

特定非営利活動 (NPO) 法人 医用ミニブタ研究所の紹介

NPO 法人医用ミニブタ研究所
福山 周作、岩永 健裕

医用ミニブタを用いた研究が円滑に行えるよう、クラウン系ミニブタの生産・供給を行う事業を行い、医歯薬農工学の発展に寄与することを目的として2013年4月に設立された法人である。通称をKMSRCとしている。

KMSRCは、(株)ジャパンファームが2001年10月にクラウン系ミニブタの生産・拠点として鹿児島県伊佐市に設立したジャパンファームクラウン研究所の事業を継承し、質の高い医用ミニブタの安定生産・供給のみならず、受託飼育設備も備えている。

クラウン系ミニブタの紹介

クラウン系ミニブタは1978年に鹿児島大学(農学部中西喜彦名誉教授)が中心となり作出された系統で、現在に至るまで約40年間にわたって特定の閉鎖集団内で繁殖・維持されてきた近交系実験動物である。クラウン系ミニブタの最大の特徴は、免疫応答に重要な役割を果たす遺伝子領域である

主要組織適合性抗原MHC (Major Histocompatibility Complex) が固定された系統を維持し、常に生産・販売している点にある(ブタのMHCはブタ白血球型抗原SLA-Swine Leukocyte Antigenと呼ばれる)。このようなMHC確立という特徴をもつ実験用ミニブタ(医用ミニブタ)は、世界的に見ても他には米国のMGH-Sachsミニブタが存在するのみであり、クラウン系ミニブタは非常に貴重な実験資源であるといえる。

MHCは非常に多様性に富む抗原で、ウィルスなどの外来抗原侵入や、他者からの臓器移植や組織移植の際に、自己と非自己を認識するために重要な指標となる。MHCの違いによって、移植された細胞や組織、臓器に対する拒絶反応の強弱が決まってくるため、MHCは移植医療や再生医療の実用化を考える前臨床研究実施の際には非常に重要な役割を果たすこととなる。KMSRCでは、SLA抗原をコードするSLA遺伝子群

のPCR解析と選択的な交配によって異なるSLAをもつクラウン系ミニブタを造成し、かつその異なる系統を維持している(表1)。医療技術トレーニング、安全性試験、急性期実験等では必ずしもSLA既知の動物を使用する必要はないため、この約40年間の実績としては、SLA遺伝子型指定を必要とする実験は必ずしも多くなかった。しかし近年、移植医療における新しい免疫反応法の評価法や拒絶反応抑制方法の開発、さらにMHC確立クラウン系ミニブタから樹立したiPS細胞を用いた基礎・応用研究などの前臨床研究に対する期待と研究進展とともに、SLA遺伝子型既知のミニブタは必須の動物として認知が進み、需要が高まっている。

ミニブタを用いた内視鏡 トレーニング

内視鏡は、体表を切開し、体腔内へアプローチする従来の外科処置と異なり、低侵襲で行える手

表1. MHC確立クラウン系ミニブタのハプロタイプ(PCR解析)

C1 ホモ系統 (hp-16.16)			C2 ホモ系統 (hp-17.17)			C3 ホモ系統 (hp-16.17)			C4 ホモ系統 (hp-17.16)		
領域	遺伝子座	遺伝子	領域	遺伝子座	遺伝子	領域	遺伝子座	遺伝子	領域	遺伝子座	遺伝子
Class I	SLA-1	*0401	Class I	SLA-1	*0804	Class I	SLA-1	*0401	Class I	SLA-1	*0804
	SLA-2	*0901		SLA-2	*0603		SLA-2	*0901		SLA-2	*0603
	SLA-3	*0602		SLA-3	*0305		SLA-3	*0602		SLA-3	*0305
Class II	DRB1	*1103	Class II	DRB1	*0801	Class II	DRB1	*0801	Class II	DRB1	*1103
	DQB1	*0601		DQB1	*0501		DQB1	*0501		DQB1	*0601

術方法として1990年代から注目を集めている手術方法である。現在も内視鏡を用いて行う新しい術式が開発される一方で、相次ぐ医療事故の発生が社会問題となっており、内視鏡トレーニングの必要性が高まっている。高度な技術と熟練を要する内視鏡外科手術の習得には、大動物を利用した実践的なトレーニングが有効である。その理由として、①ヒトと解剖学的にも大きさが似ている「医用ミニブタ」を用いることで、臨床現場と同じ器械・道具・手術手技を利用してトレーニングを実施できる。成熟個体であれば、血管や脂肪組織の感触はよりヒトに近い、②消化器手術領域の食道、胃、胸部、泌尿器、婦人科、整形外科など、幅広い内視鏡手術分野の技術トレーニングに利用できる、③「医用ミニブタ」はE型肝炎をはじめとする「人畜共通伝染病」がフリーであり、トレーニングを受講する術者への感染リスクを低く抑えることができる、などの点が挙げられる。

クラウン系ミニブタは、内視鏡

表2. 飼育スペースの推奨値

収容頭数/ ケージ	体重(kg)	床面積/ 頭(m ²)
1	< 15	0.72
	25 まで	1.08
	50 まで	1.35
	100 まで	2.16
2-5	< 25	0.54
	50 まで	0.9
	100 まで	1.8
> 5	< 25	0.54
	50 まで	0.81
	100 まで	1.62

表 2. (参考文献: Guide for the Care and Use of Laboratory Animals, 8th ed., 2011)

トレーニングを含む外科処置トレーニングに2003年から利用され始めた。外科トレーニングへの利用と同時に、ミニブタの取扱いが分からないという要望から外科処置中のミニブタの麻酔管理サポートを開始した。大動物を用いたトレーニングは、動物福祉の考えに基づく倫理性および経済性の両面から使用頭数を十分に検討する必要がある。不必要なトレーニングの実施を避け効率的に実施するために、当法人ではこれまで培った経験から適切な提案が可能である。

今回、このような機会をいただいたので、当法人における内視鏡トレーニングを含む外科処置トレーニングでの麻酔管理についてお話ししたい。

利用者からの動物の注文、搬入

トレーニング実施日程を確認し、馴化期間(約1週間)を考慮し実施施設へ搬入する。搬入先の動物飼育ケージの広さが搬入個体に適切である事を確認する。例としてアメリカのケージ推奨値を挙げる(表2)。体重が大きい個体になればなるほど、床面積が広いケージを準備し、トレーニング実施日までミニブタ個体へストレスをかけないように飼育管理を行う。提供元の生産農場と飼育環境が大きく変わる点にも配慮が必要となる。一例として、今までとは違う給餌器・給水器の形状である為に、認識できずに食事をしないこともある。対策として、搬入後に飼料を給餌器に入れる所を見せ、給水器を手で押さえて水

が出る事を認識させる。馴化期間中は、その個体をよく観察して特徴を把握しておくことで、当日にスムーズな麻酔導入ができるようトレーニング支援者は個体に十分馴れるようにしておく。馴化期間中の体調不良や、トレーニング中の不慮の事故に備え、バックアップ個体の準備も検討する。

麻酔導入から気管挿管

トレーニング実施日の前日より、絶食(飲水は自由飲水)とする。飼育環境変化によるストレス等から自分の糞を口にする個体は、糞をケージスノコの下に落とすもしくは、すぐに除去する工夫が必要である。鎮静・麻酔は、トレーニング開始時刻から逆算して導入を行う。まず鎮静は、塩酸メデトミジン(80 μ g/kg)と塩酸ケタミン(10 mg/kg)を混合してケージ内で投与する。投与方法は、脂肪層が薄く、血管走行が少なく、神経走行も比較的少ない頸部(耳根部)への筋肉内注射が安全と考える。注射する際は、投与中にミニブタが動いても針が頸部から抜けないように長さに余裕がある翼状針(21G)を利用することで、確実に注射することができる。翼状針を穿刺する際には、針先をミニブタに見せないように隠して近づき、頸部を擦りながら穿刺する。注射後は、興奮させないようケージから出て離れて観察する。眼球や尾の動き、前脚の屈伸反射から鎮静が確認できたら、飼育ケージから出して処置室へ移動する。移動後は自発呼吸を確認しつつ、トロッカー挿入

部を考えて、頸部～脇腹～鼠径部と広く剃毛を行う。次いで処置室の手術台に仰臥位で乗せて、挿管の準備をする。クラウン系ミニブタの場合、体重20-30 kgでは内径6.5 mm、30 kg以上の場合には内径7.0 mmのカフ付き気管チューブを利用する。喉頭鏡で舌を押し上げ喉頭蓋を確認する。ブタの喉頭蓋は非常に深いので、喉頭鏡はブレードが長いものを準備する。カフ付き気管チューブを挿入する際には、ミニブタの頸(喉)がまっすぐになるように補助者が舌をガーゼでつまみ上げ、もう片手で上顎を引き下げると喉頭蓋が確認しやすい。喉頭蓋が奥に落ち込んでいる場合(写真1A)には手前に引き出し(写真1B)めくりあげ(写真1C)、その奥の気道口を確認する(写真1D)。無理に気管チューブを挿入すると気道を傷つけてしまうので、気道に沿って気管チューブをやさしく回転させながら挿入する。気管チューブをあまり深く挿入すると片肺挿管となる可能性があるため、事前に適切な深さを確認しておく。挿入後、チューブのカフを膨らませ、これを柔らかいヒモで上顎に固定することで術中の体位変換時にチューブが抜け落ちることを予防できる。

体位固定および術中モニタリング

処置室に搬入後、心電図用電極を装着し、血圧測定用カフを前肢に巻き、動脈血酸素飽和度は舌もしくは耳にプローブを挟む。トレーニング時間が長くなると体温が低下するため、手術台の上には保

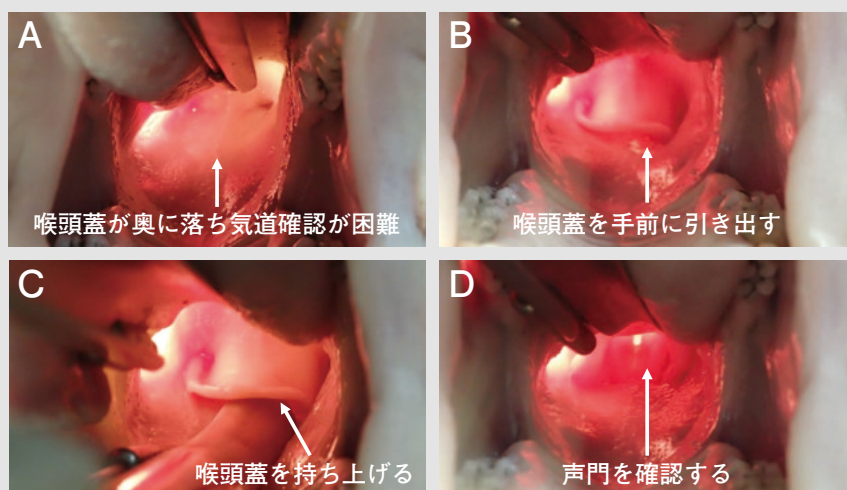


写真1. 気管内挿管手技



写真2. クラウン系ミニブタ耳介静脈

温マットと吸水シートを重ね、接触部分が低温火傷しないよう注意しながら仰臥位にミニブタを固定する。軟らかいヒモで四肢が鬱血しないように固定し、さらに四肢の固定角度や長さを調整し内視鏡操作時に邪魔にならないように腹部を広く開ける。保定と麻酔維持が安定したら、術部の消毒を行う前に、心電図、心拍数、呼吸曲線、呼気中CO₂分圧、動脈血酸素飽和度等の項目がモニターできているかについて再度確認する。

術中管理

挿管後、気管チューブを人工呼吸器に接続し、1回換気量10 ml/kgで人工呼吸を開始し、気道内

圧が10～20 cmH₂Oとなるように呼吸管理を行う。吸気麻酔としてイソフルランを使用し、手術開始時(皮切時)は3-4%、その後トレーニング中は2%を基本として維持する。輸液用のラインとして耳介静脈にサーフロを留置し(写真2)、リンゲル液を5-10 ml/kg/時間で開始し、血圧、脈拍数、出血量を考慮しながら輸液量を調整する。術中の麻酔管理は、内視鏡カメラでの術野画像と各種モニタリング事項、ミニブタの舌の血色などに注意を払う。特に出血による血圧低下に注意し、出血が多い場合には、輸液量を増やす、あるいは昇圧剤を使用するなど適切に対応する。また腹腔内の操作

内容によってはヘッドダウンへの体位変換を行うこともあるが、この際は腹腔内臓器による横隔膜圧迫のため胸腔内圧が上昇しうするため、換気量調整など適切な処置が必要となる。また体位変換の際には、心電図用電極や血圧測定用カフがずれることがあるので十分注意する。その他、点滴残量、人工呼吸器の吸入麻酔薬や酸素の残量、内視鏡システムに利用される炭酸ガスの残量、手術の器械出し等の外回り対応、さらにはトレーニング中の記録動画等の記録状態にも注意を払い、術者がトレーニングに集中できるようサポートする。

トレーニング終了

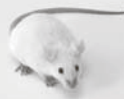
内視鏡トレーニング終了後トロッカーを抜き、ポート創を縫合する。縫合後、トレーニング参加者全員でミニブタへの黙祷をささげる。この黙祷を行ってから安楽死を行う。安楽死の方法は、吸入麻酔濃度を5%に上げ麻酔を深くした後、輸液ラインから塩化カリウムを投与する。心電図モニターで心停止を確認後、人工呼吸器を停止し、心電図電極、気管チューブ、輸液ライン等を外す。

まとめ

これまで当法人がサポートした内視鏡トレーニングあるいは種々の実験で、麻酔管理による事故は発生していない。これは、当法人がミニブタの生産・販売を行うなか

で、ミニブタ実験に関わる様々な分野の方からお教えいただいた知識やこれまでの経験、更にはトレーニング実施までの入念な準備による結果であると考え。これまでに当法人で培われてきたミニブタを用いた実験に関するノウハウをもとにして、ミニブタの利用実績がない施設に対しても、ミニブタ搬入手配からトレーニング時の麻酔管理に至るまでその施設に合った準備や方法を提案することが可能である。今後、新たにミニブタを用いたトレーニングや外科処置を伴う実験を計画される際は、是非とも一度お問い合わせをいただきたい。

(日動協ホームページ LABIO21 カラーの資料の欄を参照)



**貴重なデータを保持した実験動物を
安全・確実・清潔に全国へお届けします。**

お客様の多彩なニーズにお応えできる車両をご用意

1 t 保冷車 (空調車) 9 台	4 t 保冷車エアサス (空調車) 1 台
2 t 保冷車 (うち空調車 3 台) 4 台	4 t 保冷車エアサス PG (空調車) 2 台
3 t 保冷車 PG (空調車) 3 台	4 t 保冷車 (温調車) 1 台
	4 t 保冷車 (空調車) 2 台



マウス・ラット輸送箱

滅菌した輸送箱を事前にお届け致します。

サル輸送ケージ

特定外来生物の飼養等の許可を受けているケージをご用意しております。

ブタ用荷台柵

ケージに入らないブタ・遺伝子改変ブタにご対応致します。



カーテン・フィルタ・ネズミ返し

積載室の温度管理や虫を防ぐためのカーテン、大気中の砂・ほこり・カビ・菌等の不純物を防ぐためのフィルタ、積載室の動物（遺伝子改変動物）の逃亡防止のためにネズミ返しの設置をしています。



最大 1 億円の車両保険

保冷装置、温度調節機などの破損、故障の際に運送中のものが壊れたり、死んでしまった場合は補償になります。
万が一動物輸送中に冷蔵機が故障した場合の対処は菱重コールドチェーンの全国のロードサービスで 24 時間 365 日対応します。

Kuzuu Vector Science Inc.
~Siculus imperium transportation of ago bestia pro medical~
有限会社葛生運送 メディカルバイオ・アニマル輸送部

千葉県成田市新田 280-1
TEL 0476-73-2403
FAX 0476-73-2419

葛生運送

<http://www.kuzuu.transport.com>
info@kuzuu.transport.com