Automatic Rearing System of Mice and Transmission of *Pseudomonas aeruginosa*

Masahiro ITO, Teruo MAGARIBUCHI, Tadashi NISHIHARA and
Kaoru KOSHIMIZU

Division of Animal Research, Faculty of Medicine,
University of Tokyo, Tokyo 113, Japan

(Received for publication: April 28, 1978)

Mice either excreting or not excreting *Pseudomonas aeruginosa* in feces were maintained in stainless steel mesh cages on an automated rearing apparatus with automatic water-supply nozzles and intermittently flushing metal racks. No evidence of transmission of the organisms from positive mice to negative ones was obtained during at least eight weeks.

マウスの自動飼育と緑膿菌の伝達

伊藤 正博・曲渕輝夫・西原 正・興水 馨
東京大学医学部附属動物実験施設

先報 [7] においては、自動飼育装置により ICR マウスを 3 週齢より 14 週齢まで飼育し、従来の給水瓶・アルマイトケージ・床敷方式に比較して飼料・飲水の消費量、体重、各臓器重量、血球数およびヘマトクリット値の経時的変化に大差がないことを明らかにした。

今回は、この自動飼育方式により糞便内緑膿菌陽性マウス（以下陽性マウス）および緑膿菌陰性マウス（以下陰性マウス）を飼育し、従来の給水瓶・アルマイトケージ床敷方式と対比させながら、糞便内および飲水内緑膿菌の有無を指標にして本菌の伝達を検討したのでその成績の概要を報告する。

材料および方法

供試マウス：陽性マウスとして 4 週齢♀の SPF JCL : ICR 糞便内緑膿菌の血清型がすべて C 群 [4, 6] のを実験に供した。陰性マウスとして 4 週齢♀の SPF CRJ : CD-1 (ICR) を用いたが、試験Ⅱ-1 では 4 週齢♂の SPF DDD を用いた。

飼育装置：自動飼育装置は、先に報告 [7] したような自動給水ノズル（以下ノズル）・金網ケージ・水洗架台方式を用いた。金網ケージは周囲がすべてステンレス製金網で、網目幅は 5 × 5 mm のものを使用した。対照として従来の給水瓶・アルマイトケージ・床敷方式を用いた。

飼育方法：自動飼育における給餌は、固型飼料 MF（オリエンタル酵母）を天井落とし込み式給餌器により自由に与えた。給水は、水道 2.5 ℓ をコルベンに入れ 121°C 60 分間高圧滅菌してから給水ポリタンクに満たし、ステンレス製パイプを通じノズルに導き自由に摂取させた。金網ケージは試験期間中 1 度も交換しなかったが、水洗架台上的糞尿等は 1 日 1 回約 20 ℓ の水道水を流して処理した。

対照群の給餌は自動飼育と同じであるが、給水は容量約 250 ml のポリ製給水瓶ごと 121°C 20 分高圧滅菌した水道水を自由に摂取させ、給水瓶の交換は試験Ⅰでは週 2 回、試験Ⅱでは週 1 回とした。床敷は週 2 回ケージごと滅菌した新しいものと交換した。

飼育室の温度は $23\pm 1^{\circ}\text{C}$ ，湿度は $50\pm 5\%$ とした。

緑膿菌の検査：供試マウスの糞便内緑膿菌の有無は，試験開始前に2度各マウス新鮮便の培養によって判定した。すなわち，前島ら[5]の方法に準じ，マウスの新鮮便2個を5mlのNAC-broth（栄研）を入れた小試験管に採取して 37°C で48時間増菌培養後，その1白金耳をNAC-agar（栄研）上に塗抹培養し24時間後に集落形成の有無を観察した。寒天上に発生した集落は五島ら[3]の方法によって同定した。検出された緑膿菌は緑膿菌診断用血清（東芝化学）を用いスライド凝集反応によって血清型を決定した。

飲水は給水タンク，ノズルおよび給水瓶より無菌的に1ml採水し前記の方法により検査した。

空中落下緑膿菌は試験開始前，試験期間中および試験終了後に実験室内の水洗架台直前の床上に内径9cmのNAC-agar 2枚を1時間開放し，その後 37°C で48時間培養して検査した。

実験成績

I．同居による伝達試験

給水方式とケージの組合せを Fig. 1 に示すように4種類とし，同一ケージ内のマウス間の緑膿菌の伝達を試験した。すなわち，陽性マウス5匹と陰性マウス5匹を同居させ糞便内および飲水内の緑膿菌を毎週検査した。ノズルを用いた場合，同居感染は少なくとも4週間は成

Cage No.		Weeks after contact				
		0	1	2	3	4
1	I	●●●	●●●	●●●	●●●	●●●
	R	○○○	○○○	○○○	○○○	○○○
	N	○	○	○	○	○
2	I	●●●	●●●	●●●	●●●	●●●
	R	○○○	○○○	○○○	○○○	○○○
	N	○	○	○	○	○
3	I	●●●	●●●	●●●	●●●	●●●
	R	○○○	●●●	●●●	●●●	●●●
	B	○	●	●	●	●
4	I	●●●	●●●	●●●	●●●	●●●
	R	○○○	●●●	●●●	●●●	●●●
	B	○	●	●	●	●

I : Infector mice   ● : Positive
R : Receptor mice   ○ : Negative
N : Water in nozzle
B : Water in bottle
Cage Nos 1 and 3 : Mesh cages
Cage Nos 2 and 4 : Alumite cages

Fig. 1 Transmission of *Ps. aeruginosa* by various cage and water supply systems

立せず，さらに飲水内にも緑膿菌の侵入は認められなかった。その逆に，従来の給水瓶を用いた場合飲水内に緑膿菌は速やかに侵入し同居感染が成立した。

Fig. 2. Watering system and cage arrangement in transmission experiment (II-1)

II. 自動飼育による伝達試験

(1) 給水経路を3本にした試験

自動飼育群は、 Fig. 2 に示すように給水装置および金網ケージを配置し中央の1ケージに陽性マウス5匹を収容し、その他の8ケージには陰性マウスを各々5匹ずつ収容した。ケージ間の水平距離は15cmあるいは30cmとした。対照群も自動飼育群と同じケージ配置とした。4週齢のマウスを12週齢まで飼育し、その間糞便内および飲水内の緑膿菌を毎週検査した。

自動飼育群の成績は、 Fig. 3 に示すように陽性マウスから他のマウスへの緑膿菌の伝達は認められなかった。さらに、陽性マウスを収容したケージのノズルをはじめ他ケージのノズルおよび給水タンク内いずれの飲水からも緑膿菌は検出されなかった。一方、対照群においても陽性マウスから他ケージへの緑膿菌の伝達は認められなかったが、陽性マウスを飼育中の給水瓶の飲水内には本菌の汚染が容易に認められた。

(2) 給水経路を1本にした試験

自動飼育群は、 Fig. 4 に示すように給水タンクおよび給水経路を1本にし、陽性マウス5匹を収容したケージを3ケージとした。残りの6ケージには陰性マウスを

Cage or water tank		Weeks after experiment began								
		0	1	2	3	4	5	6	7	8
1	R	88°	88°	88°	88°	88°	88°	88°	88°	88°
	N	o	o	o	o	o	o	o	o	o
2	R	88°	88°	88°	88°	88°	88°	88°	88°	88°
	N	o	o	o	o	o	o	o	o	o
3	R	88°	88°	88°	88°	88°	88°	88°	88°	88°
	N	o	o	o	o	o	o	o	o	o
4	R	88°	88°	88°	88°	88°	88°	88°	88°	88°
	N	o	o	o	o	o	o	o	o	o
5	I	88°	88°	88°	88°	88°	88°	88°	88°	88°
	N	o	o	o	o	o	o	o	o	o
6	R	88°	88°	88°	88°	88°	88°	88°	88°	88°
	N	o	o	o	o	o	o	o	o	o
7	R	88°	88°	88°	88°	88°	88°	88°	88°	88°
	N	o	o	o	o	o	o	o	o	o
8	R	88°	88°	88°	88°	88°	88°	88°	88°	88°
	N	o	o	o	o	o	o	o	o	o
9	R	88°	88°	88°	88°	88°	88°	88°	88°	88°
	N	o	o	o	o	o	o	o	o	o
Water tank 1		o	o	o	o	o	o	o	o	o
Water tank 2		o	o	o	o	o	o	o	o	o
Water tank 3		o	o	o	o	o	o	o	o	o

I : Infector mice

R : Receptor mice

N : Water in nozzle

● : Positive

○ : Negative

Fig. 3. Transmission of *Ps. aeruginosa* by automatic rearing system

各々5匹ずつ収容した。ケージ間の距離は試験(1)と同様とした。4週齢より8週間マウスを飼育し、糞便内および飲水内の緑膿菌を4, 5, 6, 7, 8, 12週齢時に検査した。その成績は Fig. 5 に示すように、この方式によっても緑膿菌が継続的に検出されたのは、はじめから陽性であったマウスのみでありその他のマウスおよびノズル・給水タンク内の飲水からは、少なくとも8週間は緑膿菌が検出されなかった。

(3) ノズルに緑膿菌を附着させた試験

自動給水装置および金網ケージは、 Fig. 4 と同様に配置しマウスを収容する前にケージ No. 3, No. 5 および No. 7 のノズルの先端を緑膿菌48時間培養 NAC-broth (菌量 10¹⁰/ml) に1秒間浸した。その翌日全ケージに陰性マウス4週齢を5匹ずつ収容し、その後10週間にわたり糞便内およびノズル・給水タンク内飲水の緑膿菌を毎週検査した。さらに No. 3, No. 5, No. 7 のノズルは各検査時に採水後その先端を上記と同様の菌液に1秒間浸した。対照としてアルマイトケージ1ケージのみに陰性マウスを5匹収容し、従来の給水瓶により飼育した。この際給水瓶の先端をノズルと同様に各給水瓶

Fig. 4. Watering system and cage arrangement in transmission experiment (II-2)

交換時に上記の菌液に浸した。

成績は、 Fig. 6 に示すように緑膿菌の培養液に浸したノズル内の飲水およびそのケージ内に収容した陰性マウスは、 3 ケージとも 1 週以内に緑膿菌陽性となった。しかし、 緑膿菌培養液に浸さなかったノズル内の飲水およびそのケージ内のマウス、 さらに給水タンク内の飲水には少なくとも 10 週間緑膿菌の伝達は認められなかった。対照の 5 匹の陰性マウスおよび給水瓶内の飲水はともに 1 週以内に緑膿菌陽性となり、 10 週間継続的に本菌が検出された。

Ⅲ. 落下緑膿菌の検査

実験室内の落下緑膿菌は試験開始前、 試験期間中および試験終了後のいずれにおいても全く検出されなかった。

考察ならびに結論

従来マウスの緑膿菌汚染は、 主に飲水を介するとされているので [1, 2, 8, 9], 今回は自動飼育装置においても緑膿菌が飲水を介し伝達されるか否かを検討した。

その結果、 自動飼育装置に緑膿菌陽性マウスが収容されたとしても少なくとも 8 週間はノズル内の飲水へ緑膿菌の汚染は認められず、 また他ケージの陰性マウスにも伝達されなかった。さらに、 ノズルを用いれば同一ケージ内のマウス間でも 4 週間は緑膿菌の伝達がおこらなかったが、 給水瓶を用いた場合には速やかに飲水内に緑膿菌が汚染し同居感染も成立した。

これらのことより従来報告 [1, 2, 8, 9] されているように、 マウス間の緑膿菌の伝達は飲水内に本菌が汚染することが主要因であることが裏付けられた。マウスコロニーの緑膿菌汚染防止で、 保菌飼育者の配置換えおよびゴキブリを駆除することにより汚染率が低下することも報告 [2] されているが、 今回の実験から考えると緑膿菌のケージ間の空間伝達およびマウス同志の接触伝達は、 飲水を介するより起り難いものと考えられる。

ノズルの先端に人為的に緑膿菌を附着させた伝達試験では、 そのケージのノズル内の飲水および収容した陰性マウスは速やかに緑膿菌が陽性となった。しかし、 他ケージのノズルおよび給水タンクの飲水内には少なくとも 10 週間緑膿菌の伝達は認められなかった。このことはきわめて重要で興味ある事実である。おそらく使用したノズルの構造が緑膿菌の侵入阻止に関与しているものと考えられるが、 現段階でその機序は不明であり、 今後他種のノズルについても検討したいと考える。

Cage or water tank		Weeks after experiment began						
		0	1	2	3	4	8	
1	R	88°	88°	88°	88°	88°	88°	
	N	o	o	o	o	o	o	
2	R	88°	88°	88°	88°	88°	88°	
	N	o	o	o	o	o	o	
3	I	88°	88°	88°	88°	88°	88°	
	N	o	o	o	o	o	o	
4	R	88°	88°	88°	88°	88°	88°	
	N	o	o	o	o	o	o	
5	I	88°	88°	88°	88°	88°	88°	
	N	o	o	o	o	o	o	
6	R	88°	88°	88°	88°	88°	88°	
	N	o	o	o	o	o	o	
7	I	88°	88°	88°	88°	88°	88°	
	N	o	o	o	o	o	o	
8	R	88°	88°	88°	88°	88°	88°	
	N	o	o	o	o	o	o	
9	R	88°	88°	88°	88°	88°	88°	
	N	o	o	o	o	o	o	
Water tank		o	o	o	o	o	o	
I : Infector mice		● : Positive						
R : Receptor mice		o : Negative						
N : Water in nozzle								

Fig. 5. Transmission of *Ps. aeruginosa* by automatic rearing system

Cage or water tank		Weeks after experiment began										
		0	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
1	R	88°	88°	88°	88°	88°	88°	88°	88°	88°	88°	88°
	N	o	o	o	o	o	o	o	o	o	o	o
2	R	88°	88°	88°	88°	88°	88°	88°	88°	88°	88°	88°
	N	o	o	o	o	o	o	o	o	o	o	o
3	R	88°	88°	88°	88°	88°	88°	88°	88°	88°	88°	88°
	N	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●
4	R	88°	88°	88°	88°	88°	88°	88°	88°	88°	88°	88°
	N	o	o	o	o	o	o	o	o	o	o	o
5	R	88°	88°	88°	88°	88°	88°	88°	88°	88°	88°	88°
	N	●	●	●	●	●	●	●	o	●	●	●
6	R	88°	88°	88°	88°	88°	88°	88°	88°	88°	88°	88°
	N	o	o	o	o	o	o	o	o	o	o	o
7	R	88°	88°	88°	88°	88°	88°	88°	88°	88°	88°	88°
	N	●	●	●	●	●	●	●	●	●	o	●
8	R	88°	88°	88°	88°	88°	88°	88°	88°	88°	88°	88°
	N	o	o	o	o	o	o	o	o	o	o	o
9	R	88°	88°	88°	88°	88°	88°	88°	88°	88°	88°	88°
	N	o	o	o	o	o	o	o	o	o	o	o
Water tank		o	o	o	o	o	o	o	o	o	o	o
Alumite cage	R	88°	88°	88°	88°	88°	88°	88°	88°	88°	88°	88°
	B	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●
R : Receptor mice		● : Positive										
N : Water in nozzle		o : Negative										
B : Water in bottle												

Fig. 6. Trasmission of *Ps. aeruginosa* in experi- ment (II-3) by automatic and conven- tional rearing systems

今回は、自動飼育装置と緑膿菌の伝達試験を行ったがウイルスあるいはマイコプラズマのような微生物についても今後試験を実施したいと考える。

終りに臨み、本研究のため御教示をいただいた東京大学医科学研究所の鈴木潔博士、須藤カツ子技官および慶応義塾大学医学部実験動物センターの前島一淑博士に感謝する。なおこの研究は、昭和51年度文部省特定研究「実験動物の純化と開発 (No. 111501)」によった。

文 献

- [1] Beck, R. W. (1963). The control of *Pseudomonas aeruginosa* in a mouse breeding colony by the use of chlorine in the drinking water. Lab. Animal Care, 13 (Part 2), 41-45.
- [2] Flynn, R. J. (1963). *Pseudomonas aeruginosa* infection and radiobiological research at Argonne National Laboratory: Effects, diagnosis, epizootiology, control. Lab. Animal Care, 13 (Part 2), 25-35.
- [3] 五島瑳智子・桑原章吾・新井武利 (1972). 緑膿菌およびその類縁菌の分離同定に関する最近の知見. 日本細菌学雑誌, 27, 621-627.
- [4] 本間遜・金桂守・伊藤晶子・山田紘子・塩野谷博・阿部靖 (1970). 緑膿菌の血清型別と院内感染. 日本細菌学雑誌, 25, 379-389.
- [5] 前島一淑・浦野徹・伊藤喜久治・藤原公策・本間遜 (1972). マウスコロニーから緑膿菌を検出・分離する方法. 実験動物, 21, 13-18.
- [6] 前島一淑・浦野徹 (1977). 緑膿菌病, 実験小動物の感染症, 藤原公策・中川雅郎・石井俊雄・高垣善男編, ソフトサイエンス社, 東京, 123-129.
- [7] 曲淵輝夫・伊藤正博・西原正・奥水馨 (1977). マウスの自動飼育, I. ICR マウスによる飼育試験. 実験動物, 26, 309-315.
- [8] McDougall, P. T., Wolf, N. S., Stenback, W. A. and Trentin, J. J. (1967). Control of *Pseudomonas aeruginosa* in an experimental mouse colony. Lab. Animal Care, 17, 204-214.
- [9] Trentin, J. J., Van Hoosier, G. L. Jr., Shields, J., Stephens, K., and Stenback, W. A. (1966). Establishment of a caesarean-derived, gnotobiotic foster nursed inbred mouse colony with observations on the control of *Pseudomonas*. Lab. Animal Care, 16, 109-118.