反応 ④PBS 洗浄 ⑤蛍光標識 2 次抗体を添加し 60 分間反応 ⑥ PBS 洗浄 ⑦90%グリセロールで封入

上記操作手順で作製したサンプルを蛍光顕微鏡で観察した。

### 【結果と考察】

MHV-IF-Slide による検査の結果、モニライザ®IV<sub>A</sub>で MHV 陽性反応がみられた血清は陰性であった。そのためモニライザ®IV<sub>A</sub>での検査結果は偽陽性であると判断した。MHV-IF-Slide を使用する事で 4 時間程の検査時間で確定検査を実施することができ、迅速な確定検査が可能となった。今回は偽陽性であったが、今後実際に MHV 感染事故が発生した場合にも、本キットを使用する事で早期に的確な封じ込め対応がとれるものであると考えられる。

## 福島医大における微生物モニタリングを振り返って

○遊佐 寿恵<sup>1</sup>、丹治 静保<sup>1</sup>、若井 淳<sup>1</sup>、関口 美穂<sup>1, 2</sup>、片平 清昭<sup>2</sup>

<sup>1</sup>福島医大医学部・実験動物研究施設

<sup>2</sup>福島医大・医療-産業 TR センター・動物実験分野

実験動物施設における微生物モニタリング検査は、微生物統御上必須である。遺伝子組換え動物が動物実験に供されることが多くなり、マウス飼育領域で長期間にわたる繁殖を行っている今日では、その重要度が増している。国立大学法人動物実験施設協議会と公私立大学実験動物施設協議会の「実験動物の授受に関するガイドライン」には、譲渡及び譲受施設管理者は、本ガイドラインの趣旨が活かされるよう、平素から施設内の実験動物の微生物学的状態等について把握できる体制の整備に努めること、と記載されている。

福島県立医科大学医学部附属実験動物研究施設では、1997年に微生物モニタリングを開始し、施設内の実験動物の微生物学的状態を把握する体制を構築してきた。これまでの間、研究動向の変化に対応して検査手順等について見直しを行ってきた。なかでも、K0 マウスを含む遺伝子組換えマウスの繁殖・飼育の急増に伴い ICLAS モニタリングセンターや（社）日本実験動物協会の検査項目の改訂を参考にした検査項目の見直しの他に検査頻度の見直しを行った。さらに、NOG マウス等の重度免疫不全動物の飼育に伴う検査についても種々検討を行ってきた。

これまでに、研究機関間の授受に伴う微生物検査も含め、いくつかの感染を経験している。施設に搬入されたマウスからは、*Aspicularis tetraptera*、*Helicobacter hepaticus*、*Mouse hepatitis virus* 等の感染が確認されている。また、通常の免疫機能ラットから *Mycoplasma pulmonis*、*Syphacia muris*、免疫不全ラットでは *Staphylococcus aureus*、*Pneumocystis carinii* 等の感染を経験している。検査結果が陽性のつど緊張したが、幸いにも、これらの事例はいずれも限局的に封じ込めることができ、重大な感染事故には至らなかった。清浄度の高い SPF 動物維持を追求していくことは重要であるが、それが極端であれば、実験者にとっては実験の制約を受ける場合もあり不都合になる。我々の施設では実験者の要望にも配慮し、できる限り現実的な対応に努めてきた。導入動物が SPF 基準に適合しない場合には、バイオハザード対応で受け入れることにも工夫した。

今回は、これまでの18年間における感染例とその対策事例を紹介する。

## 感染実験域の使用について

○森川 正喜、三好 一郎

国立大学法人東北大学大学院医学系研究科附属動物実験施設

東北大学大学院医学系研究科附属動物実験施設では感染実験飼育室を6室設けており、それらの部屋を含む区域を感染実験域として管理している。感染実験域は動物を用いた研究用微生物の感染実験及び化学発癌剤を用いる発癌実験を行うために設置しており、基本的に、この区域以外は研究用微生物または発癌剤などの化学物質を投与する動物実験は認めていない。

感染実験域で動物実験に用いられる研究用微生物については、本学において平成27年4月1日より施行された「国立大学法人東北大学研究用微生物安全管理規程」のもと、各研究者と施設が協力をして適正な取り扱い及び管理そして実験時の安全確保に努めている。

前述したように、この区域では化学発癌剤を用いる発癌実験も行われている。発癌剤として用いられる化学物質の取扱いは、研究用微生物に比べて、難しい場合が多い。というものの、研究用微生物を用いた感染実験では、実験後の検体や使用物品にオートクレーブ処理を施すことでその機能を失わせることが可能であるが、化学物質の場合はそれぞれの環境リスクを除去する方法を検討してからでなければ実験を始めることはできない。そのためには、化学物質を用いる研究者と施設がよく協議し、実験開始から終了までの作業手順を作成してから実験を開始している。

感染実験や発癌実験以外には、特定の細胞接種実験やベクター投与実験も行われている。

当施設では、細胞接種実験を実施するにあたり、研究者に対し細胞接種実験に用いる細胞の微生物検査を義務付けているが、検査するのが難しい場合もある。そのような細胞の接種実験を行う場所に感染実験域を使用することで実験を円滑かつ速やかに進めている。

近年、ベクター投与実験の需要が増えている。P2Aレベルの実験であれば感染実験と同様としこの区域を使用するのに問題はない。しかし、現状としてはP1Aレベルのベクター投与実験にも感染実験域を使用している。このことに関しては適正かどうかを再確認する必要がある。

最後に、感染実験域において安全に実験が行われるためには、研究者から十分な情報提供が不可欠なことは勿論のであるが、施設側も提供された情報を十分に理解することが必要である。

## 当センターにおけるミニブタ飼育の実際 －飼育室の仕様変更と技術支援の紹介－

○尾崎 順子、伊藤 恒賢

山形大学医学部メディカル推進研究所動物実験センター

当センターでは平成 27 年 3 月からミニブタの飼育を開始している。ミニブタ用の飼育室は無かったため既存のイヌ飼育室を転用することとした。イヌ飼育室には自動給水・給餌装置およびスクレーパー式の自動水洗架台が整備されていたが、ミニブタを飼育するために飼育室の仕様を変更する必要が生じた。今回はこれらの飼育室の仕様変更内容および新たに整備した物品を紹介する。併せて当センターにおけるミニブタの実験に関連する技術支援について紹介する。以下、飼育室の仕様変更の内容、新規に整備した物品、技術支援の項目をまとめた。

### 飼育室の仕様変更内容

- ・給水ノズルおよびノズル位置の変更
- ・給水圧の調整、配管内エア抜き弁の設置
- ・給餌器
- ・床スノコ
- ・温水配管
- ・逃げ込み防止バー、柵の設置

### 新規に整備した物品

- ・ポータブルスロープ
- ・ハンドリフター
- ・ヒーターマット
- ・家畜用コルツヒーター

### 技術支援項目

- ・麻酔（注射）
- ・採血（大静脈洞、耳静脈）
- ・気管挿管・吸入麻酔
- ・薬剤投与（注射・経口）
- ・直腸温測定
- ・解剖補助

現在のところミニブタの実験は半年以上の飼育を伴う慢性実験が行われており、上記技術支援は全て無償で行っている。初めはセンター職員が対応していた気管挿管および採血は実験者と一緒に行い教育することで実験者が手技を習得し実施可能となった。今後もさらにミニブタに関する正しい知識と取り扱いについて理解を深め実験者に情報提供し実験環境を整えていくとともに、ミニブタにとって適正かつ最適な飼育環境を提供していきたいと考える。



## ウサギにおける 3 種混合麻酔薬の検討

○福田 直樹<sup>1</sup>、水野 祐之介<sup>2</sup>、伊藤 恒賢<sup>1</sup>

<sup>1</sup> 山形大学医学部メディカルサイエンス推進研究所 動物実験センター

<sup>2</sup> 山形大学医学部

### 【背景と目的】

近年、ケタミンやペントバルビタールナトリウムに代わり簡便に使用できる麻酔薬として 3 種混合麻酔薬として報告されている。マウスに対する使用例はいくつか報告があるが、ウサギに対しての報告例は少ない。そこで今回、我々はウサギに対する 3 種混合麻酔薬の有効性について検討した。

### 【材料と方法】

使用動物は、雄日本白色種 (JW) 1~2 年齢を 8 匹使用した。麻酔には、ドルベネ注 (塩酸メドトミジン; 共立製薬 (株), MED)、ドルミカム注射液 (ミダゾラム; アステラス製薬 (株), MID)、ベトルファール (ブトルファール; Meiji Seika ファルマ (株), BUT) を混和したものを使用した。それぞれの麻酔薬の混合量は、ラット用混合量 (MED : MID : BUT = 0.15mg/kg b.w. : 2mg/kg b.w. : 2.5mg/kg b.w. ) とブタ用混合量 (MED : MID : BUT = 0.05mg/kg b.w. : 0.5mg/kg b.w. : 0.5mg/kg b.w. ) を基準とした。ラット用の麻酔薬は、上記ラット用混合量を基準とし、0.5 倍量、1 倍量、1.5 倍量、2 倍量を各 1 匹ずつに投与した。ブタ用の麻酔薬は、上記ブタ用混合量を基準とし、1 倍量、2 倍量、4 倍量、6 倍量を各 1 匹ずつに投与した。麻酔薬は下肢筋肉内に投与した。麻酔投与後、10 分おきに心拍数、呼吸数、直腸温、麻酔深度を 2 時間測定した。麻酔深度は正位反射、四肢の痛覚反射、皮膚痛覚反射、角膜反射をそれぞれ 1 点として測定した。測定終了後、動物にアチパメゾールを投与し、覚醒させた。

### 【結果と考察】

痛覚の評価から、全ての投与量で 30 分以上の麻酔状態を確保出来たと考えられた。麻酔後の心拍数は、ラット用混合量で投与した場合、4 つの投与量に関わらず比較的同じような変動幅 (110 ~ 210 bpm) で推移したが、ブタ用混合量で投与した場合、投与量が増えるにつれ、低下する傾向があった。呼吸数については、いずれの混合量を投与した場合も安定した値で推移した。直腸温に関しては、ラット用混合量とブタ用混合量のどちらも、投与量が増えるほど体温が低下する傾向があった。今回の結果から、30 分程度の麻酔を動物に施したい場合、ラット用混合量の 0.5 倍量が適当な麻酔量と判断された。今回、麻酔深度の判断に、角膜反射を 1 つの指標として用いたが、ウサギの角膜反射が完全に消失する麻酔量は、致死量に近いことが報告されており、3 種混合麻酔においても同様に麻酔深度の判断材料にすべきではないと考えられた。またデータには示さないが、四肢の痛覚反射が消失した麻酔状態でも、ウサギの皮膚・腹膜切開や皮膚と腹膜の剥離の際には、反応を示す。そのため外科的処置が必要な場合、リドカイン等による局所麻酔が必要であると考えられた。

## 実験者へのマウス胚移植技術における指導経験

○石橋 崇、井上 吉浩  
東北大学加齢医学研究所実験動物管理室

### 【はじめに】

CRISPR/Cas9 システムを利用したゲノム編集の技術革新は著しく、エレクトロポレーションによるマウス胚への gRNA 導入法も開発され、マイクロインジェクション技術を持たない研究者でも比較的容易にゲノム編集マウスを作製できる環境が整いつつある。しかしながら、胚を仮親マウスの卵管に移植する胚移植技術の習得は避けて通れない。今回、ゲノム編集マウス作製を目指す所内研究者から胚移植技術を教えてもらいたいと相談を受けた。そこで、生殖工学関連の技術指導にあたり、日常の飼育管理や施設管理業務と両立して取組んだ技術指導スケジュールおよび実際の技術指導の概要について紹介する。

### 【技術指導の概要】

飼育管理および施設管理業務を遂行しながら技術指導に取り組む一方、胚移植実施日の飼育管理業務の一部を他の施設職員に代行してもらうため、予め業務分掌の調整を行った。当該実験者との事前の打合せにより、技術指導の内容は、胚操作のガラスキャピラリー作製、過排卵誘起のためのホルモン投与、採卵、培地における胚操作、経卵管壁卵管内移植、精管結紮マウス作製とした。技術指導のためのマウスは、採卵用マウスに BDF1 雌雄 8 週齢、偽妊娠仮親用マウスに ICR8 週齢、精管結紮用マウスに ICR5 週齢とし、実験者側で購入、用意した。実技指導については、熊本大学 CARD のマウス生殖工学技術研修テキストの内容を基本とした。最終段階である胚移植は、仮親マウス 1 匹につき 20 胚（左右卵管に各 10 胚）、トータル 6 匹の仮親マウスに移植し、トレーニングを実施した。

### 【成果と考察】

胚移植の成否は、移植後 17 日目に実験者自ら仮親マウスを解剖して確認した。その結果、移植した 6 匹の仮親マウス全てで着床胚が確認され、1 匹平均着床胚数は 13 個体であった。出産までは確認していないものの、全ての仮親で移植が成功しており、胚移植技術を習得できたと判断した。実験者は過去にマウス胚の取り扱い経験があり、過排卵誘起のホルモン投与、採卵、培地における胚操作、精管結紮マウス作製は比較的容易に習得した。一方、ガラスキャピラリーの作製や経卵管壁卵管内移植技術は、コツを掴むまで時間を要した。特に経卵管壁卵管内移植では、卵管膨大部の確認、卵管を切開する部分の位置決め、実体顕微鏡下でのマウスのポジショニングなど、個体ごとに臨機応変に対応しなければならないポイント（コツ）が多いため、移植を成功させるコツを 1 匹 1 匹丁寧に解説しながら指導する必要があると実感した。胚移植技術は、「つめ」の段階の極めて重要な技術である。今後、実験者への胚移植などの生殖工学技術の指導依頼も増えてくるものと予想されるため、研究支援としての技術指導方法のさらなる洗練に取り組んでいきたい。

## BMY 法を用いた C57BL/6 系マウスの繁殖コントロールについて

○伊藤 恒賢<sup>1</sup>、白井 千緒海<sup>2</sup>、芳賀 博凱<sup>2</sup>、水野 祐之介<sup>2</sup>、  
尾崎 順子<sup>1</sup>、福田 直樹<sup>1</sup>、須藤 まゆみ<sup>1</sup>、田中 大資<sup>1</sup>

<sup>1</sup>山形大学・医・MS 推進研究所・動物実験センター、<sup>2</sup>山形大学・医

### 【背景】

BMY (Breeding Method in Yamagata Univ.) とは発情前期の雌マウスを選別することなく PMSG (Pregnant Mare Serum Gonadotropin) の単回投与によってマウスの繁殖 (交配・妊娠・分娩・離乳) を行う方法である。本法は山形大学で開発され、自然交配よりも効率的にマウスの繁殖および生産が可能である。

私たちは、BMY 法が通常の計画的大規模繁殖に応用できることに加え、胚移植のための仮親やレシピエントの作製に対して有効な方法であることを報告した。さらに本法を応用することにより、新鮮精子および凍結精子を用いたマウスの人工授精に成功した。

一方、上記の成果は全て ICR 系マウスを用いた結果である。実際に遺伝子改変マウスのクリーニング等を考えた場合、そのバックグラウンド系統として代表的な C57BL/6 系マウスに BMY 法の応用が可能であれば、本法の応用範囲はさらに拡大する。

### 【目的】

本実験の目的は、C57BL/6 系マウスに BMY 法を適用することにより、効率的なマウスの繁殖が可能か否かを検討することである。

### 【材料と方法】

交尾経験のある C57BL/6Jcl の雄 13 匹 (12 週齢) と同系統の未経産雌 25 匹 (10 週齢) を実験に用いた。雌 25 匹の中から発情前期の動物を 10 匹選定し交配に用いた (対照群、N 群)。残りの 15 匹は PMSG の投与量により、体重 10g 当たり 0.4IU を投与した A 群 (n=5)、0.8IU を投与した B 群 (n=5) および 1.2IU を投与した C 群 (n=5) に分けた。PMSG は 16 時に投与し、48 時間後に雄マウス 3-4 匹に対して雌マウス 2-3 匹を同居させた。PMSG の濃度は全て 0.4IU/0.05ml になるように生理食塩水で調整した。

上記の 4 群間で交尾率 (Plug 確認個体数/例数×100、%)、妊娠率 (妊娠個体数/交尾個体数×100、%)、平均着床数 (総着床数/妊娠個体数)、平均生存仔数 (総生存仔数/妊娠個体数) および生産指数 (総生存仔数/例数) を比較検討した。

### 【結果】

N 群、A 群、B 群および C 群の妊娠率はそれぞれ、66.7、0、60.0 および 100.0% であった。また平均生存仔数はそれぞれ、6.5、0、7.0 および 10.5 匹であった。さらに生産指数はそれぞれ、1.3、0、4.2 および 7.0 であった。

### 【考察】

今回の結果から、C57BL/6 系マウスに対して BMY 法は十分に応用可能であり、特に C 群 (1.2IU/10 g BW) の生産指数が N 群の 5 倍以上であったことから、マウスの計画的な大規模繁殖に応用できることに加え、帝王切開時等のドナーの計画的交配等にも効果が期待できる。一方、私たちは過去の実験結果から BMY 法におけるマウスの PMSG 投与量は動物当たり 2.5IU としている。今回の実験では動物 1 匹当たり換算すると PMSG の投与量は 2.05~2.39IU であり、ICR の成績と同様の結果が得られた。

# MEMO



日本実験動物技術者協会

奥羽支部 HP : <http://www.med.akita-u.ac.jp/~doubutu/ouu/sibu.html>

東北支部 HP : <https://sites.google.com/site/jaeattohoku2/>

