放射線滅菌飼料に関する研究 I. 無菌動物用飼料への応用

岩藤 誠吾・鈴木 善雄

三共株式会社 中央研究所

紫 部 楨 己*

日本原子力研究所高崎研究所

・ 飯 塚 廣

東京大学応用微生物研究所

・ 仲 川 憲 一

オリエンタル酵母工業株式会社

(1970年2月12日受付)

近年無菌動物および SPF 動物 (Barrier-sustained Animals) が動物実験に必要欠くべからざるものとなり、今後もさらにその利用は増大するものと考えられる。現在では、これらの動物の飼育には加圧蒸気滅菌した飼料が用いられているが、この方法では満足すべき繁殖成績は得られておらず、飼料の滅菌方法の研究開発は無菌動物および SPF 動物の飼育上の重要な問題点となっている。実験動物の飼料の放射線滅菌については最近いくつかの報告がみられる [1][2][3][4] が、滅菌飼料による無菌動物および SPF 動物の飼育繁殖試験は試みられていない。

著者らは穀類の保存を目的として放射線、とくに⁶⁰Coの γ -線照射による殺菌殺虫の研究を行い良好な結果を得た [5][6][7][8]。そこでこれらの実験結果にもとづいて、今回は γ -線照射を無菌動物および SPF 動物用飼料の滅菌に応用する目的で本研究を行った。

材料および方法

1. 動物

三共株式会社 中央研究所動物飼育場の barrier system で維持されている帝王切開由来の Wistar-Imamichi ラット [9] を用いた。動物は温度 $24\pm 2^{\circ}\text{C}$ および湿度 $55\pm 10\%$ の条件で飼育した。

2. 飼 料

市販オリエンタル酵母工業株式会社製特殊繁殖用固型飼料 (CMF) を用いた。

3. γ -線照射方法

日本原子力研究所高崎研究所にて、8万キュリーの⁶⁰Co 板状線源を用い、照射率 $0.5\times 10^6\text{R/hr}$ の位置でポリエチレン袋二重にシールし $27\times 27\times 22\text{cm}$ 立方のダンボール箱に入れた 20kg の前記飼料について、0.5, 1.0, 1.5, 2.0, 2.5 および $3.0\times 10^6\text{R}$ の照射を行い完全殺菌の最低線量を検討した。

4. 殺菌効果の判定

前記各条件で照射した固型飼料を任意抽出して、1個宛別々のチオグリコレート液体培地に投じ 31°C にて7

日間培養を行い菌の増殖の有無を判定した。

5. 飼育・繁殖試験

加圧蒸気滅菌した CMF および離乳食 (オリエンタル酵母工業株式会社製) を併用して飼育した生後13週令のラットを交配し、腔栓または精子の確認された雌を3群に分けた。これら3群に、 $3\times 10^6\text{R}$, $6\times 10^6\text{R}$ 照射飼料および加圧蒸気滅菌飼料をそれぞれ与え出産させた。出産後産仔数を数え、体重測定および性別判定を行なった後、一腹哺乳仔数を雄4匹雌4匹、計8匹に制限した。哺乳仔は3週で離乳し雄雌を分け、1ケージ4匹飼いとして、それぞれ親と同じ飼料により生後10週令まで飼育し、この間毎週体重測定を行うとともに雌の腔開口日令を観察した。さらに10週令で血液および臨床化学検査を行った。また、各滅菌飼料の胎仔におよぼす影響を検討するため哺乳の終わった雌を同一飼料で飼育しつつ再び妊娠させ、妊娠21日に開腹し、胎仔の外形および骨格の異常の有無を観察した。

成 績

1. γ -線による飼料の殺菌効果

表1に示したように0.5, 1.0 および $1.5\times 10^6\text{R}$ 照射飼料の一部についてはいずれも菌の増殖が認められ、陽性率は $0.5\times 10^6\text{R}$ 照射飼料では100%, $1.0\times 10^6\text{R}$ 照射飼料では70%, $1.5\times 10^6\text{R}$ 照射飼料では40%であった。しかし、 $2.0\times 10^6\text{R}$ 以上照射された飼料のすべてについては菌の増殖が全くみられなかった。この成績から完全殺菌のための最低線量として $3\times 10^6\text{R}$ 、高線量として $6\times 10^6\text{R}$ の2段階の照射量を選定して以下の実験を行なった。なお、対照として同一飼料を加圧蒸気滅菌(121°C —20分)して供試した。

2. 繁殖成績

γ -線照射および加圧蒸気滅菌飼料で飼育したラットの繁殖成績を表2に示す。各群とも腔栓または精子の確認された雌を13匹用意した。出産率は $3\times 10^6\text{R}$ 照射群では92.3%であったが、 $6\times 10^6\text{R}$ 照射群および蒸気滅菌群ではともに61.5%と $3\times 10^6\text{R}$ 照射群と比べ低い出産率を示したが統計的に有意とはいえなかった。平均産仔数は $6\times 10^6\text{R}$ 照射群および蒸気滅菌群は12.6匹および12.3匹

* 現在 日本原子力研究所ラジオアイソトープ研修所

とほぼ同数であったが、 $3 \times 10^6 R$ 照射群は15.0匹と他の2群に比較し有意差が認められた。なお、妊娠期間は各群ともに21日で差は認められなかった。

3. 生後の発育成績

各滅菌飼料で飼育したラットの体重増加および摂餌量を図1および図2に示す。すなわち、 3 および $6 \times 10^6 R$ 照射飼料で飼育したラットの成長は、雌雄とも非常によく、10週令における平均体重は雌で約240g、雄で約300gであった。これに比べ蒸気滅菌群の体重増加はきわめて悪く、10週令においても雌で約150g、雄で約160gであった。また、平均摂餌量もほぼ体重増加と平行して γ -線照射飼料の方がまさっていた。

各滅菌飼料で飼育したラットの腔開口日令と開口時の体重を図3に示す。 3 および $6 \times 10^6 R$ 照射群の平均腔開口日令に差は認められずしかもばらつきが小さかった。しかし、蒸気滅菌群は図に示した通り、ばらつきが大きく、10週になっても開口しなかったものが4例(20%)も

Fig.1 Body weight gain of male and female rats given γ -ray-exposed or autoclaved pellets

Each point indicates a mean value of 20 animals, Vertical lines at each point show standard deviations

Fig.2 Consumption of γ -ray-exposed or autoclaved pellets by male and female rats

Each point indicates a mean value of 20 animals,

Fig.3 Age and body weight at the opening of vagina in rats fed γ -ray-exposed or autoclaved pellets

認められた。

各滅菌飼料群の10週令における血液および臨床化学検査の結果を表3に示す。 3 および $6 \times 10^6 R$ 照射群には差は認められないが、蒸気滅菌群では γ -線照射群と比べ赤血球数、Hematocrit 値および Hemoglobin 量が有意に低く、Alkaline phosphatase 活性および Cholesterol 値などが有意に高かった。

4. 胎子におよぼす影響

妊娠期間中各滅菌飼料を与えたラットの妊娠21日における観察結果を表4に示す。各群の死亡胚胎仔数に差は認められず、奇形仔も $6 \times 10^6 R$ 照射群に1例(下顎裂を伴う口吻短縮)認められたのみであった。しかしながら、生仔平均体重では蒸気滅菌群が γ -線照射群に比較して有意に小さかった。また、各群生仔の alizarin red S 骨染色標の観察結果でもほとんど異常は認められなかった。

考 察

照射滅菌条件決定の実験の結果 $2 \times 10^6 R$ 以上の照射で十分な殺菌ができることを確認したが、安全率を見込んだ完全殺菌の最低線量は $3 \times 10^6 R$ と考えられる。この成績は飼料の種類は異なるが、

Table 1. Thioglycolate broth culture of γ -ray-exposed or autoclaved pellets

Treatment	Number of pellets tested*	Positive pellets	
		No.	%
Non-treated	10	10	100
γ -ray-exposed			
0.5 Mrad	10	10	100
1.0	10	7	70
1.5	10	4	40
2.0	20	0	0
2.5	20	0	0
3.0	30	0	0
Autoclaved**	20	0	0

* Each randomly sampled pellet was introduced into a test tube containing thioglycolate broth and observed for 7 days.
** at 121° for 20 minutes

Table 2. Reproduction in rats maintained on γ -ray-exposed or autoclaved pellets

pellet †	Number of pregnancy	Number of parturition (%)	Duration of pregnancy	Number of offsprings (average litter size $\pm$ S.E.)
γ -ray-exposed				
3 Mrad	13	12 (92.3)**	21	181 (15.0* $\pm$ 0.14)
6 Mrad	13	8 (61.5)	21	101 (12.6 $\pm$ 0.85)
Autoclaved	13	8 (61.5)	21	98 (12.2 $\pm$ 0.66)

† Indicated pellets were given after mating
* $P < 0.05$
** $0.05 < P < 0.01$

Table 3. Blood properties of 10-week-old rats fed γ -ray-exposed or autoclaved pellets

Pellet	Sex	Leucocyte count ($\times 10^3$)	Erythrocyte count ($\times 10^4$)	Hemoglobin (g/dl)	Hematocrit (%)	Total serum protein (gm/dl)	A/G ratio	Urea nitrogen (mg/dl)	GPT (units*)	Alkaline Phosphatase (units**)	Total cholesterol (mg/dl)
γ -ray-exposed											
3 Mrad	♂	6.4 $\pm$ 0.33	773 $\pm$ 13.5	15.4 $\pm$ 0.26	45.8 $\pm$ 1.10	6.3 $\pm$ 0.15	1.27 $\pm$ 0.07	21.4 $\pm$ 0.6	30.5 $\pm$ 1.7	67 $\pm$ 4.2	107 $\pm$ 6.4
	♀	6.0 $\pm$ 0.38	778 $\pm$ 15.0	14.7 $\pm$ 0.20	43.8 $\pm$ 0.65	6.2 $\pm$ 0.09	1.38 $\pm$ 0.04	20.0 $\pm$ 0.9	30.9 $\pm$ 1.8	64 $\pm$ 1.7	107 $\pm$ 3.8
6 Mrad	♂	6.4 $\pm$ 0.29	763 $\pm$ 16.5	14.5 $\pm$ 0.22	46.0 $\pm$ 0.53	6.2 $\pm$ 0.08	1.39 $\pm$ 0.06	24.0 $\pm$ 0.8	30.8 $\pm$ 1.8	62 $\pm$ 3.8	105 $\pm$ 1.6
	♀	6.5 $\pm$ 0.24	761 $\pm$ 20.3	14.4 $\pm$ 0.47	43.1 $\pm$ 0.85	6.3 $\pm$ 0.05	1.42 $\pm$ 0.03	21.0 $\pm$ 0.8	35.1 $\pm$ 1.8	68 $\pm$ 4.2	108 $\pm$ 5.3
Autoclaved	♂	6.2 $\pm$ 0.31	728 $\pm$ 13.8	13.7 $\pm$ 0.25	40.6 $\pm$ 1.53	5.6 $\pm$ 0.19	1.53 $\pm$ 0.05	17.0 $\pm$ 0.8	33.9 $\pm$ 1.7	79 $\pm$ 4.3	132 $\pm$ 6.7
	♀	6.0 $\pm$ 0.33	699 $\pm$ 11.6	13.8 $\pm$ 0.19	42.0 $\pm$ 0.73	5.6 $\pm$ 0.13	1.51 $\pm$ 0.04	18.0 $\pm$ 0.7	28.1 $\pm$ 1.1	69 $\pm$ 0.8	126 $\pm$ 4.2

Each value indicates a mean $\pm$ standard deviation of 8 animals
* Karmen units
** King-Armstrong units

Table 4. Development of rat embryos of which mothers were maintained on γ -ray-exposed or autoclaved pellets

Pellet	Number of dams	Body weight of dam(g) [†]		Total number of conceptuses (average/dam)	Number of surviving fetuses (average/dam)	Pregnancy wastage (%)	Number of malformed fetuses (%)	Mean body weight of surviving fetuses [†]
		0 day	20 th day					
γ-ray-exposed								
3 Mrad	11	310±16.4	460±11.7	171(15.6)	163(14.8)	8(4.68)	0	4.92±0.022
6 Mrad	6	315±11.9	464±17.8	94(15.7)	89(14.8)	5(5.32)	1(1.12)	4.91±0.046
Autoclaved	7	294±12.6	414±13.8	100(14.3)	97(13.8)	3(3.00)	0	4.83*±0.043

[†] Mean $\pm$ standard error

* $p < 0.05$

Horton ら[1]は 3×10^6 R, Porter ら[2]は 2.5×10^6 R, 北爪ら[10]は 3×10^6 , Cook ら[4]は, 2.5×10^6 R の線量の ^{60}Co - γ -線ですべて完全殺菌の可能性を報告しているのとはほぼ一致する。

3×10^6 R 照射群の出産率は92.3%であった。当飼育場の交配雌に対する出産雌割合は通常約90%であるが、これらには不妊雌も含まれているので、この点を考慮に入ればほぼ同じ出産率と思われる。 6×10^6 R 照射群および蒸気滅菌群の出産率は61.5%と 3×10^6 R 照射群と比べ低かった。しかし、これらの群でも出産までに至らなかった母体の体重増加は産後確認後7～10日までは正常であるが、それ以後は増加を示さなかった。このことから、出産しなかったラットの胚は着床までは正常な発育を続けたが、着床後まもなくの間に死滅したものと推察される。産仔数は 6×10^6 R 照射群12.6匹および蒸気滅菌群12.2匹で 3×10^6 R 照射群15.0匹と比べ約20%少なかった。これら3群の出産した母体は交尾後、すなわち排卵後に飼料が切換えられたことから、各群とも排卵数に差はないものと思われる。また表4に示した通り3群間の胚胎仔の死亡率に差は認められなかった。これらのことから、産仔数の差は受精から着床痕として認められる間の胚の死亡率に差が生じた結果と考えられる。 6×10^6 R 照射群に1例のみ奇形仔が認められたが、成立頻度にも有意性は認められず、おそらく自然発生奇形と思われる。しかしながら実験例数も少なく現在詳細に検討している。

γ -線照射によって飼料中の各種成分が破壊される[11]ことがよく知られているから、高線量照射による飼料への影響をもみるため、われわれは 6×10^6 R 照射した飼料についても飼育繁殖試験を行った。Luckey ら[12]はX線、また Kraybill ら[13]は加圧蒸気滅菌により飼料中の種々の微量栄養素が破壊ならびに変性されることを報告している。Ferrando ら[11]は γ -線による飼料中のビタミンAの減少について述べ、Hickman [14]は γ -線により飼料中のビタミンは少量失なわれるが、栄養

障害を引き起すほどのものではないと報告している。われわれの成績では、 3×10^6 R 照射群は繁殖成績および生後の発育成績に異常は全く認められず、 6×10^6 R 照射群および蒸気滅菌群と比べ良好な結果が得られた。 6×10^6 R 照射群は 3×10^6 R 照射群と比べ出産率の低下ならびに産仔数の減少が認められた。このことは、 6×10^6 R 照射によって飼料中の特定の成分にかなりの減少ならびに不活化が起っていることを示すものと考ええる。これらに対し、加圧蒸気滅菌飼料は、滅菌による飼料の硬度の増大ならびに各程栄養素の変性・破壊などにより、出産率の低下と産仔数の減少を引き起し、さらに生後の発育にもかなりの影響をおよぼしたものと思われる。

本実験の結果から、 ^{60}Co の γ -線照射滅菌は無菌動物および SPF 動物用飼料の滅菌手段として加圧蒸気滅菌よりすぐれ、充分実用できる確信を得た。その際の照射線量は完全殺菌の安全率を見込んだ 3×10^6 R が適当と考える。なお、繁殖試験、世代試験および各滅菌飼料の化学分析結果については次報にゆずる。

照射料金は現在わが国で行なわれている委託照射料金から試算すると、包装や運賃などを考慮に入れ大体1kg 当り150円になる。

要 約

無菌動物および SPF 動物用飼料の滅菌に ^{60}Co - γ -線照射を応用する目的で本研究を行なった。 3×10^6 R 完全殺菌照射飼料による繁殖成績ならびに生後の発育成績はいずれも加圧蒸気滅菌飼料に比べてすぐれていた。 6×10^6 R 照射飼料では 3×10^6 R 照射飼料に比べ出産率の低下および産仔数の減少が認められた。

終りに本研究を行うに際し、飼料の滅菌に御助力下さった伊藤均氏、渡辺宏氏(日本原子力研究所高崎研究所)ならびに岩田寿雄氏(オリエンタル酵母工業株式会社)に、また種々助力して下さった三共株式会社中央研究所動物飼育場の方々に厚くお礼申し上げる。

文 献

- [1] Horton, R.E. and Hickey, J.L.S.: Irradiation diets for rearing germ-free guinea pigs. *Proc. Anim. Care Panel*, 11, 93~106, (1961).
- [2] Porter, G. and Lane-Petter, W.: Observation on autoclaved, fumigated and irradiated diets for breeding mice. *Brit. J. Nutr.*, 19, 295~305, (1965).
- [3] 山田淳三・北爪雅之: 放射線による飼料の滅菌方法についての検討。II. 成長繁殖におよぼす影響。実験動物, 16, 140, (1967)。
- [4] Cook, R. and Bishop, A.: Results of bacteriological testing of germ-free laboratory animals. *Lab. Anim.*, 3, 79~92, (1969).
- [5] Iizuka, H. et Ito, H.: Effect de irradiation gamma sur la microflora du rig. *Irradiation des Aliments*, 8, 21~29, (1967).
- [6] 飯塚廣・伊藤均: γ -線照射と米のマイクロフローラ (穀類の微生物に関する研究 第9報)。農化, 41, 578~584, (1967)。
- [7] Iizuka, H. and Ito, H.: Effect of gamma-irradiation on the microflora of rice. *Cereal Chem.*, 45, 503~511, (1968).
- [8] 伊藤均・紫部禎己・飯塚廣: γ -線照射による米の貯蔵効果とマイクロフローラ (穀類の微生物に関する研究 第10報)。農化, 43, 773~779, (1969)。
- [9] 今道友則: 繁殖生理および内分泌学研究に適する生理的特徴を目標とした Wistar-Imamichi rat の育成について。日本臨床, 19, 臨時増刊号, 99~109, (1961)。
- [10] 北爪雅之・齡亀一郎・村田繁子・山田淳三: 放射線による飼料の滅菌方法についての検討 I. 放射線の滅菌効果について。実験動物, 16, 139, (1967)。
- [11] Ferrando, R., Pantaléon, J. et Fromageot, D.: Étude comparative de la stérilisation classique et de la radappertisation sur un aliment destiné au rat. *Ann. Nutr. Alim.*, 22, 25~27, (1968).
- [12] Luckey, T.D., Wagner, M., Reyniers, J.A. and Foster, F.L. JR.: Nutritional adequacy of a semisynthetic diets sterilized by steam or by cathode rays. *Food Research*, 20, 180~185, (1955).
- [13] Kraybill, H. F.: Nutritive effects of foods sterilized by ionizing radiation. *Nutrition Revs.*, 13, 193~195, (1955).
- [14] Hickman, J. R.: Sterilisation of laboratory animal diets by gamma radiation. *Veterinary Record*, 80, 446, (1967)。

Sterilization of Laboratory Animal Diets by Gamma Radiation

I. Breeding of Barrier-sustained Animals with Irradiated Diets

Seigo IWADO and Yoshio SUZUKI

Central Research Laboratories, Sankyo Co., Ltd., Tokyo

Hiroshi IIZUKA

Institute of Applied Microbiology, University of Tokyo, Tokyo

Sadami SHIBABE

Japan Atomic Energy Research Institute, Takasaki Radiation
Chemistry Research Establishment, Takasaki

Kenichi NAKAGAWA

Oriental Yeast Co., Ltd., Tokyo

The pellets sterilized by gamma radiation were tested for breeding of barrier-sustained rats. Sterilization was sufficiently achieved by an exposure of the pellets to 3 Mrad. The rats fed the pellets exposed to 3 Mrad showed a reasonably

reproducibility and their offsprings which were fed the same pellets grew well as compared to the animals given autoclaved pellets, although exposure of the pellets to 6 Mrad affects parturition rate and litter size significantly.