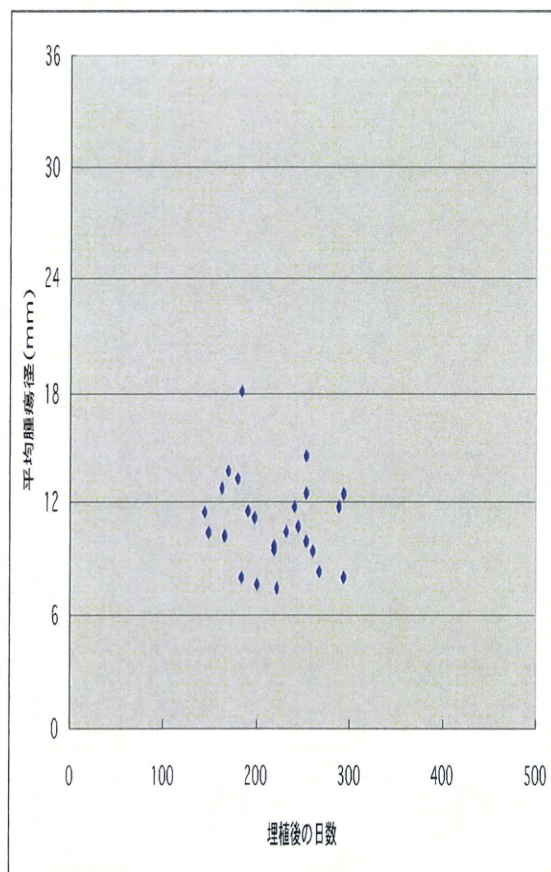
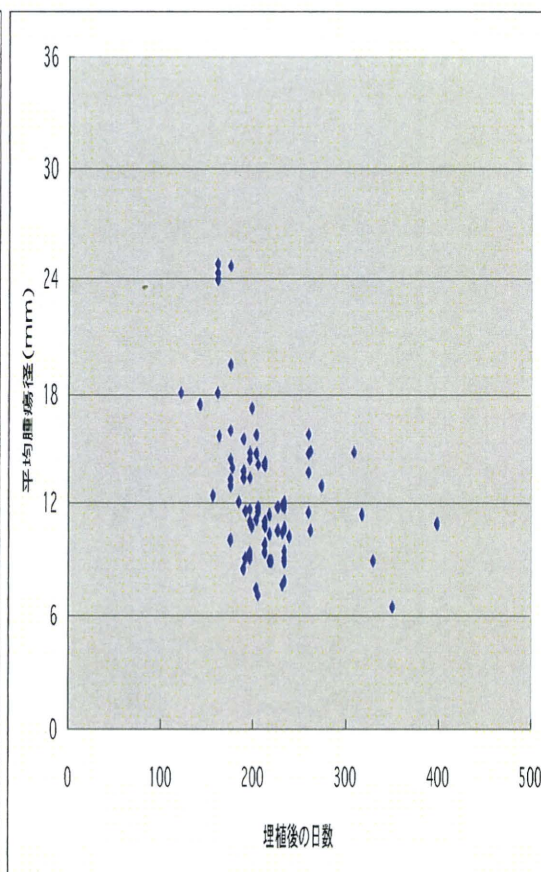


A) 厳重消毒



平均腫瘍径 $11.0 \pm 2.4\text{mm}$
 ($p < 0.001$, 順位和検定)
 解剖までの日数 218 ± 45

B) 簡易消毒



平均腫瘍径 $12.7 \pm 3.9\text{mm}$
 解剖までの日数 213 ± 46

図 7. ガラス板埋植 p53+/-マウスにおける厳重消毒と簡易消毒の埋植後の日数と埋植部位に発生した腫瘍の平均径の比較

A) 厳重消毒、B) 簡易消毒

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 厳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

	厳重消毒		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

厳重消毒群 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)

資料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、Sfrp 2 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

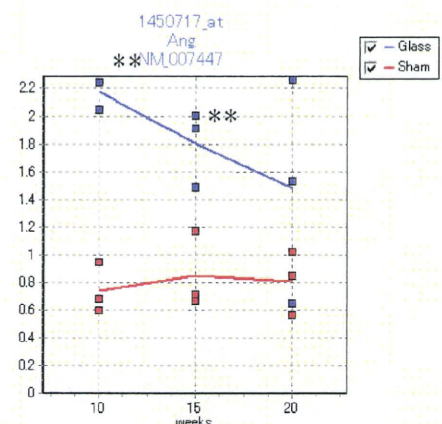
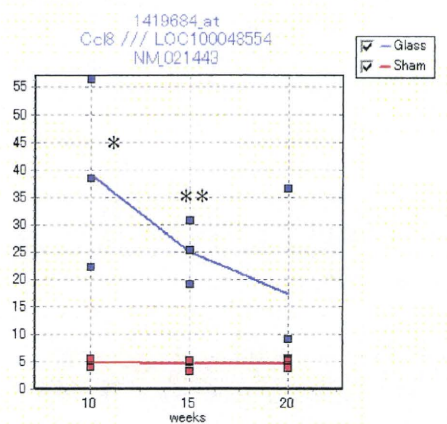
有意に変動した上記遺伝子を対象にジーンオントロジー解析を行った結果、10 及び 15 週目で「免疫応答」、「炎症」、「細胞走化性」等に関する炎症関連遺伝子発現の増加が特に顕著であった。さらに、パス

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)

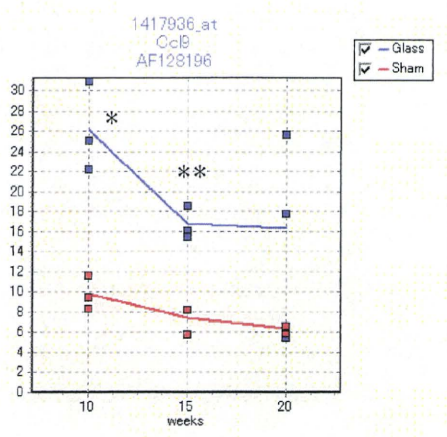


図 2. 血管形成に關与する Angiogenin 遺伝子の増加

5. 細胞外マトリックス關連遺伝子

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)。

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

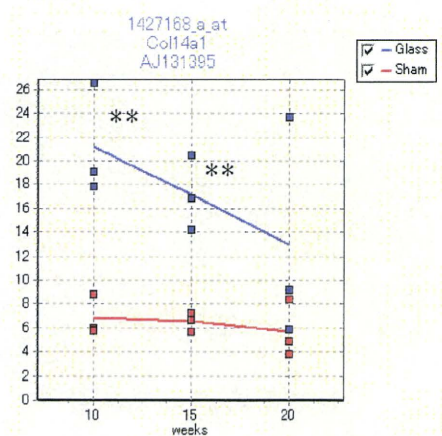
縦軸は遺伝子発現量 (copy/cell)、

Glass: ガラス板埋植群

Sham: Sham operation 群

* $p < 0.05$ 、** $p < 0.01$ 、以下同様

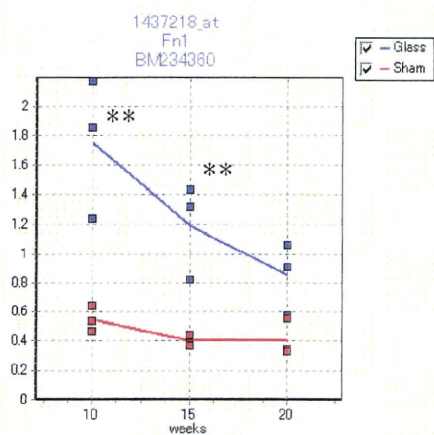
A)



4. 血管新生關連遺伝子

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)。

B)



A)

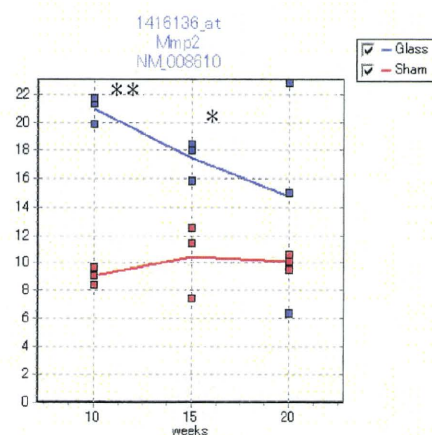


図 3. 細胞外マトリックス分子である Coll14a 及び Fibronectin-1 遺伝子の発現増加

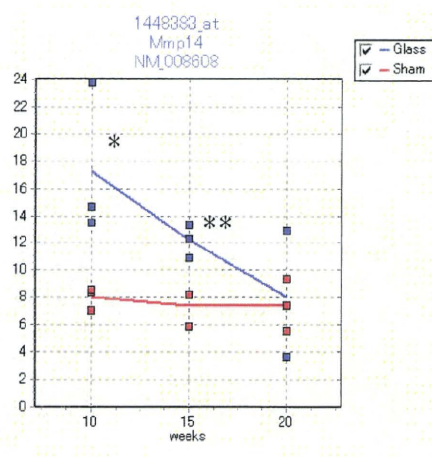
A)Coll14a1、B)Fibronectin-1

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。

B)



C)

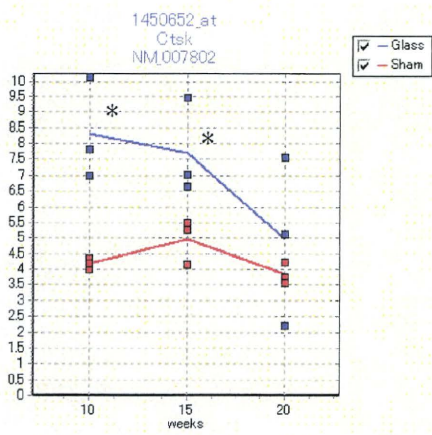


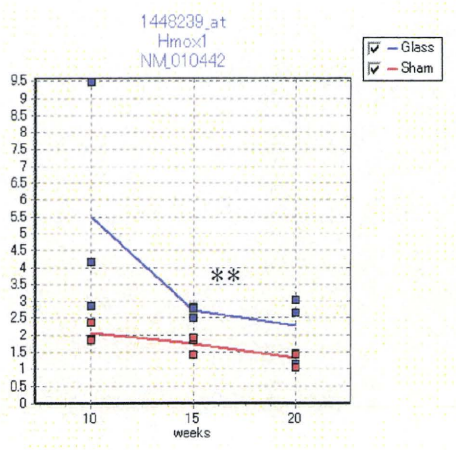
図 4. 線維化・抗線維化に働く蛋白分解酵素 MMP-12、MMP-14、カテプシン K 遺伝子の増加

A) MMP-12、B)MMP-14、C)カテプシン K

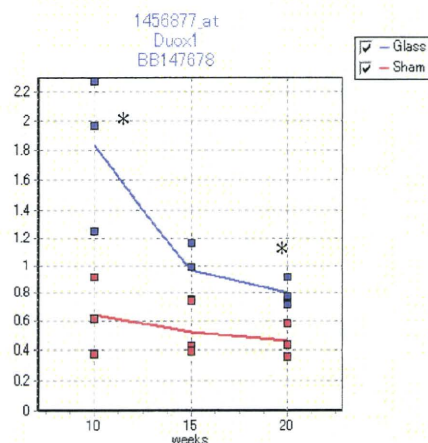
7. 酸化ストレス関連遺伝子

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ストレス関連遺伝子の変化を調べた。その結果、酸化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)



B)



C)

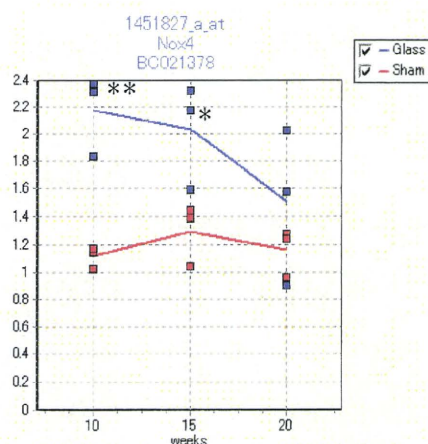


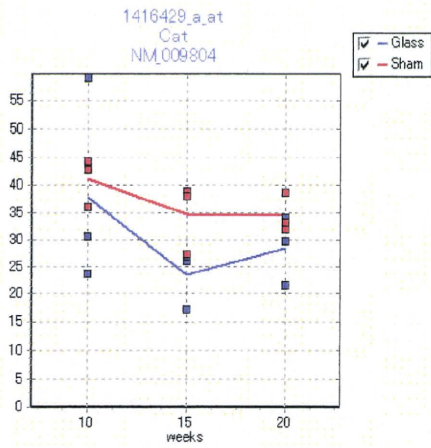
図 5. 酸化ストレス関連遺伝子の発現増加

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)。

A)

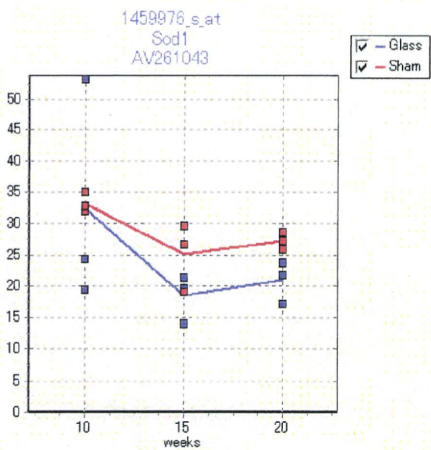


peroxidase 1

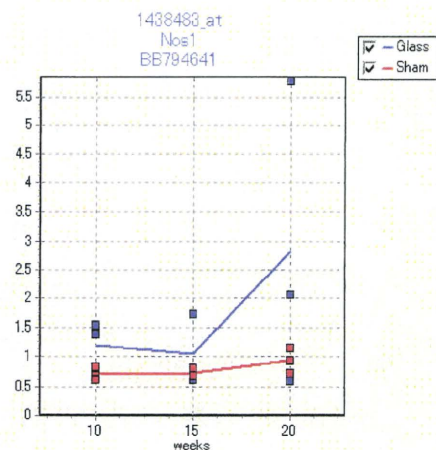
9. 活性窒素関連遺伝子

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)。

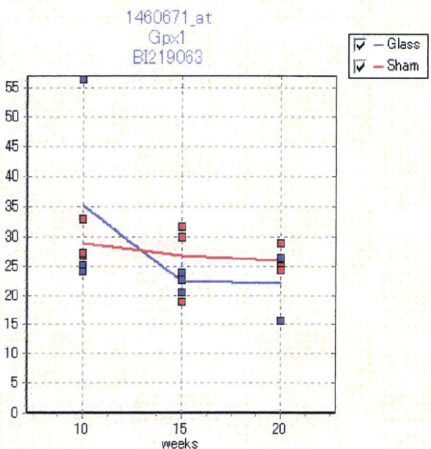
B)



A)



C)



B)

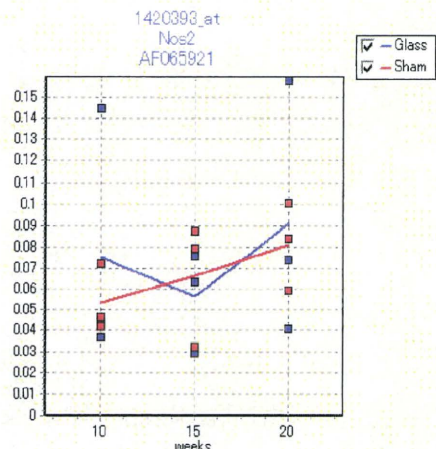


図 6. 活性酸素除去酵素遺伝子

A)Catalase 、 B)SOD1 、 C)Glutathione

C)

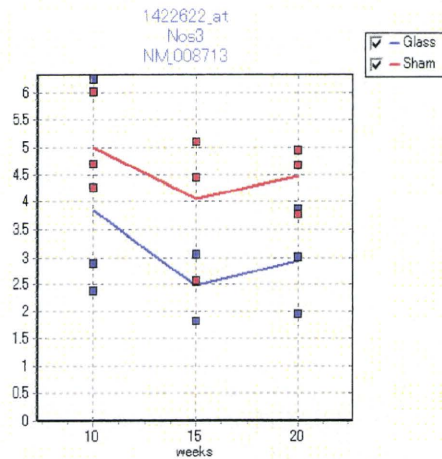


図 7. 一酸化窒素 (NO) 合成酵素

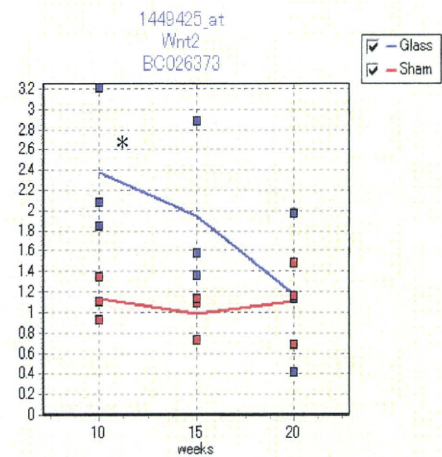
A) NOS1、B) NOS2、C) NOS3

10. Wnt 関連遺伝子

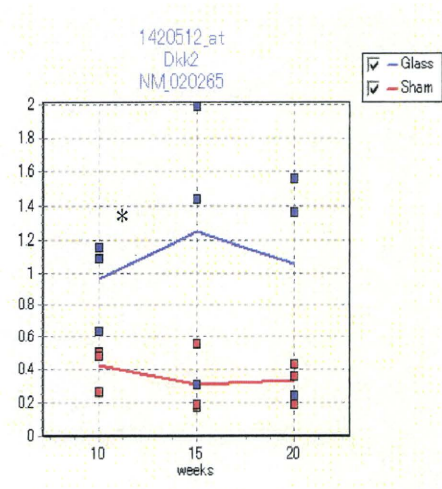
米国コロンビア大学の Matushansky S ら (2007) は悪性線維性組織球種 (MFH) が Wnt 経路を阻害することにより間葉系幹細胞 (MSC) から発生することを明らかにしている⁴⁾。Wnt シグナルの活性化は一般に癌化に関与していることは知られているが、MSC では Wnt シグナルの抑制が肉腫形成に関与している点が非常に異なっているとしている。そこで、本マイクロアレイデータにおける Wnt 関連遺伝子の発現パターンを解析した。Wnt 遺伝子について調べると Wnt2 が 10 週目で有意に増加し、15 週目でも増加傾向を示した。その他の Wnt については明らかな変動はみられなかった (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。

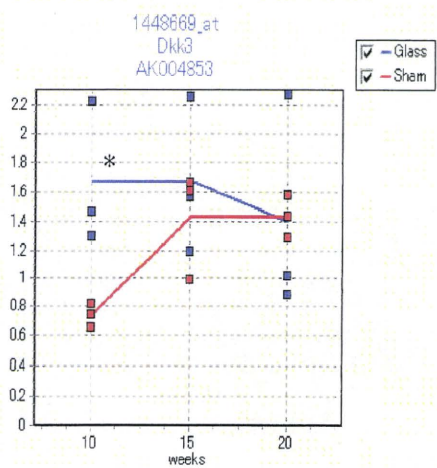
A)



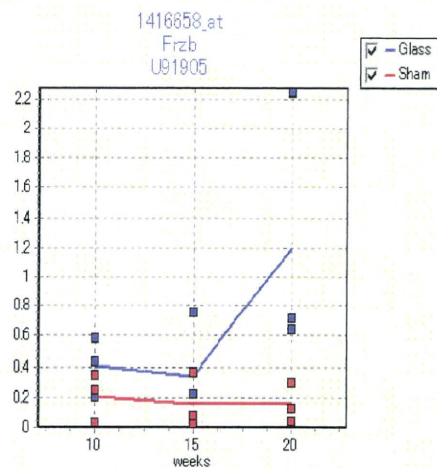
B)



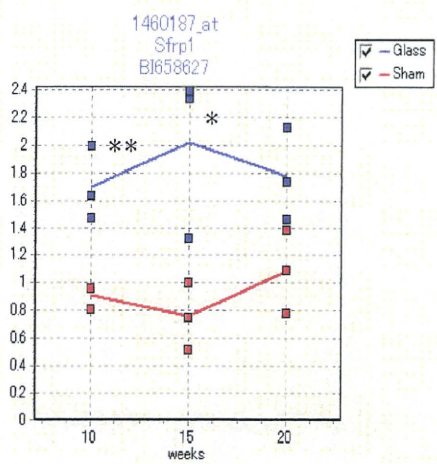
C)



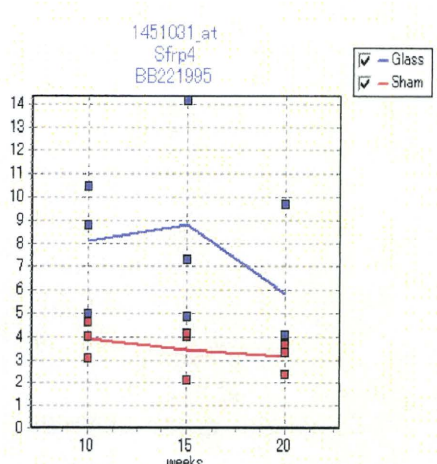
F)



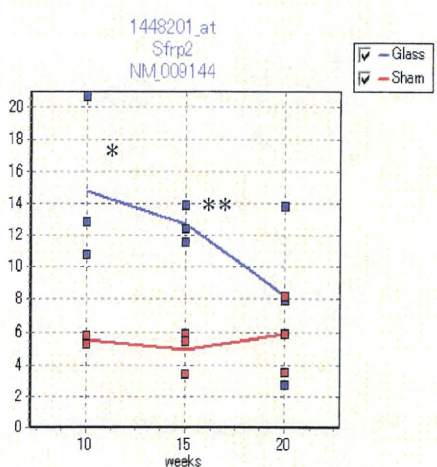
D)



G)



E)



H)

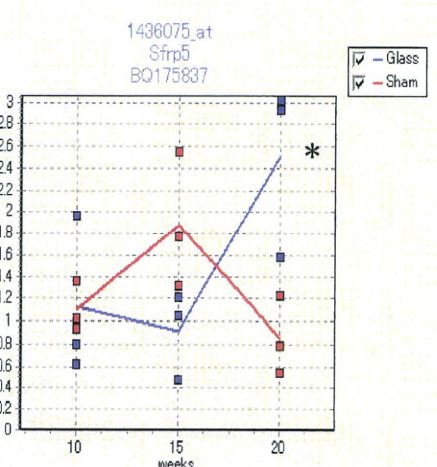


図 8. Wnt 関連遺伝子

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。

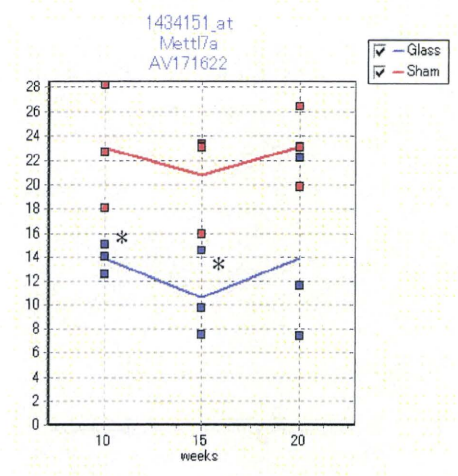


図 9. Mettl7a 遺伝子の減少

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

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

なし

3. その他

なし

資料 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

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。この目的のために平成 20 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実施した。この調査結果から、アンケート調査に回答のあった日本の GLP 適合施設では人の手術に準じた手術を実施していると考えられた。平成 21 年度は海外の GLP 適合安全性試験受託施設（2 施設）を訪問し、手術時の術野の無菌性及び術後感染制御、並びに施設内の関連する設備等の情報を実地に収集した。この結果、これらの施設ではげっ歯類の手術において人の手術に準じた（無菌）手術を実施していることが明らかになった。平成 22 年度は、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した。平成 21 年度までに実施した GLP 適合施設に対するアンケート調査や実地調査から、人の手術に準じたげっ歯類の手術の詳細等については当該施設の SOP 等に詳細に規定されていると考えられたが、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、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、つまり、げっ歯類であっても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必要あるとする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や SOP の遵守が必要と考えられた。

【平成 20 年度】

A. 研究目的

異物発がんと細菌感染の関係についてさらに情報を収集するために、GLP 適合施設等を有する法人の毒性試験実施部門、薬理試験実施部門及び薬物動態試験実施部門等における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（GLP を遵守して実施される安全性に関する非臨床試験の他に、薬理試験及び薬物動態試験に関するものを含む）。

B. 研究方法

* アンケート調査の内容

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の調査内容は、（1）ヒトの手術の場合と比較するために米国疾病対策・予防センター（CDC）の「Guideline for the Prevention of Surgical Site Infection」に記載されている手術環境に関する事項、さらに、（2）異物発がんの経験の有無や（3）マイクロチップに起因する発がんに関するものとし、本邦における GLP 適合施設等を有する法人に対してアンケート調査を実施した。

（1）①実験動物の飼育環境、②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③術後感染制御等に関する情報について実施。アンケートの項目は、ヒトの手術の場合との比較のため、「Guideline for the Prevention of Surgical Site Infection」に記載されている内容に基づいて設定した。

（2）異物発がんの経験の有無及び経験のある場合にはその内容等

（3）マイクロチップの使用の有無、並びに

マイクロチップによる発がんの経験の有無及び経験のある場合にはその内容等

別添の資料に示すアンケート調査用紙を、日本 QA 研究会（Japan Society of Quality Assurance）の協力を得て当研究会に登録されている法人（GLP 適合施設等）に送付した。（アンケート調査用紙は、別添 1 に示した。）

以上に加え、埋植時等の術野の無菌性等に関する文献等による情報、並びに p53 遺伝子及び感染／炎症による発がんに関する情報、さらに異物発がんに関する情報等を収集した。

C、D. 研究結果と考察

1. アンケート調査用紙送付先と回収率

日本 QA 研究会に登録されている 174 法人に対してアンケート用紙等を送付した。また、回答を依頼したのは、各法人の毒性試験実施部門、薬理試験実施部門及び薬物動態試験実施部門であった（各法人に 3 組のアンケート用紙及び返信用封筒を同封）。

回答率は 32.75%であり、複数回答の法人も含めて回収されたアンケート数は 89 件であった。

2. アンケート調査の解析結果と考察

（1）施設で実施している試験等

本調査では、以下のように多種類の動物が毒性試験、薬理試験及び薬物動態試験等に使用されていた。

1) 実施している試験の種類（件数）

①毒性試験（医薬品）	24
②毒性試験（医療機器）	5
③薬理試験	27
④薬物動態試験	20
⑤その他	8

医療機器に関する毒性試験を実施しているとした回答は 5 件であったが、手術を実施しているのはそのうちの 1 件のみで

あり、当該回答もげっ歯類に関する手術ではなかった。また、医薬品に関する毒性試験実施件数は 24 件であったが、その内 7 件は手術を実施していない旨の回答であった。さらに、げっ歯類に関する手術は実施されていない。

2) 使用動物種 (件数)

- ①マウス 54
- ②ラット 68
- ③ウサギ 29
- ④イヌ 19
- ⑤ネコ 0
- ⑥その他 (モルモット 16、ブタ 3、サル 9、フェレット 1、ハムスター 1)

3) 動物の飼育環境 (主にげっ歯類)

SPF 52 件
 コンベンショナル 41 件 (SPF 動物を入荷後にコンベンショナルで飼育)

以上のように本アンケート調査では、医薬品及び/又は毒性試験に関するげっ歯類の手術環境等の回答が得られなかったため、それ以外の試験におけるマウス及びラットについて SPF 及びコンベンショナルな飼育環境に分けて手術環境等についてまとめた。

(2) 手術環境 (げっ歯類のみ。以下同)

1) 手術前の動物の除毛

手術前の除毛の有無、除毛時期及び除毛方法に関する回答を以下に示す。

	除毛しない	除毛する	除毛時期			除毛方法			
			直前	1時間以上前	その他	剃刀	脱毛剤	その他	
								バリカン	ハサミ/バリカン
SPF	0	25	24		1	18	1	14	0
コンベンショナル	0	25	21	4	0	15		6	6

手術前には SPF 及びコンベンショナル環境で飼育されている動物ともに除毛が行なわれており、除毛の時期は殆どが手術の直前であり、除毛には剃刀又はバリカンが主に用いられていた。人間の場合は殆どが手術直前に剃刀を使用して除毛しているが、動物においてもほぼ同様に除毛が実施されていると考えられる。

参考までに「Guideline for the Prevention of Surgical Site Infection」には、手術前夜に手術部位を除毛した場合の手術部位感染率は、カミソリで剃毛した場合及び脱毛剤を使用した場合でそれぞれ 5.6%及び 0.6%であり、除毛しない場合は 0.6%という

報告があるとされている。剃毛での手術部位感染リスクの増加は、皮膚の微細な傷で細菌増殖がおこることによると考えられている。また、カミソリによる剃毛を手術直前に行った場合及び術前 24 時間以内の場合では、それぞれ 3.1%及び 7.1%であったとされている。さらに、手術の 24 時間以上前の剃毛により、手術部位感染率が 20%以上になるとされている。脱毛剤を使用した場合は手術部位感染リスクが低い、過敏症を起こす可能性がある。一方、どのような方法でも術前に除毛すると手術部位感染率が増加するので、除毛を避けるべきとする報告もある。

2) 手術部位の皮膚の前処置

①消毒剤の種類

手術部位の皮膚の消毒に用いられる消毒薬に関する回答を以下の表に示す。

	70%エタノール	ポビドンヨード	クロルヘキシジン	その他
SPF	14	13	8	
コンベンショナル	20	10	5	

手術部位の皮膚の前処置(消毒)には、70%エタノール(以下、「エタノール」)、ポビドンヨード及びクロルヘキシジン(ヒビテン)が用いられており、SPF環境に比しコンベンショナルな環境ではエタノールを用いる率が高かった。

本邦においてヒトの場合には、ポビドンヨードが多く用いられ、ヨード系消毒薬にアレルギーのある場合は、グルコン酸クロルヘキシジンが用いられる。ヒトの場合に手術部位の消毒薬としてアルコールのみを単独で使用するのを避ける理由は2つあり、1つは抗菌スペクトラムに関するもので、アルコールは芽胞を不活性化できないこと及び一部のウイルスを殺滅できないことによる。また、もう1つは持続時間に関するもので、アルコールはすみやかに蒸発するため、その後効果の持続の期待ができないためである。ただし、アルコール消毒は、術野の通過菌(環境により持ち込まれた菌)には効果があると考えられている。一方、皮膚の常在菌については一時的に細菌数を減らすことができるが、時間の経過とともに常在菌が再度増殖するためとされている。ポビドンヨードは皮膚に存在する間は静菌効果があるとされ、塗布後10分して完全に乾燥させてから皮膚の切開等を行う。グルコン酸クロルヘキシジンにも残存効果があるとされている。なお、アルコールを使用する場合は、グルコン酸クロルヘキシジンを混

合して使用する。なお、本調査では消毒薬を乾燥させるまで待つか、又は塗布後1分間待つという回答が殆どであり、ポビドンヨードの場合に塗布後10分間待つとした回答はなかった。また、消毒薬塗布後の放置時間について規定されていない旨の回答も数件あった。

参考までに「Guideline for the Prevention of Surgical Site Infection」には、以下の記載がある。消毒薬として、ポビドンヨード、アルコール含有製品及びクロルヘキシジンが一般的に使用されている。ただし、これらの術前皮膚消毒薬の手術部位感染リスクに対する効果については、臨床試験で比較評価した研究はなされていない。なお、これらの消毒薬を用いて患者皮膚を前処置する前に、皮膚から汚れを取り除き、さらに切開予定部位から同心円状に消毒薬で処置することとされている。

②消毒の範囲

切開部位の消毒の範囲については、SPF環境及びコンベンショナルな環境ともに「切開予定部位から同心円状に消毒し、切開部の拡大等を考慮し十分な大きさとする」、又は「切開予定部位よりも少し大きめの範囲」との回答であり、「Guideline for the Prevention of Surgical Site Infection」に記載されている「切開予定部位から同心円状に消毒薬で処置することとされており、前処置の広さは、切開部の拡大や新しく切開

する可能性等を考えて、十分な大きさと

する。」とほぼ同様と考えられた。

3) 手術担当者の手指の消毒

手術担当者の手指の消毒に関するアンケートの結果を、以下の表に示す。

	手指等の洗浄及び消毒			手術着及びマスク、手袋の使用			
	消毒薬による手洗い 有 (無)	消毒薬による肘の消毒	スクラブの使用	手術着の着用	マスクの着用	手袋の着用	
						滅菌	非滅菌
SPF	17 (7)	8 (16)	5 (19)	17 (7)	24 (0)	20 (3)	0
コンベンショナル	16 (11)	1 (26)	3 (24)	17 (9)	24 (3)	20 (5)	1

SPF 環境では手術担当者の約 70% が手術前に手指等を消毒薬で消毒し、約 30% が肘まで消毒していた。スクラブの使用は約 20% であった。一方、コンベンショナルな環境では手術担当者の約 60% が手術前に手指等を消毒薬で消毒し、約 4% が肘まで消毒していた。スクラブの使用は約 11% であった。SPF 環境においても手術時に全例が消毒薬による手洗いをしていない結果となっているが、これは手術後にすぐ試験に用いる動物等が含まれているためであると考えられる。

手術着、マスクや手袋については、SPF 環境では手術担当者のそれぞれ約 71%、100% 及び約 87% が着用していた。また、コンベンショナルな環境では手術担当者のそれぞれ約 65%、約 89% 及び約 81% (うち 1 例は非滅菌手袋) が着用していた。SPF 環境ではコンベンショナルな環境に比べて手術着、マスク、手袋等の着用率は高かった。

本アンケート調査では術後の飼育期間別に解析することができなかったが、手術後ある程度の長期間飼育する場合には、手術前に殆どの場合に手指等の消毒、手術着、マスク、手袋等の着用は行なわれているものと思われる。

参考までに「Guideline for the

Prevention of Surgical Site Infection」には、すべての手術チームメンバーは、無菌部位、滅菌済機器並びに消毒済の患者の部位に触れる前に、適切な術前手指及び前腕消毒を行うこととされている。まず、爪の中の汚れを落とし、適切な消毒薬で 3~5 分の手洗いをを行う。一日の最初に行うスクラブは、(通常ブラシを用いて) 爪も徹底的に洗浄する必要があるとされている。また、無菌ガウンと手袋を着用するとされており、手術着が汚染していた場合には着替えること、手術室に入室する場合は口と鼻を完全に覆うマスクを着用すること、頭部及び顔面の毛髪を完全に覆う帽子又はフードを着用すること、滅菌手袋を滅菌ガウン着用後に着用すること等が規定されている。なお、本調査においてガウンの滅菌の有無については調査しなかった。

4) 手術室の環境

本調査では、手術を伴う動物試験を実施していない場合もあるため、手術室に関する回答数は限られていたが、SPF 環境で専用の部屋があるとした件数は 9、専用の部屋がない件数は 18 であった。一方、コンベンショナル環境で専用の部屋があるとした件数は 7、専用の部屋がないとした件数は 17 であった。

ただし、専用であるか否かを問わず、十分な換気、HEPA フィルター等の使用があり、また、少なくとも手術と手術の間にアルコール等による消毒も行なわれていた。

参考までに「Guideline for the Prevention of Surgical Site Infection」には、手術室環境に関して以下のように規定されている。

- ①換気：廊下及び隣接区域に対して、手術室内の気圧を陽圧に保ち、少なくとも最低1時間に15回換気を行

う。適切なフィルター(HEPA フィルター等)によって、再循環気及び外気共にろ過することと等が規定されている。

- ②環境表面の清浄化と消毒：目に見える汚染が環境表面又は機器にない場合は、手術と手術には消毒薬を用いて手術室内を消毒せず、汚れていた場合には適切な消毒薬を用いて消毒する。なお、最後の手術終了時には、消毒薬で消毒することと等が規定されている。

(3) 術中及び術後の感染制御等

1) 手術機器（特に動物に直接触れるもの）の滅菌又は消毒

手術機器の滅菌又は消毒に関する回答を以下に示す。

	手術機器(主に動物に直接触れるもの)の滅菌又は消毒					
	乾熱滅菌	高圧蒸気滅菌	その他			
			ガス滅菌	アルコール	ヒビテン	過酸化水素
SPF	6	10	2	3	3	1
コンベンショナル	1	9	1	5	11	0

手術機器、ピンセット、ハサミやメス等についての滅菌又は消毒を行っていないという例は全くなく、SPF及びコンベンショナルな環境ともに何らかの滅菌又は消毒が行なわれていた。SPF環境では滅菌（乾熱滅菌、高圧蒸気滅菌及びガス滅菌）は72%、消毒（アルコール、ヒビテン等に侵漬）は28%であった。一方、コンベンショナルな環境では滅菌（乾熱滅菌、高圧蒸気滅菌及びガス滅菌）は約41%、消毒（アルコール、ヒビテン等に侵漬）は約59%であった。SPF環境での手術時には滅菌された手術機器が用いら

れる率が高い。

参考までに「Guideline for the Prevention of Surgical Site Infection」には、指針に従って全ての手術機器を滅菌することと等が規定されており、ピンセット、ハサミやメス等の機器は通常は滅菌するか又は既に滅菌された市販品を用いる。

2) 手術中に1回使用したメス、ハサミ、ピンセット等の再使用

手術中に使用するメス、ハサミ、ピンセット等の再使用に関する回答を以下の表に示す。

	再使用無	再使用有							
		同じ動物の場合				別の動物(1連の実験中の)			
		再使用前に消毒する				再使用前に消毒する			
		消毒しない	アルコール	ヒビテン	オスパン	消毒しない	アルコール	ヒビテン	オスパン
SPF	0	3	1	2	0	2	8	9	0
コンベンショナル	0	6	6	2	1	3	3	8	1

SPF及びコンベンショナルな環境ともに手術中に1回使用したメス、ハサミ、ピンセット等の再使用が行なわれていた。同じ動物への再使用並びに同じ実験中の別の動物への再使用が行なわれていた。再使用時の消毒は、いずれの場合にも消毒薬に侵漬する方法で行なわれていた。

3) 埋植材料の滅菌又は消毒

本項目に該当する試験を実施している法人は回答者中に含まれていなかったため情報は得られなかった。

4) 手術中の切開部位からの感染を防ぐための切開部位以外の部位への覆布等の使用

5) 術後手術切開創管理の方法

手術後の切開創の処置に関する回答を以下に示す。

	切開創の処置				使用する	切開創処置後の被覆剤の使用		
	閉じない	閉じる				被覆剤の使用なし	接着剤を使用した場合は使用しない	傷口を消毒した場合は使用しない
		手術用接着剤	クリップ	縫合				
SPF	2	13	9	16	4	12	7	10
コンベンショナル	0	4	3	23	2	9	3	8

術

後の切開創を閉じる方法は、SPF環境では手術用接着剤と縫合が主であり、コンベンショナルな環境では縫合が主であった。また、切開創を閉じた後の被覆剤はSPF及びコンベンショナルな環境ともに使用率が低かった。ただし、大動物（イヌ）については、全例で被覆剤が用いられていた。なお、ヒトにおいては必ず被覆剤が用いられていた。この違いの原因には、げっ歯類では被覆剤を剥がすことがあることや、手術後に長期間の飼育をしないで場合があることがあげられる。

参考までに「Guideline for the Prevention of Surgical Site Infection」には、組織を丁寧に取扱い、効果的な

用

覆布の使用はSPF及びコンベンショナルな環境でそれぞれ9及び5件、覆布を用いないとした件数はSPF及びコンベンショナルな環境でそれぞれ11及び14件であった。

参考までに「Guideline for the Prevention of Surgical Site Infection」には、術野の感染を避けるために切開部位以外の部位への覆布等を使用することが示されている。

血を行

い、壊死した組織や縫合糸等の異物を最小限とすること、手術部位が汚染していた場合の処置方法等が規定されており、さらに、切開創を閉じ、術後24～48時間は滅菌した被覆剤で保護すること、被覆剤の交換の前後並びに手術部位に触れる前後は、消毒薬で手洗いをすること等が規定されている。

6) 術中又は術後感染管理のための抗生物質等の使用

抗生物質を使用しないと回答したのはSPF及びコンベンショナルな環境でそれぞれ17及び10件であり、抗生物質を使用すると回答したのはSPF及びコンベンショナルな環境でそれぞれ12及び6件であっ

た。抗生物質を使用するかどうかは、手術の種類によるとの回答が1件あった。また、使用するのは侵襲性の高い時であるとの回答が1件からあった。さらに、抗生物質等の投与期間については術後3

日～1週間後までであるとの回答も2件あった。なお、大動物（イヌ）のテレメトリー試験の場合には、全例で術後感染防止のために抗生物質等の抗菌剤が用いられていた。

7) 手術後の動物の飼育

手術後の動物の飼育に関する回答を以下に示す。

	複数の動物を同じケージで飼育	1ケージに1匹エリザベスカラー		傷がふさがるまでケージに1匹ずつ飼育し、その後複数飼育する。
		無	有	
SPF	5	22	3	2
コンベンショナル	1	17	1	2

その他、手術後、傷がふさがるまでエリザベスカラーをした上でケージに1匹ずつ飼育しその後複数飼育するとの回答が、コンベンショナルな環境で1件あり、また、手術後その日のうちに実験に使用するため飼育なしとの回答があった。

SPF 及びコンベンショナルな環境ともに、1ケージに1匹の飼育が多かったが、本アンケートについては毒性試験、薬理試験、薬物動態試験の場合が含まれており、また、医療機器の埋植試験について実施している施設からの回答はなかった。このため、本調査の目的である埋植試験において使用された動物について、傷口を動物自身で舐めることができる状態か、また、他の動物に舐められる状態かどうかに関する情報の収集は得られなかった。

(4) 異物発がんの経験の有無及び経験のある場合にはその内容等

異物発がんに関する経験のあるとした回答はなかった。

(5) マイクロチップの使用の有無、並びにマイクロチップによる発がんの経験の有無及び経験のある場合にはその内容等

マイクロチップを使用しているとの回答は1件のみであり、マイクロチップを

埋植された動物はマウス (C57BL6 J)、使用目的は固体識別、使用数は約 2000 匹/年であった。また、マイクロチップによる発がんの経験はないとのことであった。

マイクロチップの埋植に際しては70%エタノールで挿入予定部位から同心円状に消毒し、挿入部の拡大等を考慮し、十分な範囲を消毒し、約1分放置後、市販されている滅菌済みのマイクロチップを同じく滅菌済みのマイクロチップ挿入器を用いて挿入するとされている。

文献調査について

本年度は、埋植時等の術野の無菌性等に関する文献等による情報収集、並びに p53 遺伝子及び感染/炎症による発がんに関する情報収集、さらに異物発がんに関する情報収集を行なったが、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）（平成17年度～平成19年度）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—の平成19年度の報告書に記載した事項以外に、あらたに注目すべき情報はなかった。

E まとめ

本アンケートの調査により、マウスやラット等の場合とヒトの場合とで異なると考えられる手術環境を以下に示す。ただし、本アンケート調査の結果は、非 GLP 下で実施される薬理試験及び薬物動態試験の結果であり、また、医療機器の埋植試験を実施している施設からの回答がなかったが、SPF 下でのげっ歯類の手術環境についての情報はおよそ収集できたと考える。

- ①手術部位の皮膚の前処置（消毒）に SPF 環境及びコンベンショナル環境ともに 70%エタノールが 56~57%程度用いられていた。ヒトの場合で殆どがポピドンヨード又はクロルヘキシジン（ヒビテン）が用いられている。その理由はその効果がアルコールより高いこととされており、アルコール単独の消毒では手術部位の皮膚の前処置が不十分である可能性が考えられる。
- ②切開部位以外の部位からの感染をさけるために切開部位以外の部位を覆布で覆うことは殆ど行なわれていない。
- ③手術機器、特に動物に直接接触れるピンセット、ハサミやメス等についてはヒトでは滅菌されたものが使用されているが、マウスやラット等のげっ歯類では SPF 環境の場合においても滅菌（乾熱滅菌、高圧蒸気滅菌及びガス滅菌）は 72%、消毒（アルコール、ヒビテン等）は 28%であった。また、これらの手術機器の同一動物での再使用のみならず、同一実験中で他の動物にも再使用されていることから、これらの手術機器による感染等の可能性が考えられる。
- ④術後の創傷の管理としてげっ歯類では通常は抗菌剤の投与はせず、また、切開創を被覆剤で保護しない。つまり、傷口からの感染の防御が不十分な可能性が高い。

⑤動物自身が舐める又は別の個体に舐められる等して、傷口からの細菌（口内細菌や皮膚常在菌等）感染が起きる可能性について検討するために必要な長期飼育の動物に関する情報が不足しているが、本アンケート調査の回答によれば多くの場合は 1 動物が 1 ケージに飼育されていたため、他の動物により傷をなめられる可能性は低いと考えられる。ただし、その場合でもエリザベスカラーをしていない場合が殆どであり、手術後の保定器具により身動きできない場合及び創傷の位置が動物自身でなめることができない場合を除き、動物自身がなめることによる傷口からの感染の可能性は否定できない。

以上の結果から、GLP 施設等における SPF マウスやラットの手術に関して、ヒトの術後感染の制御の観点からは、SPF としての管理及び取扱いに加え以下のような点に注意して行うことが必要と考える。

- (a) 切開部位以外の部位からの感染をさけるため、切開部位以外の部位を覆布で覆う。
- (b) 皮膚の消毒にはポピドンヨードを用い、消毒に必要な時間放置後に皮膚の切開等を行う。
- (c) 手術に用いるピンセット、ハサミやメス等は滅菌して用い、少なくとも別の動物への再使用は避ける。
- (d) 可能であれば、切開部位からの感染を避けるため被覆剤等で覆う。
- (e) 他の個体に傷口をなめられると皮膚常在菌、口内細菌等により汚染されるため、1 匹ずつケージで飼育する。また、傷口を自身で舐めることが可能な場合は、エリザベスカラー等を装着させる等して、動物自身で舐めることができないようにする。