

Poster Presentation for JALAS 2019

(Japanese Association for Laboratory Animal Science)

Building of Microbiome experiment Using bioBUBBLE and IVC

Yuyo KA¹, Tomoyuki OGURA¹, Kayo TOMIYAMA¹,
Masami UENO¹, Ryoko NOZU¹, Yuya NOZAWA²,
Nobuyuki TSURUZONO³, Riichi TAKAHASHI¹

1. Central Institute for Experimental Animals (CIEA)

2. CLEA Japan, Inc.,

3. NOMURAJIMUSHO, INC

バイオバブルクリーンルームと個別換気ケージを用いた マイクロバイーム動物実験の環境構築

Building of microbiome experiment using bioBubble and IVC

✧ 何裕遥¹、小倉智幸¹、富山香代¹、植野昌未¹、野津量子¹、野澤侑也²、鶴藺伸幸³、高橋利一¹

¹公益財団法人 実験動物中央研究所、²日本クレア株式会社、³株式会社野村事務所

✧ Yuyo KA¹, Tomoyuki OGURA¹, Kayo TOMIYAMA¹, Masami UENO¹, Ryoko NOZU¹, Yuya NOZAWA²,
Nobuyuki TSURUZONO³, Riichi TAKAHASHI¹

¹Central Institute for Experimental Animals (CIEA), ²CLEA Japan, Inc., ³NOMURAJIMUSHO, INC

CIEA

SINCE 1952

目的

無菌、ノートバイオームマウスを用いた動物実験は、これまでビニールアイソレータ（以下、VI）が用いられてきたが、VIの準備に時間がかかっていた。近年、個別換気ケージ（以下、IVC）を用いた無菌マウスの飼育維持が報告されている。我々は、この飼育技術のマイクロバイーム動物実験への適用を目指し、バイオバブルクリーンルーム（以下、バブル）とIVCを組み合わせた飼育環境を構築した。無菌マウスの飼育維持および、有菌マウスとの同時飼育ができるか検討を行い、バブルとIVCにおける微生物制御能を評価した。

評価

実験1：陽圧制御のコンベンショナル飼育室で、無菌マウスの飼育維持ができるか（3ケージ）

実験2：同一IVCラック内で無菌マウスと有菌マウスを飼育できるか（無菌：2ケージ、有菌：4ケージ）

実験3：マイクロバイーム実験を想定した陰圧制御のBSL2実験室で、バブルと安全キャビネットを用いて無菌マウスの飼育維持ができるかを検討した。（2ケージ）

材料・方法

-バブルとIVCを用いた実験環境の構築-

1) 陽圧制御のコンベンショナル飼育室(図1)

WSとPB付属のバブル（bioBUBBLE, Inc）を設置、IVCラックはソフレッシュケアラック（日本クレア(株)）(図2)を使用した。作業者は無塵衣を着用してバブルに入室し、ケージ交換等はWSで実施した。

2) 陰圧制御のBSL2実験室(図3)

マイクロバイーム動物実験の環境を想定しSCを覆うようにバブルを設置した。以降は1) に準じ、ケージ交換等はSCで実施した。



図1：陽圧制御のコンベンショナル飼育室

図2：IVCラック

図3：陰圧制御のBSL2実験室

-機材の滅菌方法-

飼育機材はIVC毎に1セット(図4)で準備した。滅菌条件を良くするためにケージの蓋をずらした状態(図5)で2重の滅菌袋に収容した。ロガーによる温度実測値(図6)から飼育機材の滅菌条件を127℃ 40分とした。水の滅菌は耐熱容器に温水を充填し、容器の蓋を緩めた状態(図7)で2重の滅菌袋に収容した。同様な予備検討から滅菌条件は127℃ 90分とした。滅菌済機材は滅菌袋を1枚外しPBに収容後、MB-10（500ppm）を噴霧し一晩静置した。



図4

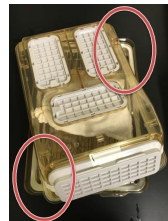


図5

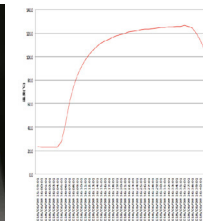


図6

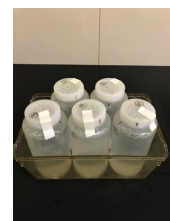


図7

-WSへのIVCの導入方法-

作業前にWS内にMB-10を噴霧した。使用中のIVCは外装にMB-10を噴霧してWS内に導入した(図8)。WSのスペース上、1度の搬入は3ケージ以内とした。WS内にMB-10を噴霧して5分間静置し、PBから滅菌済IVCを搬入した。

-ケージ交換-

マウスはピンセットを使って移動した。ピンセットは70%エタノール入りのピンセット立てに入れ、ケージ毎に交換した。作業ごとに70%エタノールが入ったハndsプレーを用いて手指の消毒を行った(図9)。ケージ交換は週1回実施した。実験2ではケージ交換の順番は有菌の3ケージを先に実施し、次に無菌、有菌、無菌の順番でケージ交換を実施した(図10)。また、ピンセットとハndsプレーは無菌と有菌マウスで使い分け、無菌マウス飼育のIVCを操作するときはグローブを交換した。

-清掃・消毒-

作業後は70%エタノールを用いてWS内や作業台、床を清拭し、清掃・消毒を行なった(図11)。バブルの外は塩素水(200ppm)を用いて、清掃・消毒した(図12)。

-無菌検査と有菌定着マウス-

無菌検査は日本実験動物学会の検査法に準じ週1回、全ケージで実施した。有菌マウスにはAltered Schaedler Flora（以下、ASF）定着のノートバイオームマウスを使用した。ASFの検査も無菌検査と同様の頻度で実施した。

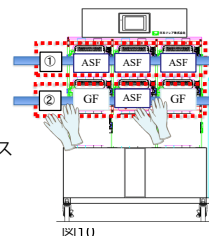


図10



図11



図12



図13

結果・考察・総括

実験1

結果：38週間の無菌マウス飼育の維持を確認し維持を終了した。

考察：マイクロバイーム動物実験では、菌投与から評価までの期間をおおよそ1ヶ月と想定しているが、さらなる長期飼育も可能であると考えている。

実験2

結果：同一ラックに混在する無菌IVCケージと、有菌IVCケージのマウスを29週間飼育の維持を確認し維持を終了した。

考察：無菌マウスが維持できた結果は、IVCケージ間でクロスコンタミネーションを起こさずに管理ができることを示している。従来であれば、評価する菌毎にVIの準備が必要となるところ、IVCの使用により大幅な作業スペースの削減と時間短縮が可能となることが示唆された。

実験3

結果：14週間の無菌マウス飼育の維持を確認し維持を終了した。

考察：実験1、2の結果を受け、マイクロバイーム動物実験を実施するBSL2環境での評価へ進めた。BSL2環境では室圧陰圧制御で、かつマウスは陰圧制御のSCを使って管理する必要(図13)がある。そこで、SCを覆うようにバブルを設置し、無菌マウスを維持することができた。

総括

以上の兼用により、マイクロバイーム動物実験に適用可能な新基盤技術が構築できたと考えている。さらなるステップとして実際のマイクロバイーム動物実験において信頼性検証を進めて行く。同時に本技術の汎用化を目指してSOP作成と技術の普及を目指したい。

Construction of experimental environment for Microbiome animal experiments using the bioBUBBLE Enclosure and the Individual Ventilation Cage

Purpose

The animal experiments with germ-free or gnotobiotic mice used to be operated with a vinyl isolator, but it takes much time to prepare the vinyl isolator. Recently, the rearing and maintenance of germ-free mice using individual ventilation cages has been promoted.

In order to apply the breeding technology to microbiome animal experiments, the bioBUBBLE enclosure and IVC are combined to construct a breeding environment.

The method comprises examining the possibility of keeping and simultaneously breeding germ-free mice and not germ-free mice simultaneously breeding and evaluating the ability to control microorganisms in the bioBUBBLE enclosure and IVC.

Assessment

Experiment 1: Confirming whether germ-free mice can be kept and maintained in a positive pressure-controlled conventional breeding room. (3 cages)

Experiment 2: Confirming whether germ-free mice and ASF mice can be reared in the same IVC rack. (2 cages for germ-free mice, 4 cages for ASF mice)

Experiment 3: In the BSL 2 lab room, where the microbiome experiment is conducted under negative pressure, for breeding germ-free mice by using the bioBUBBLE enclosure and safety cabinet.

Materials and Methods

Construction of experimental environment using the bioBUBBLE enclosure and IVC

1) The conventional breeding room under the positive pressure (Figure 1)

Install the bioBUBBLE enclosure with a working station and pass-through box. The IVC is made by Japan CLEA. (Figure 2). The operator must wear dust-free clothes in order to enter the bB enclosure, and must also change the cages in the working station.

2) BSL 2 lab room under negative pressure (Figure 3)

Assuming the environment of the microbiome animal experiment, install the bioBUBBLE enclosure in order to cover the safety cabinet. The IVC rack is made by Japan CLEA (Figure 2). The operator must wear dust-free clothes in order to enter the bB enclosure,

and must also change the cages in the safety cabinet.

Equipment sterilization method

One set of breeding equipment was prepared (Figure 4) for each IVC. The cage was placed in a double sterile bag with the lid of the cage shifted in order to improve sterilization conditions (Figure 5). The sterilization of breeding equipment was at 127 degree C for 40 minutes (Figure 6). In the sterilization of water, the heat-resistant container was filled with warm water, and the container was placed in a double sterilization bag with the lid of the container loosened (Figure 7). From the same preliminary study, sterilization conditions were set at 127 degree C for 90 minutes. The sterilized equipment was removed and stored in the pass-box, sprayed with MB-10 (500 ppm), and left overnight.

The method of introducing IVC to the working station

MB-10 was sprayed into the working station before work. The IVC in use was introduced into the working station by spraying MB-10 on the exterior (Figure 8). Due to the space of the working station, one loading was upto 3 cages. We sprayed MB-10 in the working station and let it stand for 5 minutes, and then carried in the sterilized IVC from the pass-box.

Cage replacement

The mice were moved using tweezers. The tweezers were placed in a 70% ethanol-containing tweezer stand and exchanged for each cage. The hands were disinfected using a hand spray containing 70% ethanol each time (Figure 9). The cage was changed once a week. In Experiment 2, the cage replacement was carried out for 3 cages of ASF mice first, next, cage replacement was performed in the order of germ-free, ASF, and germ-free (Figure 10). Tweezers and a hand spray were used for both germ-free and ASF mice, and the gloves were changed when operating the IVCs for germ-free mouse breeding.

Cleaning and Disinfection

After work, we cleaned and disinfected the working station, work bench, and floor with 70% ethanol (Figure 11). The outside of the bioBUBBLE enclosure was cleaned and disinfected using chlorinated water (Figure 12).

Germ-free inspection and ASF mice

The sterility test conforms to the test method of the Japan Society of Experimental animals once a week, and it was carried out in all the cages. For the ASF mice, we used the Altered Schaedler Flora (ASF) established gnotobiotic mice. ASF inspection was also performed as frequently as sterility testing.

Results, Consideration, Supervision

Experiment 1

Result: 38 weeks of breeding germ-free mice was confirmed, and maintenance was terminated.

Consideration: In microbiome animal experiments, the period from bacterial administration to evaluation requires approximately 1 month, and we believe that further long-term breeding is also possible.

Experiment 2

Result: Mice were bred for 29 weeks with germ-free IVC cages and ASF IVC cages mixed in the same rack, and maintenance was terminated.

Consideration: The results of maintaining germ-free mice indicate that they can be managed without cross-contamination between IVC cages. If it is conventional, we need to prepare the vinyl isolator for each bacteria to be evaluated, by using IVC cages; it was suggested that a significant reduction of working space and time could be achieved.

Experiment 3

Result: Maintenance of 14 weeks of germ-free mice breeding was confirmed and terminated.

Consideration: Based on the results of experiments 1 and 2, we proceeded to evaluate mice in the BSL 2 environment, where microbiome animal experiments will be conducted. In the BSL 2 environment, there is a need for negative pressure, and the mice in the safety cabinet are kept under negative pressure (Figure 13). So, we set up the bioBUBBLE enclosure to cover the safety cabinet; it was possible to maintain the germ-free mice.

Supervision

By using both the bioBUBBLE enclosure and the IVC cages, a new basic technology applicable to microbiome animal experiments has been developed. As a further step, we will proceed with the verification of reliability in actual microbiome animal experiments. At the same time, we aim to create the SOP and spread the technology, aiming at generalization of this technology.