

れがある。)

*感染管理のための抗菌剤等の使用

昨年度実地調査を行った2つのGLP適合施設においては、ペニシリンを手術1日前又は当日から手術後2日目まで投与していたが、米国学術研究会議のガイドラインには以下のように記載されている。

抗生物質の予防的投与

無菌的手術の術技等を忠実に守れば必要になることはほとんどないが、使用する場合は以下の指針を念頭に置くこと：

- ①抗生物質は三流の外科医を二流の外科医にしてくれることはあるが、二流の外科医が抗生物質によって一流外科医になれることは絶対はない
- ②術中に高い組織内濃度に達するように術前に投与する
- ③術前の抗生物質投与によって複雑な手術の感染リスクを低減することができる
- ④一般的に術後に抗生物質を投与する必要はない
- ⑤抗生物質を使用する場合は、広域スペクトルのものを使用する
- ⑥「優れた抗生物質も下手な手術の尻拭いはしてくれない」。つまり、抗生物質の予防的投与は正しい無菌手術の実践に代わるものではないとされている。

(注：モルモット、ウサギ、ハムスターの場合、抗生物質の不適切な使用により死亡するおそ

- (5) 手術後の動物の飼育（昨年度までの調査と比較するため、該当部分のみ抜粋）

術後の動物の体温管理、麻酔からの覚醒時の注意点、節水、栄養摂取、創口の管理（感染防御、抜糸等を含む）等に関する記載はあるが、1ケージに何匹飼育するかについては、明確に記載されてない。ただし、倫理的には1ケージに1匹と考えられる。このため、複数の動物を1ケージで飼育する場合の注意として、他の動物による障害が起きないように注意することとされている（Bernal, et al., J. Investigative surgery, 2009）

- (6) その他

げっ歯類の生存手術において特に注意が必要な事項として、以下のようなものがあり、試験結果に与える影響を最小限とするためにこれらの事項を考慮したげっ歯類の取り扱いが詳細に規定されている。これらの詳細な規定は、昨年度調査した試験実施施設で遵守されていた規定と同じであった。

げっ歯類の生存手術においては、手術により傷を最少にし、術中及び術後の感染を制御し、また、痛みや栄養状態を適切に管理することにより、手術による生体反応への影響を減らすべきであるとされ、その理由及び注意点等がガイドライン等に示されている。

- 1) ラット及びマウスは体容積に対する体表面積比が高く、代謝が速い。

- ① 代謝速度が速く脂質蓄積量が小

さいためエネルギー枯渇はストレスとなるおそれがある。

- ② より大型の動物と比べ、薬物の作用を発現するために用いる用量が多い。
- ③ 単位時間あたりの脱水速度が速い。
- ④ 除毛部分から体温が急速に失われていく。この低体温による術中の死亡がしばしば起こる。

2) 手術ストレス

- ① 手術に対する主な特徴的反応は、カテコラミン、コルチコステロン、成長ホルモン、バソプレシン、レニン、アルドステロン、プロラクチンの血漿中濃度上昇と、FSH、LH、テストステロンの血漿中濃度低下である。血漿中のインスリン及びグルカゴン濃度は不安定である。組織外傷に対するこうしたホルモン反応によってグリコーゲンと脂質の分解が促進されて高血糖症が起きる。高血糖症の持続時間は様々であるが、大手術後の場合はこの反応が4~6時間持続することがある。蛋白質代謝の変化はより長く持続し、負の窒素バランスが数日間持続する。小手術であっても影響が長時間持続することがある。
- ② 組織の外傷を最小限に抑え、感染を予防し、術後の疼痛と不快感を管理し、動物の栄養必要量を満たすことによって手術に対する代謝反応が小さくてすむ。生存手術の目的は、未処理群との間のばらつきが極めて低い規定の動

物モデルを作成することである。重要な目標はできる限り迅速に動物を生理的に正常な状態、あるいは規定の（異常）状態に転換することである。

3) 止血（げっ歯類のみでなく、一般的な事項）

- ① 術中の出血を最小限に抑えることが、以下の理由により必要である。
 - ・ 血液は細菌にとって完全な増殖培地である。
 - ・ 失血によって回復不良となり死亡率も高くなる。
 - ・ 失血によって術後の回復時間が長引く失血が研究の交絡因子となるおそれがある。

その理由は：

- ② 出血を最小限に抑えるためにすべきこと
 - ・ 組織面を長軸に沿って切開する。
 - ・ 筋肉を横軸方向に切開してはならない。
 - ・ 大血管を特定して隔離する。
 - ・ 解剖学的構造を理解する。

4) 組織の損傷・汚染を防ぐ（げっ歯類のみでなく、一般的な事項）

- ① 損傷及び感染は動物に悪影響を及ぼし、また実験データの交絡因子となる。以下の4原則を守って組織の損傷と感染を低減する
 - ・ 「手術は優しく」：組織を乱暴に扱うと疼痛が増す。
 - ・ 「時間による損傷」：器官を室内環境に曝すことは組織にとって有害である。露出時間が長い

ほど損傷の程度は大きくなる。手技の速度と質の正しいバランスを見出すこと。手術が 90 分以上に及ぶと感染の確率も 3 倍に上昇する。

- ・「湿潤な組織は良好な状態」：加温した滅菌生理食塩水または乳酸加リンゲル液により組織を常に湿潤に保って乾燥を防ぐ。
- ・「汚染は希釈により可能な限り除く」：感染性微粒子の個数（免疫応答性動物の場合、通常は感染性微粒子～106 個／組織 1g）が動物の免疫系の能力を超えた場合に感染が起きる。この資料に記載されている無菌法をできるだけ忠実に守り、創傷部位の微生物数を低減する。汚染した場合は大量の体温程度に加温した洗浄液（滅菌生理食塩水または乳酸加リンゲル液）で汚染物質を希釈する。

以上のように、IACUC の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関するガイドライン中の詳細な規定は、CDC (Center for Disease Control) の Guideline for the Prevention of Surgical Site Infection (手術部位感染防止ガイドライン) に示された人の手術環境、設備及び術者の手技等とほぼ同様な内容であった。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

に関するガイドインの遵守が必要と考えられた。昨年度までの調査結果から、GLP 適合施設等では、これと同等又は準じる方法でげっ歯類の生存手術が実施されていると考えられた。

2. 文献調査について

本年度は、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収集した。既に報告したような感染等の慢性的炎症による発癌の可能性を強くする論文が散見されているが、それ以外には特に注目すべき情報はなかった。

E. まとめ

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、初年度は本邦の GLP 適合施設等を有する法人へのアンケート調査を行い、昨年度は 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（infusion 試験におけるカニューレの留置のための手術）に関する実地調査及び情報収集を行った。本年度は、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、ALAAC (Association for the Assessment and Accreditation of Laboratory Animal Care International) 等の基本的考え方にに基づき、げっ歯類の生存手術における無菌手術（Aseptic Surgery）の重要性を勘案した具体的な規

定が示されており、その内容は CDC の手術部位感染防止ガイドラインに示された人の手術環境、設備及び術者の手技等とほぼ同様であった。

細菌共存環境の影響を排除し、検体の物理的形状に依存せず、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。

日本においても、特に大学等における実験動物の取扱いに関して、本調査により収集した情報を何らかの形で提供していきたいと考える。

参考又は引用文献

1. CDC: Guideline for the Prevention of Surgical Site Infection (手術部位感染防止ガイドライン) , 1999. Infect Cont Hosp Epidemiol 1999;20:247-278
<http://www.cdc.gov/ncidod/dhqp/pdf/guidelines/SSI.pdf>
2. Rodent aseptic surgery guidelines (ALAAC)
3. 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) 8th edition 2010
4. Guidelines for Survival Rodent Surgery
<http://oacu.od.nih.gov/ARAC/surguide.pdf>
5. 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) .

6. IACUC Guideline 8 - Rodent Surgery Guidelines (Pennsylvania 大学 IACUC)
7. Rodent Surgery Application of Aseptic Technique and Perioperative Care (Texas 大学 San Antonio 校 Laboratory Animal Resources Center)
<http://research.utsa.edu/files/larc/RodentSurgeryApplicationhandouts.pdf>
8. Survival Surgery Procedures :Rodents (Johns Hopkins 大学 IACUC)
9. Experimental Surgery (Minnesota 大学 RAR (Research Animal Resource) IACUC)
<http://www.ahc.umn.edu/rar/surgery.html>
10. Guidelines for Survival Surgical Procedures and Post-Operative Care in Rodents (Jefferson 大学 IACUC. 2011 年)
11. Rodent Surgery Guidelines (Procedures in Rodent Survival Surgery) (Boston 大学 IACUC)
<http://www.bu.edu/orcccommittees/iacuc/policies-and-guidelines/rodent-surgery-guidelines/>

12. Guidelines for Rodents survival Surgery (The Academy of Surgical Research (ASR)) Bernal J et al., J. Investigative surgery, 22, 445-451, 2009

13. Immunosuppression and selective inflammatory cell depletion. Studies on a guinea pig model of corneal ulceration after ocular alkali burning. Foster CS, Zelt RP, Mai-Phan T, Kenyon KR. Arch Ophthalmol. 1982 Nov;100(11):1820-4.

14. CDC: Guideline for the Prevention of Surgical Site Infection (手術部位感染防止ガイドライン, 1999. Infect Cont Hosp Epidemiol 1999;20:247-278
<http://www.cdc.gov/ncidod/dhqp/pdf/guidelines/SSI.pdf>

Sci. 115 (Suppl. 1), 175P.

第 84 回日本薬理学会年会要旨集 (一般演題 ; 2011 年 3 月 30 日、横浜)

2) 古荘諭美、小澤美香、懸川友人、大室 弘美

マクロライド抗生物質がスプライシング関連因子の細胞内動態に及ぼす影響
日本薬学会第 131 年会要旨集 30P-0480
(一般演題 ; 2011 年 3 月 30 日、静岡)

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

F. 健康危惧情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表等

1) 「薬事法規・制度及び倫理 解説」(分担執筆)、2011-12 年版薬事日報社、薬事衛生研究会編集 平成 23 年 4 月 1 日発行

2. 学会発表

1) Yoshida L. S., Kohri S., Fujii H., Yuda Y., and Takano-Ohmuro H.
Evaluation of radical scavenging properties of shikonin. *J. Pharmacol.*

別添 5

III. 研究成果の刊行に関する一覧表

該当無し。

IV. 研究成果の刊行物・別冊

該当無し。

げっ歯類の手術 無菌操作の実施と周術期管理

Marcel I. Perret-Gentil, DVM, MS
テキサス大学サンアントニオ校
実験動物資源センター
大学専任獣医師・センター長
(210)458-6692
larc@utsa.edu

この文書の目的

これは実験動物資源センター（LARC）で行う「げっ歯類手術実践ワークショップ」の配布資料である。この資料で概説した原則と方法は正しいものであるが、各自の施設における方針とガイドラインは遵守すること。

規則およびガイドライン

- ・ 実験動物の管理と使用に関する指針（米国学術研究会議）はオンライン <http://www.nap.edu/bookstore/isbn/0309053773.html> で閲覧、購入することができる。この指針にはこう記載されている：「げっ歯類が比較的手術感染しやすいことが論議されている；不顕性感染が有害な生理学的、行動学的反応を引き起こすおそれがあることをこれまでのデータは示唆しており（Bradfield et al., 1992; Cunliffe-Beamer 1990）、この有害反応は手術の成功と研究結果の双方に影響を及ぼす可能性がある。」
- ・ げっ歯類に関する OLAW ガイドラインによれば、手術は専用施設を必要としないが、無菌操作により行わなければならない。
- ・ UTSA IACUC におけるげっ歯類の生存手術に関する方針は次のサイトに掲載されている。
<http://vpr.utsa.edu/oric/iacuc/programpolicies.php>

げっ歯類の手術に無菌操作を用いる根拠

無菌状態を維持することの重要性（NRC「実験動物の管理と使用に関する指針」）：

- マウスおよびラットには術後感染に対する抵抗性があることが喧伝されているが、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。しかしラットおよびマウスの場合、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およ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）。

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いつくのは危険である。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）。

定義

- ・ **滅菌状態**：生存微生物およびその芽胞が全く存在しない状態。
- ・ **無菌状態**：微生物数が極めて少ない状態。生存する病原性微生物が存在しない状態；無菌の状態。
- ・ **無菌手術**：滅菌手袋、滅菌器具などを使用し、外部環境からの感染性微生物の侵入に対する予防措置を講じて行う手術。
- ・ **汚染された／コロニー形成された**：細菌／微生物が存在する（ $<10^6$ /組織 1 グラム）状態。臨床徴候は現れる場合と現れない場合がある。免疫反応により感染を回避できる可能性がある。
- ・ **感染／敗血症**：細菌／微生物が存在する（ $>10^6$ /組織 1 グラム）状態。臨床感染が顕在化し、組織培養の結果は陽性である。

0 Bacteria

Sterile

Aseptic

Contaminated

>1,000,000

Infected

- ・ **滅菌**：生存微生物を全て排除または破壊する過程。十分な滅菌であると判断できる基準は、増殖促進培地を添加した場合に微生物が増殖しないことである。
- ・ **消毒**：病原性生物を破壊するための化学的または物理的過程。消毒薬は全て栄養型の微生物には有効であるが、芽胞に対しては必ずしも有効ではない。
- ・ **大手術**：体腔を貫通および露出させる、または物理的・生理的機能の著しい低下を伴う外科的介入（開腹術、開胸術、開頭術、関節置換術、四肢切断術など）。
- ・ **小手術**：体腔を露出させず、物理的機能の低下を全くあるいはほとんど伴わない外科的介入（創縫合；末梢血管へのカニューレ挿入；去勢、除角、脱出修復など家畜に対する日常的処置；動物病院の「外来」で日常的に行われている処置の大半、など）。

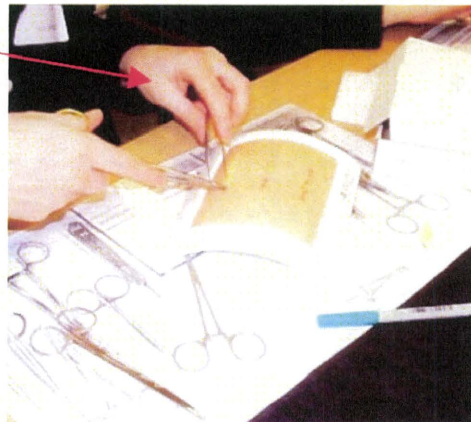
優れた手術技術の条件とは：

- ・ 無菌状態を維持できること
- ・ 組織を穏やかに取り扱えること

- ・ 組織切開を最小限に留められること
- ・ 器具を正しく使用できること
- ・ 効果的に止血できること
- ・ 適切な縫合材および縫合法を選択できること

技術は練習すればするほど上達し、磨きがかかる
一に練習、二に練習！！

間違った器具の持ち方—
 「手術手技」の項を参照



特に注意すること

- ・ ラットおよびマウスは体容積に対する体表面積比が高く、代謝が速い。
 - 代謝速度が速く脂質蓄積量が小さいためエネルギー枯渇はストレスとなるおそれがある。
 - より大型の種と比べて薬理的用量が高い。
 - 単位時間あたりの脱水速度が速い。
 - 除毛部分から体温が急速に失われていく。術中死の原因として多いのが低体温症である。
- ・ 手術ストレス：
 - 手術に対する主な特徴的反応は、カテコラミン、コルチコステロン、成長ホルモン、バソプレシン、レニン、アルドステロン、プロラクチンの血漿中濃度上昇と、FSH、LH、テストステロンの血漿中濃度低下である。血漿中のインスリンおよびグルカゴン濃度は不安定である。組織外傷に対するこうしたホルモン反応によってグリコーゲンと脂質の分解が促進されて高血糖症が起きる。高血糖症の持続時間は様々であるが、大手術後の場合はこの反応が4～6時間持続することがある。蛋白質代謝の変化はより長く持続し、負の窒素バランスが数日間持続する。小手術であっても影響が長時間持続することがある。
 - 組織の外傷を最小限に抑え、感染を予防し、術後の疼痛と不快感を管理し、動物の栄養必要量を満たすことによって手術に対する代謝反応が小さくてすむ。生存手術の目的は、未処理群との間のばらつきの程度が極めて低い規定の動物

モデルを作成することである。重要な目標はできる限り迅速に動物を生理的に正常な状態、あるいは規定の異常状態に転換することである。

止血

- ・ 術中の出血を最小限に抑えることが重要である。その理由は：
 - 血液は細菌にとって完全な増殖培地である
 - 失血によって回復不良となり死亡率も高くなる
 - 失血によって術後の回復時間が長引く
 - 失血が研究の交絡因子となるおそれがある
- ・ 出血を最小限に抑えるために
 - 組織面を長手方向に沿って切開する
 - 筋肉を横方向に切開してはならない
 - 大血管を特定して隔離する
 - 解剖学的構造を理解する

組織の損傷・汚染

- ・ 損傷および感染は動物に悪影響を及ぼし、また実験データの交絡因子となる。以下の4原則を守って組織の損傷と感染を低減する：
 - 「手術は優しく」：組織を乱暴に扱うと疼痛が増す。
 - 「時間による損傷」：器官を室内環境に曝すことは組織にとって有害である。露出時間が長いほど損傷の程度は大きくなる。手技の速度と質の正しいバランスを見出すこと。手術が90分以上に及ぶと感染の確率も3倍に上昇する。
 - 「湿潤な組織は上機嫌」：加温した生理食塩水または乳酸加リンガー液 (LRS) により組織を常に湿潤に保って乾燥を防ぐ。
 - 「汚染は希釈で解決」：感染性微粒子の個数（免疫応答性動物の場合、通常は感染性微粒子 $\sim 10^6$ 個/組織1グラム）が動物の免疫系を凌駕した場合に感染が起きる。この資料に記載されている無菌法をできるだけ忠実に遵守して、創傷部位の微生物数を低減する。汚染した場合は大量の加温洗浄液（滅菌生理食塩水または乳酸加リンガー液）で汚染物質を希釈する。



0 Bacteria
Sterile

Aseptic

Contaminated

>1,000,000
Infected

リスクへの対処

- ・ 100%保証された環境やリスクが皆無の環境などあり得ない
- ・ 以下の項目に応じて許容できるリスクの水準を規定しなければならない
 - 手術の種類
 - 手術の複雑性
 - 種
 - 不成功の場合の重大性

生体材料による影響

- ・ 臨床感染するために必要な細菌数が大幅に減少する。
- ・ 感染／敗血症
 - ～1000-10,000 個の細菌／微生物が存在する (Praston et al. J Clin Micro, 1993)
 - 臨床感染
 - 組織培養陽性



術前準備

- ・ 健康状態の評価。 推奨事項：
 - 動物施設への馴化期間を5～7日間設けて輸送によるストレスを克服させる。
 - 疾患を示す次のような臨床徴候が認められないこと：
 - ・ 外観的には姿勢および行動が正常で、体毛に光沢があり、目が輝いていること。
 - ・ 呼吸の特徴（くしゃみ、咳、異常呼吸音が認められない）および心血管の状態（アルビノ動物の場合、耳と粘膜が明るい桃色である）を評価する。
 - ・ 食餌および水分摂取量が正常である。
- ・ ラットおよびマウスの場合、通常絶食は不要である
ラットおよびマウスは嘔吐しないため、他の種のような術中／術後に嘔吐するリスクはない。消化管手術を行う場合は絶食させてもよいが、短期間（2～3時間）にすること。ただし絶食させる理由を慎重に検討し、止血に必要な正常代謝過程が阻害されることを考え合わせる。例えば24時間以上絶食させない限り胃は空にならないが、絶食により肝臓のグリコーゲン貯蔵量が激減する（「環境刺激の突然の変化に対する行動および心臓の反応：食餌摂取量の強制的変更による影響」、Steenbergen JM; Koolhaas JM; Strubbe JH; Bohus B. Physiology and Behaviour 45, 729-733. さらに Vermeulen JK, Vries de A, Schlingmann F, Remie R (1997). 「食餌剥奪：常識かナンセンスか？」 Animal Technology, Vol 48, No 2, pg 45-54）。

- ・ 動物の固定
 - 術野を管理するために四肢を固定しなければならない場合は、神経損傷や循環遮断を引き起こすおそれがあるため、四肢を過度に伸張しないこと。
 - 固定の必要がある肢のみを拘束する。動物は四肢の動きによって麻酔が浅くなってきたことを示すということを念頭に置く。
 - 関節を損傷したり、呼吸を阻害したりするおそれがあるため、四肢を不自然な方向に伸ばさないこと。
 - 四肢を拘束する必要がある場合は、手根部と前肢に絆創膏を巻くこと。背中側に通した1本の絆創膏で両手根部を繋いで前肢と体幹部を固定してもよい。
- ・ 麻酔をかけた動物の身体を決してテーブル代わりに使用しないこと。胸部または腹部に手や器具を置いてはならない。外側から圧力をかけると呼吸および血流が阻害される。

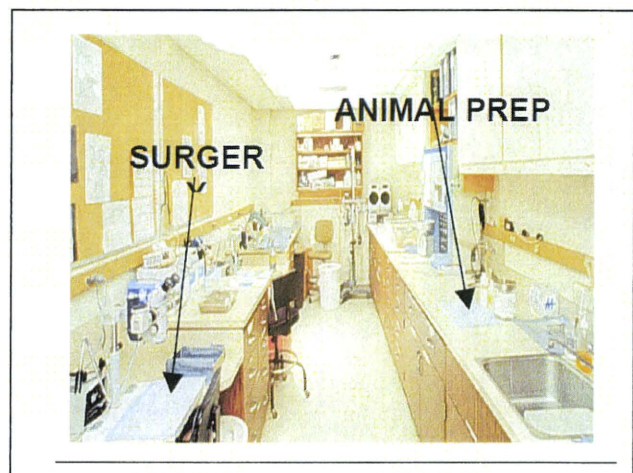
全般的な手術準備

NRC「実験動物の管理と使用に関する指針」には次のように記載されている：「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）」。



場所

- ・ ラットやマウスには、NRG 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る。
- ・ 以下が、げっ歯類の生存手術に必要なまたは必須である：
 - 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

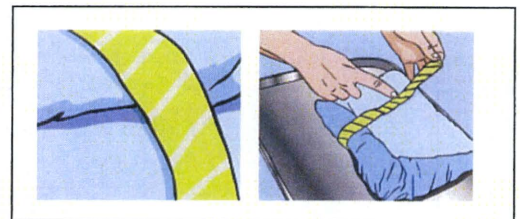
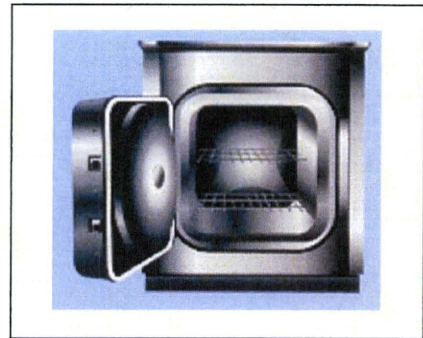


沫、床敷の埃や付近のケージから飛んでくる体毛によって術野が汚染されるのを防ぐためである。

- 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口など通行量が多い場所は避けること。

器材類

- ・ 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（例えば下図のストリップテストやケミカルカラーインジケーターを用いる）。適切な滅菌が行われた場合、感温変色ストライプは黒色に変色し、ケミカルカラーインジケーターは茶色に変色する。



非滅菌

滅菌

器材類は全てリネンまたは特殊紙で二重包装するか、フィルター付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。UTSA では包装が破れた（内容物の露出）または濡れた場合を除いて、包装の有効期限は滅菌後1年間としている。

オートクレーブは以下のように設定すること：

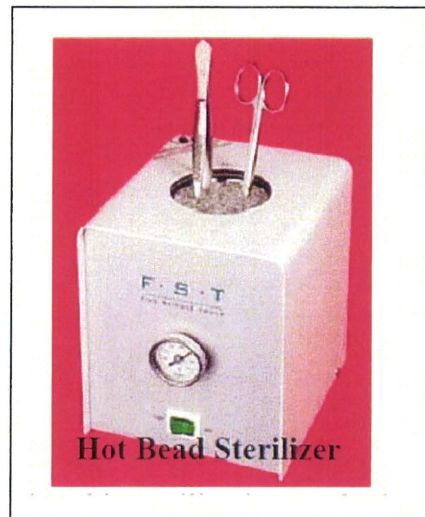
Autoclave Settings	Temp (F)	Pressure (PSI)	Time (min)
General Wrapped Items	250	20	30
Bottled Solutions	250	20	30
'Flashing'	270	30	4-7

「フラッシング」とは器具を包装せずに短時間オートクレーブする場合である。「フラッシング」は不可欠な器具を落とした場合に用いることが多い。

- ・ 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—次項を参照）。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。

- 高温ビーズ滅菌器

- この方法で滅菌できるのは器具の先端部だけである。
- 予めビーズを推奨温度まで加熱した後、器具を推奨時間差し込む（通常器具の先端部を 15 秒間差し込む）。
- 滅菌前に器具の肉眼で見える汚れは取り除いておかなければならない。
- 器具は組織に触れる前に冷却しなければならない。
- 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。
- 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。



- 液体滅菌剤（例、グルタルアルデヒド[Cidex]

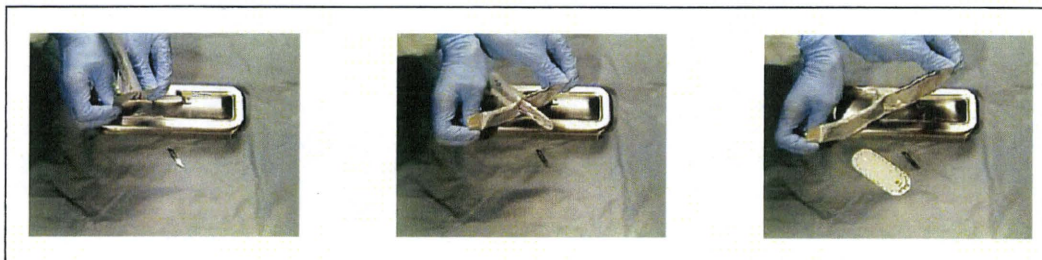
- 冷滅菌溶液を使用する場合は必ず器具を製造業者が規定する適切な時間浸漬し、また滅菌溶液の有効期限を守ること
- 溶液から取り出した器具は滅菌水、生理食塩水、アルコールのいずれかで洗浄すること
- 洗浄した器具は滅菌野に置かなければならない

- 精密な器具

- 精密な器具、移植材料、加熱すると溶解または損傷する器材はエチレンオキシド滅菌してもよい
- 残留ガスの毒性副作用を防ぐために包装は十分曝気すること
- 曝気には 24～72 時間かかる

- 包装された器具

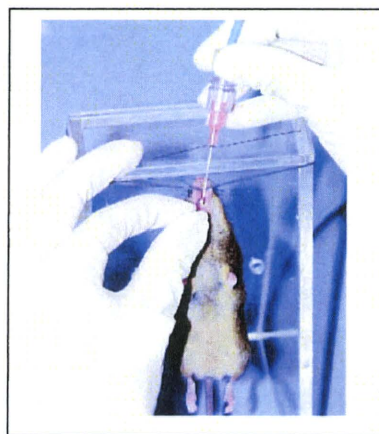
いったん包装を開封したら、他の滅菌器具は全て滅菌野に置かなければならない。包装は器具や手術セットが汚染しないように開封しなければならない。



- 器具類をまとめて手術セットを用意する
 - 先端部を同じ方向に向けて並べること。
 - 使用する順番に置くと便利である。
 - 手技が終わったら次の手技を行うまで器具の先端部を滅菌ガーゼで覆っておく。
 - 手術セットとドレープで覆った動物の間は無菌ではないことに留意すること；この部分に器具を置いてはならない。

動物の準備

- 待機中の動物と手術中の動物は、視覚的にも臭覚的にも分離しておくこと。
- 麻酔
 - 通常、げっ歯類の麻酔法として望ましいのは高精度気化器を用いたイソフルレンガス麻酔であると考えられている；しかし注射麻酔も可能である。
 - ガス麻酔は導入チャンバー内で導入するか、または先に麻酔カクテルを注射してもよい。
 - 麻酔を維持するためにガスマスクまたは気管内チューブを使用して麻酔薬を投与してもよい。気管内挿管はラットの場合は14～18ゲージ、マウスの場合は20～21ゲージの静脈カテーテルを鼻から胸郭入口部までの長さに切断して使用する。ラットおよびマウスの挿管に役立つ専用の装置やキットが市販されている。
 - ガスを最も安全に送出できる、校正済みの高精度気化器を使用することを推奨する。ただし以下のガイドラインに従って高精度気化器を使用せずにガスを送出してもよい：



導入には通常、濃度 2～5%のイソフルレンガスが適している。ガスを正しく使用するには導入チャンバーの容積を正確に把握する必要がある。チャンバーの容積を確認した後(この値はすぐに確認できる場所に控えておくとうよい)、容積1リットル当たり0.1～0.2 mlのガスを(ボトルから液状で)注入する。この作業は、容器の内底に綿球を入れ、これにボトルに入った液状ガスを染み込ませればよい。容器が小さい場合は組織学的検査用の組織カセットに綿を封入し、カセット内の綿に液体を注ぐか、染み込ませればよい。チャンバーの容積1000 mlにつき液状ガス0.2 mlを注入するとガス濃度は約4%である。エモリー大学獣医学研究室内の職員の経験によれば、未処理のICRマウス9匹(雄5匹・雌4匹；2ヶ月齢)を、イソフルレンを注入したチャンバー(0.2 ml/チャンバー容積1 L)に順次入れたところ、57+/-21秒後に横臥した。ただし迅速かつ効果的に導入するためにマウス約3匹ごとにチャンバーに液体を補充しなければならなかった。この方法でガスを送出する場合、外部に排気されるヒュームフードまたはクラスIIBの安全キャビネット

の下で行わなければならない。

Volume of liquid agent/ 1000 ml chamber volume	Approximate concentration of isoflurane or halothane
0.05 ml	1%
0.1 ml	2%
0.2 ml	4%
0.3 ml	6%

このガス麻酔の持続時間は極力短くすること。

- ・ 麻酔ガスの排除
 - 廃棄麻酔ガスは排除しなければならない。認められている方法は：
 - 換気テーブル。この方法は表面から 6~8 インチの位置でのみ有効である。麻酔を導入する際に、これより高い導入チャンバーを用いてはならない。
 - ケミカルフュームフード。
 - 外部に排気されるクラス IIB の安全キャビネット。
 - チャコールキャニスター。チャコールキャニスターは初回使用前、および使用の都度、計量しなければならない。大部分のキャニスターは推奨重量（通常 50 グラム）に達した時点で交換しなければならない。キャニスターのサイズと製造業者の推奨に応じて、特に長時間に及ぶ手術の場合は、術中にもキャニスターを計量して効果が持続しているかどうか確認すること。
 - 眼の保護：麻酔下の動物は眼軟膏を塗布して角膜を保護すること。角膜を傷つけるおそれがあるため軟膏のチューブの先が眼に触れないようにする。



- ・ 除毛
 - 切開部周囲の体毛を小型のバリカンで剪毛する。決して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。
 - 剪毛に替わる簡単な方法は抜毛である。通常、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、傷つけずに除毛することができる。
 - 脱毛クリームを使用してもよい。脱毛クリームを長時間皮膚に塗布しておくこと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。



• 手術部位の消毒：

- 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または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（スクラブではなく）で拭くこと。消毒石鹸は皮下組織を刺激する。
- 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。



• 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ピングが必要である。使用できるドレープの種類は：

- 手術用ペーパードレープ。低価格でオートクレーブ可能である。
 - 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、通常動物を覆ってしまうため監視がしづらい。
- プラスチックドレープには中がよく見える、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 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、UTSA で試験した結果、微生物およ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もドレーピングに使用できる。



- ・ ストッキネットを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郭入口部、会陰の処置など）に有用である。
 - まぶしくないように必ず光沢のある面をマウスに当てること。
 - 動物の体温が最初から低かった、または過度に濡れていた（スクラブ、アルコール）、あるいは手術が安全キャビネット／風洞内で行われた場合はヒートシンク低体温症が引き起こされるおそれがあることに留意する。これを防ぐため、常に暖房した麻酔／準備区画および保温した手術台を使用する。
 - ホイルを使用すれば次のマウスの術野が無菌に保たれる。

注記：術中

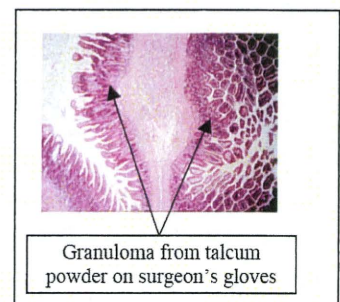
- ペーパードレープまたは布製ドレープを濡らさないよう注意する。
- 濡れた素材は下にある非滅菌表面から細菌を吸い上げる芯として機能する。
- 上記の現象が生じた場合は器具が汚染されたと考えるべきである。

術者

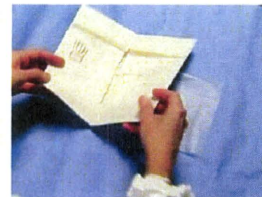
- ・ 逆性石鹼で手洗いをする。
- ・ 手術用滅菌手袋、マスク、清潔な実験着を着用する。パウダー付手袋を用いる場合は滅菌生理食塩水でパウダーを落とす。手袋のパウダーは異物反応を引き起こす異物である。
- ・ バッチ手術を行う場合は手袋を取り替えるか、手袋をした手指を化学滅菌剤で洗浄し生理食塩水ですすぐ。手袋に残留した滅菌剤は組織を刺激し局所感染のリスクを増大させる。滅菌タオルで拭き取る。手袋が着け心地が悪くなったり、破れたり、穴が開いたりした場合は新しい滅菌手袋を装着する。



(写真の説明) 術者の手袋についていたタルカムパウダーによる肉芽腫



- 手術用手袋の装着
 - 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



- 手術用手袋の装着法
 1. 手袋の外側表面が汚染しないように装着する。
 2. 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。
 - 3.~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。

滅菌手術用手袋の装着法のビデオは以下のサイトで見ることができる

<http://vpr.utsa.edu/files/larc/DonningSterileSurgicalGloves.mov>

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（滅菌器具のトレイ、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してはならない。落ちた器具はもはや無菌であるとはみなせないため、再滅菌するまでは拾って再使用しないこと。
- 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。

低体温症の予防

- ・ 麻酔中は正常体温を維持する
 - ラットおよびマウスは体表面積比が高いため、熱伝導により急速に体温が低下する。
 - 手術死の主因には、必ずしも手術または麻酔だけではなく**低体温症**も含まれる。体温は鎮静または麻酔下では急激に低下する。体温が低いと不可逆性ショックおよび死亡に至るおそれがある。
 - 術前、術中、術後を通じて動物のために保温源を用意すること。
 - 不適切な保温装置も大きな危険を孕んでいる。表面温度が位置によって異なる電気保温パッドのげっ歯類への使用は推奨できない。
 - 回復中の保温源としてスライド加温器を用いてもよい。
 - 最も安全な器具は熱水循環式の毛布である。
 - 動物の下に絶縁材を敷くこと（例、気泡緩衝材または畳んだドレープ）。
 - 保温ランプは暖房を調節できるように離して設置する。
 - 術中、動物の付近に単純な温度計を設置すれば環境温度を測定できる（体温との差が+1~2° であること）。
 - 冷えた動物を保温するよりも正常体温を維持する方が簡単である。動物の体温が低下すると循環および器官の機能が低下する。
 - 特にケミカルフュームフードまたは安全キャビネットを使用する場合、これらのフードから強い気流が生まれるため、保温源を補うことが重要である。