

日本実験動物技術者協会
第2回実験動物技術研究交流大会
講演要旨集



日 時：平成28年12月10日（土）9:00～14:35

場 所：秋田大学総合研究棟 理工学部6号館 多目的共用講義室

主 催：日本実験動物技術者協会 奥羽・東北支部

共 催：東北動物実験研究会

主 管：秋田大学バイオサイエンス教育・研究サポートセンター動物実験部門

日本実験動物技術者協会
第2回実験動物技術研究交流大会
プログラム

日 時：平成 28 年 12 月 10 日（土）9:00～14:35

場 所：秋田大学総合研究棟 理工学部 6 号館 多目的共用講義室
〒010-8502 秋田市手形学園町 1 番 1 号

大会長：小畑孝弘

（秋田大学バイオサイエンス教育・研究サポートセンター動物実験部門）

主 催：日本実験動物技術者協会 奥羽・東北支部

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 小畑孝弘（大会長 秋田大学）

◎ 教育講演（講演55分／討論5分）

- 9:10～10:10 座長 小畑孝弘（秋田大学）

教育講演：「キリンにおけるストレス軽減の取り組みとハズバンダリートレーニングの導入」

（日本実験動物技術者協会 第 387 回本部共催講演会）

柴田典弘 先生（秋田市大森山動物園）

- 10:10～10:35 フロアディスカッション・写真撮影・休憩

◎ 一般講演（1）（講演 10 分／討論 5 分）

- 10:35～11:20 座長 福田直樹（山形大学）

1. 遺伝子組換えマウスの不適切な取り扱い—動物実験施設の対応—

○白濱育美、HAO YIN、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）

2. 温室効果ガス削減を目指した動物実験施設モデルの開発

○森川正喜、三好一郎

(東北大学大学院医学系研究科附属動物実験施設)

3. 東北大・加齢研・動物実験施設の新築についてー概算要求から設計までー

○井上吉浩、石橋 崇、工藤洋平、千葉奈津子

(東北大学加齢医学研究所実験動物管理室)

◎ 一般講演 (2) (講演 10分/討論 5分)

□ 11:20~12:05 座長 森川正喜 (東北大学)

4. 床敷とケージ内環境 (アンモニア濃度) について~動物福祉と経済効率を両立させるために~

○小畑孝弘、小松幸恵、場崎恵太、矢野愛美、福田康義、関 信輔、西島和俊

(秋田大学バイオサイエンス教育・研究サポートセンター動物実験部門)

5. 個別換気ケージにおけるマウス飼育環境の検討

○田中大資、須藤まゆみ、尾崎順子、伊藤恒賢

(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)

6. 個別換気ケージにおける ICR マウスの哺育ケージ内環境

○伊藤恒賢、田中大資、須藤まゆみ、尾崎順子

(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)

□ 12:05~13:00 昼食・休憩

◎ 一般講演 (3) (講演 10分/討論 5分)

□ 13:00~13:30 座長 安野 航 (岩手医科大学)

7. 納豆菌芽胞を用いた Tyzzer 菌消毒効果の評価

○矢野愛美、福田康義、小畑孝弘、小松幸恵、場崎恵太、関 信輔、西島和俊

(秋田大学バイオサイエンス教育・研究サポートセンター動物実験部門)

8. 秋田大学におけるティザー菌感染事故への対応

- 福田康義、矢野愛美、小松幸恵、場崎恵太、小畑孝弘、関 信輔、西島和俊
(秋田大学バイオサイエンス教育・研究サポートセンター動物実験部門)

◎ 一般講演 (4) (講演 10 分/討論 5 分)

- 13:30~14:00 座長 場崎恵太 (秋田大学)

9. マウスにおける三種混合麻酔薬の反復投与による血液学的検討

- 鈴木崇斗、遊佐寿恵、小澤和典、関口美穂
(福島県立医科大学医学部附属実験動物研究施設)

10. 生体モニタを使ったウサギに対する 3 種混合麻酔薬の評価

- 福田直樹、伊藤恒賢
(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)

◎ 一般講演 (5) (講演 10 分/討論 5 分)

- 14:00~14:30 座長 白濱育美 (弘前大学)

11. 発生工学支援業務の導入と今後の課題

- 深澤貴史、若井 淳、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)

12. 凍結融解過程における抗酸化酵素であるカタラーゼがウサギ精子の生存性に与える影響

- 場崎恵太、小松幸恵、福田康義、矢野愛美、小畑孝弘、松田幸久、関 信輔、西島和俊
(秋田大学バイオサイエンス教育・研究サポートセンター動物実験部門)

- 14:30~14:35 閉会挨拶 高橋智輝 (奥羽支部長 岩手医科大学)

キリンにおけるストレス軽減の取り組みと ハズバンダリートレーニングの導入

柴田典弘

秋田市大森山動物園

2011年4月。10年ぶりとなるキリン担当に復帰したが、飼育されていた2頭は大きな問題を抱えていた。オスのジュン18歳はメスに対する激しいネッキング行動と左前肢に過長蹄を、メスのリンリン6歳は過剰な走り回り行動、さらには見知らぬ物音に対する過敏性が非常に高い状態であった。いつ事故が起こってもおかしくないと判断し「これら問題行動」を抑制するための手法を一から追及し実践に移した。

キリンの問題行動を抑制するための手法は、当時全く技術的な情報がなかったため、問題行動そのものを引き起こさないために何をすべきかを念頭においた。また、過敏性の除去に対しては、個体の性格起因ではなく飼育管理自体が影響していると断定し、飼育上起こり得るストレスを如何にして軽減できるかを考えた。

結果、約1カ月後には過長蹄を除くすべての問題が解決。人との距離は一気に縮まり、これまでは不可能であった胸部や大腿部に直接接触れるようになる等、さらなる可能性を感じたため、2011年7月から水族館トレーナーの指導によるハズバンダリートレーニングを導入し現在に至る。

ハズバンダリートレーニングはオペラント条件付けを用い、正の強化による望ましい行動の頻度を高めることに専念。罰は一切与えないため、ストレス軽減の取り組みと並行させながらの実施が可能であった。メスにおいては想定をはるかに上回る短期間で大きく進展し、開始1カ月後には前肢の削蹄が可能となった他、5カ月後には無麻酔で頸静脈からの採血に成功するなど、物音におびえ走り回っていた事実が信じられないくらいの劇的な変化に繋がった。残念ながら、オスはトレーニング開始直前の2011年6月に歯の摩耗が起因となる消化器疾患により死亡したため、過長蹄を処置することは叶わなかったが、これまでは「できない」とされてきた無保定下による削蹄をはじめ、定期採血が可能となったことによりこの技術は全国に普及。今ではキリン飼育園の約半数である30園で実施されており、キリンの健康管理に不可欠な飼育技術として認知されてきている。

こうした取り組みを実施するにあたり一番肝心なことは、永続的なケアとして繋がっていくことである。これまで5人の職員に対し同様の管理ができるよう技術の継承を進めてきた結果、当園においては私がいつ担当を外れても問題が生じない状態となった。ハズバンダリートレーニングは「誰がやってもできる」ことが前提であり、一人の技術者だけでは将来的に何も残らないと考える。

遺伝子組換えマウスの不適切な取り扱い — 動物実験施設の対応 —

○白濱育美、HAO YIN、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

本年 7 月、当施設の洗浄室で仔マウスが発見された。発見された仔マウスが遺伝子組換えマウスであることを想定して利用者の動物実験施設の立ち入りを禁止するとともに、ジェノタイプング解析を行い、発見されたマウスが遺伝子組換えマウスであることを確定した。カルタヘナ法に基づき文科省に報告、9 月 8 日（木）に口頭による嚴重注意を受けた。洗浄室でマウス発見後の当施設の対応について報告する。

【動物実験施設での対応】

・事故発生時

マウス発見の報を受け、施設職員が直ちに捕獲した。施設全館を封鎖、他に逃亡したマウスがないことを確認した。「遺伝子組換え動物管理区域外でマウスを発見し、遺伝子組換えマウスである可能性がある」ことを担当事務部門へ連絡した。

・翌日以降

逃亡したマウスと特徴が似ているマウスを飼養している講座を確認。担当事務部門職員と共に講座関係者に聞き取り調査を行った。

並行して遺伝子組換えマウス全系統の飼養匹数調査を実施。

聞き取り調査で発見されたマウスを保有する講座を特定出来なかったため、調査対象の講座に尾片と PCR 条件、プライマー等の提出を依頼し、ジェノタイプング、シーケンス解析による系統同定を実施した。さらに、第三者機関へジェノタイプングを依頼し、発見されたマウスが遺伝子組換えマウスであることを確定し、本学動物実験委員会に報告した。

【再発防止対策】

本遺伝子組換えマウスの不適切な取り扱いに関する全学的な対応に加え、当施設では以下の対策を実施した。

- 1) 附属動物実験施設利用細目、利用マニュアルの改正。
- 2) 通常の匹数管理日誌に加え、遺伝子組換え動物管理簿を設置。
- 3) 遺伝子組換え動物管理簿が適切に記載されているかの調査。
- 4) ケージ交換方法の変更。
- 5) 上記対策に関する利用者説明会の開催。

温室効果ガス削減を目指した動物実験施設モデルの開発

○森川正喜、三好一郎

東北大学大学院医学系研究科附属動物実験施設

我が国が京都議定書の第一約束期間（2008～2012年）に排出した温室効果ガス量は、基準年である1990年と比べ8.2%減少し目標値（6.0%）を達成した。しかし、5年間の平均排出量（二酸化炭素換算）は12億7900万tで1990年を1.4%上回り、さらに、2013年は14億800万tに達しており総排出量は増加傾向にある。この状況を受け、政府は2020年度の温室効果ガス削減目標を以前の25%削減から極めて現実的な値3.8%（2005年度比）にした。

2007年の国立大学法人東北大学全体の二酸化炭素排出量は99,600 t-CO₂/年であり、動物実験施設中央飼育室は1,852 t-CO₂/年であった。2013年は大学全体が137,526 t-CO₂/年と増加したのに対し、当施設では1,758 t-CO₂/年と減少していた。この要因の一つとして、飼育ラックを陽圧型から陰圧型に変更したことが考えられる。

当施設では、2008年～2009年、当施設では、温室効果ガス削減の具体的な取り組みとして、ハード面では照明器材や冷蔵庫更新し、ソフト面では必要最小限度の点灯、帰宅時におけるOA機器の電源OFFの周知及び点検、階段の2up 3downを推奨することで、2007年の二酸化炭素排出量に対し21 t-CO₂/年以上の削減を期待した（平成20年度奥羽・東北支部合同勉強会にて報告）。結果としては、効果は見られるものの、空気調和機等の他の設備で消費されるエネルギーによる影響が大きいことがわかった。このことは、場当たりの対策では限界があり、動物実験施設の核となる設備を変えていかなければ大きな効果は期待できないことを示唆していることから、温室効果ガス削減の方針を明確にした施設モデルの考案が求められている。

我が国の国立大学法人に設置されている動物実験施設の多くは、精度と再現性の高い実験結果を担保するために飼育環境の均一化を目指して1970年代から1990年代に竣工している。そのため、近年、経年劣化に伴い「改築・改修」が求められている。しかしながら、実験動物を飼養保管しながらの「改築・改修」は容易でなく、さらに費用も高額であることからその実現は難しいのが現状である。このような状況だからこそ、「改築・改修」の機会が巡ってきた際に温室効果ガスの排出が少ない動物実験施設が竣工されるように温室効果ガス削減を目指した施設モデルの開発が必要である。

東北大・加齢研・動物実験施設の新築について — 概算要求から設計まで —

○井上吉浩、石橋 崇、工藤洋平、千葉奈津子
東北大学加齢医学研究所実験動物管理室

【はじめに】

現有施設は昭和55年3月に竣工した延べ面積757m²の4階建ての建物（本館）及び2階連絡通路で結ばれている旧医用細胞資源センター（新館；延べ面積411m²）の構成となっている。しかし、築36年が経過し、天井防水の剥破、内外壁のクラック亀裂による雨漏り等の老朽化に加えて、東日本大震災時の地震による建物自体の歪や大小のひび割れにより気密性が低下しており、安心・安全な研究施設の確保が緊急課題として改善の整備を行う必要が出てきた。そこで平成24年度概算要求（文科省：国立大学改革基盤強化促進費・施設整備事業）を行い、予算獲得に向けてスタートした。要求書類のブラッシュアップを重ねながら、当初の学内B判定からA判定へ、そして学内S判定へと昇格し、平成27年度概算要求にて事業名「加齢疾患モデル総合実験施設改修」として予算獲得に成功した。

【新営棟と改修棟】

加齢疾患モデル総合実験施設は、所内の RI 貯留槽跡地に新営棟となる動物資源実験棟（マウス・ラット）を、そして隣接の RI 棟を改修しての先端医療実験棟（現：非臨床試験推進センター（ヤギ））の2棟である。当初、新営棟と改修棟の2階を結び、新営棟はマウス・ラットの飼育を中心に、改修棟の2階は近年増えてきた慢性実験のための動物実験室として整備する予定だった。しかしながら、ヤギにおける動物実験を基にした電子医療機器開発のグローバルスタンダード化を進めるため、改修棟は非臨床試験推進センターとして新設し、GLP 及び AAALAC 認証取得を目指すことになった。そのため、新営棟と改修棟はそれぞれに独立した建物として設計を行うことになった。また、筆者が担当した新営棟（マウス・ラット）についても可能な限り AAALAC 認証を目指した設計にすることとなり、NIH 建築基準及び ILAR 指針（AAALAC 成書）を参考に検討した。

【設計にあたってのコンセプト（既存施設の弱点を踏まえた設計目標）】

1. 動物施設としてハイレベルな機能を長期にわたって維持できるような構造、設備
2. 地震等の災害に強い施設
3. 空調設備等のメンテナンス、ランニングコストおよび光熱費の低減と省エネ化
4. 温度・湿度の制御（湿度もコントロール）および環境保全対策（臭気）
5. 感染事故予防上、微生物コントロールしやすい飼育設備と衛生設備の設置および動線化
6. 新営施設への動物導入は、規定微生物フリーで新規搬入し、高度 SPF 化
7. 遺伝子組換え動物規制法に対応しやすいレイアウトと拡散防止措置
8. 飼育管理の負担軽減化（自動給水方式等）
9. アレルギー対策（動物だけでなく人にも優しい環境の実現）

10. 飼育スペースの確保（充実）、セキュリティの強化

11. 国際実験動物管理公認協会（AAALAC International）認証基準を可能な限り満たす

【設計と予算との兼合い】

新営棟は、敷地面積 312m²（17m×18m）、延べ面積 1,195m²（R4）のほぼ正方形のユニークな動物施設が建てられる予定である。交付された予算には限りがあるため、理想通りの要望した設計が実現できなかったところが多少なりあるものの、今後数十年の耐用を見据えた国内の動物実験施設では稀な免振構造の建物ができる。現在、着々と建設工事が進められている。

床敷とケージ内環境（アンモニア濃度）について ～動物福祉と経済効率を両立させるために～

○小畑孝弘、小松幸恵、場崎恵太、矢野愛美、福田康義、関 信輔、西島和俊

秋田大学バイオサイエンス教育・研究サポートセンター動物実験部門

【背景と目的】動物実験施設では動物福祉の観点から動物を快適な環境にて飼養することが求められる。一方、動物福祉を損なわない範囲で無駄をなくして経費削減をすすめていくことも大切である。快適な飼育環境を維持するための管理の一つに適正な頻度のケージ交換がある。当施設ではマウスにとって快適な環境の維持のため、週に1回の割合でケージ交換を行ってきた。しかし、もし、ケージ交換の頻度が週に1回以下でも問題ないことが明らかとなれば、経費削減や作業時間の短縮が可能となり、ケージ交換作業自体のマウスに与えるストレスも軽減することができる。一方、ケージ交換が週に1回でも不足している可能性もある。床敷の質、量および飼育動物数の適正化を検討することにより、動物福祉を向上させることで、より信頼性の高い動物実験結果がもたらされると考えられる。

ケージ交換の間隔を決める指標になると思われるアンモニア濃度の基準は、飼育室全体のアンモニア濃度（20 ppm 以下）について記載があるのみで、飼育ケージ内の基準は定められていない。さらに、この基準は作業員への影響の観点から設定されたものであり、飼育動物の福祉の観点や、動物に与える影響について考えられたものではない。そこで、当施設で従来より使用している木製フレック状の床敷とアンモニア濃度を抑える効果があるといわれる木製立方体型の床敷を用い、アンモニア濃度を調べることでケージ交換が適正な頻度を検討することとした。

【材料と方法】① 両床敷の24時間後の吸水量を求め、マウスの排尿量を元に床敷の重量を決定した。ただコストをほぼ同じにするために多かったほうに合わせている。ただB社製の床敷は2週間飼育するので2倍量とした。

②1 ケージ（サイズ/225×338×140mm）に4匹のICR雌マウスを飼育した。餌はCE-2(日本クリア製)、水は滅菌水を自由摂取させた。それぞれの期間飼育した後にケージの重量を測定し、GASTEC社製のアンモニアNo. 3Lガス検知管（検知範囲 0.5～78ppm）を用いてケージ内のアンモニア濃度を測定した。測定箇所は3点（マウスの目の高さを基準に 中央部・糞便近く・糞便からはずれた）とした。統計解析は、SPSSを用いて（検定名1元配置の分散分析と多重比較）を行った。

【結果と考察】2週間ケージ交換をしない場合でもマウスの体表が著しく汚れることはなかった。アンモニア濃度は、糞便近くは測定範囲外（78ppm以上）であることもあったため、残り2点で解析することとした。木製フレック状（7日後）と木製立方体型床敷（14日後）のアンモニア濃度において有意差はなかった。

しかし、アンモニア濃度はケージ内の場所によっても数値のバラつきが大きく、信頼性のある測定を行うのは容易でなかった。従って、動物にとって安全・有害の閾値を決めるのはさらに困難で、アンモニア濃度に加え、マウスの生理・行動の視点から、ケージ交換の頻度を定めることが適当であると思われた。

個別換気ケージにおけるマウス飼育環境の検討

○田中大資、須藤まゆみ、尾崎順子、伊藤恒賢

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

【背景と目的】 個別換気ケージシステムは、ケージ間の相互微生物感染を防止できる優れた実験動物飼育システムであるが、ケージ内の環境がどの程度動物に影響を及ぼすかは不明である。今回私たちは、マウスの飼育環境富化のために、種々の床敷を用いて個別換気ケージ内の環境を測定し、マウスに影響を及ぼす環境をアンモニア濃度、粉塵数および生菌数の観点から検討したので報告する。

【材料と方法】 飼育装置はマウス用ベントラックシステム（米国アレンタウン社製）で、7列8段の両面で112ケージ収容できるタイプを用いた。実験群は当センターで採用している床敷のTEK-FRESH（A社製、A群）、代替候補のALPHA-dri+Plus（B社製、B群）およびAspen Bedding（C社製、C群）を40gずつ、別々のマイクロバリアケージ（W196×D306×H166mm）に入れ、計3群を設定した。5週齢の雄C57BL/6Jclマウス15匹を体重測定し、5匹ずつに分けてケージに収容した。2週間おきにアンモニア濃度と粉塵数を測定し、ケージと床敷を交換した。さらに5-7週齢と17-20週齢では、詳細なデータを得るために、週2回の測定を行った。また、7週齢時に2週間使用した床敷と20週齢時に3週間使用した床敷を用い、生菌数を測定した。体重は1週間おきに測定した。アンモニア濃度と粉塵数の測定には、それぞれアンモニア検知管（ガステック社製）とパーティクルカウンター（LIGHTHOUSE社製）を用いた。ラックからケージを取り出し1分間放置後、シールドバルブ挿入口から測定装置の先端を挿入し、高さ60mmの地点で測定した。生菌数の測定には、ペトリフィルム培地生菌数測定用ACプレート（スリーエムジャパン社製）を用いた。使用後のケージに滅菌水を1ℓ入れ攪拌し、30分間静置した。懸濁液を段階希釈して、希釈液1mlをACプレートに塗布し、35℃で48時間培養した。コロニーの数をカウントし、ケージ内の生菌数を求めた。

【結果】 アンモニア濃度はB群では全週齢で5ppm以下と低濃度であったが、A群では7週齢と9週齢でそれぞれ140ppmおよび80ppm、C群では7週齢と19週齢でそれぞれ187ppmおよび40ppmと高濃度を示した。粉塵数は11週齢ではC群、20週齢ではA群がほかの群よりも多かった。生菌数は7週齢と20週齢のどちらにおいても、A群、B群、C群の順に少なかった。体重は全群に差異を認めなかった。これらの結果を受け、一部の飼育室において、A群の床敷からB群の床敷に切替え、経過を観察しているところである。

個別換気ケージにおける ICR マウスの哺育ケージ内環境

○伊藤恒賢、田中大資、須藤まゆみ、尾崎順子

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

【背景と目的】 当センターでは殆どのマウスの飼育に個別換気ケージ (IVC) システムを導入して 2 年以上を経過する。それ以前にも IVC システムを数カ所の飼育室で使用し、木製床敷を 1 週間に 1 度の間隔で交換していた。しかし、全面的に本システムを導入したことから、紙製床敷を 2 週間に 1 度の頻度で交換する方式に変更したところ、雌マウスの膈内膿瘍個体の増加や哺育仔の低成長を経験している。IVC システムはケージ間の相互微生物感染を防止できる優れた実験動物飼育システムであるが、ケージ内の詳細な環境については不明な点が多い。そこで今回私たちは、特に哺育期間中のマウス環境富化を目的として個別換気ケージ内の環境を測定したので報告する。

【材料と方法】 環境の測定項目はケージ内のアンモニア濃度、粉塵量および一般生菌数とした。測定方法は共同研究者の報告の通りである。群の構成は、当センターが採用している床敷の TEK-FRESH (A 社製) 40g を使用した群を対照群とし (T-40 群、n=4)、ALPHA-dri+Plus (B 社製) を 40g (A-40 群、n=3)、50g (A-50 群、n=3) および 60g (A-60 群、n=3) 使用した群の計 4 群を 1 シリーズとし、床敷交換頻度の異なる 2 つのシリーズで測定した。測定期間は 4 週間とし、マイクロバリアケージ (W196×D306×H166mm) に雌性 Jcl:ICR を個別飼育した環境の下、妊娠 14 日目から 2 週間 (X 期間) でケージを交換後にさらに 2 週間 (Y 期間) の計 4 週間の観察したシリーズを実験 1 とし、同様の開始から 4 週間 (Z 期間) 何も床敷を交換しないシリーズを実験 2 とした。アンモニア濃度と粉塵量は 2 週間に 5 回の割合で測定し、実験終了時には各群のケージ内一般生菌数を測定した。各群の哺育仔数は産仔数の影響を考慮して 12 匹に調整した。

【結果】 実験 1 において、X 期間では分娩を境に全ての群のアンモニア濃度が上昇し、14 日目には 60~139ppm であった。Y 期間ではケージ交換 4 日目で 89~170ppm と短期間にアンモニア濃度の上昇が顕著となり、14 日目には 4 群とも 200ppm に達した。4 週間の実験期間中に 1 度もケージを交換しなかった実験 2 と 2 週間毎に交換した実験 1 の結果を比較したところ、アンモニア濃度の差異を認めなかった。この結果は、哺育期間中のアンモニア濃度は床敷材の種類や量の違い、またはケージ交換の頻度などよりも、哺育すること自体がアンモニア濃度の上昇に影響を与えていると推察された。粉塵量は、T-40 群でケージ交換時に直径 0.5-5.0 μm の粉塵量が増大し、A-50 群で分娩前後や離乳時期に 1.0-10.0 μm の粉塵が増加が認められ、床敷の違いによる特徴が観察された。一般生菌数では、全ての群にケージ当たり 4~5 $\times 10^9$ 個の一般生菌が検出され、育成期の C57BL/6 マウスを用いた実験 (本交流大会で報告) の結果に比較して約 1000 倍以上の値を認めた。実験終了後に離乳したマウスの体重を測定した結果、T-40 群の乳仔に体重の増加傾向を認めた。

納豆菌芽胞を用いた Tyzzer 菌消毒効果の評価

○矢野愛美、福田康義、小畑孝弘、小松幸恵、場崎恵太、関 信輔、西島和俊
秋田大学バイオサイエンス教育・研究サポートセンター動物実験部門

【背景】 Tyzzer 菌 (*Clostridium piliforme*) は微生物カテゴリーCにランクされる病原菌で、芽胞を形成して環境中に長期間維持される上、アルコール等一般的な消毒薬は効果を示さないため、消毒が困難である。

当施設では5月に行った微生物モニタリング検査において、コンベンショナル区域にあるげっ歯類再搬入室のモニター動物が Tyzzer 菌陽性であることが発覚した。その後、確認検査と感染領域特定のため、モニライザを使用して同区域の飼育室を検査したところ、げっ歯類再搬入室およびクリーンウサギ飼育室が陽性となった。そこで、げっ歯類再搬入室とラット・ウサギの実験で使用している2実験室についてミンケアとエクスポアーを使用して消毒を行った。しかし、芽胞は高い耐久性を持つために十分に消毒されているか、消毒効果に疑問が残る。そこで、Tyzzer 菌と同じく芽胞を形成する納豆菌 (*Bacillus subtilis*) の芽胞に対する効果を指標に、消毒効率を評価することとした。

【材料と方法】 納豆菌を普通寒天培地にて24時間培養後、集菌してPBSに懸濁し37°Cで48時間培養したものを遠心分離により回収し、2006年より-20°Cで保存していた納豆菌芽胞を使用した。3.5 cm ディッシュの裏側にマーカーで印をつけ、その部分に滅菌済み綿棒で納豆菌芽胞を塗布し、乾かしたものを芽胞サンプルとした。燻蒸により消毒薬が到達する位置に芽胞サンプルを配置し、消毒作業後ディッシュを回収した。ディッシュの納豆菌芽胞を塗布した部分に滅菌済み生理食塩水をたらし、懸濁液を回収してSCD寒天培地に播種した。SCD寒天培地を18時間培養し、形成されたコロニー数をカウントした。

【結果と考察】 凍結保存していた未消毒納豆菌芽胞をSCD寒天培地に播種したところ、問題なく発育しコロニーを形成したため、これを芽胞サンプルとして性能評価試験に使用することとした。

ミンケアによる消毒を行った大実験室1と大実験室2ではそれぞれの14サンプル全てにおいて納豆菌のコロニーは確認されなかった。一方、最初に感染が発覚したげっ歯類再搬入室のミンケアによる消毒では9サンプル(箇所)のうち4サンプルに納豆菌のコロニーが確認された。そこで、再度エクスポアーでげっ歯類再搬入室の消毒を行ったところ、9サンプル中8サンプルにおいて納豆菌のコロニーが確認された。さらに、3回目のミンケアによる消毒をげっ歯類再搬入室で行ったところ9サンプル全てで納豆菌のコロニーは観察されなかった。

げっ歯類再搬入室の1回目の消毒では、未消毒時に比べて数は遥かに少ないが、納豆菌コロニーが確認されたため、消毒が不十分であったと考えられる。げっ歯類再搬入室の2回目の消毒では1回目の消毒よりもサンプルの納豆菌のコロニー数が多く、ほぼ消毒されなかったと考えられる。大実験室1と大実験室2、げっ歯類再搬入室の3回目の消毒後は納豆菌が発育しなかったため、十分に消毒されたと考えられる。

以上のことから、消毒の操作によりその効率は大きく異なることが明らかとなり、芽胞形成菌に対する消毒効率評価に納豆菌の芽胞を使用することは有用であると考えられた。

「秋田大学におけるティザー菌感染事故への対応」

○福田康義、矢野愛美、小松幸恵、場崎恵太、小畑孝弘、関信輔、西島和俊
秋田大学バイオサイエンス教育・研究サポートセンター動物実験部門

【はじめに】

実験動物中央研究所（ICLAS）に委託した 2016 年 5 月の微生物検査において、げっ歯類再搬入室（コンベンショナル区域内）で飼育中のラット（2 匹/2 匹）で抗 *Clostridium piliforme*（ティザー菌）抗体陽性反応が出た。ティザー菌は、ICLAS 微生物カテゴリー C であり、正常免疫機能を有する動物では臨床症状や病変はみられない。そのため、コンベンショナル区域で本菌が検出された場合、飼育動物を全淘汰するか否かの判断が難しい。しかし、秋田大学動物実験部門は一方通行の構造になっておらず、げっ歯類再搬入室の利用者と SPF およびクリーン区域の利用者が交差するため、ティザー菌が他の区域へ拡散する可能性が高かった。そこで、当部門ではげっ歯類再搬入室で飼育中の動物の全淘汰および除菌作業を行った。今回の発表では、当部門で行ったティザー菌の感染への対応および想定された感染経路について報告する。

【経過】

げっ歯類再搬入室はコンベンショナル区域の最も奥に位置するが、ここで飼育されていたラットを用いた実験は区域内の入り口付近の実験室で行うため、区域全域が汚染されていると推察された。そのため、ICLAS の検査結果を受けて直ちに、コンベンショナル区域全域を対象に物理的封じ込め（ガウン・マスク・帽子・手袋・長靴の着用）を行った。また、げっ歯類再搬入室の利用者の中には、動線を逆行してクリーン区域内のラット飼育室を利用する者もいた。そのため、クリーン区域にも感染が拡大している可能性が高く、クリーン区域の飼育ラットおよびコンベンショナル区域の飼育ラットおよびウサギから採血を行い、ICLAS で抗ティザー菌抗体検査を受けた。その結果、クリーン区域のラット飼育室およびコンベンショナル区域のラット、ウサギから抗ティザー菌抗体陽性反応が出た。これを受け、げっ歯類再搬入室については、直ちに飼育ラットを全淘汰し、除菌作業を行った。微生物学的検査により除菌効果が確認されたため、げっ歯類再搬入室の利用を再開すると同時に全利用者へ除菌完了の報告を行った。ウサギについては、当部門の微生物モニタリング項目にティザー菌は含まれていなかったため、淘汰は行わなかった。クリーン区域ではティザー菌陽性が確認されたラット 1 個体を淘汰したが、それ以外の飼育ラットについては繰り返し検査を行った結果、陰性であったため淘汰しなかった。

【ティザー菌感染の原因】

この度の汚染事故の正確な原因は特定できなかったが、コンベンショナル区域ではげっ歯類再搬入室のラットおよび畜産農家から搬入したウサギを用いた実験を同一実験室で行っているため、この両者間でティザー菌の感染が伝播したと推察された。そのため、再発防止策としてラットおよびウサギ専用の実験室を指定した。今回のティザー菌の感染事故を受け、利用者に対して動線の厳守を促し、コンベンショナル区域外へ汚染を拡散させないように物理的封じ込めを継続して行うこととした。

マウスにおける三種混合麻酔薬の反復投与による血液学的検討

○鈴木崇斗、遊佐寿恵、小澤和典、関口美穂
福島県立医科大学医学部附属実験動物研究施設

【背景・目的】動物実験の実施には、国際3原則の1つである「苦痛の軽減」が必須項目である。苦痛の軽減のために用いられてきた麻酔薬のうち、エーテルは動物の粘膜への刺激性があること、ペントバルビタールは単独の使用で鎮痛効果がないことなど、麻酔薬として使用が推奨されなくなったものがある。近年、安全域の広い三種混合麻酔薬が動物実験の実施に推奨されている。本学においても三種混合麻酔薬を推奨している。三種混合麻酔薬を、腹腔内投与した場合にはグルコース(GLU)と無機リン(IP)の上昇が報告され、皮下投与では、GLU、IP、クレアチニンキナーゼ(CK)、カリウム(K)の上昇が報告されている。手術や薬物投与などの麻酔下で実験を行う場合には、麻酔薬が繰り返し使用されることがある。しかし、三種混合麻酔薬の反復投与による、マウスの血液学的性状への影響についての詳細な検討はない。本研究の目的は、三種混合麻酔薬の反復投与が、マウスの血液学的性状に影響を与えるか否か検討することである。

【方法】供試動物は、10週齢のICR雄マウス(n=10)を用いた。実験系は、三種混合麻酔薬(MMB)群とコントロール群の2群(各群:5匹)を設定した。三種混合麻酔薬は、塩酸メedetミジン 0.3ml、ミダゾラム 0.8ml、酒石酸ブトルファノール 1.0ml を滅菌生理食塩水を 7.9ml 加えて、計 10ml に調整した。マウスの体重 10g あたり 0.1ml の割合で、腹腔内に投与した。また、コントロール群には、滅菌生理食塩水を投与した。評価項目として、体重、バイタルサイン(血圧、心拍数)、麻酔スコア、麻酔時間、横臥位時間を測定し、血液生化学検査(GLU、IP、Ca、LD、CK、Na、K、Cl)を行った。測定には、非観血式自動血圧測定装置(BP-98A)と生化学分析装置(FDC7000V)を用いた。バイタルサインと麻酔効果の測定は、麻酔薬投与後に、経時的に行い、頻度は毎週2回で、期間は3週間の計6回測定した。また、採血は両群ともに、実験開始21日目に、三種混合麻酔薬または滅菌生理食塩水を投与後、1時間後に3%イソフルラン吸入麻酔下で、速やかに開腹し、後大静脈より実施した。統計学的解析はSPSS Statistics ver.24を用いて、二元配置分散分析とt検定を行った。P値が0.05以下を有意差ありとした。

【結果】MMB群の心拍数は、麻酔投与回数に関係なく、麻酔投与10分後に、心拍数が低下した。また、血圧の収縮期は、麻酔投与回数に関係なく、麻酔薬投与後の血圧の低下が認められた。麻酔効果の比較では、麻酔薬投与1回目と比較して、麻酔スコア、麻酔時間、横臥位時間に有意な差はなかった。血液生化学測定では、コントロール群と比較して、MMB群のGLU、IP、Ca、LD、およびKが有意に高値であった(p<0.05)。また、MMB群のNaとClにおいては、コントロール群と比較して有意に低下した(p<0.05)。

【考察】本研究の結果から、三種混合麻酔薬の投与回数に関係なく、バイタルサインと麻酔効果に与える影響はないことが明らかになった。即ち、マウスが三種混合麻酔薬に対して、耐性を獲得することがなかったということが示唆される。また、三種混合麻酔薬の反復投与は、血液生化学に影響を及ぼすことが明らかになった。三種混合麻酔薬の腹腔内単回投与で、GLUやIPが高

値になるという報告があることから、今後、ICR マウスを用いて、三種混合麻酔薬の単回投与と反復投与を比較し、さらに検討を進める予定である。

生体モニタを使ったウサギに対する3種混合麻酔薬の評価

○福田直樹、伊藤恒賢

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

【背景と目的】近年、3種混合麻酔薬（メドトミジン、ミダゾラム、ブトルファノール）が考案され、マウスやラットに対して有効な麻酔薬として報告されている。しかし、ウサギへの3種混合麻酔薬の投与による麻酔効果についての報告は少ない。当センターでは、主にブタとウサギの麻酔状態の確認のため、中動物用モニタを購入した。今回、ウサギに比較的低容量の3種混合麻酔薬を3つの投与経路から投与し、その麻酔効果を、生体モニタを使用し観察した。

【材料と方法】動物は、日本白色種（JW）ウサギ（4～5ヶ月齢、雄）を用いた。薬剤は、鎮静薬 Medetomidine (Med, ドルベネ, 共立製薬)、Midazolam (Mid, ドルミカム, アステラス製薬)、非麻酔性鎮痛薬 Butorphanol (But, ベトルファール, Meiji Seika ファルマ) の3種混合麻酔薬 (Med/Mid/But) を用いた。各薬剤の投与濃度は、Med を 0.075mg/0.075ml/kg、Mid を 1mg/0.2ml/kg、But を 1.25mg/0.25ml/kg とした。麻酔薬の投与経路は、耳介静脈からの投与 (i.v.)、臀部筋肉内投与 (i.m.)、背部皮下投与 (s.c.) の3通りを使用した。動物は4匹を使用し、各個体に3つの投与経路から麻酔薬を投与した。1度の麻酔薬投与から次の麻酔薬投与までの間隔は、制限給餌食 120g を完食するまでとした。麻酔投与後、動物は保温マット (30℃設定) の上で、側臥位の状態にした。生体情報は、動物用モニタ BSM-3592 (日本光電) を使用し、血圧、脈拍数、SpO₂、呼吸数及び直腸温を同時に測定した。また痛覚の指標として、正位反射の他、麻酔後10分置きに、耳介反射、後肢の引き込み反射、jaw tone を観察した。測定は、正位反射が回復した時点で終了した。

【結果と考察】痛覚は、いずれの投与経路から投与した場合も、10分後に全ての個体から痛覚を消失させることは難しく、また投与50分後には痛覚スコアが1以下となった。脈拍数については、i.v.とi.m.が投与直後に減少するのに対し、s.c.は10分程度かけて、同程度まで減少した。平均血圧は、全ての投与方法で、測定終了時まで減少傾向が続いた。SpO₂は、投与前はi.m.とs.c.では、徐々に減少するのに対し、i.v.は急激に減少し、投与約30分後に最低値を示した後、徐々に回復する傾向があった。呼吸回数は、いずれの投与経路も投与後徐々に低下し、20分後から測定終了時まで安定した値で推移した。直腸温は、どの投与方法も徐々に低下した。今回投与した麻酔量は、全ての痛覚を消失する程度の深い麻酔状態を30分間程度維持することは難しいが、安静な状態を維持出来ることが分かった。3種混合麻酔薬の投与方法については、i.v.の場合、速やかに麻酔状態を得ることが出来るが、SpO₂が急激に減少することから、投与の際は慎重に行う必要がある。短時間で終了できる簡単な手術であれば、3種混合麻酔薬と局所麻酔薬を組み合わせることで可能であるかもしれないが、皮膚と筋層の剥離の際にも反応があるため、利用には慎重な対応が必要である。

発生工学支援業務の導入と今後の課題

○深澤貴史、若井 淳、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

【背景と目的】

2013年時点で当施設で飼育していたマウスは、その80%が遺伝子組み換え動物であった。中には繁殖能力に問題があり、継代していく上で常にリスクを伴う系統もあり、以前から一部の利用者からバックアップの為に凍結胚の作製希望があった。

ただし一部の利用者からの要望であり、実際にはどれだけの需要があるのか分からなかった為、遺伝子組み換え動物を保有する講座を主な対象とした需要調査を行った。

その結果、遺伝子組み換え動物を保有している講座の内、少なくとも約7割が凍結胚の作製を希望している事が分かった。また「将来的に遺伝子組み換え動物を凍結胚で購入したい」「必要になった際に対応してもらえると助かる」といった意見もあり、発生工学支援の需要は高いと判断した。

【業務の立ち上げ】

技術の習得には、理化学研究所バイオリソースセンターで開催された技術研修に参加し、器具の作製や培養液の調製といった事前準備から、胚の凍結保存や胚移植まで一連の作業を教わった。

2013年11月から試行期間を設け、無償で行う事を条件に複数の講座から多数の系統の凍結胚作製の依頼を受け、より多くの経験を積み、正式な業務として導入する事を想定した上での問題点の改善や規約の作成等に役立てる事が出来た。

2014年4月に利用規約の原案を運営委員会に提出し、審査及び修正を経て、2014年9月より正式に発生工学支援業務を開始した。

【支援業務導入の結果】

講座の中には、将来的に実験に使用する可能性があるという理由で最低限の数ではあるが、継代を繰り返しているだけの系統を保有している所もあった。凍結胚の作製が可能となつてからは、空いたスペースや継代にかかっていた時間を利用して新しい研究を始める等、研究施設としてプラスとなる兆候がみられている。

【現状と今後の課題】

現在、当施設でも少数ではあるが凍結精子の利用の要望が出始めている。既に他大学から凍結精子を購入した利用者もおり、凍結精子利用の為に規約作成など基盤作りを急いでいる。また、微生物学的クリーニングへの応用も考えており、業務の拡大と共に技術を習得する人員の育成が早急に解決すべき課題となっている。

凍結融解過程における抗酸化酵素であるカタラーゼが ウサギ精子の生存性に与える影響

○場崎恵太、小松幸恵、福田康義、矢野愛美、小畑孝弘、
松田幸久、関 信輔、西島和俊

秋田大学バイオサイエンス教育・研究サポートセンター動物実験部門

凍結精子および卵は半永久的に保存できるため、系統保存に幅広く使用されている。ウサギは、射出精子の採取が容易であり、人工授精が可能なことから、精子凍結による系統保存が効率的である。しかし、ウサギ精子の凍結融解後の生存率は低く、改善が望まれる。

精子の凍結融解後の生存性に影響を与える要因の一つとして活性酸素種（ROS）がある。ROSは、精子のクロマチン凝縮に関与しており、精原細胞の増殖やアポトーシスを誘発することで生殖細胞数を調節している。また、成熟期の精子においてROSは、受精能や先体反応、ミトコンドリア鞘の安定性、運動率において重要な役割を担う。一方、過剰なROS産生は精子細胞膜の不飽和脂肪酸に対して過酸化現象を引き起こし、フリーラジカルによる脂質過酸化反応により膜統合性を変化することで、DNA損傷や細胞アポトーシスを誘起する。

射出精液の精漿中には抗酸化酵素が豊富に含まれ、精子への酸化ストレスを軽減している。しかし、精子の凍結過程において、微生物除去を目的として射出精液から精漿が分離・除去される場合がある。また、凍結融解過程においてROS産生値が上昇するため、精子に酸化ストレスが加わり、融解後の運動率や生存率を低下させると考えられる。そこで、本研究では、凍結過程で精漿を除去した精子に抗酸化物質の一つであるカタラーゼを添加することで、凍結融解後の精子生存率が改善されるかを調査した。

1回の実験で使用する精液はJWウサギ秋田品種7匹よりランダムに採取した。同一個体からの採精は1週間以上の期間を空け、計5回の凍結操作を実施した。精漿を除去するために、射出精液にTCG緩衝液を加え、遠心分離した。沈殿した精子は、精子数および精子運動率を測定後、運動精子数を 600×10^6 個/mLとなるようにTCG緩衝液で調整した。調整した精子懸濁液をカタラーゼ（c1345、Sigma、2000-5000 units / mg）の至適濃度を調査するために5群に分けた。各濃度のカタラーゼ（0 $\mu\text{g/mL}$ 、70 $\mu\text{g/mL}$ 、140 $\mu\text{g/mL}$ 、210 $\mu\text{g/mL}$ 、280 $\mu\text{g/mL}$ ）を添加した大豆由来Lechtin HEPES extender（SLH）で希釈後、冷却速度 $-0.2^\circ\text{C}/\text{分}$ で、 25°C から 4°C まで冷却した。精液をストローに充填し、 4°C に30分、液体窒素蒸気中に15分間静置後、液体窒素中に浸漬した。凍結後1週間で凍結精子ストローを 50°C の恒温槽に10秒間浸漬することで融解し、精子数および精子運動率を測定した。

カタラーゼ0 $\mu\text{g/mL}$ において、凍結融解後の運動精子数は平均 44×10^6 個/mL、精子運動率が平均31%であった。他方、カタラーゼ70 $\mu\text{g/mL}$ 添加群で 63×10^6 個/mL（42%）、140 $\mu\text{g/mL}$ で 63×10^6 個/mL（40%）、210 $\mu\text{g/mL}$ で 59×10^6 個/mL（32%）、280 $\mu\text{g/mL}$ で 39×10^6 個/mLであった。カタラーゼ70および140 $\mu\text{g/mL}$ 添加群において凍結融解後の精子運動率が高く、とくに70 $\mu\text{g/mL}$ 添加で0 $\mu\text{g/mL}$ に比べ運動率が有意に高かった。また、210 $\mu\text{g/mL}$ では0 $\mu\text{g/mL}$ に比べ運動率は低い傾向がみられた。

以上の結果より、凍結保存液 SLH へのカタラーゼ 70 μ g/mL 添加が、凍結融解過程における精子運動率の低下を有意に抑制することを明らかにした。また、カタラーゼは、活性酸素種の一つである過酸化水素を分解する酵素であることから、凍結融解における運動率低下の要因の一つとして、過酸化水素が考えられた。

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/>