

200940025A

厚生労働科学研究費補助金

医薬品・医療機器等レギュラトリーサイエンス総合研究事業

生体内埋設型医療機器の素材に係わる生物学的な安全性評価に関する研究
-発がん性を主体とした再評価と国際調和-

(H20-医薬-一般-003)

平成21年度 総括・分担研究報告書

研究代表者 関田 清司
国立医薬品食品衛生研究所

平成 22 (2010) 年 3 月

厚生労働科学研究費補助金

医薬品・医療機器等レギュラトリサイエンス総合研究事業

生体内埋設型医療機器の素材に係わる生物学的な安全性評価に関する研究
-発がん性を主体とした再評価と国際調和-

(H20-医薬-一般-003)

平成21年度 総括・分担研究報告書

研究代表者 関田 清司
国立医薬品食品衛生研究所

平成 22 (2010) 年 3 月

別添 1

厚生労働科学研究費補助金

医薬品・医療機器等レギュラトリーサイエンス総合研究事業

生体内埋設型医療機器の素材に係わる生物学的な安全性評価に関する研究
-発がん性を主体とした再評価と国際調和-
(H20-医薬-一般-003)

平成 21 年度 総括・分担研究報告書

研究代表者 関田 清司

平成 22 (2010) 年 3 月

目 次

I. 総括研究報告書		
生体内埋設型医療機器の素材に係わる生物学的な安全性評価に関する研究 -発がん性を主体とした再評価と国際調和- (H20-医薬-一般-003)	関田 清司	1
II. 分担研究報告書		
1. 埋設材料の安全性評価と無菌性の関連性の検討	児玉 幸夫	6
	関田 清司	
2. 埋設材料の遺伝子発現データ解析	高木 篤也	10
3. 安全性試験に関する情報収集 (各国の規制当局の情報収集を含む)	大室 弘美	13
III. 研究成果の刊行に関する一覧表		34
IV. 研究成果の刊行物・別冊		34
V. 参考資料		

厚生労働科学研究費補助金（医薬品・医療機器等レギュラトリーサイエンス総合研究事業）

I. 総括研究報告書

生体内埋設型医療機器の素材に係わる生物学的な安全性評価に関する研究

-発がん性を主体とした再評価と国際調和-

研究代表者 関田清司

国立医薬品食品衛生研究所・安全性生物試験研究センター・毒性部動物管理室・室長

研究要旨

人体に埋植される生体由来を含む種々の人工材料の安全性に関する従来の動物実験の問題点を見直すこと、及び、可能性としての「細菌共存環境」がげっ歯類特有の異物好発がん性の誘因であることを検証するとともに、異物発がんメカニズムを遺伝子レベルで明らかにすることを目的に研究を行った。これまでの埋植発がん性試験の結果、p53+/-マウスで、埋植部位に腫瘍発生が認められ、プラスチックに比べ、ガラスでより強い催腫瘍性が認められた。ガラスを埋植した群では、コンベンショナルな条件下で飼育したマウスは germ free の条件下で飼育したマウスより早期に腫瘍発生を生じることを示唆する結果が得られた。そこで、p53 遺伝子ヘテロ欠失無菌マウスを新たに作製し、同様にガラス板の埋植手術を行い、その発癌率を確認する追加実験を開始した。また、術野の厳重消毒と簡易消毒の異物発がんに及ぼす影響を調べるため、p53 ヘテロ欠失マウスにガラス板を埋植した発がん比較実験を開始した。埋植による異物発がんメカニズムを明らかにするため、これらの試験の埋植部位の組織を対象にした遺伝子発現解析を定量的マイクロアレイ解析法(Percellome 法)を用いて実施するため、経時的に組織を採取し、組織学的検査を実施した。埋設材料の有害性に関する調査研究のため、海外の GLP 適合安全性試験受託施設を訪問し、手術を伴う試験の実地調査及び情報収集を行った結果、当該施設における実験動物の手術環境は、ヒトの手術時とほぼ同等であることが明らかになった。

研究分担者

児玉幸夫 国立医薬品食品衛生研究所・
安全性生物試験研究センター・
毒性部・研究員
高木篤也 国立医薬品食品衛生研究所・
安全性生物試験研究センター・
毒性部・室長
大室弘美 武蔵野大学・薬学部・医薬品
情報学教室・教授

A. 研究目的

平成 17 年度からの 3 年間に先行して実施された厚生労働科学研究費補助金「生物由来の医療機器に関わる国際的調和に関する研究—埋設型医療機器素材の安全性評価の再評価と国際調和— (H17-医薬一般-019)」において、微生物環境を制御した p53 ヘテロ欠失マウスを用いた研究から「細菌共存環境」が埋植材料の発がんを修飾する要因であることを示唆する知見が得られた。本研究の目的は、これまでの研究をさらに推進し、人体に埋植される生体由来を含む種々の人工材料の安全性に関する従来の動物実験の問題点を見直すこと、及び、可能性としての「細菌共存環境」がげっ歯類特有の異物好発がん性の誘因であることを検証するとともに、異物発がんメカニズムを遺伝子レベルで明らかにすることである。げっ歯類を用いた埋植材料の安全性試験（毒性試験）は、通常、1～2 cm 角、厚さ 1 mm 内外の板状の被検物（埋植材料）を動物の上背部皮下に埋植し、長期にわ

たり観察する。その結果、異物発がん（悪性線維性組織球腫（MFH）様の肉腫）を高率に引き起こすことが知られている。しかし、ヒトにおける発がんの報告は皆無に等しい。但し、例外として感染が加わった際に発がんが起こることが知られている。この差を科学的に検証することは、材料と生体の化学的相互作用と、単なる物理的性状要因を正しく区別し、今後の埋植物安全性評価の正確性の向上に繋がり、開発促進と安全性向上の両面から患者にとって有益であると考えられる。

B. 研究方法

無菌手術環境及び無菌術野の作出に関しては、前年度まで使用した germ-free 動物の実験・飼育動物施設、及び、実験機材を継続して使用し同様に実施した。無菌 p53 ヘテロ欠失マウス（C57BL/6N）に対してのガラスの板状検体の埋植及び飼育を厳密無菌操作下で行った。さらに、術野の厳重消毒と簡易消毒（ヨーチン消毒）の異物発がんに及ぼす影響を p53 ヘテロ欠失マウスを用いて比較した（関田、児玉）。埋植異物周囲に形成される反応組織、腫瘍を対象としたマイクロアレイによる遺伝子発現解析を行うため、埋設部位及び腫瘍組織を採取し、組織学的検査を実施した。なお、用いる手法として国立医薬品食品衛生研究所毒性部で菅野らにより開発された定量的マイクロアレイ解析法（Per cellome 手法（Kanno J, et al., "Per cell" normalization method for mRNA

measurement by quantitative PCR and microarrays. BMC Genomics. 29;7:64, 2006.)) を用いる (高木、児玉)。体内埋設型医療機器の安全性に関する評価を適切に行うために、「細菌共存環境」がげっ歯類特有の異物好発がん性の誘因である可能性について検討することを目的とし、本年度は、OECD GLP を遵守して試験を実施しているカナダの2つの安全性試験受託施設を訪問し、手術等に関するプレゼンテーション、施設見学並びに手術を伴う試験を実地に見学し、情報収集した(大室)。

なお、動物実験の計画及び実施に際しては国立医薬品食品衛生研究所の「動物実験の適正な実施に関する規程」に従い実施する。

C, D. 結果と考察

無菌 p53 ヘテロ欠失マウス

(C57BL/6N) に対してのガラスの板状検体の埋植及び飼育を厳密無菌操作下で行う試験を開始した。なお、対照群には sham operation を実施した群を設定した。術野の厳重消毒と簡易消毒の異物発がんに及ぼす影響を p53 ヘテロ欠失マウスを用いて調べる実験に関しては、厳重消毒群が1匹飼いで、簡易消毒群が5匹飼いであることから、ケージ当たりの動物数が発癌率に影響する可能性を考慮し、新たに厳重消毒の5匹飼い群、簡易消毒の1匹飼い群を追加することとし、それぞれ実験を開始した(関田、児玉)。埋植

による異物発がんメカニズムを明らかにするため、これらの試験の埋植部位の組織を対象にした遺伝子発現解析を定量的マイクロアレイ解析法(Percellome 法)を用いて実施するため経時的に組織を採取した。また、適切なサンプル選定のため、採取組織の組織学的検査を遂行した(児玉、高木)。

GLP に適合した海外(カナダ)の安全性試験受託施設での手術を伴う試験に関する実地調査及び情報収集を行った。この結果、①手術部位の消毒に複数の消毒薬を用いること、②動物に直接接触する手術機器の再使用は同一動物にしか行っていないこと及び再使用する場合には機器を消毒すること、③切開部位以外を覆布で覆っていること、並びに④術中及び術後感染制御のために抗菌剤を一定期間使用していること、さらに⑤調査した施設の1つは傷口からの感染を防ぐため滅菌したジャケットを術後の動物に着用させること等が、昨年度のアンケート調査の結果とは異なっていた。これら①～⑤の事項は、昨年度のアンケート調査の結果からで、手術環境において改善が必要と考えられた事項であった。本調査の結果、調査対象となった施設における実験動物の手術時の術野の無菌性(皮膚の消毒、手術時の無菌性等)、並びに術後感染制御等はヒトとほぼ同等であることが明らかになった。

来年度は、本年度作成したアンケート調査票(案)を今般の調査に基づいて改

定し、当該調査票を用いて、さらに多くの海外の GLP 適合施設における埋設医療機器等に関する手術時の術野の無菌性（皮膚の消毒、手術時の無菌性等）、並びに術後感染制御等に関する情報等を調査する予定である（大室）

なし
3. その他
なし

E. 結論

医療用埋植物安全性評価の正確性の向上のため、マウスの長期無菌飼育試験の基盤を確立し、医療素材の移植実験を実施、「細菌共存環境」が埋植材料の発がんを促進することが示唆された。また、医療素材の移植実験に関する国内外の情報を整理した。（但し、今後、無菌動物固有の液性、細胞性環境の関与についての考察を要する可能性がある。）

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表

なし

2. 学会発表

なし

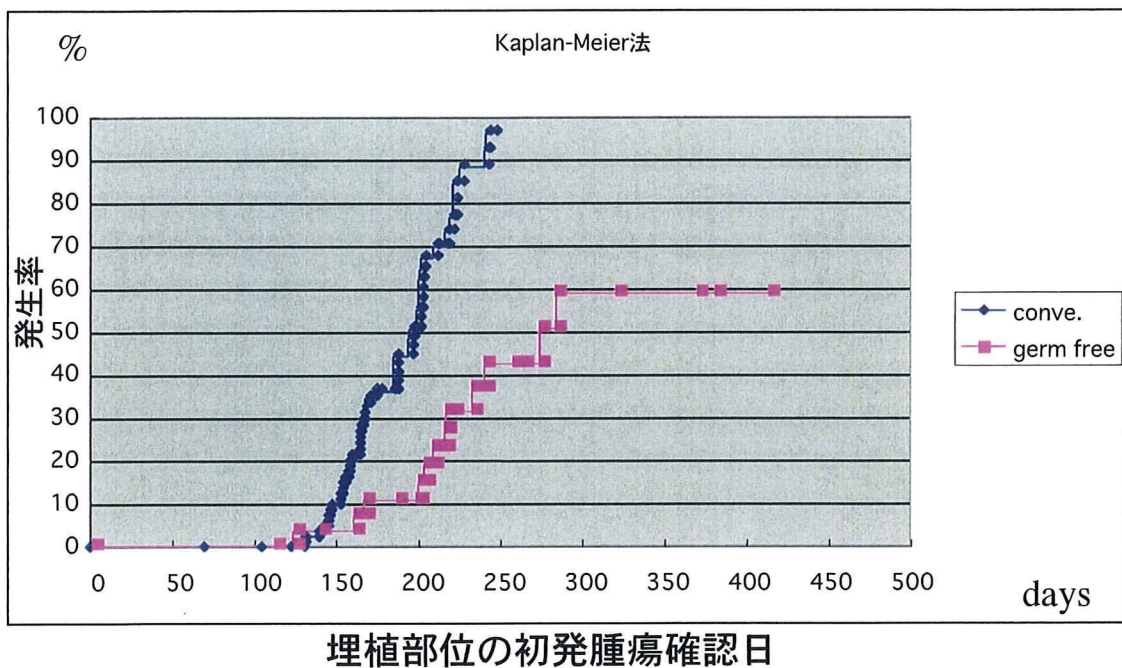
H. 知的財産所有権の出願・登録状況（予定も含む）

1. 特許取得

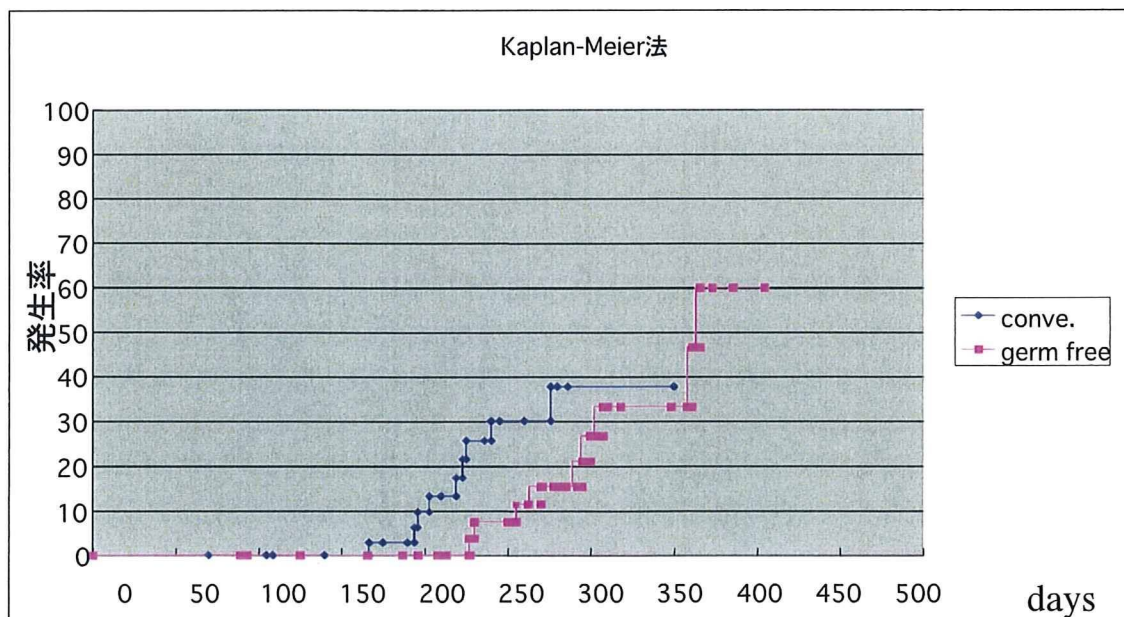
なし

2. 実用新案登録

p53^{+/-}マウスにおけるconventionalまたはgerm free環境下での異物発がん性の比較（ガラス板埋植）



p53^{+/-}マウスにおけるconventionalまたはgerm free環境下での異物発がん性の比較（プラスチック板埋植）



厚生労働科学研究費補助金（医薬品・医療機器等レギュトリーサイエンス総合研究事業）

II. 分担研究報告書

1. 埋設材料の安全性評価と無菌性の関連性の検討

研究分担者：児玉幸夫 国立医薬品食品衛生研究所・安全性生物試験
研究センター・毒性部・研究員

研究分担者：関田清司 国立医薬品食品衛生研究所・安全性生物試験
研究センター・毒性部動物管理室・室長

研究要旨

平成 20 年度までの埋植発がん性試験の結果、p53+/-マウスで、埋植部位に腫瘍発生が認められ、プラスチックに比べ、ガラスにより強い催腫瘍性が認められた。ガラスを埋植した群では、コンベンショナルな条件下で飼育したマウスは germ free の条件下で飼育したマウスより早期に腫瘍発生を生じることを示唆する結果が得られた。そこで、p53 遺伝子ヘテロ欠失無菌マウスを新たに作製し、同様にガラス板の埋植手術を行い、その発癌率を確認する追加実験を開始した。また、術野の厳重消毒と簡易消毒の異物発がんに及ぼす影響を調べるため、p53 ヘテロ欠失マウスにガラス板を埋植した発がん比較実験を開始した。

A. 研究目的

平成 17 年度からの 3 年間に先行して実施された厚生労働科学研究費補助金「生物由来の医療機器に関わる国際的調和に関する研究—埋設型医療機器素材の安全性評価の再評価と国際調和—（H17-医薬一般-019）」において、微生物環境を制御した p53 ヘテロ欠失マウスを用いた研究から「細菌共存環境」が埋植材料の発がんを修飾する要因であることを示唆す

る知見が得られた。本研究の目的は、これまでの研究をさらに推進し、人体に埋植される生体由来を含む種々の人工材料の安全性に関する従来動物実験の問題点を見直すこと、及び、可能性としての「細菌共存環境」がげっ歯類特有の異物好発がん性の誘因であることを検証することである。げっ歯類を用いた埋植材料の安全性試験（毒性試験）は、通常、1～2 cm 角、厚さ 1 mm 内外の板状の被検

物（埋植材料）を動物の上背部皮下に埋植し、長期にわたり観察する。その結果、異物発がん（悪性線維性組織球腫（MFH）様の肉腫）を高率に引き起こすことが知られている。しかし、ヒトにおける発がんの報告は皆無に等しい。但し、例外として感染が加わった際に発がんが起こることが知られている。この差を科学的に検証することは、材料と生体の化学的相互作用と、単なる物理的性状要因を正しく区別し、今後の埋植物安全性評価の正確性の向上に繋がり、開発促進と安全性向上の両面から患者にとって有益であると考えられる。これまでの研究の結果、無菌状態で飼育した動物では異物発がんの発生率が低下することが示唆された。本研究ではその結果を受け、germ free の p53+/- マウスを用いた確認試験を行うとともに、並行して経時的に採取した組織のマイクロアレイ解析による異物発がん機序解析を実施する。さらに、術野の厳重消毒と簡易消毒の異物発がんに及ぼす影響を SPF 条件下の p53 ヘテロ欠失マウスを用いて比較することにより、一般的に実施可能な試験法を提案するための条件の検討を行う。これらにより、今後の埋設物安全性評価の正確性のいっそうの向上に繋がることが期待される。なお、動物実験の計画及び実施に際しては国立医薬品食品衛生研究所の「動物実験の適正な実施に関する規程」に従い実施する。

B. 研究方法

無菌手術環境及び無菌術野の作出に関

しては、前年度まで使用した germ-free 動物の実験・飼育動物施設、及び、実験機材を継続して使用し同様に実施した。無菌 p53 ヘテロ欠失マウス（C57BL/6N）に対してのガラスの板状検体の埋植及び飼育を厳密無菌操作下で行った。さらに、術野の厳重消毒と簡易消毒（ヨーチン消毒）の異物発がんに及ぼす影響を p53 ヘテロ欠失マウスを用いて比較した。

C, D. 結果と考察

無菌 p53 ヘテロ欠失マウス

（C57BL/6N）に対してのガラスの板状検体の埋植及び飼育を厳密無菌操作下で行う試験を開始した。なお、対照群には sham operation を実施した群を設定した。術野の厳重消毒と簡易消毒の異物発がんに及ぼす影響を p53 ヘテロ欠失マウスを用いて調べる実験に関しては、厳重消毒群が 1 匹飼いで、簡易消毒群が 5 匹飼いであることから、ケージ当たりの動物数が発癌率に影響する可能性を考慮し、新たに厳重消毒の 5 匹飼い群、簡易消毒の 1 匹飼い群を追加することとし、それぞれ実験を開始した。

E. 結論

術野の厳重消毒と簡易消毒の異物発がんに及ぼす影響を明らかにするため、SPF 条件下で p53 ヘテロ欠失マウスを用いた比較実験ならびに germ-free 条件下での p53 ヘテロ欠失マウスを用いたガラス埋植発がんの確認実験を進めた。

F. 研究発表

1. 論文発表

なし

2. 学会発表

なし

G. 知的財産所有権の出願・登録状況(予定も含む)

1. 特許取得

なし

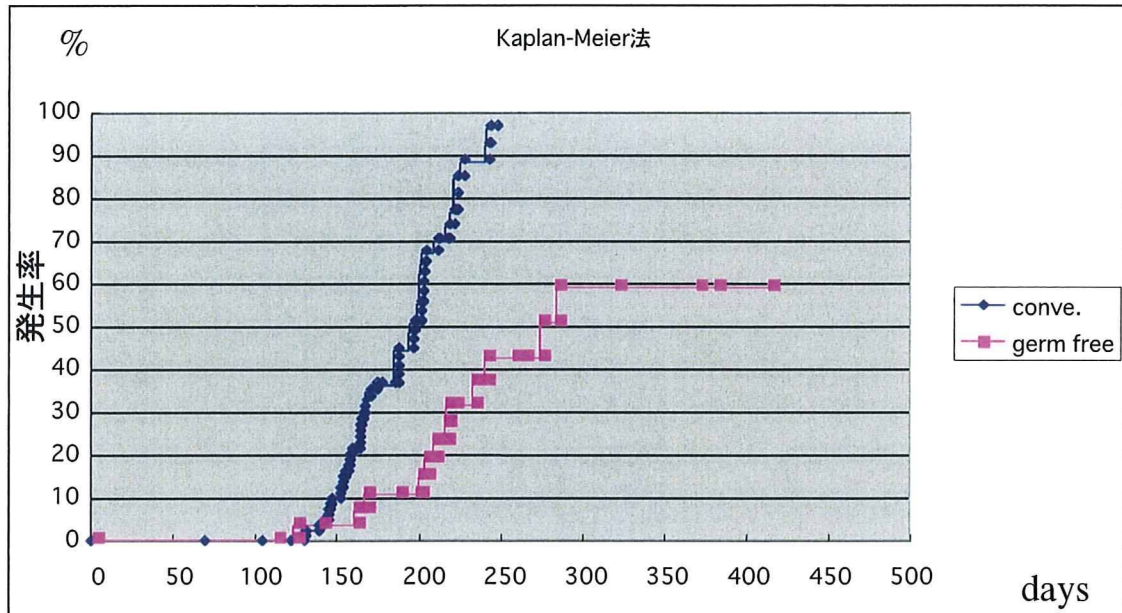
2. 実用新案登録

なし

3. その他

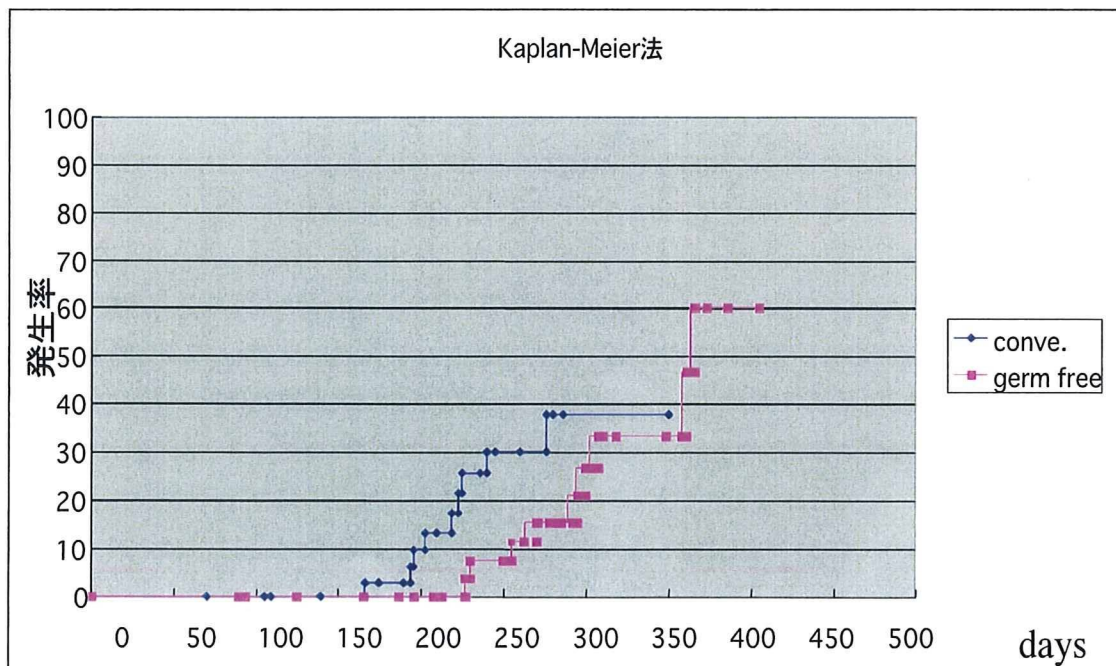
なし

p53+/-マウスにおけるconventionalまたはgerm free環境下での異物発がん性の比較（ガラス板埋植）



埋植部位の初発腫瘍確認日

p53+/-マウスにおけるconventionalまたはgerm free環境下での異物発がん性の比較（プラスチック板埋植）



2. 埋設材料の遺伝子発現データ解析

研究分担者：高木篤也 国立医薬品食品衛生研究所・安全性生物試験研究センター・
毒性部・室長

研究分担者：児玉幸夫 国立医薬品食品衛生研究所・安全性生物試験研究センター・
毒性部・研究員

研究要旨

異物発がんメカニズムを遺伝子レベルで明らかにするため、p53ヘテロマウスを用いた異物発がん性試験で得られた腫瘍及び埋植組織の経時的な採取を行った。また、アレイ解析用に適切なサンプル選定のため、採取組織の病理標本作製を前年度に引き続いて行った。また、異物発がんで生じる悪性線維性組織球種の遺伝子発現等に関する最新文献について整理した。

A. 研究目的

げっ歯類に高頻度に見られる異物発がんについて、従来から多くの研究があるが、それらの成立には、げっ歯類の強力な免疫力による術野や創傷の自己無菌化を前提としている。これに対して、ヒトに埋設する外科手術における無菌管理は非常に厳重であること、更にヒトに於いても感染が加わった際には発がんが促進されることが知られている。これまでに、微生物環境を制御した p53 遺伝子ヘテロ欠失マウス (germ-free 及び conventional) を用い、埋設による腫瘍発生を観察した結果、germ-free 環境下では conventional 環境下よりもがん発生率が低下することが示唆された。本研究は、この試験結果を踏まえ、これらの異物発がんメカニズムを遺伝子レベルで

明らかにすることである。

B. 研究方法

平成 21 年度においては、p53 ヘテロ欠失マウスに対するガラスまたはポリエチレン製の板状検体の埋植及び飼育を厳密無菌操作下、及び、SPF 環境下で従来型の簡易殺菌操作下で実施し、採取した埋設部位反応組織及び発生した腫瘍組織から解析に適したサンプル選別のための組織学的解析を進める。採取アレイ解析にはアフィメトリクス社の Gene Chip Mouse Genome 430 2.0 Array を用いる。なお、用いる解析手法として国立医薬品食品衛生研究所毒性部で菅野らにより開発された定量的マイクロアレイ解析法 (Percellome 手法 (Kanno J, et al., "Per cell" normalization method for mRNA

measurement by quantitative PCR and microarrays. BMC Genomics. 29;7:64, 2006.)) を用いる。また、悪性線維性組織球種(MFH)の遺伝子発現及び異物発癌機序に関する最新の文献について整理した。

C, D. 結果と考察

埋植による異物発がんメカニズムを明らかにするため、これらの試験の埋植部位の組織を対象にした遺伝子発現解析を定量的マイクロアレイ解析法(Percellome 法)を用いて調べるため、経時的に組織を採取した。また、適切なサンプルの選定のため、採取組織の病理標本作製を前年度に引き続いて遂行した。これまでに採取したサンプル数は約 220 例で、その内、腫瘍が 25 例含まれている。MFH に関する文献では組織学的分類法に関して、10 年程前までは多角形/紡錘形の MFH は大人の間葉系悪性腫瘍の多くを占める代表的な腫瘍であったが、最近の WHO の軟部腫瘍の分類により、MFH は未分化の多角細胞肉腫と単なる同義語であると見なされている(Osama M et al., 2008)。マイクロアレイを用いた軟部肉腫の分類も試みられている。Nakayama ら(2007)は 105 人から得られた 10 種類の軟部腫瘍を対象にマイクロアレイ解析を実施し、MFH を遺伝学的に特徴づけた。その結果、紡錘形/多形細胞肉腫である脱分化型脂肪肉腫、粘液肉腫、平滑筋肉腫、悪性神経鞘腫、線維肉腫、MFH など単一の緩やかなクラスターを形成し、類似した遺伝子発現プロファイルを有する

ことが分かった。また MFH に分類された 21 例中 15 例が他の肉腫の遺伝子発現パターンと類似性を示し、再分類が可能なが示された。同様に、肉腫の分類が 5 種類の既存のマイクロアレイのデータセットを用いて試みられている。170 遺伝子が予測に採用された。また、大部分の MFH は平滑筋肉腫、脂肪肉腫、線維肉腫に再分類された(Konstantinopoulos PA et al., 2010)。また、実験動物を用いたマイクロアレイ解析が実施されている。P53のconditional deletionと活性型rasを有するマウスから生じた MFH のマイクロアレイ解析を実施した結果、ras の標的分子である FOXM1 の遺伝子発現が高く、また、転移と相関性が見られた。FOXM1 はフォークヘッド転写因子ファミリーの一つで、他の固形腫瘍でも腫瘍形成を促進することが知られている(Mito JK et al., 2009)。なお、この実験では MFH のマイクロアレイ解析の比較対照のため、正常の筋肉を用いている。異物発がん機序については最近、二つの総説が出されており、炎症に伴う、活性酸素、活性窒素、サイトカイン等の関与について解説されている(Okada F, 2007, Moizhess TG, 2008)。また、活性窒素については 8-nitroguanine が MFH のプログレッションのバイオマーカーであるとの報告があった(Hoki Y. et al., 2007)。

参考文献

Hoki Y et al., 8-Nitroguanine as a potential biomarker for progression of

malignant fibrous histiocyoma, a model of inflammation-related cancer, Oncol report, 18, 1165-1169, 2007.

Konstantinopoulos PA et al., Analysis of multiple sarcoma expression datasets: implications for classification, oncogenic pathway activation and chemotherapy resistance, PLoS ONE, volume5, Issue 4, e9747, 1-13, 2010.

Mito JK et al., Cross species genomic analysis identifies a mouse model as undifferentiated pleomorphic sarcoma/malignant fibrous histiocyoma, PLoS ONE, volume 4, Issue 1, e8075, 1-6, 2009.

Moizhess TG, Carcinogenesis induced by foreign bodies, Biochemistry, 73, 763-775, 2008

Nakayama R. et al., Gene expression analysis of soft tissue sarcomas: characterization and reclassification of malignant fibrous histiocyoma, Modern Pathol., 20, 749-759, 2007.

Okada F, Beyond foreign-body-induced carcinogenesis: Impact of reactive oxygen species derived from

inflammatory cells in tumorigenic conversion and tumor progression, Int J Cancer, 121, 2364-2372, 2007.

Osama M, et al., Arch. Pathol., Lab. Med., Malignant fibrous histiocyoma, 132, 1030-1035, 2008.

E. 結論

異物発がんメカニズムを遺伝子レベルで明らかにするため、p53 ヘテロマウスを用いた異物発がん性試験で生じた腫瘍及び埋植組織の経時的な採取と組織学的検査を行った。

F. 研究発表

1. 論文発表

なし

2. 学会発表

なし

G. 知的財産所有権の出願・登録状況(予定も含む)

1. 特許取得

なし

2. 実用新案登録

なし

3. その他

なし

3. 各国の規制当局の情報収集を含む埋植物の安全性試験に関する情報収集

研究分担者：大室弘美 武蔵野大学大学院薬科学研究科、薬学部及び薬学研究
所

研究要旨

本研究の目的は、ヒトに埋設される生体由来を含む様々な人工材料の安全性に関する従来の動物実験の問題点を見直すために、各国の規制当局の情報収集を含む埋設物の安全性試験に関する情報を収集することである。本年度は、「細菌共存環境」がげっ歯類特有の異物好発がん性の誘引である可能性に関する情報を収集することを目的として、実験動物の飼育環境、手術時の術野の無菌性（皮膚の消毒、手術時の無菌性等）並びに術後感染制御等に関する情報を得るために、昨年度の本邦の GLP 適合施設等を有する法人へのアンケート調査に引き続き、海外の GLP 適合安全性試験受託施設を訪問し、実地調査及び情報収集を行った。また、来年度の海外の GLP 適合施設等を有する法人へのアンケート調査のため、昨年度使用したアンケート調査票をもとに、調査票（案）を作成した。両施設とも医薬品及び医療機器 GLP の適合施設であるが、訪問時には医療機器の埋設試験については実施していなかった。このため、手術時の術野の無菌性及び術後感染制御に関しては、infusion（点滴等の注入）投与による医薬品の安全性に関する試験における infusion 用カニューレの埋め込みの際の情報を、術者による説明並びに実際の手術に立ち会うことにより得た。また、実験動物の飼育環境を含め、施設内の設備等の情報についても、説明及びラボツアーにより収集した。調査の結果、当該施設における実験動物の手術環境は、ヒトの手術時とほぼ同等であることが明らかになった。

A. 研究目的

細菌共存環境がげっ歯類特有の異物好発がん性の誘因であることを検証し、検体の物理的形狀に依存せず、化学的活性のみに依存する発がん性試験系の構築の可能性を検討することを目的とし、以下を行う。実験動物の飼育環境、手術時の

術野の無菌性（皮膚の消毒、手術時の無菌性等）並びに術後感染制御等に関する情報を得るために、海外（カナダ）の2つの GLP 適合施設を訪問し情報収集する。また、当該施設におけるマイクロチップ等による異物発癌の経験等についても情報収集する。さらに、来年度に予定して

いる海外の GLP 適合施設におけるアンケート調査に用いるアンケート調査票作成に関する情報収集等を行う。加えて、異物発癌、感染と慢性炎症による発癌に関する情報を文献調査により得る。

B. 研究方法

1. OECD GLP を遵守して試験を実施しているカナダの2つの安全性試験受託施設を訪問し、手術等に関する説明を受け、さらに施設見学並びに手術を伴う試験を実地に見学し、情報を収集した。
2. 本邦の GLP 適合施設に対して昨年度実施した「動物の飼育環境、手術時の術野の無菌性（皮膚の消毒、術野の無菌性等）並びに術後感染制御等に関するアンケート調査」を海外の GLP 適合施設に対して実施するために必要な情報を収集した。
3. 動物の個体識別に使用されているマイクロチップによるげっ歯類の異物発がんに関して、文献調査並びに今回実地調査を行った施設において情報を収集した。
4. 来年度実施予定の海外の GLP 適合施設に対するアンケート調査のため、昨年度の日本の GLP 適合施設に対するアンケート調査票をもとに新たに調査票（案）を作成した。

以上に加え、実験動物の倫理的取り扱いに関する規制における手術等に関する規定に関する情報、並びに昨年度に引き続きげっ歯類の異物発がん、感染／炎症による発がんに関する情報等を文献調査により収集した。

C、D. 研究結果と考察

1. OECD GLP を遵守して試験を実施している安全性試験受託施設における埋設試験等の手術を伴う試験に関する実施調査と情報収集

(1) 実地に調査を行った施設

① Charles River Laboratories
Preclinical Services
住所：Montreal22022
Transcanadienne Senneville,
Quebec H9X 3R3, Canada

② ITR Canada

住所：19601 Clark Graham, Baie d'Urfé
(Montréal), Québec H9X 3T1, Canada

(2) 調査内容

- 1) 施設の概要及び調査内容の概略

① Charles River Laboratories
Preclinical Services
動物の飼育環境、手術時の術野の無菌性（皮膚の消毒、術野の無菌性等）並びに術後感染制御等に関する情報収集のためになされた施設に関する説明、術技に関する説明、並びにラボツアー等は、C. Copeman 氏 (Science Director)、D. Gilbert 氏 (Director)、及び S. Besner 氏 (Manager) が担当した。

当該施設は GLP 適合の安全性試験受託施設である。当該施設は、様々な種類の infusion 試験を実施しており、この試験のためにカニューレ留置手術が行なわれる。特に infusion 試験では長期間動物を観察する機会が多いことから、感染制御が非常に重要となっている。訪問時

には、医療機器の埋設試験は実施されていなかったため、infusion 試験のためのカニューレ留置手術に関する情報を主に収集した。なお、当該施設では infusion 試験以外の手術を伴う試験についても、同等のレベルで実施しているとのことであった。

② ITR Canada (19601 Clark Graham, Baie d'Urfé (Montréal), Québec H9X 3T1, Canada)

動物の飼育環境、手術時の術野の無菌性（皮膚の消毒、術野の無菌性等）並びに術後感染制御等に関する情報収集のためになされた施設に関する説明、術技に関する説明、手術の見学並びにラボツアー等は、G. Bain 氏 (Vice President)、T. Hirakawa 氏 (Liasion)、E. Cote

氏 (Clinical Veterinarian)、及び J. Younan 氏 (Director) が担当した。本施設も上記①の施設と同様に手術を伴う試験としては infusion 試験が主に実施されていた。また、訪問時には埋設試験は実施されていなかったため、infusion 試験に関する情報を主に収集した。なお、当該施設においても infusion 試験以外の手術を伴う試験についても、同等のレベルで実施しているとのことであった。

(3) 調査結果と考察

- 1) 動物の飼育環境、手術時の術野の無菌性（皮膚の消毒、術野の無菌性等）並びに術後感染制御等

以下の表に、上記①及び②の施設の状況を纏めた。

	Charles River Laboratories Preclinical Services	ITR Canada
手術環境		
1) 手術前の動物の除毛		
① 手術前の除毛	有	有
② 除毛時期	手術直前	手術直前
③ 除毛方法	カミソリによる剃毛 手術室とは別の部屋又は区域で実施	カミソリ刈った毛が飛び散らないように吸引装置付)による剃毛 手術室とは別の部屋又は区域で実施
2) 手術部位の消毒		
① 消毒剤の種類	4%グルコン酸クロルヘキシジンによる消毒の後にポビドンヨード(ソジン)を使用。 消毒時間、消毒後にどの程度時間を置くかは決めていないが、通常は5~10分程度放置。	手術室全室にて、4%グルコン酸クロルヘキシジンを含ませたガーゼと水を含ませたガーゼによりごみ等を除くその後、アルコールを含ませたガーゼで3回清拭し、さらにポビドンヨードを含ませたガーゼで3回清拭し、同ガーゼを当てたまま手術室に被験動物を搬入。 手術室にて切開直前にさらにポビドンヨードにて清拭
② 消毒の範囲	手術部位の2倍程度	手術部位の2倍程度
3) 手術担当者の手指の消毒		
① 消毒薬による手洗い	クロルヘキシジン	石けんのみ
② 消毒薬による肘の消毒	肘の手前まで	肘まで
③ スクラブの使用	使用	使用

	Charles River Laboratories Preclinical Services	ITR Canada
4) 手術着, マスク, 手袋, 帽子の使用		
①手術着の着用	・手術用ジャケット着用	・手術用ガウン (緑色, 滅菌済み) 着用
②帽子の着用	・着用	・着用
③マスクの着用	・着用	・滅菌済み着用
④滅菌手袋の着用	・着用	・着用 ・手術個体毎に交換
5) 手術室の環境		
①専用手術室の有無	・手術による. Infusion試験では有	・専用手術室有
②手術室の環境 (換気, HEPAフィルターの使用等)	・換気 15回/1時間 ・HEPAフィルター使用	・換気回数 不明 ・施設全体にHEPAフィルター様のフィルターを通す空調システムであるが, さらにHEPAフィルター使用
③手術室及び実験台等の消毒	・1 試験毎に消毒(壁及び床は Quatricide Pv-1515使用)	・使用する少なくとも1日前に手術室 (実験台, エアフィルター等を含む) の掃除, 洗浄及び滅菌 (Quatricide使用) ・エアフィルターは試験前に交換 ・手術日の前日午後, 実験室内の設備をアルコール清拭又はアルコール噴霧 ・各手術毎に実験台をアルコール清拭
手術中及び術後の感染制御等		
1) 手術機器 (動物に直接触れるもの) の滅菌又は消毒	・主にガス (エチレンオキシド) 滅菌	滅高压蒸気滅菌
2) 手術中に使用した手術機器の再使用	・同一個体の場合のみ有 ・再使用する場合は, 消毒薬 (アルコール) に浸し滅菌水で洗浄後使用する,又は滅菌布上に置く.	・同一個体の場合のみ再使用することもある. ・再使用する場合は, 消毒薬 (Germex) に浸し滅菌水で洗浄後使用する,又は滅菌布上に置き,再使用時に滅菌水で洗浄して使用する. 消毒薬は2又は3匹毎に交換
3) 埋設材料の滅菌又は消毒	・カテーテルの場合は, 高压蒸気滅菌が主であるが, 材質により高压蒸気滅菌やガス滅菌を選択	・販売元により滅菌済みのカテーテルはそのまま使用する. 滅菌されていない場合は, 高压蒸気滅菌
4) 切開部位以外の部位への覆布等の使用	・覆布 (surgical drape)	・滅菌覆布 (surgical drape)
5) 術後手術切開創の管理		
①切開創の閉じ方	・手術用接着剤を使用, 又は縫う	・縫う
②切開創の滅菌被覆剤での保護	・創を閉じた後は保護しない. ただし, 抗菌剤 (ポリミキシン, ネオマイシン等) を塗布	・開口している創については滅菌水とペニシリンGを噴霧. ・手術部位を覆うことができる清潔なジャケットを着用させる ・霊長類では, 包帯又はバンドエイド使用
6) 術中又は術後感染管理のための抗菌剤等の使用	・ペニシリン (手術日に注射, 手術後2日まで投与. ただし, ウサギは腸内の細菌フローラがなくなるため投与しない.)	・ペニシリンG (benzathione penicillin G及びprocain penicillin G)を手術1日前から手術後2日まで投与. (抗菌剤以外に鎮痛剤を手術前30分から2時間前に投与. 場合によっては手術後24時間投与.)
7) 手術後の動物の飼育	・術後は1動物/1ケージ ・げっ歯類にはエリザベスカラーは使用しない (イヌやウサギの場合は使用することもある.)	・術後は1動物/1ケージ ・麻酔からの覚醒前は頻りに経過観察 ・エリザベスカラーは使用しない.

注: 手術室の設備は, ほぼヒトと同等であった.