

# 動物実験施設における 動物実験施設における感染動物の清浄化業務

今度匡祐

岐阜大学生命科学総合研究支援センター動物実験分野

当動物実験分野では岐阜大学の共同利用施設である大型の動物実験施設を管理しており、実験動物を衛生的な環境下で飼育している。検疫結果は実験動物の微生物学的な清浄度をはかる重要な指標であり、当施設では他施設から新規に導入される動物を対象とした導入時検疫と、既に収容されている動物を対象とした定期検疫を実施している。これらの検疫において当施設で指定している病原体が検出された場合、利用者の要請に応じて感染動物の清浄化を実施している。清浄化には帝王切開と体外受精の2つの方法を用いており、いずれの方法をとるかは利用者との相談の上で決定している。

**Key words** : 動物実験施設, クリーンアップ

## 1. はじめに

動物実験において、感染症対策が必要となる主な理由は、獣共通感染症の予防のほか、実験の再現性の確保、動物福祉が挙げられる。動物実験の実施者や施設職員の健康を脅かす人獣共通感染症の予防は言う間でも無く、病原体に感染した動物は、それが平常時には不顕性のものであっても、実験によるストレスで発症するなど、実験の結果に影響を与えることが懸念される。また、動物福祉の観点からも、実験処置以外の不要な苦痛を与えないことが求められており、動物実験施設においては、これらの病原体を徹底的に排除し、感染を予防するといった清浄性の維持が必要となる。

当動物実験分野でも寄生虫、ウイルス、細菌などの病原体を排除するため、他施設から新規に導入される

動物を対象とした導入時検疫、および施設内で飼育されている動物に対する年4回の定期検疫を実施し、その清浄性の指標としている。また、動物から病原体が検出された際には、帝王切開や体外授精を無菌的に行うことで動物の清浄化を行っている(図-1)。

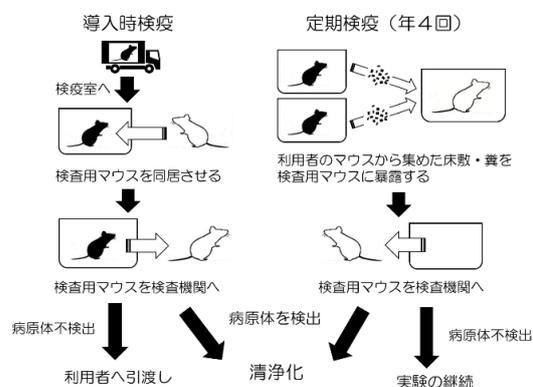


図-1 検疫方法

当動物実験分野では、2005年9月からこれまでに、系統数にして238件の導入時検疫を実施してきたが、約28%にあたる66件で陽性項目が認められ、隔離と清浄化の対象となっている。一般に、動物実験施設において病原体への感染が明らかとなった場合、感染動物の隔離を行い、病原体の特徴に応じて速やかに施設内からの排除を行う。施設内からの排除の方法としては、感染動物の淘汰の外、投薬、帝王切開、体外受精などが挙げられる。投薬は実験に対する薬物の影響が懸念されるほか、病原体の完全な排除が困難であるため、当施設では帝王切開と体外受精をマウスの清浄化方法として用いている。

## 2. 帝王切開

帝王切開による清浄化では、妊娠した感染マウスに対し、帝王切開を無菌的に行うことで、無菌状態の仔マウスを摘出。その仔を清浄性の確認された仮親に育成させることで、系統の清浄性を確保する。

清浄化作業では、帝王切開と体外受精のいずれの方法でも、感染動物飼育室と清浄な手術室のそれぞれにスタッフを一人ずつ配置して実施している。

まず、感染動物飼育室内で妊娠19日目の感染動物を頸椎脱臼にて安楽死させる。その後、同室内に設置された安全キャビネットが無菌的に帝王切開を行い、胎児を摘出する。取り出した胎児は容器に収容し、容器表面を殺菌した後、清浄な手術室のスタッフへ引き渡す。手術室では、胎児を蘇生させた後、仮親のケージから回収した仮親の仔と尿の付いた床敷きで匂い付けを行い、仮親へ里子付けする。その後は仮親と共にアイソレーター内で飼育を行い、離乳が確認された後、仮親を微生物検査へ発送する。

## 3. 体外受精

体外受精による清浄化では、感染マウスから精子と未受精卵を無菌的に採取し、清浄環境下にて受精させ、得られた受精卵を清浄性の確認された偽妊娠マウス

へ移植する。

作業は帝王切開と同様に感染動物飼育室と清浄な手術室それぞれに一人ずつスタッフを配置して行う。

まず、感染動物飼育室内で感染動物のオスまたはメスを安楽死させ、安全キャビネット内でオスからは精巢上体を、メスからは卵管を無菌的に採取する。採取した精巢上体や卵管は、容器へ収容し、容器表面を殺菌してから手術室へ引き渡す。手術室では、精巢上体から精子を採取し、CO<sub>2</sub> インキュベーター内で1時間の前培養を行う。前培養の間、卵管からは未受精卵を採取し、前培養終了後に媒精を行い、一晩CO<sub>2</sub> インキュベーター内で培養する。翌日の朝、2細胞期まで発生が進んだ受精卵を選別・洗浄し、事前に用意した清浄な偽妊娠メスへの移植を行う。

## 4. 作業日程

清浄化作業は交尾/妊娠/出産など、動物の生理的状态に依存する部分が多く、日程に融通が利かない場合が多い。当施設では、すべての作業を平日の業務時間内に収めるため、清浄化作業は原則として週に1回、1回の作業で2系統までとして、日程の調整を行っている。

また、帝王切開と体外受精では作業の日程も大きく異なり、帝王切開では4週間単位、体外受精では1週間単位での日程の確保が必要となる。

帝王切開では、木曜の15時にオスとメスを同居させ、翌日金曜日の朝に交尾確認を行う。その後、妊娠17日目と18日目の14時に帝王切開前の出産を抑制するルテウムを皮下投与。妊娠19日目の午前中に帝王切開と里子付けを行い、離乳までビニールアイソレーター内で飼育する。

週数	月	火	水	木	金
1				・メスとオスを同居	・交尾確認
2	妊娠3日目	妊娠4日目	妊娠5日目	妊娠6日目	妊娠7日目
3	妊娠10日目	妊娠11日目	妊娠12日目	妊娠13日目	妊娠14日目
4	妊娠17日目 【出産抑制】 ・ルテウム投与	妊娠18日目 【出産抑制】 ・ルテウム投与	妊娠19日目 【手術】 ・胎児の摘出 ・里子付け		

図－2 帝王切開日程

体外受精では、採卵の事前準備として過排卵処理を施す。過排卵処理は月曜16時にPMSG(妊馬血清性腺刺激ホルモン)を、水曜16時にhCG(ヒト柔毛性性腺刺激ホルモン)を投与。木曜の午前中に採卵/採精を行い、正午頃に媒精、CO<sub>2</sub> インキュベーター内で翌日まで培養する。金曜は午前中に卵の発生状況の確認をした後、卵の洗浄と偽妊娠雌への移植を行う。移植後はビニールアイソレーター内で飼育し、出産/離乳を確認した後、微生物検査を行う。

週数	月	火	水	木	金
1	【過排卵処理】 ・PMSG投与		【過排卵処理】 ・hCG投与	【手術1日目】 ・採精 ・採卵 ・媒精 ・培養	【手術2日目】 ・卵の選別/洗浄 ・移植

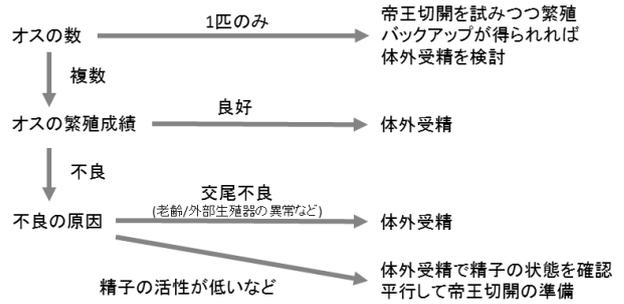
図－3 体外受精日程

### 5. 各手法の特徴と使い分け

当施設では帝王切開と体外受精の2つの手法を動物の清浄化に用いている。両手法とも、感染動物から清浄な仔を得るという目的は共通しているものの、それぞれに長短があるため(図－4)、感染動物の系統的特徴や状態、感染している微生物などを考慮の上、事前に依頼者との相談を行い、どちらの手法を用いるか決定している(図－5)。

帝王切開	体外受精
必要な動物数が少ない	必要な動物数が多い
オスを消費しない	使用個体は全て消費する
自然繁殖しない系統には使用できない	繁殖不良の個体からも産仔を得られる可能性がある
操作手順が少ない	操作手順/準備が多い
4週間単位での計画が必要	1週間単位で計画

図－4 帝王切開と体外受精の特徴



図－5 清浄化手法決定の例

### 6. 清浄化の実施状況

当施設ではこれまでに寄生虫6種、細菌4種、ウイルス1種について清浄化を行ってきた。

以前は作業上の都合から、主に帝王切開を用いていたが、2016年度より体外受精を本格的に組み込んでおり、2016年度から現在までの清浄化業務における各手法の採用件数は、帝王切開9件、体外受精7件となっている。また、系統維持を目的とした体外受精は2016年から4件実施しており、いずれも産仔の引き渡しを完了している。

今後は各手技の精度向上に努めると共に、現在は教員1人、技術職員1人で実施している清浄化業務の施設内習得者を増やすことで、より安定したサービスの提供を目指す。

### 謝辞

感染動物の清浄化手法について数多くの技術的なご助言を頂きました他大学の動物実験施設の職員の皆様、ならびに、本稿の作成を支えて下さった岐阜大学生命科学総合研究支援センター動物実験分野のスタッフの方々に、この場を借りて深く感謝の意を表します。

### 参考文献

- 1) 実験動物感染症の対応マニュアル. 三盛社. P.269.
- 2) 図解・実験動物技術集 I. アドスリー.P.60.
- 3) マウス生殖工学技術マニュアル.