

表 1. p53+/-マウスにおける conventional または germ-free 環境下での埋植部位に発生した腫瘍の平均径のサイズと個数（全体に占める割合（%））の比較

	conv		germ-free	
	個	%	個	%
総腫瘍個数	49	100.0	31	100.0
平均径 (mm)				
<12.0	11	22.4	25	80.6
12.0 ≤ ~ <14.0	7	8.2	4	12.9
14.0 ≤ ~ <16.0	5	10.2	1	3.2
16.0 ≤	26	53.1	1	3.2

Conventional 群 と germ-free 群で腫瘍サイズに有意差有り (p<0.001、ウィルコクソン順位和検定)

表 2. ガラス板埋植 p53+/-マウスにおける 嚴重消毒と簡易消毒環境下での埋植部位に発生した腫瘍の平均径のサイズと個数（全体に占める割合（%））の比較

	嚴重消毒		簡易消毒	
	個	%	個	%
総腫瘍個数	25	100.0	77	100.0
平均径 (mm)				
<12.0	18	72.0	42	54.5
12.0 ≤ ~ <14.0	5	20.0	21	27.3
14.0 ≤ ~ <16.0	1	4.0	14	18.2
16.0 ≤	1	4.0	10	13.0

嚴重消毒群 と簡易消毒群で腫瘍サイズに有意差有り (p<0.001、ウィルコクソン順位和検定)

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

これまでの実験で p53+/-マウス皮下にガラス板を埋植すると、埋植後 25 週から肉眼的に腫瘍が観察され始めることを確認した。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、雌 p53+/-マウス背部皮下にガラス板を埋植し、腫瘍化する前の 10、15 及び 20 週後に採取した埋植周囲組織を対象に定量的なマイクロアレイ解析 (Percellome 法) を行なった。この結果、炎症・免疫、血管形成、細胞外マトリックス、線維化等に関与する遺伝子が増加した。これらはガラス板埋植による炎症・異物反応とその後のカプセル化の組織学的変化を反映したものと考えられた。また、酸化ストレス関連遺伝子のヘムオキシゲナーゼ 1 等の増加が認められ、酸化ストレスの亢進が示唆された。また、分泌性シグナル因子の Wnt2 が増加するとともに Wnt 抑制分子の Dkk2、Dkk3、Sfr1、Sfrp2 の増加が認められた。これらの結果、本実験の異物発がん過程において酸化ストレスや Wnt シグナルの変化が関与している可能性が示唆された。

A. 研究目的

これまでの実験で p53+/-マウス皮下にガラス板を埋植すると、埋植後 25 週位から肉眼的に腫瘍が観察され始めることを確認した。本研究では、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、腫瘍化に至る前段階の過程の遺伝子発現レベルの変化をマイクロアレイ手法を用いて解析した。

B. 研究方法

雌 p53+/-マウス皮下にガラス板を埋植し、10、15 及び 20 週後に経時的に採取し

たガラス板周囲皮下組織をマイクロアレイ解析に用いた。対照群にはガラス板を埋植しなかったシャムオペレーション群を用いた。マイクロアレイ解析用の 1 群の匹数は 3 匹とした。採取サンプルは Ambion 社の RNAlater に入れ、-80 度で凍結保存した。なお、サンプル間のバラツキを少なくするため、実体顕微鏡下で、採取組織から可能な限り筋、脂肪組織を除去した。RNA はキアゲン社の RNeasy にて抽出、蛍光標識後、のべ 34,000 遺伝子の発現解析が可能なアフメトリクス社の Gene Chip Mouse

Genome 230 2.0 Array とハイブリダイズを行った。マイクロアレイ解析には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.)) を用いた

C, D. 結果と考察

p53+/-マウス皮下にガラス板を埋植し、10、15 及び 20 週後に採取したガラス板周囲皮下組織を対象にマイクロアレイ解析を実施した。採取組織の一部はヘマトキシリン-エオジン標本作製後、顕微鏡観察を行い、いずれの組織も 20 週の時点まで腫瘍化していないことを確認した。

1. 変動遺伝子数

マイクロアレイ解析の結果、t-検定により有意 ($p < 0.05$) に増加したのべ遺伝子数は 10 週目で 807、15 週目で 940、20 週目で 766、有意 ($p < 0.05$) に減少したのべ遺伝子数は 10 週目で 355、15 週目で 566、20 週目で 840 であった。

2. ジーンオントロジー及びパスウェイ解析

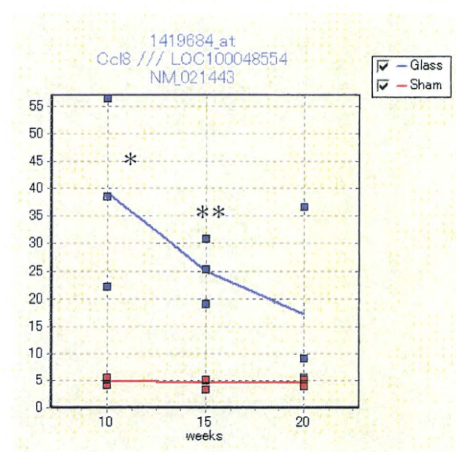
有意に変動した上記遺伝子を対象にジーンオントロジー解析を行った結果、10 及び 15 週目で「免疫応答」、「炎症」、「細胞走化性」等に関する炎症関連遺伝子発現の増加が特に顕著であった。さらに、パスウェイ解析ソフト Ingenuity Pathway Analysis によるパスウェイ解析を行ったところ、10 及び 15 週目で増加する遺伝子で、「inflammatory response」、「cellular movement」、「immune cell trafficking」等の炎症・免疫反応に関連する系が、また

「hematological system development and function」の血管形成に関する系が抽出された。20 週目で増加する遺伝子でも同様に、これらの系が抽出されたが、相対的頻度は減少していた。10、15、及び 20 週後の減少遺伝子では明らかな系は抽出されなかった。

3. 免疫・炎症関連遺伝子

次に、個別の遺伝子に着目して解析を行った。免疫・炎症関連遺伝子は埋植後 10 及び 15 週で大きく増加し、20 週でその増加の程度が小さくなるものが多く認められた。典型的な例を図 1 に示す。chemokine (C-C motif) ligand 8 (CCL8) 及び CCL9 遺伝子は 10 及び 15 週目のガラス板埋植群でそれぞれ有意に増加し、20 週目で減少傾向が認められている。その他の炎症関連遺伝子としてケモカイン・サイトカインである CCL6、CCL11、CCL24、補体成分の C1qa、C1qb、C1r、B 細胞や単球に発現する Fc γ 受容体である Fcgr1、Fcgr2b、Fcgr3 等の多くの遺伝子発現増加が同様に認められた (data not shown)。

A)



B)

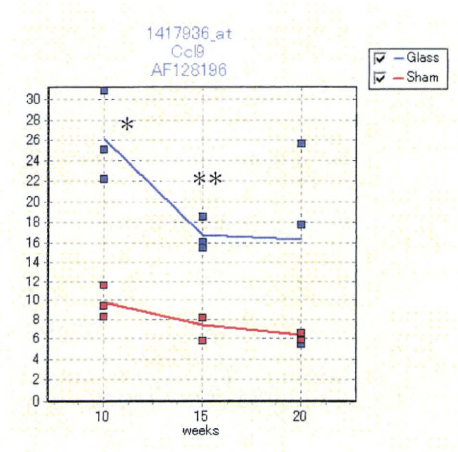


図 1. ケモカインである CCL8 及び CCL9 遺伝子の発現増加

A) CCL8、B) CCL9

縦軸は遺伝子発現量 (copy/cell)、

Glass: ガラス板埋植群

Sham: Sham operation 群

* $p < 0.05$ 、** $p < 0.01$ 、以下同様

4. 血管新生関連遺伝子

血管新生因子である angiogenin が 10 及び 15 週において有意に増加した(図 2)。

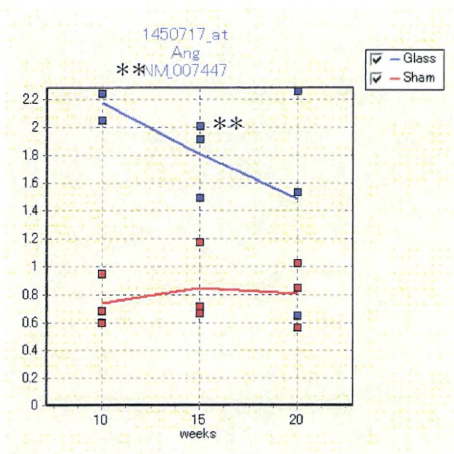
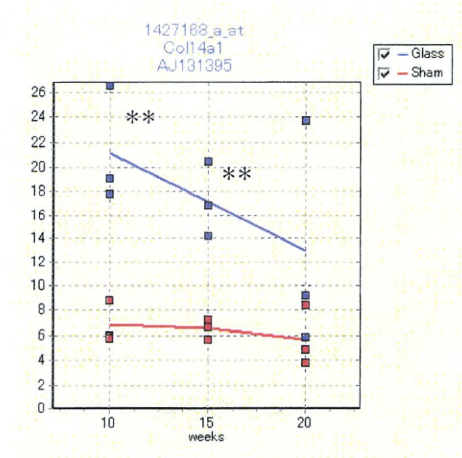


図 2. 血管形成に関与する Angiogenin 遺伝子の増加

5. 細胞外マトリックス関連遺伝子

細胞外マトリックス分子である collagen 14a(Col14a) と fibronectin-1 が 10 及び 15 日で有意に増加した (図 3)。

A)



B)

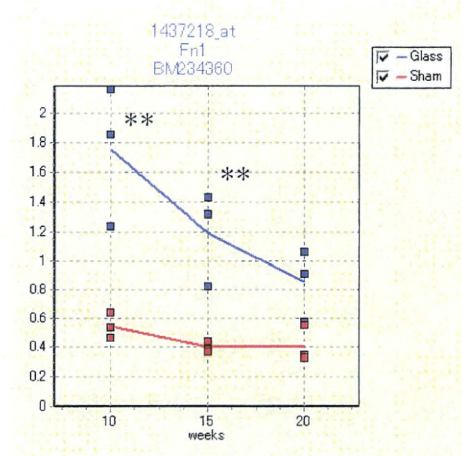


図 3. 細胞外マトリックス分子である Col14a 及び Fibronectin-1 遺伝子の発現増加

A) Col14a1、B) Fibronectin-1

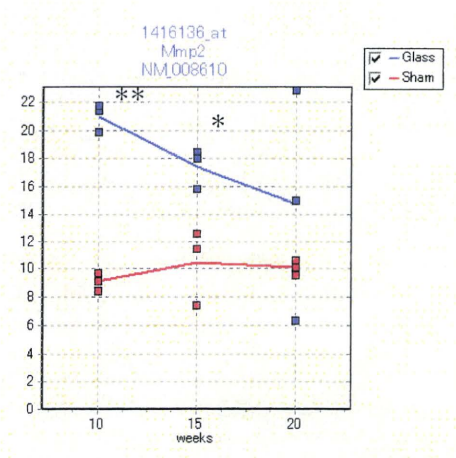
6. 線維化・抗線維化関連遺伝子

組織の線維化、抗線維化に働く蛋白分解酵素の matrix metalloproteinase 2 (MMP-2)、MMP-14、抗線維化に働くカテプシン K

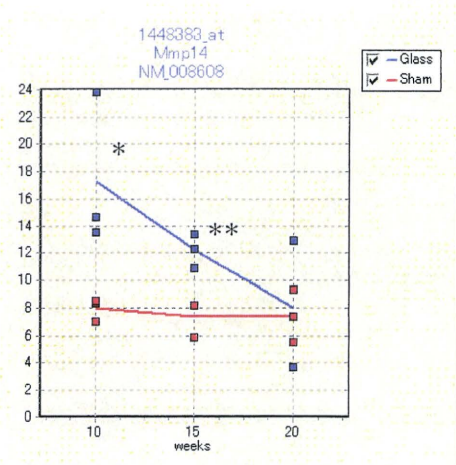
がガラス板埋植群で増加した (図 4)。

これらの炎症、血管形成、細胞外マトリックス、蛋白分解酵素の増加はガラス板埋植による炎症・異物反応とその後のカプセル化の組織学的変化を反映したものと考えられた

A)



B)



C)

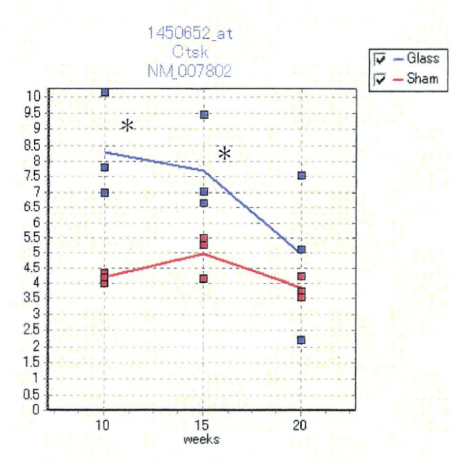


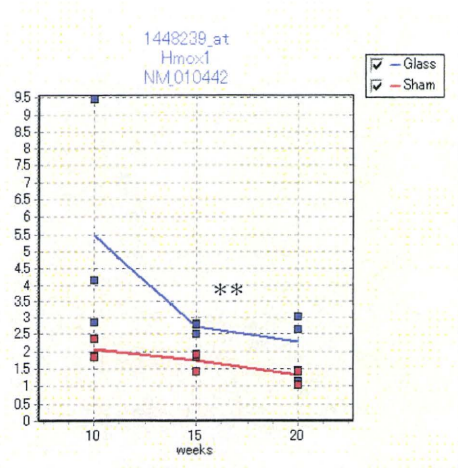
図 4. 線維化・抗線維化に働く蛋白分解酵素 MMP-12、MMP-14、カテプシン K 遺伝子の増加

A) MMP-12、B) MMP-14、C) カテプシン K

7. 酸化的ストレス関連遺伝子

異物発がん機序として種々のサイトカインによる影響に加えて酸化的ストレスの関与が示唆されている^{1,2)}。本実験において酸化的ストレス関連遺伝子の変化を調べた。その結果、酸化的ストレスに対して増加することが知られている heme oxygenase 1 (Hmox1) が 10 週目で増加傾向、15 週目で有意に増加した。さらに、活性酸素産生酵素である dual oxidase 1 (Duox1) が 10 週と 20 週で有意に増加し、15 週でも増加傾向を示した。また、同じく活性酸素産生酵素である NADPH oxidase 4 (Nox4) が 10 と 15 週で有意に増加した (図 5)。

A)

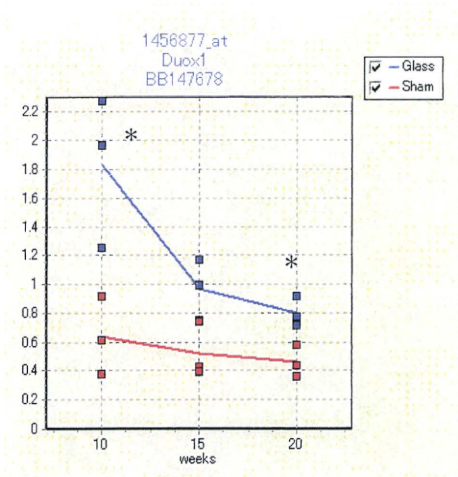


A)Hmox1、 B) Duox1、 C)Nox4

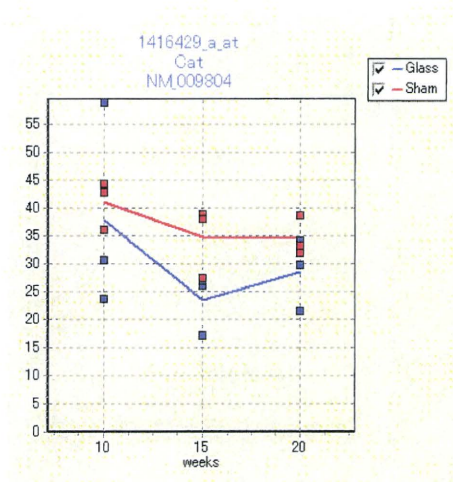
8. 活性酸素除去関連遺伝子

一方、活性酸素除去に働く、Catalase (Cat)、Superoxide dismutase 1 (SOD1)、Glutathione peroxidase 1 (Gpx1)に有意な変化は認められず(図 6)、同様に SOD2、SOD3、Gpx2~6、メタロチオネイン 1、2にも有意な変化は認められなかった(data not shown)。

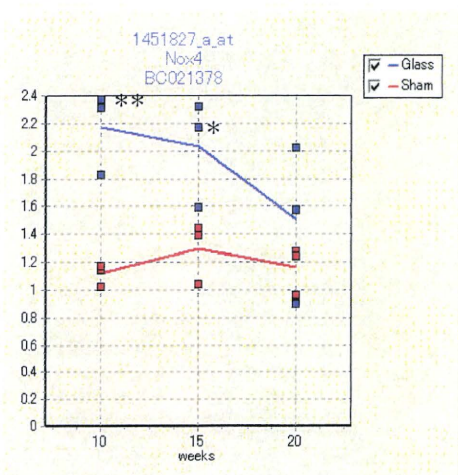
B)



A)



C)



B)

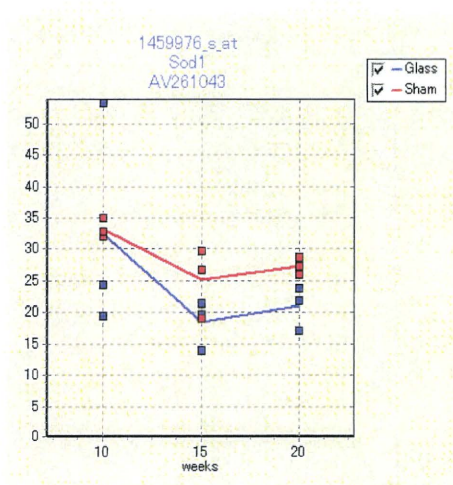
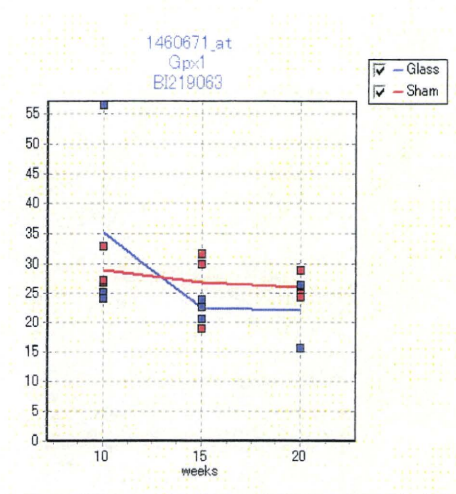


図 5. 酸化的ストレス関連遺伝子の発現増加

C)



B)

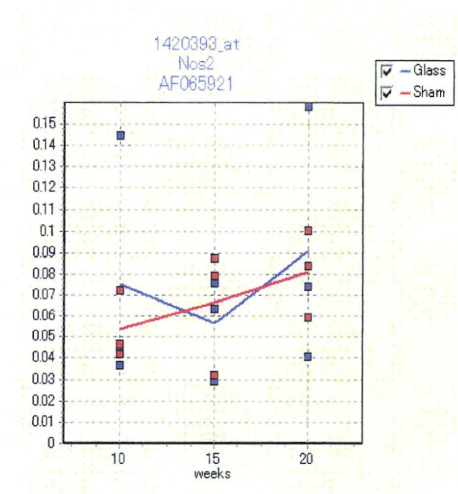


図 6. 活性酸素除去酵素遺伝子

A) Catalase 、 B) SOD1 、 C) Glutathione peroxidase 1

9. 活性窒素関連遺伝子

異物発がん機序には活性酸素に加えて、活性窒素の関与が示唆されている^{1,2)}。一酸化窒素合成酵素の NOS1、2、3 について検討したところ、それぞれ有意差は無かったが、NOS1 で増加傾向、NOS3 で減少傾向が認められた (図 7)。

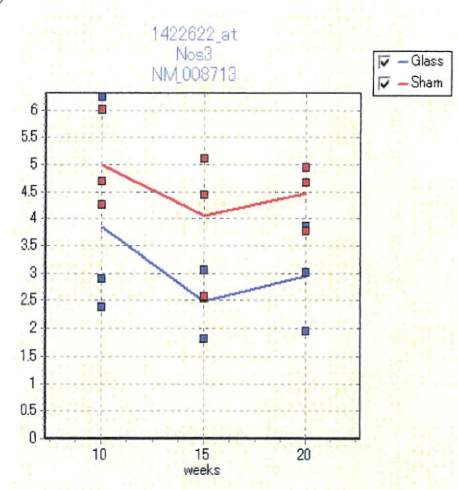
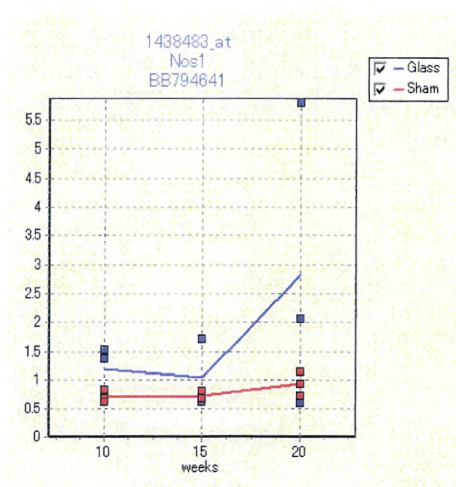


図 7. 一酸化窒素 (NO) 合成酵素

A) NOS1、B) NOS2、C) NOS3

A)

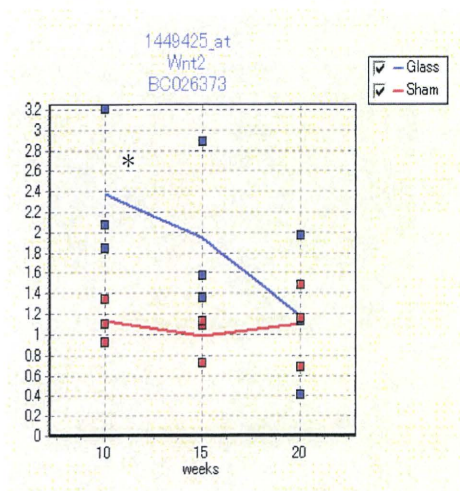


10. Wnt 関連遺伝子

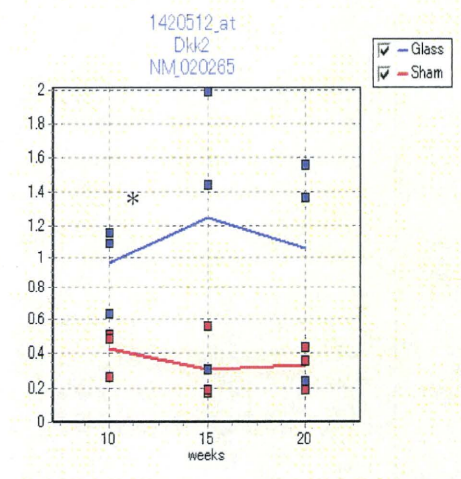
米国コロンビア大学の Matushansky S ら (2007) は悪性線維性組織球種 (MFH) が Wnt 経路を阻害することにより間葉系幹細胞 (MSC) から発生することを明らかにしている⁴⁾。Wnt シグナルの活性化は一般に癌化に関与していることは知られているが、MSC では Wnt シグナルの抑制が肉腫形成に関与している点が非常に異なっているとしている。そこで、本マイ

クロアレイデータにおける Wnt 関連遺伝子の発現パターンを解析した。Wnt 遺伝子について調べると Wnt2 が 10 週目で有意に増加し、15 週目でも増加傾向を示した。その他の Wnt については明らかな変動はみられなかった (data not shown)。次に、Wnt 抑制分子について調べた。Wnt 抑制分子の Dkk2、Dkk3 が 10 週目で有意に増加した。さらに Wnt 抑制分子の Sfrp について調べたところ、Sfrp1 と Sfrp2 が 10 及び 15 週目に有意に増加し、Sfrp5 が 20 週目で有意に増加した。また、Sfrp3 (Frzb)、Sfrp4、もそれぞれ増加傾向を示した (図 8)。Sfrp は分泌型蛋白で、Wnt と結合し、Wnt と受容体の結合を阻害することが知られている。ガラス板周囲組織で Wnt シグナルが亢進しているか、抑制されているかについては、現段階では不明であるが、細胞レベルで今後詳細に検討される必要があると思われる。

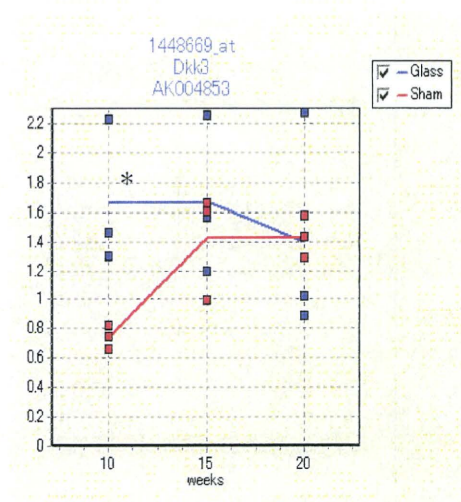
A)



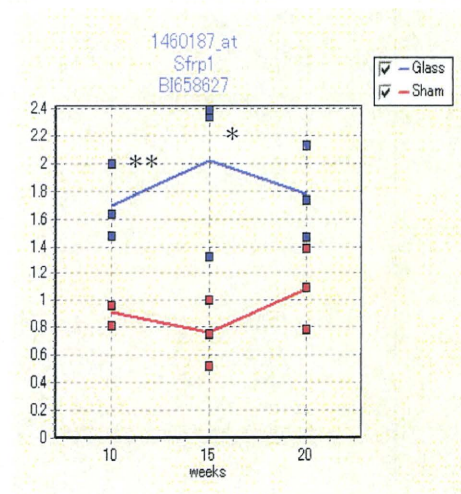
B)



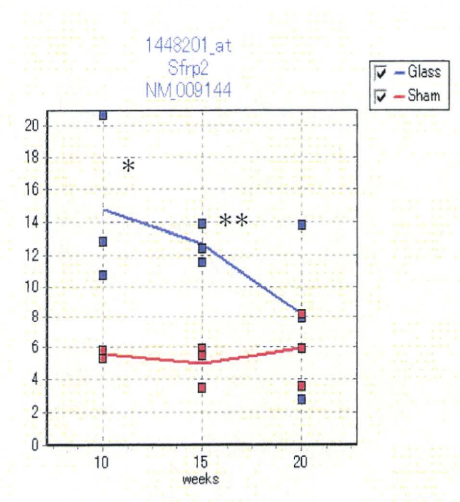
C)



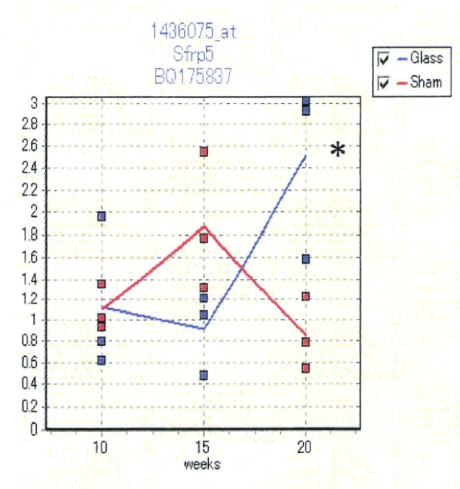
D)



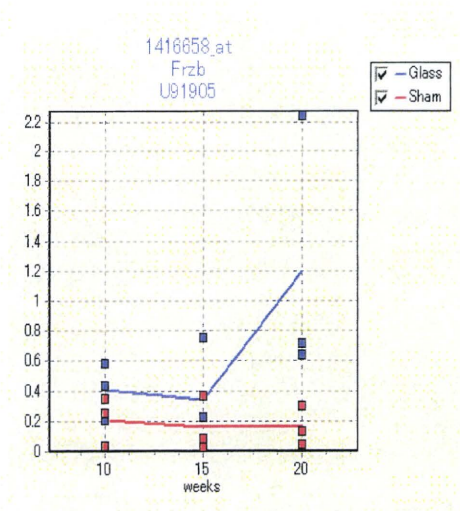
E)



H)



F)



G)

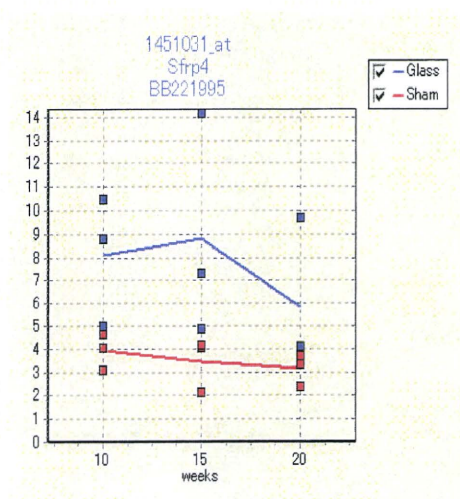


図 8. Wnt 関連遺伝子

A) Wnt2、B) Dkk2、C) Dkk3、D) Sfrp1、E) Sfrp2、
F) Sfrp3 (Frzb)、G) Sfrp4、H) Sfrp5

11. その他

減少遺伝子については有意に変動する遺伝子が増加遺伝子に比較して、比較的少数であった。これらの内、機能未知の Methyltransferase like 7a (Mettl7a) の有意な減少が 10 及び 15 週後で認められた (図 9)。Mettl7a については *in vitro* でヒト中皮細胞に鉍物繊維を添加すると酸化ストレス遺伝子が増加し、Mettl7a が 1/2 に減少したとの報告があることから³⁾、異物に対する細胞の共通の反応である可能性がある。

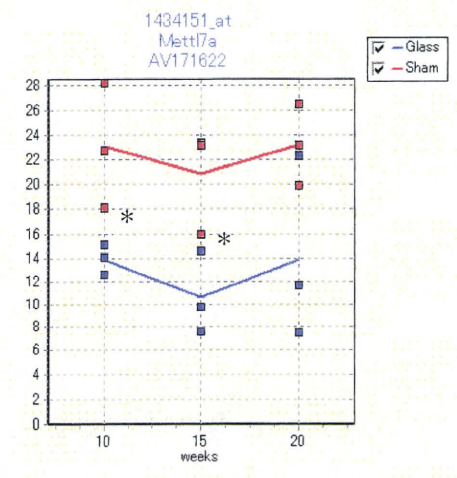


図 9. Mettl7a 遺伝子の減少

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、雌 p53+/-マウス背部皮下にガラス板を埋植し、10、15 及び 20 週後に採取した埋植周囲組織を対象に定量的なマイクロアレイ解析 (Percellome 法) を行なった。この結果、炎症・免疫、酸化ストレス、線維化等に関与する多くの遺伝子群の発現増加を明らかにした。また、酸化ストレス関連遺伝子の増加が認められた。さらに、分泌性シグナル因子の Wnt2 が増加、及び Wnt 抑制分子の Dkk2、Dkk3、Sfr1、Sfrp 2 の増加が認められ、本実験での異物発がん過程において酸化ストレスや Wnt シグナルの変化が関与している可能性が示唆された。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表

1) 広瀬明彦、高木篤也、西村哲治、津田洋

幸、坂本義光、小縣昭夫、中江大、樋野興夫、菅野純 (2011) ナノマテリアルの慢性影響研究の重要性、薬学雑誌、131、195-201.

2) Horibata, K., Ukai, A., Koyama, N., Takagi, A., Kanno, J., Kimoto, T., Miura, d., Hirose, A., and Honma, M. Fullerene (C60) is negative in the *in vitro* pig-A gene mutation assay. Genes and Environment 33, 27-31, 2011.

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

なし

3. その他

なし

参考文献

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

2) 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.

3) Hillegass J.M et al., Mechanisms of oxidative stress and alterations in gene expression by Libby six-mix in human mesothelial cells, Particle and Fibre Toxicol., 7, 26, 2010.

3) Matushansky I, Hernando E, Socci ND et al., Derivation of sarcomas from mesenchymal stem cells via inactivation of the Wnt pathway, J Clin Invest, 117, 3248-3257, 2007

3. 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収集

研究分担者 大室弘美 武蔵野大学薬学部、大学院薬科学研究科及び薬学研究所

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等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、昨年度に引き続き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等を収集することとした。昨年度までの GLP 適合施設に対するアンケート調査や実地調査から、これらの情報の詳細等については SOP 等に詳細に規定されていると考えられるが、入手することはできなかった。このため、げっ歯類の手術のうち術後も生存させる手術（生存手術）について、本年度は海外（主に米国）の大学等の施設の動物倫理委員会（IACUC）のガイドライン等を調査した。それらのガイドラインは、動物保護法（米国）及び動物実験の指針（実験動物の管理と使用に関する指針（米国学術研究会議）等）、ALAAC (Association for the Assessment and Accreditation of Laboratory Animal Care International) 等の基本的考え方に基づき動物の手術に関する具体的な規定や事例が示されており、生存手術に関しては人の手術に相当する手術環境、設備及び術者の手技等が示されていた。細菌共存環境の影響を排除し、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等の適切な実施には、これらのげっ歯類の生存手術に関するガイドラインの遵守が必要と考えられた。

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、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収集する。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。

なお、本年度実施予定であった海外の GLP 適合施設における上記情報を収集するためのアンケート調査は、十分な数の海外の GLP

適合施設へのアンケート調査の実施が難しいことが判明したため、実施しなかった。

B. 研究方法

実験動物の手術のうち術後も生存させる手術（生存手術）について、米国動物保護法（AWA）及び指針（実験動物の管理と使用に関する指針：Guide for the care and Use of Laboratory Animals 等）に無菌的な実施が必要とされており、日本においても「動物実験の適正な実施に向けたガイドライン」（2006年6月1日。日本学術会議）に、大規模な生存手術には無菌操作は不可欠であり、小規模生存手術の場合は大規模手術ほど厳密でないが器材の滅菌は必要とされている。また、実験動物の倫理的取り扱いに関するガイドライン（ALAAC 等）にも、手術時の無菌性等の規定があり、また、無菌手術等に関する概略が記載されている。ただし、その具体的な内容についてはこれらの法律や指針等には記載されていない。

げっ歯類の生存手術に関する飼育環境、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ついては、GLP 適合施設等では SOP 等に詳細に規定されていると考えられるが、それらを入手することはできなかった。そこで、海外（主に米国）の規制当局等から発出されているガイドライン等をもとに作成された海外の大学等の動物倫理委員会（IACUC：Institutional Animal Care and Use Committees）によるガイドラインに注目した。本年度は、上記指針やガイドライン、IACUC 並びに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記述等の文献等を「Aseptic surgery、Rodents、

Guidelines」等の key word により検索し、げっ歯類の生存手術に関する詳細な情報を収集した。検索された文献のうち、詳細が記載されているものについて日本語に翻訳した。

また、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. 実験動物の倫理的取り扱いに関する規制を踏まえた手術等の規定に関する情報収集

本年度は以下のようなガイドライン等から、げっ歯類の生存手術に関する飼育環境、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の情報を収集した。

- (1) 調査により収集したガイドライン等
 - ① Rodent aseptic surgery guidelines (ALAAC)
 - ② Guide for the Care and Use of Laboratory Animals (実験動物の管理と使用に関する指) Institute of Laboratory Animal Resources (Commission on Life Sciences National Research Council (米国学術研究会議)) 8th edition 2010
 - ③ Guidelines for Survival Rodent Surgery (NIH Guidelines)
 - ④ Practical guidelines for aseptic surgery in rodents and the management of surgical facilities in a laboratory (ANZCCART (The Australian and New Zealand Council

for the Care of Animals in Research and Teaching) Fact Sheet) .

- ⑤ IACUC Guideline 8 - Rodent Surgery Guidelines (Pennsylvania 大学 IACUC)
- ⑥ Rodent Surgery Application of Aseptic Technique and Perioperative Care (Texas 大学 San Antonio 校 Laboratory Animal Resources Center (LARC) で行う「げっ歯類手術実践ワークショップ」の配布資料)
- ⑦ Survival Surgery Procedures : Rodents(Johns Hopkins 大学 IACUC)
- ⑧ Experimental Surgery (Minnesota 大学 RAR (Research Animal Resource) IACUC)
- ⑨ Guidelines for Survival Surgical Procedures and Post-Operative Care in Rodents (Jefferson 大学 IACUC. 2011年)
- ⑩ Rodent Surgery Guidelines (Procedures in Rodent Survival Surgery) (Boston 大学 IACUC)
- ⑪ Guidelines for Rodents survival Surgery (The Academy of Surgical Research (ASR)) Bernal J et al., J. Investigative surgery, 22, 445-451, 2009

以上のガイドライン等の中で、⑥Texas 大学 San Antonio 校 Laboratory Animal Resources Center (LARC) が実施する「げっ歯類手術実践ワークショップ」の配布資料が、最も詳細かつ具体的なげっ歯類の生存手術に関する飼育環境、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の情報が記載されていた。このガイドラインは、上記②の米国学術研究会議（NRC）の指針「実験動物の管理と使用に関する指針」に基づいて作成されている。LARC では、この資料で概説した原則は正しいが、各施設の方針とガイドラインを遵守することとしている。本報告では主に⑥のガイドラインを用い、不足する情報は他のガイドラインを用いた。

(2) げっ歯類の生存手術に無菌操作を用いる根拠

げっ歯類の生存手術にも無菌操作を用いる根拠は、「実験動物の管理と使用に関する指針」（NRC、上記②の文献）に、以下のように示されている。

無菌状態を維持することの重要性：

- マウス及びラットには術後感染に対する抵抗性があるとされているが、緑膿菌、ネズミコリネ菌、マウス肝炎ウイルス、スピロヌクレウス・ムリスなどの不顕性感染がストレスまたは免疫抑制によって臨床疾患に至る経緯を報告した記事が文献上に多数存在する (Foster, *et al.*, 1982)。
- 従来、研究者らはげっ歯類の手術を非無菌的に行っていた。しかし、ラット及びマウスの場合、感染は不顕性であることを示唆するエビデンスが実験から得られている。無菌手術法の導入により食餌／水分の摂取量が増え、術後の回復が改善したことも報告されている (Cunliffe-Beamer,

T.L., 1972-73. Cunliffe-Beamer, T.L. *Biomethodology*, 1983)。実験的に誘発したラットの創感染には、肉眼的な臨床徴候または明白な行動的徴候が伴わなかった (Bradfiels, Schachtman, McLaughlin, Steffen)。不顕性感染は行動的・生理的变化を引き起こす可能性がある (「ラットの不顕性創感染が行動及び生理に及ぼす影響」、*Lab. Animal Science*, 42 (6), 572-578, 1992. 正誤表, Vol 43(2), 20, 1993)。

このため、げっ歯類の感染に対する抵抗性は特殊なものであると思ひ込むのは危険である。げっ歯類モデルは抗菌研究に用いられており、げっ歯類は手術に起因する疾患などヒトの細菌性疾患を模すために使用されてきた。この事実は、術後感染など感染症の発現に関しては、げっ歯類とヒトなど他の哺乳類種との間に差がないと考えられることを示唆している (Morris T., *Laboratory Animals*, 1995, Vol 29, page 26)

(3) げっ歯類の生存手術に関する手術環境等 (昨年度までの調査内容との比較のため、主に無菌操作に関連するもののみを抜粋)

1) 手術の準備

上記ガイドライン⑥「Rodent Surgery Application of Aseptic Technique and Perioperative Care」より必要部分を引用し、一部を追記及び改変)

「げっ歯類の一般的な実験的手術

の特性 (より大型の種と比べて切開部が小さいこと、手術チームの人数が少ないこと、1回の手術で複数の動物を手術すること、手術時間が短いことなど) により、標準的無菌操作の修正が必要、もしくは望ましい場合がある (Brown 1994; Cunliffe-Beamer 1993)。げっ歯類の手術に特有の問題に対処するための有用な提言がなされている (Cunliffe-Beamer 1983, 1993)。

*手術の場所等

ラットやマウスには、米国学術研究会議の指針がより大型の種のために規定しているような手術室は不必要であり、以下がげっ歯類の生存手術に必要なまたは必須とされている。

①術中はげっ歯類の手術専用となる清潔で整然とした (片付いた) 消毒済みの区画。

②埃がなく、手術に関係のない機器は置かれていない。

③動物の準備、術野、動物の回復の機能が分離されている。長いベンチトップの上を分割した区画でもよいが、動物の準備は手術を行う部屋とは別の部屋で行うのが最も望ましい。その理由は動物の抜け毛、切開部の消毒液の飛沫、床敷の埃や付近のケージから飛んでくる体毛によって術野が汚染されるのを防ぐためである。

④塵埃による汚染を防ぐために供給ダクトの下は避けること。

⑤余計な邪魔が入ったり、気流が生

じたりするのを防ぐために出入りなど通行量が多い場所は避けること。

手術台の表面の消毒については、手術を行う前後には手術台の表面を

清潔にし、あらゆる微生物を除去することとされ、その際に使用する消毒薬は以下の表1のとおりである。

表1 手術台等の表面の消毒に推奨される消毒薬

AGENT	EXAMPLES [*]	COMMENTS
Alcohols	70% ethyl alcohol 85% isopropyl alcohol	Contact time required is 15 minutes. Contaminated surfaces take longer to disinfect. Remove gross contamination before using. Inexpensive.
Quaternary Ammonium	Roccal [®] , Quatricide [®]	Rapidly inactivated by organic matter. Compounds may support growth of gram negative bacteria.
Chlorine	Sodium hypochlorite (Clorox [®] 10% solution) Chlorine dioxide (Clidox [®] , Alcide [®] , MB-10 [®])	Corrosive. Presence of organic matter reduces activity. Chlorine dioxide must be fresh; kills vegetative organisms within 3 minutes of contact.
Glutaraldehydes	Glutaraldehydes (Cidex [®] , Cetylicide [®] , Cide Wipes [®])	Rapidly disinfects surfaces.
Phenolics	Lysol [®] , TBQ [®]	Less affected by organic material than other disinfectants.
Chlorhexidine	Nolvasan [®] , Hibiclens [®]	Presence of blood does not interfere with activity. Rapidly bactericidal and persistent. Effective against many viruses.

^{*} The use of common brand names as examples does not indicate a product endorsement.

(Jefferson 大学 IACUC. 2011 年より)

昨年度実施調査を行った2つの施設で使用されていた HEPA フィルターに関しては、上記ガイドライン④ (ANZCCART のガイドライン) に以下のように記載されていた。

げっ歯類の手術は通常、キャビネット内の動物とこれを扱う術者の双方をエアロゾルの危険性から保護する効果を発揮する高性能粒子除去 (HEPA) フィルターを備えたクラス II の生物学的安全キャビネット内で行う。感染による危険も多いが、それとは別にエアロゾルによる危険も職業性喘息及び実験動物アレルギー

ーを引き起こす。

*** 器材類の滅菌等**

①手術器具はオートクレーブ滅菌しなければならない。必ずインジケーターを使用してその器具が無菌であることを確認すること。

その他、器具等の素材により、乾熱滅菌、ガス滅菌、グルタルアルデヒド滅菌等も用いることができる。

②器材類は全てリネンまたは特殊紙で二重包装するか、フィルターつきの特殊金属容器に入れてから滅菌しなければならない。包装した

器具の全てに有効期限を記入すること。

- ③バッチ手術（同じ器具を複数の動物に使用）を行う場合は、次の動物に移る前に器具を清拭し先端部を再滅菌する（例、高温ビーズ滅菌器を使用する等。手技が1回終わるごとに器具を滅菌するのに最も適している。）。器具を2セット用意して動物が替わるごとに交互に使用してもよい。

（注：1日かけてバッチ手術を行う場合、午前中に使用した器具は午後にオートクレーブ滅菌済みの新しい器具と交換すること。この滅菌法を5匹以上のげっ歯類に使用することは推奨できない（施設のガイドラインに従うこと）。新たな群の動物にはオートクレーブ滅菌済みの新たな器具セットを使用しなければならない。）

* 動物の準備

①除毛

- a) 剪毛 切開部周囲の体毛を小型のバリカンで剪毛する。体毛が創を汚染しないように、また切開部周囲が消毒できるように十分広めに剪毛するが、動物の体温調節能が低下するため除毛しすぎないこと。絆創膏の粘着面を使用して抜けた体毛を除去する。
- b) 脱毛 マウス（他のげっ歯類とは異なり）の毛嚢はテロゲンつまり休止期にあるため、傷つせずに除毛することができる。

- c) 脱毛クリーム 脱毛クリームを長時間皮膚に塗布しておくこと化学熱傷を引き起こすおそれがあるため、塗布時間を厳格に守ること。

②手術部位の消毒（消毒剤の種類と消毒の範囲）

- ・アルコールのみを使用するのは不適切である。
- ・標準的な手術準備はヨードフォア（ポピドンヨード製剤）または4%グルコン酸クロルヘキシジンと70%アルコールを交互に使用して3回消毒する。
- ・ガーゼまたは綿棒を使用して円を描きながら消毒すること。
- ・剪毛部の中心から初めて外側に向かって拭いていく。
- ・絶対に同じスポンジで中心に戻らないこと。
- ・ヨードフォアまたはクロルヘキシジンスクラブとアルコールを交互に使用して消毒し、最後はヨードフォアまたはクロルヘキシジン溶液（スクラブでないもの）で拭くこと。消毒石鹸は皮下組織を刺激するため使用しない。
- ・低体温症を引き起こすおそれがあるため動物を濡らしすぎないように注意する。

- ③切開部位以外の部位からの感染をさけるためのドレープ等の使用 内臓または滅菌器具が未消毒の皮膚や体毛に接触する可能性がある場合はドレープ（覆布）で

覆うこと（ドレーピング）が必要とされている。昨年度実地調査した2施設ともドレープを使用していた。

使用できるドレープの種類

- ・手術用ペーパードレープ（低価格でオートクレーブ可能）

穴が予め開いているものと、自分で穴を開けなければならないものがある。ペーパードレープの欠点は、動物を覆ってしまうため動物の麻酔状態等の監視に支障がでる場合があることである。（濡らさないように注意）

- ・布製ドレープ（濡らさないよう注意）
- ・プラスチックドレープ（動物をよく観察できるという利点がある。）
- ・動物の身体が乾いている場合（滅菌ガーゼで消毒済みの皮膚を拭いて乾かす）は、透明の粘着性ドレープ
- ・Glad の Press'n Seal（サラップのようなもの）は術野を無菌的かつ効果的に覆うことができる経済的な方法である。これは食品用の製品であるが、Utah 大学において試験した結果、微生物及び有機物質は全く存在しなかった。透明なこの素材は、粘着面で動物（全体）を覆っても容易に監視ができる。窒息しないように必ず鼻を出しておくこと。
- ・滅菌ガーゼスポンジ

- ・ストッキネット（動物に被せると簡単に滅菌野を形成できる。）

- ・マウスの場合、予め～8.5_6 インチに切断したアルミホイル片（重ねてオートクレーブ滅菌したもの）（術者は滅菌ホイルを手につか、手術部位に直接置く。助手はマウスを手術の種類に応じて背臥位、腹臥位、横臥位のいずれかによりホイル上に載せる。術者がマウスを望ましい方法で包んで固定する（マウスには触れないこと）。手術終了時に術者はホイルで包んだマウスを助手に手渡す。）

- ・ラットには厚手のホイルが必要な場合がある。（厚手のホイルはマウスに例外的な体位を取らせる場合（胸腺内注入またはアブレーションのための胸部入口部、会陰の処置など）に有用である。術者がまぶしくないように必ず光沢のある面を内側にして使用すること。

*手術担当者の準備

- ① 逆性石鹼で手洗いをする。
 - ② 手術用滅菌手袋、マスク、清潔な実験着を着用する。パウダー付手袋を用いる場合は滅菌生理食塩水でパウダーを落とす。手袋のパウダーは動物に対して異物反応を引き起こす異物である。
- ・バッチ手術を行う場合は手袋を取り替えるか、手袋をした手指を化学滅菌剤で洗浄し生理食塩

水ですすぐ（手袋に残留した滅菌剤は実験動物の組織を刺激し局所感染のリスクを増大させる）。滅菌タオルで拭き取る。手袋が着け心地が悪くなったり、破れたり、穴が開いたりした場合は新しい滅菌手袋を装着する。

③無菌状態の維持（ガウン非着用）

- 手袋をした手は腰の高さより上に挙げ、切開部と滅菌した物品（滅菌器具のトレー、滅菌ドレープ）以外は触らないこと。
- 一旦手袋を装着したら非滅菌部分に触ったり、寄りかかったりしてはならない。手を下げてはならない。自分の皮膚や衣服を手袋で触ってはならない。
- 器具は常に滅菌パウチまたは滅菌表面から取り上げる。汚染のおそれがあるため器具を包装／ドレープの縁に接触させてはならない。
- 手術器具を手術台から落とすてはならない。落ちた器具はもはや無菌ではないため、拾って使用しないこと。
- 滅菌表面は乾燥させておく。湿気は術野の汚染の原因となるおそれがある。

手指の洗い方については、昨年度までの調査で得た情報と異なり、洗浄剤、洗浄部位やスクラブの使用には言及していないが、滅菌手袋の装着については以下のような詳細な指示があり、また、ビデオでも説明するなど、手袋の外側を直接手で触れない

ことにより汚染を避けることとされている。逆性石けんで洗浄後にイソジンのスクラブを行う旨が規定されているガイドラインもある。

• 手術用手袋の装着

- ①滅菌操作により手袋を開封する（包装の内部は無菌であることを忘れてはならない—検査用手袋は滅菌手袋とは異なる。）
- ②手袋の外側表面が汚染しないように装着する。
- ③開封した包装から片方の手袋を折り返した袖口を持って持ち上げる。
- ④その手袋を手を回すようにしながら装着する。
- ⑤手袋をした指をもう一方の手袋の袖口に差し入れる。
- ⑥手袋をした指を袖口に差し入れたまま、手袋をもう一方の手にはめる。折り返した袖口が手袋をした手を汚染から守ってくれる。
- ⑦手袋に手が入ったら折り返した袖口を手術着の袖にかぶせる。
- ⑧次に指を最初の手袋の袖口に入れて手術着の袖にかぶせる。

* 手術の手技

- ① 術中は手袋をはめた手の動作と滅菌器具の移動を制限して術野の汚染を最小限に抑える。
- ② 皮膚または体壁にある大血管を回避するために計画的に切開する。
- ③ 壊死の原因となるため組織は丁寧に扱い、組織を圧排する際には

過剰な力を加えない。

- ④ 出血は回避または最小限に抑えなければならないが、出血した場合は滅菌ガーゼスポンジ、綿棒、ゲルフォーム・スピアで血液を吸い取る。組織を損傷し、新たな出血が生じる原因となるおそれがあるため、拭き取るような動作は避け、吸い取るようにすること。
- ⑤ 創が汚染した場合は、体温程度に加温した滅菌乳酸加リンゲル液または生理食塩水で汚染部位を流し洗う。

(4) 手術切開創の管理（昨年度までの調査内容との比較のため、切開創の閉じ方及び術後感染管理のための抗菌剤の使用に関する部分のみ抜粋）

*切開創の閉じ方

切開創を針と糸で縫合する場合

について、①組織の種類に合った種類の針の使用、②針の使い方、③糸の種類、④縫合の仕方、⑤縫合、及び⑥結紮等が、詳細に記載されている。また、創傷クリップ、ステープル及び／または組織接着剤を使用する場合がありますとされている。さらに、組織接着剤に関して、張力が加わらない創の場合は、短い切開部の皮膚を接着する、または縫合糸間の皮膚切開部を補強するために使用するとされ、シアノアクリレート皮膚接着剤（例、Vetbond、Nexaband、Dermabond）を用いるとのことである。この接着剤の使用についても詳細な説明がある。切開創を閉じる際に使用する糸や接着剤については表2を参照のこと。

表2 切開創を閉じる際に使用する糸や接着剤

MATERIAL*	CHARACTERISTICS AND FREQUENT USES
Polyglactin 910 (Vicryl®), Polyglycolic acid (Dexon®)	Absorbable; 60-90 days. Ligate or suture tissues where an absorbable suture is desirable.
Polydioxanone (PDS®) or, Polyglyconate (Maxon®)	Absorbable; 6 months. Ligate or suture tissues especially where an absorbable suture and extended wound support is desirable
Polypropylene (Prolene®)	Nonabsorbable. Inert.
Nylon (Ethilon□)	Nonabsorbable. Inert. General closure.
Silk	Nonabsorbable. (Caution: Tissue reactive and may wick microorganisms into the wound, so silk is not recommended for skin closure). Excellent handling. Preferred for cardiovascular procedures.
Chromic Gut	Absorbable. Versatile material.
Stainless Steel Suture/Wound Clips/Wound Staples	Nonabsorbable. Requires instrument for removal.
Cyanoacrylate (Vetbond®, Nexaband®, Tissue Mend®)	Skin glue. For non-tension bearing wounds.

(Jefferson 大学 IACUC. 2011 年より)