

関西実験動物研究会会報

Kansai Journal of Laboratory Animals

平成6年7月 14号

関西実験動物研究会

Kansai Laboratory Animal Research Association

目 次

<第35回研究会>

講演会

1. 毒性試験における臨床検査正常値
ー製薬協が行ったアンケート調査からー
海野 隆（鐘紡㈱・薬品安全性研究所）…………… 2
2. GCPと医療倫理
須原 郁雄（武田薬品工業㈱・薬事管理部）…………… 10
3. 毒性試験における国際的ハーモナイゼーション
ーICHのめざす効果ー
菊池 康基（武田薬品工業㈱・医薬開発本部）…………… 14

<第36回研究会>

- 会員の研究発表 …………… 23

特別講演

実験動物のzoonoses

- 上田 雄幹（岐阜大学・農学部）…………… 43

<第37回研究会>

講演会

ラットにおける生化学的遺伝子座の開発から

染色体地図の作成まで

- 山田 淳三（京都大学・医学部）…………… 45

<そ の 他>

- 関西実験動物研究会だより …………… 51

- 総会・評議員会議事概要 …………… 52

- 会員の動き …………… 54

編集後記

< 第 3 5 回 研 究 会 >

日時： 平成 4 年 1 0 月 9 日（金）

場所： 千里ライフサイエンスセンタービル

講演会

1. 毒性試験における臨床検査正常値
－製薬協が行ったアンケート調査から－

海野 隆 （鐘紡株式会社・薬品安全性研究所
／日本製薬工業協会・第二分科会副幹事）

2. G C P と医療倫理

須原 郁雄（武田薬品工業株式会社・医薬事業部
薬事管理部・監査室・調査役）

3. 毒性試験における国際的ハーモナイゼイション
－ I C H のめざす効果－

菊池 康基（武田薬品工業株式会社・医薬開発本部・審議役
／日本製薬工業協会・基礎研究部会長）

毒性試験における臨床検査正常値

—製薬協が行ったアンケート調査から—

海 野 隆

(鐘紡(株)薬品安全性研究所／日本製薬工業協会基礎研究部会)

はじめに

毒性試験のバックグラウンドデータは各試験施設内で目的にかなった方法に従って収集し利用されるものであり、なかでも臨床検査値はサンプルの採取、処理条件や測定方法、測定機器により同一施設の中でもかなり変動することが知られている。これら実験動物の臨床検査値バックグラウンドデータはすでにいろいろの機関から発表されているが、日本製薬工業協会（製薬協）も1981年に「毒性試験成績評価における問題点」として調査報告書をまとめている。

その後、1983年に「医薬品の安全性試験の実施に関する基準（厚生省GLP）」が、翌年には「医薬品毒性試験法ガイドライン」が施行され、製薬企業が実施する毒性試験の内容と質はかなり向上してきた。しかしこのように整備された環境下での各施設バックグラウンドデータを広く収集したものはとくになかったため、製薬協は1989年、加盟各社に対し、一般毒性試験の臨床検査正常値のアンケート調査を実施した。その詳細は製薬協調査報告書「毒性試験における臨床検査正常値について」にまとめたほか、一部は雑誌にも公表（Matsuzawa, T. 1992, Matsuzawa, T. et al. 1993）したので御覧いただきたい。今回は上記、調査結果の概要を報告する。

アンケート調査の集計

アンケート調査の回答を寄せられた会社は70社（有効回答数67社）、回収率は87.5%であった。その内容はラット：約7,000 匹／性、イヌ：約4,800 匹／性、サル700 匹／性、マウス約60匹／性、雄ウサギ：約200 匹、雄ミニブタ：28匹分のデータであった。

提供された各種動物における年齢はラットでは10, 18, 31および58週齢前後のデータが多くみられ、イヌでは6～10カ月齢のデータが全体の約85%を占めていた。

各動物種における血液の採取部位は表1に示すとおりでラットでは腹大動脈からの採血

が圧倒的に多く、イヌでは橈側皮静脈からの採血が多かった。

表1 毒性試験臨床検査検体の採血部位

動物種	採血部位	血 液	血液化学
ラット (65)	心臓	3	3
	動脈		
	頸	3	5
	腹大	35	43
	尾	1	0
	大腿	2	3
	静脈		
	頸	11	4
	眼窩	7	6
	後大	10	10
	尾	6	0
	大腿	6	4
	背側中足	1	0
	静脈		
イヌ (42)	耳介	1	0
	頸	4	4
	橈側皮	38	38
	伏在	1	1
サル (10)	静脈		
	橈側皮	3	2
	鼠径部	2	2
	大腿	6	6
	伏在	1	1

回答施設数：68 ()：利用施設数

表2 採血時における麻酔法
(血液化学的検査の場合)

動物種	ラット (66)	イヌ (42)	サル (10)
エーテル	56	0	0
ハロタン	1	0	0
ペントバルビタール	18	1	0
チオペンタール	0	2	1
ケタミン	0	0	4
無麻酔	3	40	6

また採血時の麻酔条件（表2）はラットではエーテルが多くペントバルビタールがこれに続き、頸静脈、眼窩静脈叢からの採血は無麻酔であった。イヌの採血は圧倒的に無麻酔下で行われていたが、ペントバルビタールまたはチオペンタール麻酔下で採血している施設（いずれも採血部位は桡側皮静脈）もあった。なお、サルでは無麻酔採血と、麻酔採血が相半ばしていた。

抗凝固剤の使用は血液検査については各種動物ともに圧倒的にEDTAの使用が多かった。また血液化学的検査では約1/4の施設がラット、イヌについてヘパリンによる抗凝固処理した血漿を用いて測定していた。これはLDH など血液凝固時に血球成分から逸脱する酵素系の存在を配慮したものと推定される (Matsuzawa, T. et al, 1993)。

血 液 検 査

各種動物における血液検査の実施状況は表3に示す通りである。

医薬品の毒性試験法ガイドラインでは血液検査において通常よく実施されている項目の例として赤血球数、ヘモグロビン、ヘマトクリット、網状赤血球数、白血球数、白血球百分率、血小板数、PT、APTTを例示しているが、ラットでの実施率は網状赤血球で78%、PT、APTTでそれぞれ75%、54%であった。赤血球数、白血球数、血小板数はすべての施設で自動血球計数装置を用いて測定されていたが、ヘマトクリット、網状赤血球数および白血球分画では多項目自動測定装置のほかそれぞれ従来から用いられている遠心分離法、視算法を採用している施設もあった。また凝固検査はほとんどの施設で凝固法、光散乱法による半自動測定装置が用いられていた。

同一施設における血液検査値について各種動物の種差を検討してみると、赤血球数ではマウス>ラット>イヌ・サルと大動物の方が低値を示す傾向にあり、ヘマトクリット及びヘモグロビンではラット・イヌ>マウス・ウサギ、白血球数ではラット>マウス、血小板数ではラット・マウス>サル>イヌ・ウサギ、PT、APTT ではラット>イヌの関係にあった。またラットにおける系統差は白血球数、血小板数においてSD>Wistar>F344の傾向がうかがわれた。また赤血球数、ヘマトクリット、ヘモグロビンはラットにおいて雌に比べ雄で高値を示す成績が多く、血小板はラット、マウスのいずれにおいても雄で高い傾向にあった。またイヌのPT、APTT は雄で高値を示す傾向にあった。さらにマウス、ラットの赤血球数、血小板数は加齢にともない減少し、逆に白血球数は増加する傾向が認められた。

表3 各施設における血液学的検査の実施項目（％）

動物種 (施設数)	ラット (65)	イヌ (42)	サル (10)
赤血球数	100	100	100
ヘモグロビン	100	100	100
ヘマトクリット	100	100	100
網状赤血球数	78	81	70
白血球数	100	100	100
白血球百分率	94	88	70
血小板数	98	100	100
赤血球沈降速度	0	5	10
P T	75	86	90
A P T T	54	71	80
フィブリノーゲン	18	24	60
P T T	0	2	0

血液化学的検査

各種動物における血液化学的検査の実施状況は表4に示す通りである。毒性試験法ガイドラインで例示されている検査項目のうち、蛋白分画の実施率はラットで27％、サルで20％とかなり低値を示していたが、その他の項目は動物種を問わず80％以上の実施率であった。しかしガイドラインに例示されていない検査項目の実施率はかなり低かった。

なお血液化学的検査における測定方法は、総蛋白(Biuret法)、トランスアミナーゼ(UV法)、コレステロール(COD法)のようにほとんどの施設が同一測定法を採用している項目がある反面、血糖、中性脂肪、無機リンなどのようにかなりまちまちの項目もあった。

アンケート調査結果より各測定項目検査値の種差についてみると、GOT、LDH、リン脂質、血糖および無機リンがラットで、総蛋白、AIPおよびChEがサルで、UNおよびKがマウスで、クレアチニンがウサギで、コレステロールがイヌでそれぞれ他種動物より高値を示す傾向にあった。またGOTおよびGPTはF344系ラットがSD系ラットに比べ高値を示す傾向にあった。測定値の性差は中性脂肪、リン脂質および無機リンが雌に比べ雄ラットで、ChEおよび総蛋白が逆に雌ラットで、AIPがラットおよびサルの雄でそれぞれ高値を示す傾向にあった。加齢の影響としては、AIPの減少がラット、イヌおよびサルに共通して認められたほか、無機リンの減少がラットおよびイヌで、ChE、コレステロール、中性脂肪およびリン脂質の増加がラットで、イヌのCPKおよびアカゲザルのLDHに減少がみられた。

表4 各施設における血液化学的検査の実施項目（％）

動物種 (施設数)	ラット (66)	イヌ (42)	サル (10)
GOT/AST	100	100	100
GPT/ALT	100	100	100
蛋白	100	98	100
アルブミン	98	93	100
グルコース	100	98	100
コレステロール	100	98	100
トリグリセリド	89	93	80
ビリルビン	83	79	100
尿素窒素	100	98	100
クレアチニン	97	93	80
AlP	100	98	100
ナトリウム	100	95	100
カリウム	100	95	100
塩素	91	81	90
カルシウム	97	98	90
無機リン	92	90	80
LDH	65	76	80
CPK	61	67	30
蛋白分画	27	26	20
リン脂質	39	50	20
遊離脂肪酸	17	21	10
遊離コレステロール	8	10	0
HDLコレステロール	2	2	0
尿酸	23	24	20
γ-GTP	20	24	10
ChE	20	33	30
LAP	20	14	10
AMY	8	5	0
OCT	0	2	0
ICG	0	7	0
PSP	0	10	10
BSP	0	7	10
マグネシウム	3	2	0
鉄	8	7	10
浸透圧	2	2	0
その他	2	0	0

尿 検 査

各種動物における尿検査の実施状況は表5に示す通りである。毒性試験法ガイドラインに例示されている検査項目のうち、試験紙法で実施可能な項目の実施率は80%を越えてい

たが、浸透圧、電解質および沈渣の実施率は60% 以下と低かった。

尿検査における各種実験動物の種差、系統差、性差はとくに明確ではなかった。

表5 各施設における尿検査の実施項目（%）

動 物 種 (施設数)	ラ ッ ト (59)	イ ヌ (37)	サ ル (5)
尿量	92	89	60
pH	90	89	100
尿糖	92	92	100
ケトン体	92	92	100
ビリルビン	87	86	80
蛋白	93	92	100
潜血	92	92	100
ウロビリノーゲン	90	92	100
比重	75	89	80
浸透圧	15	19	20
ナトリウム	59	57	40
カリウム	59	57	40
塩素	46	46	20
カルシウム	14	8	20
無機リン	7	5	0
外観・色調	20	19	40
沈渣	46	54	60
クレアチニン	7	5	20
NAG	3	5	20
γ-GTP	2	3	0
ALP	2	0	0
マグネシウム	2	3	0
亜硝酸塩	0	3	0

お わ り に

以上、製薬協が加盟各社を対象に実施した毒性試験における臨床検査のバックグラウンドデータについて報告した。しかしその内容は膨大なデータ量を持つもので紙数が限られている本稿でそのすべてを紹介することはできない。このため興味のある方は是非、調査報告書を御覧いただきたい。

なお蛇足になるがFig.1 に単一の生産者のSD系ラット（18~20 週齢）を用いて同一の方法で測定された9施設のGPT（UV 法）およびアルブミン（BCG法）のバックグラウンドデータを示した。その平均値を小さいものから大きなものへ並べたが、中央値である5番目の

施設の値と残りの8施設の値との間で統計的な差を見ると、GPT では雄で8施設、雌で2施設、アルブミンでは雌雄ともに7施設に有意差が認められる（t 検定）。このように同一の系統のラット用い、同一の方法で測定された臨床検査値でもかなりのばらつきが認められることは、今後各社のデータがさらに積極的に相互活用するための前提として、臨床検査測定値の変動要因となる諸条件の実態を知り、何らかの形で標準化、統一化を図る必要性を示唆するものではないだろうか。

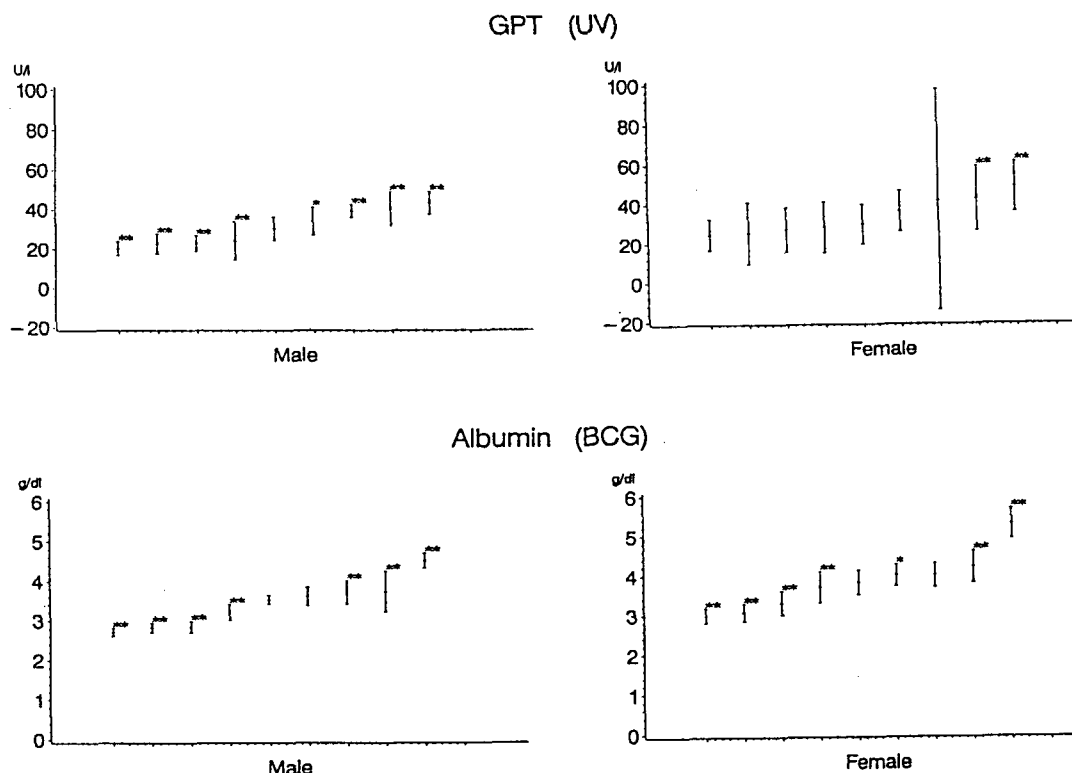


Fig. 1 各施設臨床検査値のばらつきの例
SD系ラット（18～20週齢：同一生産者）の同一方法により測定されたGPT（UV法）
およびアルブミン（BCG法）の9施設（横軸）のバックグラウンドデータ
（中央値：5施設目に対する各施設測定値の差 * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$: t検定）

文 献

- 猪俣訓一、小佐妻恒夫、松本一彦 他(1981) 毒性試験成績評価における問題点 日本製薬工業協会安全性委員会基礎研究部会 資料19
- 松澤利明、野村護、海野隆 他(1991) 毒性試験における臨床検査正常値について 日本製薬工業協会医薬品評価委員会基礎研究部会 資料51
- Matsuzawa,T.(1992) Present Status of Animal Clinical Pathology Examinations in the Japanese Pharmaceutical Manufactures Association. Toxicologic Pathology 20:528-533
- Matuzawa,T. Nomura,M. and Unno,T.(1993) Clinical Pathology Reference Ranges of Laboratory Animals. J.Vet.Med.Sci.55: 351-362
- Matsuzawa,T.and Ishikawa,A.(1993) The Effect of Preanalytical Conditions on Lactate Dehydrogenase and Creatine Kinase Activities in the Rat. Comp. Haematol.Int. 3: 214-219

G C P と医療倫理

須原郁雄（武田薬品・薬事管理部）

G C P については、「医薬品の臨床試験の実施に関する基準（G C P）について」（平成元年10月2日付）にて通知され、さらに「医薬品の臨床試験の実施に関する基準（G C P）マニュアル」（平成2年5月30日付）が示され、平成2年10月1日より実施されている。本日はG C Pの概要及び演者の体験についてお話をすると共に、その実態については「医療機関におけるG C Pの運用に関する研究班」が平成3年3月に実施したアンケート調査結果の報告の一部をご紹介します。

G C P 制定の経緯としては、第二次世界大戦が終了し、ニュールンベルグ裁判でナチス医師団の残虐な人体実験が暴露され、そのことを踏まえて1947年に「ニュールンベルグ綱領」が発表された。その後1964年にヘルシンキで開かれた世界医師会総会で「ヘルシンキ宣言」が発表された。さらに、東京改正とベニス改正が加えられた。この宣言の精神に基づいて今日のG C Pが制定されています。また米国を初め、英国、西ドイツ、フランス、E C等の欧米先進国でも同様の考え方によるG C PあるいはG C P案が公表されており、米国では既に数年前から実施されています。

G C Pの4大ポイントは、1. 治験審査委員会、2. 治験の契約、3. 被験者の同意、4. 記録等の保存であります。

1. 治験審査委員会

米国ではI R B、英国などヨーロッパ諸国では Ethical committee（倫理委員会）と言われており、主に治験実施の倫理的並びに科学的な妥当性について審議します。

i)委員の構成

医学、歯学、又は薬学の専門家の他に少なくとも一人の非専門家委員、合わせて5人以上で組織します。「非専門家委員は被験者の人権保護等倫理面での審議を期待するものであり、識見の高い一般人等の参加が望まれる」となっており、

欧米では法律家や宗教関係者、あるいはその地域のCommunityの委員などが任命されています。日本では「行政・会計などを専任する事務系職員」が大部分(92%)であり、「看護職員」が 23.3%、学識経験者（非臨床系教授等）7.4%であり、法律家（弁護士等）は3.3%に過ぎなかった。大部分の施設で事務系の職員を非専門家委員としているのは、治験の庶務・経理関係者が参加する必要に迫られてのことと思われます。また、外部の委員が参加する場合、委員会の日程が合わせにくい点も原因の一つに挙げられています。「被験者の人権擁護」の点からは事務系職員よりもむしろ看護職員に期待が寄せられるのではないのでしょうか。

ii) 治験審査委員会への当該医師の参加

GCPでは「治験に関与する医師は治験審査委員会の当該治験に関する審議には参加しないものとする」と規定されているが、「委員会への出席を認めない」及び「委員会への出席は認めるが審議・採決には参加させない」施設は 76.8%であった。「委員会への出席を認め、審議・採決にも参加させる」施設及び「委員会への出席を認め、審議には参加させるが、採決には参加させない」施設が 23%見受けられたが、これらの場合は治験審査委員会の第三者性を維持する上から問題があると思われます。

2. 治験の契約

GCPでは「治験の契約は治験依頼者と医療機関の間で文書により行なうものとする」と規定されているが、実際に「医療機関の長」が 84.7%、また「医療機関の長からその任に当たるように委嘱された契約担当者」及び「知事、市長、総長、センター長等医療機関の長の上位者」が合わせて15.0% とほとんどの施設がGCPの要件を満たしていた。

3. 被験者の同意

GCPマニュアルでは「同意は原則として文書で得るべきである」と記載されており、止むを得ず口頭により同意を得た場合には単にカルテに記入するだけではなく、口頭同意に関する記録を残すことが要求されています。

i) 小児患者に対する同意取得方法

GCPでは「被験者本人が同意の能力を欠き、被験者本人の同意を得ることが

困難な場合には法定代理人又は被験者の最善の利益を測りうる者等被験者に代って同意を成し得る者の同意を得るものとする」としているが、小児患者の場合、母親が代理人になる場合が多く、優れた治験薬でないと同意が得にくいようです。

ii) 意識・精神障害患者に対する同意取得

GCPマニュアルでは「精神障害者を被験者にせざるを得ない場合は、可能な限り被験者に説明し、その同意を得るように努力することが必要である。被験者から安定した同意が得られる場合には代理人の同意は必要ない。安定した同意が得られない場合には、代理人の同意が必要になる」としているが、アンケート調査の結果では「代理人の同意を得る」が 32.7%、「代理人の同意を得たうえで、可能なかぎり本人の同意も得る」が 63.7%、合わせて、代理人の同意だけでもよしとする施設が 96.5%を占め、必ず本人の同意を必要とした施設は4.0%にとどまった。

iii) がん患者に対する同意取得

GCPマニュアルでは「悪性腫瘍等の治験において、被験者に病名を告知することが医療上非常に悪い影響を及ぼすと考えられる場合には、病名よりはむしろ症状を説明し同意を得るように努める」と述べられている。代理人の同意だけでよいとする施設は 15%、「代理人の同意を得た上で、可能なかぎり本人の同意を得る」施設は 61.3%であり、両者合わせて、代理人の同意だけでもよいとする施設は 76.3%であった。一方、必ず本人の同意を必要とした施設は 21.3%にのぼった。

iv) 同意説明文書

GCP及び同マニュアルでは同意説明文書の作成を治験総括医師の業務とし、治験審査委員会の審議事項として同意説明文書の内容の適切性の検討が含まれている。また、治験担当医師は「同意を得るに際しては、同意説明文書に基づき、被験者に説明するものとする。被験者に説明文書を渡して説明することがより効果的と考えられる場合には、説明文書を手渡して説明することが望ましい」ことが要求されている。アンケート調査の結果では、「同意説明文書を渡したうえで、口頭でも説明する」ことを求めている施設は、33.4%で、「同意説明文書を渡さ

ず、同意説明文書に基づいて説明する」ことを求めている施設は8.2%と少数であり、大部分は「同意説明文書を渡して説明するか、渡さないで説明するかは、治験担当医師に一任」であった。

いずれにせよ、医師と患者の日常のよき信頼関係が同意取得の際、必要と思われます。

4. 記録等の保存

治験に係わる記録類や生データ類の中、治験依頼者側で保存するものについては承認を受けた日から5年間、又は再審査が終了するまでの期間、のうちの長い方に期間、医療機関で保存するものについては、少なくともその治験薬の製造承認時まで保存しなければなりません。

現在、GCPの形式的な面は充実してきているが、倫理面・実質面でも国際的にひけを取らないように、なお一層の充実が望まれます。

毒性試験における国際的ハーモナイゼーション - ICHのめざす効果 -

菊池 康基

(武田薬品工業株式会社 医薬開発本部)

1. はじめに

日・米・EC新薬承認審査ハーモナイゼーション会議、International Conference on Harmonisation of Technical Requirements for Registration of Pharmaceuticals for Human Use(ICH)は第1回が1991年11月にブラッセルで、第2回が1993年10月にフロリダ州オーランドで開催された。さらに第3回が1995年11月に横浜で開催されることになり、すでに(1994年3月現在)、厚生省および日本製薬工業協会(製薬協)は、その準備にとりかかっている。ご承知のように、ICHは国際製薬協(IFPIA)が事務局となり、日米欧の行政(厚生省、FDA、EC)と業界(日本、米国、欧州の各製薬協)が全く対等の立場で参加して、薬事規制の調和について、品質・安全性・有効性(臨床試験)の3分野について、問題点を検討しようとするものである。

本研究会での私の講演は1992年10月に行われ、ICHの第1回会議について報告した。しかし、本稿の発行時期からみて、1年半前の講演内容のみでは全く旧聞に属することになってしまう。そこで、この拙文は過去の講演記録としてではなく、ICHの最新の情報をお届けすることに主点を変え、ICHの第2回会議も含めて、安全性分野のこれまでの成果についての概略をご紹介しますこととした。さらに、付随する問題として、毒性試験のガイドラインに対する基本的な考え方について会員各位の御理解を頂きたく、まとめてみた。

2. ICHの成果

筆者は、1987年より6年間、製薬協・医薬品評価委員会・基礎研究部会の部会長として、非臨床試験に関する諸問題、例えばガイドラインの新設・改正への対応、各種試験の現状

現所属：(株)ラビトン研究所・大阪医薬品臨床開発研究所

把握とレベルアップ、GLP、などについて部会のお世話をし、また行政との対話に努めてきた。任期中にICHが始まったこともあって、第1、2回（ICH-1,-2）については安全性の専門家会議（EWG、Expert Working Group）に製薬協の代表の一人として、準備会議、本会議さらにはテーマに直接関係する国際Workshopなど、諸種の会合に出席してきた。ICHでは、本会議はいわばセレモニー的な色合いが強い。検討項目についての実質的な討議は、年に数回開かれる準備会議やWorkshopの場で行われる。従って、これらの会合で意見を戦わせ、合意に向けての作業に参加することが極めて重要である。

以下、安全性に関するICHの検討項目について、進展状況を概説する。

ICH-1 November 5～7, 1991, Brussels

以下の6項目について討議した。

1) 単回投与毒性試験

ハーモナイゼーションはほぼ達成されており、ICH統一ガイドラインを作成する必要はない。なお、①各国行政はLD₅₀を要求しない、②非げっ歯類では、反復投与毒性試験の投与量設定のための予備試験などのデータの使用を認める、ことなどが合意された。

厚生省医薬品毒性試験法ガイドライン：単回投与毒性試験について、上記の主旨に従って改正された^{1, 2)}。

2) 反復投与毒性試験

①厚生省に対し、日本のガイドラインの記述のうち、「無影響量」を「無毒性量」に変更すること、「遅延毒性」という用語が不適切であることが指摘された。

②投与期間について、げっ歯類では最長6ヵ月投与でよいことで合意された。非げっ歯類についても、げっ歯類と同じく最長6ヵ月投与で一旦合意が成立した。ところが、1992年春にロンドンで開催されたWorkshopにおいて、FDAは前言をひるがえし、データ不足を理由に6ヵ月と12ヵ月投与の比較がなお必要と強固に主張したため、合意はご破算となった（FDAの身勝手さがあからさまにでた例である）。さらにFDAは、6ヵ月と12ヵ月投与データの対比のためのprospective survey protocolを昨年のEWGで提示

したが、日欧が拒否したため、現在FDAのみが米国申請に際して6ヵ月と12ヵ月投与の両データを提出するよう要求している。但し、このデータについてはICH-3で開示するようICH-2の運営委員会でFDAに対し、勧告が出された。

厚生省医薬品毒性試験法ガイドライン：反復投与毒性試験について、上記の主旨に従って改正された^{1・2)}。

3) 癌原性試験

①最高用量の設定に関しては、日欧は臨床用量を基準にしているのに対し、FDAはMTDを基準とするよう主張し、結論は得られなかった。

②マウスを用いる癌原性試験の意義についての議論も結論には至らず、いずれもICH-2に持ち越しとなった。

4) 生殖毒性試験

①かねて、ドイツのProfessor Bassが作成していた生殖毒性に関する統一ガイドラインを、ICH3極統一ガイドラインとすべく検討した。これが完成するまでは各国ガイドラインに従って実施された試験データの相互受け入れをはかることで合意した。

②日本では臨床Phase Iにおいて、生殖試験のSeg Iのデータが要求されているのに対し、欧米では反復投与毒性試験において雄の生殖能について精査してあればよい。この問題について日本の対応が求められた。

3極統一ガイドラインについては、ICH-1終了後もEWGにおいて精力的な検討が行われ、17回にわたるドラフトの練り直しの結果、ICH-2の運営委員会において最終ガイドラインが承認された。これを受けて厚生省では、このガイドラインの日本語への翻訳が終了次第、現行ガイドラインの改正作業に着手する予定である。また、雄生殖能については、厚生省研究班で適切な試験方法について検討中であり、製薬協もこれに協力して共同研究に参加している（本年3月、東京の準備会議で、この共同研究は高い評価を受けた）。すでに日本でも、反復投与毒性試験における、精巣の病理などで異常がなければ、Phase I までにSeg I データは不要との方向は動かし難い。

5) バイオ医薬品

毒性試験の実施に関しては、ケースバイケースに対応することで、すでに3極の合意が得られており、国際調和の面では問題がないことで合意した。

6) 非臨床試験実施のタイミング

臨床試験の各相あるいは申請までに実施される非臨床試験の種類は3極間に差があり、これの調和を図るべく議論したが、基本的な考え方に開きがあり、現状では時期尚早ということで先送りされた。

ICH-2 October 27~29, 1993, Orland, Florida

以下の4つの項目について、1年間準備会議等を重ね、さらに本会議の直前2日間にわたり、各EWGのpre-meetingを持ち、合意に向けて大きく前進した。その成果は、本会議においてシンポジウム形式で発表された。ICH-1に比べると、各テーマのEWGにその分野の専門家の参加も増え、顔ぶれも固定して、連続した討議もスムーズに行われた。また、これに対応するための国内の会合も飛躍的に増加した。

1) 癌原性試験

①用量設定については、ICH-1からの継続で検討が加えられ、ガイドライン案がEWGの合意のもとに提出された。このガイドライン案では用量設定においては、動物とヒトとの曝露レベルを考慮すべきとし、最大用量設定のための5つの指標、即ち飼料中最大量、MTD、薬物動態学的指標、吸収飽和量、薬物力学的指標を示している。
②癌原性試験実施の条件設定、③げっ歯類2種の有用性の2課題については結論は出ず、引き続きEWGで討議することになった。

2) 遺伝毒性試験

①基本的な考え方、試験の手法に関することなど11課題について検討し、8課題については合意に至った。これらのうち7課題について本年3月の東京でのEWGでガイドライン案として「遺伝毒性：遺伝毒性試験に関する特有の問題点」がまとめられ、運営委員会に提出された。

②基本セットの試験の組み合わせなど、合意が得られていない課題については、継続審議となり、更につつこんだ討議が行われることになる。最大の論点は、培養細胞による突然変異試験(マウスリンフォーマを用いる試験など)を基本セットに組み入れるかどうかにある。

3) トキシコキネティックス(毒性試験におけるpharmacokinetics)

トキシコキネティックスとは毒性試験において、動物が薬物によってどの程度曝露されたかを確認するために行われるもので、実際には薬物の血中濃度の測定で曝露レベルを把握する。EWGにおける度重なる討論を経て、「毒性試験における全体的曝露の評価に関するガイダンス(案)」が合意された。

4) R I 標識化合物の反復投与

日本の申請時に、ADME試験におけるR I 標識化合物の反復投与による臓器分布のデータが、慣例として提出されており、この点について欧米から強い批判があった。厚生省からこれらのデータを必須としているわけでないことについて説明があり、またR I 化合物の投与理由について海外の理解が得られたことから、日本に対する勧告ではなく、EWGで合意したガイドライン案として「反復投与組織分布のガイダンス」がまとめられた。

ICH-3 November 29 ~ December 1, 1995, Yokohama

前述の検討項目のうち、継続中の癌原性試験、遺伝毒性試験などについて、結論あるいはガイドラインがまとめられるように努力することになろう。新規テーマはなるべく少なくする意向であり、安全性では非臨床試験の実施タイミング(ICH-1でとりあげたテーマ)などが候補にあがっており、3月の東京での準備会議で決定することになる。

3. ICHの効果

これまでのICHの最大の収穫は、EWGの会合を通じて、3極6団体の代表の間での自由な対話と意見の交換が行われたことである。ある問題について、日本の行政はどうか考えるのか、それに対し業界の意見はどうか、ということをはっきりと伝える(あいまいでなく)ことの大切さを改めて認識した。

筆者が出席した遺伝毒性EWGを例にとると、1992年秋以降1993年10月のICH-2までの間に、国際学会なども利用して5回（1回2日程度）以上の会合を開いている。我々の英語のハンディについては、paperや資料の配布で補ったり、欧米の人達の気配りや助力もしばしばであった。このことは意見の対立はあっても、会議を何とか成功させようというEWG全体の意識が強かったからにほかならない。

ICHが開催されるまで、毒性試験に関して製薬協の知名度は殆どなかったといつてよい。基礎研究部会がまとめたデータで、おそらく最初に英語で紹介されたのは、反復投与毒性試験の6ヵ月と12ヵ月の対比資料ではなかったかと思われる。その後、ICHの場で基礎研究部会のデータが次々と報告され、製薬協に対する欧米の認識は一変したと感じられた。また、トキシコキネティックスのrapporteurとして会議をリードし、ガイドラインのとりまとめに尽力された五十嵐現部会長（エーザイ）の功績も誠に大きなものがあり、製薬協の存在を強く印象づけたものと思われる。

もう一つの大きな成果は、行政との関係がより密接になったことである。国内での行政との連絡を密にして意志の疎通を図って、十分な打ち合わせのもとにICHの会議に望むというパターンがほぼ定着したものと思われる。このことは、ICHを受けてのガイドラインの改正においても今後好結果を生むものと期待される。

ICH-3に向けて、日本の現状を可能な限り正確に把握し、より好ましい調和の方策を積極的に提言するという姿勢で臨むかぎり、今後も大きな成果が得られるであろう。

次に、ICHの効果が具体的にどのように現れるかについて、ふれてみたい。

1) 試験数の減少

新薬の承認審査のハーモナイゼーションが進み、各種ガイドラインの共通化、また多少手法が異なるガイドラインでもその相互承認がされるようになると、従来行われていた同種試験の繰り返しや、追加試験が不要になる。事実、生殖毒性試験や反復投与毒性試験などは相互承認が進み、無意味な再試験がほとんど実施されなくなっている。このことは世界的にみても、労力、経費、時間の大幅な節減となる。

2) 使用動物の減少

最近、代替法についての議論が盛んである。代替法が掲げる3R、即ち①Replacement; in vivo試験のin vitro法への置換、②Refinement; in vivo試験の質の向上、及び③Reduction; 動物数の削減のうち、①についてはごく少数の例外的な試験を除き、適用される毒性試験はほとんど見当たらない。しかし、②と③については世界的にみてICH

の成果が大きく寄与することは確実であろう。

3) 試験の質の向上

最も重要な問題と考える。ガイドラインが共通化することは、試験が易しくなって楽になることを意味するものではない。欧米の申請にも使える科学的に質の高いデータを得るためには、単にガイドラインに従った定形的な試験を行うのではなく、ヒトでの安全性評価のために試験のデザイン、結果の解釈などについて常に科学的な検討を加える必要がある。

4) 研究者の資質向上

科学的見地から個々の試験の質を高めるために、研究者の資質の一層の向上が求められることになる。また、研究者の責任がますます重くなることを覚悟しなければならない。ガイドラインとG L Pのハーモナイゼーションが進むことによって、次に研究者の質、あるいは資格の問題がクローズアップされることは間違いない。すでに毒性研究者に対する国際的な資格制度についての検討が始められている。公平にみて、日本の毒性研究の水準が欧米より低いのは事実である。日本として、毒性学分野の人材育成のために大学教育、卒後教育について、真剣に取り組まなければ、世界に大きく遅れをとることになりかねないことを危惧している。

4. ガイドラインについて

I C Hに代表される国際調和の推進は、ガイドラインについて各極の行政と業界が共通の正しい認識と理解をもつことによって、初めて可能となる。そこで、ガイドラインとは何か？という問題について考えてみたい。

しばしば言われることは、欧州各国のガイドラインは basic principle を述べているのに対し、日本のガイドラインは minimum requirement である、ということである。Minimum requirement の意味は、最小限の要求事項と理解していたが、どうもそうではなく、欧米では“書かれたことだけやればよい”という意味に用いられているようである。

そこで、厚生省の医薬品のための毒性試験法ガイドラインについて検証してみよう。まず、ガイドラインについてであるが、“ガイドラインは薬事法に基づく行政指導の一つであり、指針として自由度を与え、原則を示すことが望まれる”と位置付けられる。行政指導はその拘束力の程度によって次の4つに分けられる。

方針：趣旨に沿えばよく、具体的な方法には制約されない。

手引き：従うことが望まれるが、制約されない。

原則：理由が無い限り、従わねばならない。

規則：書かれていることには、従わねばならない。

ガイドラインはこのうちの、「原則」に相当する³⁾。理由が無い限り従わねばならないということは、逆にいうと、正当な理由があれば、必ずしもガイドラインに記された方法に従わなくてもよい事を意味している。

しかしながら、実際問題としてはガイドラインを拘束力の最も強い、「規則」と解釈したり、あるいは法律と勘違いしている向きが多い事も事実である。例えば、ガイドラインには“～することが望ましい”という言葉がしばしば用いられる。この「望ましい」の意味が立場によって異なることが指摘されている。即ち、ガイドラインの策定者側は、これを「必ずしもしなくてもよい(may be)」の意味で使っているのに対し、行政側では「したほうがよい(be better)」の意味になるらしい。更に、企業側、特に開発業務に携わっているサイドに至っては「せねばならぬ(must)」と解釈して、自らの手足を縛っていることなどは、その現れである⁴⁾。

厚生省のガイドラインの前文には「～本来、すべての医薬品について一律の試験方法を定めることは合理的ではなくまた、試験の進展に応じて新たな試験を追加する必要があることも少なくない。したがって、得られた所見が臨床上の安全性評価に資することができるものである限り、必ずしもここに示した方法を固守するよう求めるものではない。」と書かれており、この主旨を十分に尊重することが大切である。

このようにみえてくると、厚生省のガイドラインは、決して従来言われているような「書かれたことだけをやればよいもの」ではなく、「試験の原理、原則を示すもの、あるいはbasic packageを提示するもの」であり、欧米のガイドラインと全く同等の主旨で制定されていることが、お解りいただけよう。

国際調和が叫ばれている今日、これからの理想的なガイドラインとしては、

- ① 普遍性 (consensus)
- ② 明解性 (specification)
- ③ 柔軟性 (flexibility)
- ④ 国際性 (harmonisation)

の4要素を有することが、必須条件となる。また、より好ましいガイドラインとするため、① ガイドラインの定期的な見直し、② 特定(例外的)なケースに対する科学的基盤に基づいた対応、③例外的なケースの情報収集とそれらの普遍化、などについて、常に心掛けることが大切である。

5. おわりに

毒性試験の国際調和が進展することによって、統一ガイドラインの作成、あるいは試験データの相互承認が行われるようになる。そして、ガイドラインに対する共通認識と、それに基づく統一的な評価系が構築され、世界各国に通用する質の高い試験データが求められるようになる。それに伴い、研究者の責任の増大と研究者の資質の向上がより求められることになる。

ガイドラインは試験手法の原理・原則を示すものである。従って、個々の化合物について、安全性評価のために最も適切な試験を実施するにはどうしたらよいか、ということを研究者は常に考えなければならない。単に、ガイドラインに書いてある通りに試験を実施するだけならば、研究者は不要である。毒性試験法ガイドラインの前文は飾りではない。毒性試験の計画・実施に当たっては、前文の主旨を十分に理解して、柔軟に対応することが肝要である。

文 献

- 1) 厚生省薬務局薬新薬第88号(1993) 単回及び反復投与毒性試験ガイドラインの改正について。
- 2) 厚生省薬務局新医薬品監修(1994) 医薬品非臨床試験ガイドライン解説、薬事日報、東京。
- 3) 柳田知司(1991) 日本製薬工業協会・医薬品評価委員会・基礎研究部会第66回総会、パネル討論“ガイドラインとは”。
- 4) 高橋道人(1991) 日本製薬工業協会・医薬品評価委員会・基礎研究部会第66回総会、パネル討論“ガイドラインとは”。

<第36回研究会>

日時：平成4年12月4日（金）

場所：楽友会館

会員の研究発表

1. FISH法によるラットPKATA（第8染色体）、SYB2, GH（第10染色体）遺伝子の物理的マッピング
2. 自動給水装置配管内の微生物汚染防止についての検討
3. サル用代謝ケージの考案
4. 老齢F344 ラットの飼育経験
5. ラットを用いた聴覚毒性試験： WistarラットおよびF344 ラットにおける聴性脳幹反応（ABR）の比較
6. 自発運動へ及ぼす照度の影響について -散瞳剤を用いた検討-
7. 連続照明下で生じたアルビノおよび有色ラットの網膜障害
8. 自然発症てんかんラットの血清テストステロン値について
9. ラットにおける性ホルモンレセプターの基礎検討
10. Wistar fatty ラットにおける受精卵採取の試み
11. 老化促進モデルマウス(SAM) の受精卵採取における系統差
12. 過排卵処置マウスの排卵数ならびに体外培養における胚発育の系統差
13. ラットの着床時間と胚成長の系統間比較
14. 唾液腺涙腺炎ウイルス感染のSHR雄ラット交尾能力への影響
15. 実験用動物からのCampylobacter 属菌の分離とその性状
16. 無菌ラットへの腸内菌投与による盲腸収縮について
17. 雌F344 ラットにみられた内部泌尿生殖器の発生異常
18. CF#1/b-cacマウスに発現した糖尿病症状を示す小型マウスについて
19. ネフローゼ自然発症ICGNマウスの病態解析

特別講演 実験動物のZoonoses

岐阜大学農学部・獣医学科・家畜病理学講座 上田雄幹

FISH 法によるラット PKATA (第8染色体)、

1.

SYB2, GH (第10染色体) 遺伝子の物理的マッピング

○庫本高志、森 政之、芹川忠夫、山田淳三 (京都大、医、動物実験施設)

ラットにおける連鎖地図はマイクロサテライトマーカーの開発により拡充されてきた。しかし、現在まで特定の染色体領域に物理的にマッピングされた遺伝子は非常に少なく連鎖地図と物理地図を対応させるアンカー遺伝子の開発が強く望まれている。ラット第8染色体においては9個の遺伝子座について連鎖解析が行われているが、連鎖地図は3つに分断されている。一方、第10染色体には11遺伝子座を含む全長74cMにおよぶ連鎖地図が作製されている。

今回、我々は PKATA、GH および SYB2 遺伝子をアンカー遺伝子とするために、蛍光 in situ ハイブリダイゼーション (FISH) 法によりこれらを染色体上にマッピングした。PKATA 遺伝子は姫路工業大学の大隅隆先生より、GH 遺伝子は三菱化成生命科学研究所の竹内隆先生よりそれぞれ分与していただいた。また、SYB2 遺伝子についてはラットゲノミックライブラリーから PCR 法によりクローニングした。これらの遺伝子をビオチンラベル後、プローブとして用いた。雄 ACI ラット大腿骨骨髓細胞より調製した染色体標本を変成、プロテインアーゼ処理後、プローブと37℃で一晩ハイブリダイズした。シグナルは FITC アビジンおよびビオチンラベル抗アビジン抗体を用いて増幅された。シグナルの位置はRバンド法により同定された。その結果、PKATA 遺伝子は 8q32、GH 遺伝子は 10q32、SYB2 遺伝子は 10q24 にそれぞれマッピングされた。

ラット第10染色体上には、RONU (Rowett nude) 遺伝子や高血圧に関与する遺伝子がマッピングされている。一方、第8染色体上には血圧を下げる遺伝子が PKATA 遺伝子の近くにあるという成績が報告されている。ラットアンカー遺伝子の開発はラットにおけるこのような興味ある遺伝子の positional cloning への道を開くものと期待される。

自動給水装置配管内の微生物汚染防止についての検討

二宮寿三、奥平和明、高村 等、中原清忠、今井良悦、天社昭一郎、青野皆基

(武田薬品・薬安研・光支所)

実験動物の飲用水の供給には自動給水装置が広く普及しており、当社の研究所でも給水作業の省力化のため、開所以来自動給水装置を使用している。しかし、本装置は配管内の水量に比べ動物の摂水量が少なく水が滞留し、給水ノズルから微生物等が侵入し、飲用には適さない水が供給される可能性がある。そこで我々は、ラット用の自動給水装置配管内の水の微生物学的汚染状況を把握し、更に配管内の水の入れ替え条件を検討した。

検討には100 ケージ収容可能な飼育ラックを用いた。動物は雌雄のF344/DuCrjラット（日本チャールスリバー）を使用し、個別に飼育した。

今回の検討では生菌数を微生物汚染の指標として用い、検査は衛生試験法（1980）飲料水一般細菌数検査法に準じて実施した。

最初に給水配管内の水を滞留状態とした時生菌数がどのように変化するか調査した結果、動物飼育開始6時間後に生菌が確認され、さらに1日後には生菌数は上水基準の100 個/mlを超えることが明らかとなった。

次に、常に少量の水を配管末端から流した場合、生菌数がどのように推移するか検討した。その結果、3 ヶ月間自動給水装置配管内の生菌数をほぼ上水基準内に維持できることが確認された。

以上の成績から、本給水法は従来の設備をそのまま使用して自動給水装置配管内の微生物汚染を制御できる有用な方法であると判断した。尚、当研究所では本方法を採用して4年間を経過したが、動物用飲水の定期検査において生菌数が上水基準を超えたことはない。

○三村哲夫，谷川茂之，尾崎潤一郎，久世博，笠井秀男*

(田辺製薬・安全性研究所) * (田辺製薬・マルゴ・リサーチ・サービス)

厚生省から薬物動態試験のガイドラインが発表され、薬物の体内動態を調べることが重要視されつつある。代謝がヒトに近いとされるサルを用いて、薬物投与後の薬物の血中濃度あるいは尿中への排泄をみる機会が今後増大すると考えられる。しかしながらサル用代謝ケージとして要求を満たす適当なものが見当らない。そこで我々はケージ内でサルにストレスを与えることなく採血を容易に行え、また、尿量および摂水量を正確に測定できる代謝ケージを考案した。なお、このケージの作製は日本クレア(株)に依頼した。

従来の代謝ケージでは血液採取時の保定が容易でなかった。そこで、代謝ケージの上部を天版にし、その中央にレールを一本通し、側板を左右にはめることにより狭体(保定のためのケージ内移動柵)を引く際にサルの抵抗をなくし、ストレスを与えることなく保定できるようにした。また、両側に側板をはめることにより尿採取時のケージ外への尿の飛散を防いだ。

摂水量の測定では、摂水時の水の飲みこぼしが目立ったことから、給水口の下に受け皿を設け飲みこぼした量も測定できるようにした。

6匹のサルについて24時間尿および摂水量を測定したところ、報告されているようにサルの摂水量および尿量にはかなり個体差があり、摂水量では0～470ml、尿量では70～260mlとなった。24時間における摂水量がゼロとは考えられず、代謝ケージにいれて充分慣らしておくことが必要と考えられた。

玉野三男, 須磨正人, 一柳紀克, 藤波不二雄, 赤沢義明,
山本武彦, 武下政一 (田辺製薬 マルゴ・リサーチ・サービス)

近年, 老齡動物を用いた薬理試験が注目されているが, 老齡動物の安定供給を全面的に生産業者に依頼することは困難である. 我々の施設での背景データを得る目的で F₃₄₄ ラットを生涯飼育した結果, 死亡の初発時期は20カ月齢で, 平均寿命 (50% 生存率) は雌雄ともに30カ月齢であった. このデータを参考にして効率的に老齡動物を薬理試験に供給しているので, その飼育経験の概要を報告する.

材料・方法

動物: 繁殖用種雄を退役した18カ月齢の F₃₄₄/DuCrj 系ラットを 6回購入 (1回当り30-60匹) し, 約25カ月齢まで飼育した.

飼育条件: 室温23±1℃, 湿度50-60%, 12時間照明のバリアーシステムの環境下で金属製ケージ内で個別飼育した. 餌料 (オリエンタル酵母社製固形飼料 CRF-1) と水は自由に摂取させた.

成績

死亡率: 20カ月齢で 1.1% (0-3.3%), 25カ月齢で17.8% (10.0-26.7%) であった.

一般状態: 脱毛が19カ月齢, 皮下腫瘍が20カ月齢から発現し, 両者の発現率は加齢に伴って増加した.

体重: 入荷時体重は入荷ロットが異なっても概ね同様で, 450g前後であった. 約19カ月齢迄若干の体重減少が認められが, 約20カ月齢で入荷時の域にまで回復した. その後の体重推移は横ばいであった.

摂餌量: 一週間の摂餌量は入荷直後は 90g前後であったが, 19カ月齢まで徐々に増加した. 19カ月齢以降は概ね一定の値を示し, 一週間の摂餌量は130g前後であった.

総括

入荷ロットが異なっても, 死亡率, 体重および摂餌量の推移は概ね同様であった. 入荷直後の体重および摂餌量の推移から, 老齡ラットの馴化は若齡ラットより長期間要すると考えられた.

WistarラットおよびF344ラットにおける聴性脳幹反応（ABR）の比較

尾崎晴茂，永藪徳久，倉実穂，栗崎泰行，倉田一之，安藤孝夫（武田薬品，薬安研）

動物における聴覚毒性試験に聴性脳幹反応（ABR）の測定が利用されている。通常，被験動物は麻酔下におかれ麻酔薬の影響を受けた状態で検査が行われていた。近年，ラットにおける聴覚毒性試験法として無麻酔・無拘束下の動物を用いた方法が確立された（Yamamoto, M. et al, Fundam. Appl. Toxicol. 18 : 499-503, 1992）。本報告では，Yamamotoらの報告の中で用いられているWistarラットと当研究所一般毒性試験に常用されているF344ラットを用い，無麻酔・無拘束下で正常時のABRの振幅および潜時を解析し，比較した。次いで，正常ABRを測定したWistarラットおよびF344ラットを用いて聴覚機能に影響を及ぼすことが知られるフロセミドを投薬し，ABRの振幅および潜時の変化を比較した。

35～45週齢の雄のWistarラットおよびF344ラットを実験に供した。ABR測定用電極を埋め込み，ソケットを歯科用セメントで頭頂骨に固定し，1週間以上経過してから実験を実施した。動物はシールドルーム内の防音箱に入れて環境に順応するまで10～30分間放置し，トーンピップで刺激した。音刺激は，音圧を90dB SPLで一定とし，周波数を0.5，1，2，4および8 kHzの条件で行い，音刺激によって発生した誘発電位を誘発反応記録装置によって128回同期加算した。ABRの比較には，振幅，P4とP1の相対的振幅比，潜時およびP1からP4までの潜時差（IPL）

をパラメーターとした。

表 正常ラットにおけるABRのP1値

8kHzの音刺激によって得られたABRのP1について各種パラメーターの数値を表に示した。すべてのパラメーターにおいて両系統間に差はみられなかった。他の周波数で得られたABRにおいても両系統間に差はみられな

パラメーター	Wistarラット	F344ラット
振幅（ μV ）	7.97 $\pm$ 3.29	6.71 $\pm$ 2.04
相対的振幅比	1.16 $\pm$ 0.27	1.45 $\pm$ 0.31
潜時（msec）	2.16 $\pm$ 0.06	2.29 $\pm$ 0.10
IPL（msec）	2.17 $\pm$ 0.06	2.14 $\pm$ 0.11

かった。従って，Wistarラット同様，F344ラットも聴覚毒性試験に使用可能であると考えられた。

次いで，フロセミドの100mg/kgを静脈内投与後1，5，10，20，40，80，160，320および1440分にABRを測定した。フロセミド投与直後，両系統において音刺激に対するABRが消失し，時間の経過とともに振幅および潜時の回復がみられた。8kHzの音刺激によって得られたABRのP1について，WistarラットおよびF344ラットのABR各波の消失から再発現までの時間は，それぞれ13.3 $\pm$ 5.16分および36.6 $\pm$ 8.16分で，F344ラットが長くかった。残りのピークにおいても同様の傾向がみられた。フロセミドによるABRの消失には両系統間に差はなかったが，F344ラットでABRの再発現が遅れたことから，F344ラットの方が強く影響されたと考えられた。つまり，フロセミドの聴覚機能に及ぼす影響において系統差があることが示唆された。

— 散瞳剤を用いた検討 —

福西克弘、大和田幸明、辻野未絵、寺岡美枝、渡辺直人、海野隆（鐘紡・薬品安全研）
オープンフィールド装置を用いてラット自発運動に及ぼす影響を、照度、散瞳ならびに加齢について検討した。

動物はF344/DuCrj系雌雄ラット（10週齢、4 カ月齢、24カ月齢）を用いた。照度と自発運動との検討では照度を25, 100, 400および1600 luxに設定した。観察項目はAmbulationおよびRearing とし、3 分間の行動を1 回観察した。散瞳には検査用散瞳点眼剤ミドリンP（参天製薬株式会社）を用い、対照群には蒸留水を同様に処置した。

10週齢の散瞳剤を処置しない動物（非散瞳動物）ではAmbulationおよびRearing は、400 lux 以上の照度で低下傾向を示し、光刺激に対する影響が認められた。散瞳剤を処置した動物（散瞳動物）についても、100 lux以上の照度でAmbulationおよびRearing は照度の増加にともない低下し、光刺激に対する影響が認められた。一方、非散瞳動物と比較すると25 luxの散瞳動物のAmbulationおよびRearing はほぼ同じ値を示したが、100 lux以上の照度では非散瞳動物に比べ高値を示した。即ち、散瞳動物においても照度の違いによる光刺激に対する反応性の変化が認められるものの、100 lux 以上の照度では非散瞳動物に比べ常に自発運動量の高い傾向が観察された。

次に光刺激に注目して加齢にともない眼の機能が低下していることが予想される老齢ラット（F344/DuCrj）についても散瞳剤を用いて、自発運動を観察した。

4 カ月齢の動物を散瞳させた場合、10週齢と同様にAmbulationが増加したが、24カ月齢のラットではAmbulationの増加は観察されなかった。老齢ラットで認められたAmbulationの変化は網膜の加齢変化と関連した光刺激に対する感受性の変化による可能性が考えられた。

以上より、散瞳させたラットの自発運動(Ambulation)の変化を観察することは、光に対する視覚の機能的変化を検索する一方法である可能性が考えられた。

○鬼丸順子, 小林欣滋, 三村哲夫, 谷川茂之, 久世博,

川合是彰, 堀正樹 (田辺製薬 安全研)

連続照明下でマウスあるいはラットを飼育すると、短期間で網膜障害が惹起されることが報告されている。今回、我々は24時間連続照明下でアルビノラットおよび有色ラットを14日間飼育し、その間の眼科学的变化を検討する目的で、瞳孔径の測定、網膜電位図(以下ERG)の記録および眼底検査を実施し、アルビノラットと有色ラットで比較を行うとともに、眼科学的变化を捉えるのにどの方法が最も適しているかについて検討を行った。

方法 アルビノラットとしてSlc:SD系雄ラットを、有色ラットとしてACI/N系雄ラットを用い、いずれも4週齢から以下の処置を行った。処置群は、約120~190 luxの照度で、24時間連続照明下で14日間飼育の後、7日間の回復期間(12時間/12時間明暗サイクル)を設けた。また、無処置対照群としては、約15~70 luxの照度で、12時間/12時間の明暗サイクルで、処置群と同一の期間、飼育した。一般状態の指標として、体重および摂餌量を全例について、週3回以上測定し、また、瞳孔径測定、ERG記録(光刺激装置MSP-2R, 日本光電、多用途誘発反応記録装置MEB-3102, 日本光電、特殊コンタクトレンズ型電極, 京都コンタクト)および眼底検査(眼底カメラ、KOWA RC-2)を各群2~4例について、処置1, 3, 5, 7, 10, 14および回復7日に実施した。

結果 処置群の体重は両系動物とも処置期間中、軽度の増加抑制を示し、摂餌量は処置期間から回復期間にかけて、対照群に比べ低値を示した。一定光量下で測定した瞳孔径は、アルビノラットで処置3日より散瞳効果が強まり、処置5日で最大となったが、その後は縮瞳方向に向かった。ERGは、アルビノラットで処置1日にわずかにa波の潜時の遅延および振幅の低下がみられ、処置3日以降、a波、b波ともに潜時の遅延ならびに振幅の低下が進行し、処置14日では波の消失例も認められた。また、回復7日も、ほとんど回復しなかった。眼底検査では、アルビノラットで処置7日より眼底動脈の狭細化が、処置10日より眼底静脈の狭細化が認められ、回復もなかった。一方、有色ラットでは連続照明下で14日間の飼育を行ったが、瞳孔径、ERGおよび眼底検査のいずれにも異常は認められなかった。

要約 14日間の連続照明処置により、アルビノラットでは不可逆的な網膜障害が惹起されるのに対し、有色ラットでは網膜障害は惹起されることが確かめられた。また、瞳孔径測定、ERG記録および眼底検査のなかで、ERG記録が最も早く眼科学的变化を捉えることができた。

水内 博, 伴野 清 (田辺製薬・分析研),

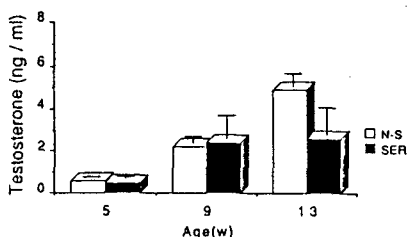
浅野裕三, 新比恵啓志, 中川洋子 (田辺製薬・安全研),

芹川忠夫, 山田淳三 (京大・医・動物実験施設)

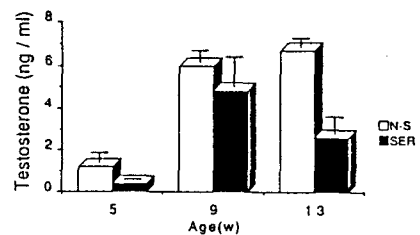
常染色体上の劣性突然変異遺伝子 tremor と zitter の双方をホモに持つ二重突然変異体である自然発症てんかんラット (S E R) は, 6 ~ 7 週齢から欠伸様発作および強直性痙攣を自然発症的に発現する。本ラットは病理形態学的検査によって, 精巣・卵巣の萎縮が認められ, 両性とも不妊である。今回, 自然発症性の発作が観察されない 5 週齢と, 発作が観察される 9 及び 13 週齢の 8 時及び 14 時における雄 S E R の血清中テストステロン (T) 値を E I A 法により測定し, 不妊との関連性について検討した。対照動物には, 妊性を持つ同腹非 S E R (N - S) を用いた。

その結果, 下図に示すように 14 時における, N - S の T 値は加齢とともに上昇したが (週齢: 平均 $\pm$ SE, ng/ml, 5: 1.2 ± 0.5 , 9: 6.0 ± 0.5 , 13: 6.7 ± 0.4), S E R は 5 から 9 週齢にかけて上昇した後, 13 週齢では 9 週齢に比べ約 1/2 に減少した (5: 0.4 ± 0.0 , 9: 4.8 ± 1.4 , 13: 2.6 ± 0.8)。また, いずれの週齢においても N - S に比較して低値であり, 8 時と 14 時における S E R の T 値は 9 週を除きほとんど差が認められなかった。

以上の結果から, S E R における T 産生能は本来は正常であるが, S E R の雄性不妊の主原因と考えられる精子形成過程の異常に伴う二次的影響として, その産生量が低下していると推察した。



N-SおよびSERの8hにおける血清中テストステロン濃度



N-SおよびSERの14hにおける血清中テストステロン濃度

長崎徹、周参見正行、本田勝也、川合是彰、堀正樹
(田辺製薬・安全性研究所)

生殖器に対する毒性を評価する上で、内分泌環境を検索することは重要である。しかし、実験動物のホルモン測定用に開発されたキットでルーチンの内分泌検査に使えるものは極めて少ないのが現状である。そこで今回、最近市販されたホルモン測定用キットの中から、エストロゲンレセプター(ER)ならびに血清中の黄体形成ホルモン(LH)及び卵胞刺激ホルモン(FSH)測定キットを選び、その有用性をラットを用いて、主に性周期との関連から検討した。

子宮及び卵巣の細胞質可溶性画分中のER測定にはER・EIA「アボット」(ダイナボット社)を、血清中のLH及びFSHの測定には、 $[^{125}\text{I}]$ を用いたラットLH及びFSH RIAキット(アマシャム社)を使用した。動物は12週令のCrj:CD系雌ラットを用いて、各性周期毎に屠殺し、子宮、卵巣及び血清を採取した。また 17β エストラジオール及び妊馬血清ゴナドトロピン(PMSG)を連続一週間皮下投与したラットにおいても同様に測定した。

その結果、子宮におけるERレセプター濃度は発情間期から発情前期にかけて高く、発情期で低い傾向を示した。卵巣では発情間期にかけてゆるやかな上昇を示すに留まり、明らかな変化を示さず、ER濃度も子宮に比べて1/8程度であった。エストラジオール投与した場合には、子宮のER量が低下する傾向がみられ、またPMSG投与により、卵巣及び子宮のER量は明らかに低値を示した。これらのことから、ER量の測定結果は内分泌環境の変動をよく反映するとみなせた。一方、LH及びFSHでは性周期に関しては、発情前期後半にみられるLHサージを、午前中に剖検したため捉えることができなかった。しかし、本キットで測定されたホルモン濃度は今までに報告されたものと同一レベルであることが確認できた。PMSG投与した場合には、血清中LH濃度は高値を示し、フィードバック機構に基づく、下垂体機能の変化を確認することができた。また、生殖能力を持たないtremorラットにおいても血中ホルモン濃度は、発症しないヘテロのものと比較して高く、子宮内ER量は低い傾向にあることが確認できた。

以上のように、今回検討した二つの測定系は、性周期及びホルモン投与による内分泌環境の変化ならびにモデル病態において、下垂体-卵巣系の変動を把握するのに有用と判断された。

○岩知道公彦、大森吉明、嶋川幸三、阿部敏男、米田友彦

(武田薬品・実験動物管理室)

【目的】常染色体劣性ホモ接合子によって肥満と高血糖を発症する Wistar fatty ラットでは繁殖率が極めて低い。その原因は十分には究明されていないが、生殖に関するホルモンや生殖器重量の低値などから、内分泌系の異常の関わりが推定されている。我々は本系統の繁殖方法として受精卵移植技術の応用を進めており、今回は、効率良い採卵条件を見出す目的で、雌の週齢、体重及び交配、並びに採卵率等について検討した。

【材料及び方法】5～14週齢の Wistar fatty ラットの雌に、過排卵処置として妊馬血清性性腺刺激ホルモン (PMSG) 及びヒト絨毛性性腺刺激ホルモン (hCG) の各10 IU/rat を48時間間隔で腹腔内投与後、12～14週齢の成熟した非肥満(lean)の雄と同居させた。翌朝に腔栓の観察で交配を確認し、その24時間後に卵管より受精卵(2細胞期胚)を採取した。

【結果】5～6週齢の個体では33.9%(20/59 匹)に交配が確認され、平均採卵数が37.8個、及びその中の平均正常卵数が20.2個(53.4%)を示したが、7週齢以降の個体では交配が極めて低率、あるいは全く確認されなかった。次に交配が確認され、受精卵の採取が可能と判断された5～6週齢の個体について、体重と交配率の関連性について検討した結果、体重が80～100gを示す個体では21.1%(8/38 匹)に交配が確認されたが、101 g 以上の個体では交配確認は0%(0/81 匹)であった(表1)。

【結論】以上の成績より、Wistar fattyラットの雌では5～6週齢で、且つ体重が100g以下の肥満が進行していない個体において受精卵が効率良く採取できることが明らかになった。

表1 5～6週齢のWistar ラットにおける体重別の交配率および受精卵の回収率

体 重 (g)	供試雌数	交配確認 雌数	交配率 (%)	回収卵数 (mean±SD)	正常卵数 ^{*)} (mean±SD)	回収率 (%)
80～100	38	8	(21.1)	54.0±14.5	38.7±23.8	(71.6)
101～120	46	0	(0)			
121～140	31	0	(0)			
141～160	4	0	(0)			

*) : 2細胞期胚

○大森吉明、岩知道公彦、嶋川幸三、阿部敏男、米田友彦

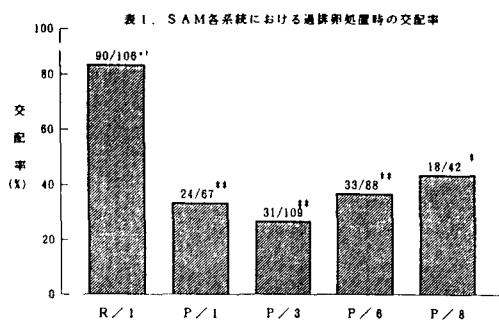
(武田薬品・実験動物管理室)

【目的】老化促進モデルマウス(SAM)は、急速な老化徴候の発現と寿命の短縮を特徴とする一連の疾患モデル動物であり、P系及びその対照としてのR系からなる。我々はSAMの系統維持過程において、P系の中でもSAMP1TA及びSAMP8/Taでは出産率に加えて一腹産仔数が少ないことを認めており、その対策として受精卵移植の応用を進めている。今回は受精卵の回収状況を把握するために、P系としてSAMP1TA(P/1と略す)、SAMP3TA(P/3)、SAMP6/Ta(P/6)及びSAMP8/Ta(P/8)、並びにR系としてSAMR1TA(R/1)の雌について交配率及び採卵率等の過排卵処置に伴う反応を比較検討した。

【材料及び方法】8～16週齢の上記5系統の雌に、過排卵処置として妊馬血清性腺刺激ホルモン(PMSG)及びヒト絨毛性性腺刺激ホルモン(hCG)の各5IU/mouseを48時間間隔で腹腔内投与後、各同系統の成熟雄と同居させた。その翌朝に腔栓の観察で交配を確認し、その24時間後に卵管より受精卵を採取した。さらにこれら受精卵の中から形態的に正常な2細胞期胚を培養し、胚盤胞への発育状態を観察した。

【結果】過排卵処置後の交配率はR系に比べP系でいずれも有意な低値を示した(表1)。平均回収卵数はR/1に比べP/1、P/3及びP/8で有意な低値を示した(表2)。回収受精卵の中に占める2細胞期胚及び変性卵数はR/1、P/3、P/6及びP/8で正の相関性を示したが、P/1では明らかな相関性を示さなかった。2細胞期胚の培養ではR/1、P/3及びP/6で90%以上が胚盤胞へ発育した。P/1及びP/8では約70%が胚盤胞へ発育し、他系統に比べ胚の発育性に低下が認められた。また、自然交配と比較して、過排卵処置により得られる2細胞期胚の数はR/1で約2.5倍、P/3及びP/6で約2倍に増加したが、P/1及びP/8では殆ど差がなかった。

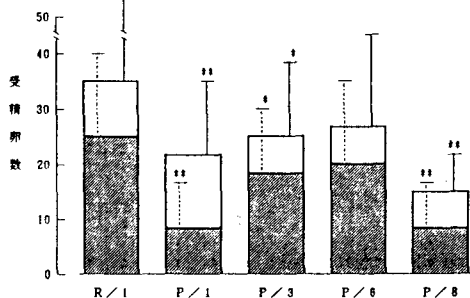
【結論】以上の成績から、SAMA各系統において過排卵処置に伴う反応に系統差がみられ、とくにSAMP1TA及びSAMP8/Taでは過排卵処置の効果は期待できないことが示唆された。



** : 交配確認雌数/供試雌数

* : Significantly different from SAM-R/1, $p < 0.05$ ** : Significantly different from SAM-R/1, $p < 0.01$

表2. 過排卵処置後に交配させたSAM各系統における回収受精卵数



○ : 2細胞期胚数/匹. Values are the mean ± S.D.

* : Significantly different from SAM-R/1, $p < 0.01$ ** : Significantly different from SAM-R/1, $p < 0.001$

大島晴子・○森岡宏至・江崎孝三郎（大阪府大・農・実験動物）

〔目的〕マウスの過排卵に関する報告は多いが、過排卵処置に対する反応の系統差についての報告は少ない。そこで、各種系統マウスの過排卵処置に対する反応について交尾率、誘起排卵数、胚の性状の面から調べ、さらに誘起排卵胚の体外における発育についても、あわせて検討した。

〔方法〕使用動物は9系統の近交系（BALB/cA、C3H/HeN、C3H/HeS1c、C57BL/6N、DBA/2N、DDK、KK、NC）と1系統のクローズドコロニー（ddY）の成熟マウスである。過排卵処置は、一般にマウスで実施されている妊馬血清性性腺刺激ホルモン（PMSG、5IU）とヒト絨毛性性腺刺激ホルモン（hCG、5IU）を48時間間隔で腹腔内投与する方法を適用した。自然排卵、誘起排卵のいずれにおいても、妊娠第2日の13時に卵管を灌流して胚を回収し、数、性状、発育ステージなどを観察した。また、自然排卵妊娠での初産子数を調べた。さらに、過排卵処置によって得られた各種系統の2細胞期胚を96時間体外培養し、経時的に胚の発育を観察した。

〔結果〕1) 自然排卵による排卵数・正常胚数・産子数ではddYがいずれの近交系よりも有意に多く、また近交系間にも差が見られた。特に、DBA/2の排卵数・正常胚数は近交系で最も多かったが、産子数は最も少なかった。2) 過排卵処置による交尾率に系統差が見られた。排卵数は、NCを除く他の系統において、過排卵処置によって有意な増加を示したが、NCの排卵数は増加せず、他のどの系統よりも有意に低い値を示した。過排卵処置による胚の正常性は、DBA/2とKK以外では自然排卵に比べて、有意に低下した。3) 誘起排卵胚由来の2細胞期胚は体外培養によって各系統とも胚盤胞へと発育したが、胚盤胞への発育はDDKで55.6%、NCでは4.3%と非常に低かった。また、胚盤胞へ高率に発育した5系統（BALB、C3H/N、C3H/S、B6/N、ddY）間においても胚の発育速度に差が見られた。

〔結論〕以上より、過排卵処置に対する反応に系統差があること、特にNCでは過排卵処置効果が認められないこと、DDKおよびNCでは2細胞期胚からの体外培養が困難であることが判明した。発生工学の研究材料として多数の正常な初期胚を得るために、過排卵処置の種々の条件について、系統毎に検討していく必要があると考えられた。

○森岡宏至・江崎孝三郎（大阪府大・農・実験動物）

昨年の本研究会で、Dark Agouti (DA) ラットと Sprague-Dawley (SD) ラットの妊娠期間および胚の発育度について報告した。今回は、胚の着床時間ならびに受胎物（胚および胎盤込み）の系統差について検討した。

〔方法〕使用動物はDAとSDラットで、14時間明時、10時間暗時の照明下で飼育した。精子確認日を妊娠第1日とした。着床部位を肉眼的に観察するため妊娠第5日の指定時刻に、生理的食塩水に溶解した1% Evans blue の0.3 ml を伏在静脈に注入した。注入15分後に開腹し、染色部位数を数え、閉腹し、妊娠10日に受胎数を数えて着床率の確度を求め、受胎物のサイズと重量を計測した。

〔結果〕1) DA ♀ × DA ♂ (DA) と DA ♀ × SD ♂ (DS) では、妊娠5日の16:00h 前後から着床し始め、20:00h および 21:00h の着床率は、それぞれ60～62%と97～99%であった。一方、SD ♀ × SD ♂ (SD) と SD ♀ × DA ♂ (SA) では、妊娠6日の02:00h の着床率は64～66%で03:00h には90～97%を示し、胚着床時間において前者 (DAとDS) と後者 (SDとSA) の間に約6時間の差が見られた。2) 妊娠10日における受胎物のサイズと重量については、DAとDS間、またSDとSA間に差は認められなかったが、DAおよびDSの受胎物のサイズと重量は共にSDおよびSAのそれよりも有意に小さく軽いものであった。

〔考察〕前回報告した結果と併せて、DAラットおよびSDラットあるいはその交雑ラットで妊娠期間、胚の発育度、着床時間、受胎物の重量（胚の成長）に差が見られ、妊娠期間および胚の発育度が着床時間および胚の成長に必ずしも一致していなかった。胚および胎子の発育に対して、母親の遺伝的要因の関与が考えられることから、遺伝的要因の異なる動物間での胚移植に際しては、上述のような相異を十分認識した上で実施することが胚移植の成否に繋がるものと推察される。

前田勝弘, 小倉安巳, 深川清二, 内海健二郎 (大日本製薬・総研)

藤原公策 (日大・農獣医)

SDあるいはSHRラット繁殖コロニーに唾液腺涙腺炎 (SDA) が流行すると繁殖指数が低下し, また, 妊娠SD, SHRあるいはWistarラットにSDAウイルス (SDAV) を接種すると胎子, 新生子の死亡, 幼子の発育障害が起こり, 特にSHRラットでは障害が顕著であることをさきに報告した。今回は, SHRラットを用いて, 雄の交尾能力へのSDAV感染の影響, 感染雄と同居交配した雌ラットの妊娠および胚 (胎子) への影響を調べた。

SHRラットは, 自社バリア動物室で繁殖, 血清学的にSDAVの汚染がないことを確認した13~27週齢のものを実験に供した。動物室は温度 $24 \pm 2^{\circ}\text{C}$, 湿度 $55 \pm 5\%$ とし, ラットの飼育はオートクレーブ滅菌 (121°C , 30分) したCA-1固型飼料 (日本クレア (株)) および水道水を自由摂取させた。交配は雄ラットと発情前期の雌ラットを1夜同居した。翌朝, 精子を認めた個体を妊娠0日と判定した。感染に用いたSDAVは, ラット顎下腺継代されたSDAV・TG株を用い, ラットには $2.5 \times 10^2 \text{LD}_{50} / 0.05 \text{ ml}$ を経鼻接種した。SDAV経鼻接種した雄ラットと交配した雌ラットは, 妊娠14日に子宮を摘出し, 胚 (胎子) の生死を検査した。

交尾能力を確認した雄ラット10例中5例にSDAVを経鼻接種したところ, 接種後4日に発症した。これらの発症ラットを接種後4日 (発症初期), 7日 (発症後期), 11日 (症状消退後) に発情前期の雌ラットと1夜同居交配した。接種雄ラットの交尾能力は非接種対照と差はなかった。接種後4日, 同7日, 同11日の雄ラットと交配した雌ラットの胎子および胚死亡は, 23例中15例 (65%), 55例中30例 (55%) および36例中12例 (33%) で, 接種後4日の雄ラットと交配した雌ラットに多くの死亡胚を認めた。つぎに, 雄ラットが接種後いつまでウイルスキャリアであるかを調べた。SDAV接種後7, 11, 15日の雄ラットと雌ラットを1夜同居交配したところ, 接種後7, 11日の雄ラットと交配した雌ラット9例は, SDAを発症したが, 接種後15日の雄ラットと交配した雌ラット10例は全例未発症であった。接種後15日の雄ラットと交配した雌ラットの妊娠後14日の血清CF抗体は全例陰性, 同雌ラットの交配に用いた接種雄ラット (接種後16日) のCF抗体価は1:160~1:320であった。

SDAV感染雄ラットの交尾能力は対照と差がなかった。しかし, 接種後4~11日の雄ラットは交配した雌ラットへの感染源となり, SDAを発症させ, 胚および胎子死亡の原因となった。一方, 接種後15日の雄ラットと交配した雌ラットにはSDAの発症はなく, CF抗体の出現もなかった。これらの事実からラットがSDAVを保有する期間は12~15日であることが判った。

○三日月勝見、根縫弘子、高橋恵子、境 陽子、平沢 勉、千葉博喜、
大原真代子(塩野義・油日ラボ)

我々の施設で飼育している種々実験用動物にCampylobacter属菌に汚染している動物種がいるのではないかと考え菌検索を実施した。今回は、菌検索の結果および分離菌株の生物学的性状について報告する。

<材料および方法>

1. 供試動物 : SPF環境下にて飼育しているマウス、ラット、ニトリおよび通常環境下にて飼育しているモルモット、ウサギ、ネコ、ビーグル、カキザル、アカザル等を中心に検索した。
2. 菌分離法 : 種々実験用動物の糞便よりスロー、ハッラーの培地を用いてCampylobacter、Helicobacter属菌の分離を行った。培養に際しては、BBL社製キャンビバックを用い、疑わしい発育集落についてはブルータ寒天培地、溶血ウマ血液を10%に加えたブルータ寒天培地に釣菌した。
3. 種々培地上での発育性 : カキザル、ビーグル由来株について食塩卵、DHL、SS、NAC、SF、普通、ブルータ、ウサギ血液のそれぞれの寒天培地上での発育性について検討した。
4. 分離菌株の性状試験 : カキザル、ビーグル由来株について種々生物学的性状試験を実施した。また、マイクロプレートDNAハイブリタ化ーション法により分離菌の同定を行った。

<結果および考察>

Campylobacter属菌の分離成績では、マウス、ラット、モルモット、ウサギ、ネコ、アカザル、ニトリは陰性であったが、ビーグルは15例検索中9例(60%)が、カキザルは130例検索中8例の(6%)が陽性であった。分離菌株について菌種を同定するために生物学的性状試験を実施した結果、カキザル由来株はC. fetus、ビーグル由来株はC. jejuniと同定された。また、マイクロプレートDNAハイブリタ化ーション法により分離菌を同定したところ、カキザル由来株はC. fetus、ビーグル由来株はC. jejuniと同定された。

今回、我々がカキザルおよびビーグルより分離したCampylobacter属菌は、ヒトにも病原性がある事が知られており、人畜共通伝染病の観点より動物飼育管理上の問題が大きいものと考えられた。

中尾博之、藤原充良、山元勝一、内田清久（塩野義・油日）

一般に齧歯類における無菌動物の盲腸は、通常動物より大きいことが以前より知られており、盲腸拡張の原因について多くの報告があるものの、結局は「腸内細菌叢の欠損に起因する影響」と考えられている。これら盲腸拡張は、実際に無菌動物の繁殖過程や動物実験手技上において、少なからず支障を来している。今回私達は、胆汁酸代謝に及ぼす腸内菌の影響を調べる実験過程で、Gnotobiotic ラットを作出する機会を得たので、ここでは腸内細菌の役割を探る一助として、ヒト由来腸内細菌の盲腸収縮作用について検討した。

「材料と方法」： 当施設で自家繁殖した無菌のWistar/Shi. ラット（約4ヶ月齢：雄）に数種ヒト由来の腸内細菌：B. vulgatus, B. longum, C. ramosum, E. coli, L. gasseri, P. productus（理化学研究所微生物系統保存室より分与）の単一投与や、これら6菌種の複合投与、更に通常ラット及びヒト糞便を用いて、それぞれ経口投与6日後（P. productusの追加実験：投与14日後、28日後）に安楽死させたのち、消化管重量などを測定し、得られた値を対照群と比較した。投与菌の調製は、継代新鮮株をGAM半流動高層培地（中試験管：口径18mm×110mm, プチルゴム栓付）に移植し37℃, 1～2日間培養後速やかに外部を2%過酢酸で噴霧し、アイソレーターに導入後、ゾンデを用いてラットに1mlずつ経口投与した。また投与時並びに投与後の菌数検索には、BL寒天とGAM寒天を用い、好気または嫌気条件において37℃, 2～3日間培養後に菌数を測定し対数値で表示した。

「実験成績」

【1】B. vulgatus を単一投与時の消化管内各部位の菌数推移は、消化管上部（胃～回腸）では3.2～7.4 Log./g. material の範囲を示したが、大腸各部位（盲腸・結腸・直腸）と糞便では2日後より安定した菌数値（10.4～10.6 Log./g.）を示した。

【2】それぞれ6菌種単一投与後の糞便内菌数を見ると、投与菌種に関わらず、投与2日後で9.1～10.5 Log./g. feces と既にプラトーに達し、その後は投与6日後の実験終了時まで高い菌数値で推移した。また単一投与群における投与6日後の消化管重量をGF対照群（収縮率）と比較すると、盲腸に幾分収縮傾向が見られたP. productus群は14.7±2.4g（体重比3.8g%：収縮率19.1%）を示し、L. gasseri群は15.5±1.5g（体重比4.6g%：収縮率15.1%）を示したが、P. productus投与群にのみ盲腸収縮が認められた（ $P < 0.05$ ）。

【3】複合投与群での投与6日後の盲腸重量をGF対照群（収縮率）と比較すると、先ず6菌種の混合投与群のそれは、12.9±0.6g（体重比3.6g%：収縮率29.1%）を示し、各単一投与群に比べてより盲腸収縮が認められた。また通常ラット糞便投与群は、9.9±1.6g（体重比2.6g%：収縮率45.5%）と著明な盲腸収縮を認めたが、ヒト糞便投与群や通常環境継代CVラット群の値にまでは収縮しなかった。更にヒト糞便投与群のそれは、7.3±0.7g（体重比2.2g%：収縮率59.9%）を示し、通常環境下で継代しているラットの値7.8±1.6g（体重比2.0g%：収縮率57.0%）と、ほぼ同程度にまで収縮するに至った。

【4】P. productus投与後の期間と盲腸収縮を検討した追加実験では、投与2週後が16.46±0.86g, 投与4週後が16.22±1.18g と、期間延長が盲腸のより収縮には繋らなかった。

ヒト由来腸内菌の単一投与において、P. productus 群にのみ盲腸収縮能（ $p < 0.05$ ）を認めたが、その程度はCV群（CV環境継代）の約半分には過ぎないことが判明した。

○森 郁生、林 新茂、堀之内 彰、吉次 紀子、杉谷 順康、野々山 孝（武田薬品・薬安研・光）

F344 ラットは医薬品の安全性試験に供される実験動物として最も代表的な系統のひとつであるが、その発生異常に起因する自然発生病変についての報告はほとんどない。我々は過去5年間(1988-1992年)に毒性および癌原性試験に用いた雌F344ラット、1500例中3例に内部泌尿生殖器の発生異常を認め病理学的検索を行った。

いずれの動物も4週齢で動物業者より購入し閉鎖環境下で無処置飼育後、14(#1)および111週齢(#2および#3)時に剖検した。

ルーチンの動物観察および臨床検査ではいずれの例にも異常は認められなかった。

肉眼的にはいずれの例においても内部泌尿生殖器以外の臓器に異常はみられなかった。

#1では、右側子宮角および卵管が欠如していた。#2では、右側子宮角は細く索状を呈し、同側の卵管は欠如していた。#3では、左右の子宮角および腔はいずれも細く著しい低形成を示し、左側の卵管が欠如していた。加えて#3では、左側腎臓が欠如し、右側腎臓は軽度の代償性肥大を示した。なお、いずれの例においても卵巣および膀胱に変化はなかった。

組織学的検査では、肉眼的に低形成を示した#2および#3の子宮角はいずれも疎な結合組織のみからなり子宮内膜、子宮腺、固有層、筋層など子宮本来の組織構造はみられなかった。#3の子宮頸部近位の子宮角横断切片では管腔様構造がみられたが、内膜を構成する上皮細胞は認められなかった。正常ラットの子宮は重複子宮からなり子宮頸部において左右の子宮角がそれぞれ別々に腔に開口するが、#1および#2における子宮頸部の縦断面切片では子宮角の欠如あるいは低形成を示した側の子宮外口および子宮内腔が認められなかった。卵巣では全例とも卵管が欠如していた側の卵巣嚢が欠如していたが、卵巣そのものに異常はなく、成熟した卵胞あるいは黄体が認められた。また#2の両側および#3の右側腎臓に軽度の腎症がみられた。

ラットの泌尿生殖器は中間中胚葉から発生すると考えられており、腎臓は2つの原基すなわち中腎管および後腎形成芽体から発生し、また卵管、子宮、および腔の一部は中腎管の存在下で中腎旁管から発生するとされている。今回検索した3例のうち#1および#2は中腎旁管から卵管、子宮への発生過程に異常を来したものと考えられた。また、#3では内部生殖器の低形成あるいは欠如に加えて片側の腎臓も欠如していたことから、中腎管の発生異常に起因すると考えられた。

○細野和裕、江守武彦、嶋川幸三、阿部敏男、米田友彦

(武田薬品・実験動物管理室)

【目的】白内障とリンパ腫の病態モデル動物として系統維持しているCF#1/b-cacマウスの数例に小型で多尿を示す異常例が発現し、この両親および正常同腹仔同士の交配により同様の異常例が約25%の発現頻度で認められた。そこで、本症例の病態を明らかにするために以下の検討を行った。

【材料および方法】本小型マウスおよび対照としてCF#1/b-cacの正常例を用いて生後4～24週齢にわたり、一般状態の観察、体重、尿糖、血糖および血中インスリンの測定、並びに経口糖負荷試験を行った。また、10週齢の少数例については血中成長ホルモンの測定、剖検および臓器重量測定を行った。

【結果】本小型マウスでは正常例に比較して以下の変化が認められた。

1) 生後約2週より小さい体型を示し、正常例と識別された。体重は雌雄共に4週齢では50～60%と低値を示し、加齢と共に増加傾向はみられたが、その比率は殆ど変わらずに推移した。

2) 摂餌量および摂水量は1.5～2倍と多く、また、多尿のために床敷の顕著な汚染が認められた。

3) 尿糖は4週齢から陽性を示し、雄に強い傾向がみられた。血糖は4週齢から高く、10週齢の雄で約4.5倍(320～520mg/dl)、雌で約2.5倍(220～280mg/dl)の高値を示した。

4) 血中インスリンは10週齢で約2倍の高値を示したが、24週齢では正常例と同程度の値に推移した。また、11および18週齢では耐糖能の低下を示した。

5) 10週齢における血中成長ホルモンは約1/4の低値を示し、剖検では盲腸の膨満、小腸および盲腸重量の高値、並びに下垂体重量の低値が認められた。

【結論】以上の成績から、本小型マウスは早期から糖尿病症状並びに耐糖能と血中インスリン値の異常を示しており、糖尿病モデルとしての有用性が示唆される。また、成長ホルモンの分泌異常を併せもつ病態と推察される。

今後は、さらに糖尿病態などの詳細について検討する予定である。

19. ネフローゼ自然発症ICGNマウスの病態解析

岳乗飛¹⁾, 岡本宗裕¹⁾, 田島 優¹⁾, 竹中やよい¹⁾, 浅野敏彦²⁾, 黒澤努¹⁾,
(阪大・医¹⁾, 予研・獣医²⁾)

ICGNマウスは予研のICRコロニー中に発見され、近交化途上にあるネフローゼの疾患モデル動物である。とくに若齢より大量の蛋白尿を排出する。ネフローゼは病因が不明であるが、ICGNマウスの病態解析によりこの病因の解明が期待される。本研究ではICGNマウスとICRマウスの尿蛋白、血漿蛋白、尿クレアチニン、血漿コレステロール、血漿BUNおよび腎臓の糸球体数を解析した。

材料と方法

実験動物：0-24日齢のICGNマウスとICRマウスである。

尿血漿蛋白はDC Protein Assayで、尿クレアチニンはクレアチニン-テストワコーで、血漿コレステロールはコレステロールE-テストワコーで、血漿BUNは尿素窒素B-テストワコーで計った。

腎糸球体数：動物をエーテル麻酔後、腎を摘出し、10%中性緩衝ホルマリン液浸漬固定、パラフィン包埋、常法にしたがって薄切、HEおよびPAS染色し、光顕で計数した。

結 果

1.尿蛋白は両系統のパターンが、0日齢をのぞきいずれの日齢でもICGNで有意に高い値であり ($P < 0.01$) 違っていた。ICGNでは9日齢から急激に増加し、19日齢で最高となってから徐々に低下した。しかしICRでは19日齢から漸増しただけであった。

2.血漿蛋白はICRでは生後急激に増加し、14日齢で最高となった。しかしICGNでは24日齢までほとんど変化せず、いずれの日齢でもICRに比べICGNで有意に低い値であった ($p < 0.01$)。

3.血漿コレステロールはICRマウスが0日目では71.76mg/dlと低いが、やがて徐々に増加し、14日齢では最高となった。ICGNマウスはICRマウスと同じパターンを示したがいずれも高い値を示し、14日目と24日目では有意差を持って高い値を示した。

4.血漿BUNはICRマウスよりICGNが高い ($p < 0.01$) 値を示した。ICGN,ICRとも生後増加し、6日目では最大となり、その後徐々に低下した。

5.尿クレアチニンはICRマウスは0日目では14.2mg/dlで9日齢まで変化が少ないが、14日齢から急増する。ICGNも同じ傾向があったがほとんどの日齢でICRより低い傾向を示した。

6.ICR, ICGNマウスとも生後糸球体数は急激に増加し、6日目から漸増した。

以上のICGNマウス所見はヒトのネフローゼ症候群の所見と似ており、ICGNマウスがこの疾患モデルとして価値を持つものであると考えられた。

zoonosis (複数-ses) は動物 (脊椎動物—主に哺乳類・鳥類) から罹るヒトの病気で、普通は感染症について言われる。衛生学からの概念で、direct zoonosis, indirect (vector transmitted) zoonosis, saproozoonosis=common source disease に分けられるが、cyclozoonosis, reverse zoonosis などもある。感染症の観点からは interspecies transmission の一つで、通常、行き止まり感染である。生物学の観点からは寄生体と宿主の進化の問題として取り上げるべきものと思われる。

実験動物の zoonoses について、動物種別に主なものを紹介する。

げっし類・ウサギ類

Arenavirus の LCMV、Lassa complex と Takaribe complex に属するウイルスが野生げっし類に保毒されていて脳炎、出血熱を起こす。Hantavirus のウイルスによる感染では野生げっし類からラットに伝播してヒトが発症する腎症候性出血熱が大きな問題である。二種類の細菌が病原となる鼠咬症 (付表 1)、カビによる皮膚真菌症 (付表 2) などにも注意が必要である。

イヌ・ネコ

Rhabdovirus の狂犬病ウイルスはすべての温血動物が罹患すると言われ、世界的には撲滅から程遠い地域も多い。Q 熱, Lyme disease は日本にあるが Eherlichia canis 感染症や Cat scratch disease の我が国での存在は不明である。その他、Brucella canis, Leptospira interrogans また Salmonella, Yersinia, Campylobacter も問題になる。数種の菌が bite infection の病因として知られている (付表 1)。ほかに Toxoplasma gondii などの原虫、Toxocara canis などの寄生虫、皮膚真菌症 (付表 2) がある。

サル類

Poxvirus 群の Tanapox virus, Yaba virus (Parapox) はサルが保毒している。Monkey pox virus はリス類 (Heliosciurus, Funisciurus) が病原巣でサルもヒトも発症する。Herpes virus 群ではマカク属のサルが保毒している Herpesvirus simiae (B virus) がヒトに脳炎

を起こすので嚴重な対策を必要とする。その他マーマセットやリスザルのヘルペスウイルスもヒトに感染する。Filovirus 群の Marburg virus と Ebola virus はヒトに重篤な出血熱を起こす。病原巣は不明である。vector-transmitted のものとして yellow fever virus, Kyasanur forest fever virus などがある。

サル類は系統發生的にヒトと近い関係にあるためか、ヒトの病原体にサルが感染する場合も多く、reverse zoonoses として動物を扱う関係者としては注意が必要で、また、ヒトーサルーヒトの感染環も実験室などでは起こりうる。Herpes simplex virus Measles virus, parainfluenza 3, poliovirus などのウイルスによる疾病のほか、細菌性赤痢、結核その他の抗酸菌病、アメーバ赤痢、ランブル鞭毛虫症などがある。Cryptosporidium と Pneumocystis はヒトのものとサル類のものとが同一かどうか未定である。

付表 1 咬傷感染 bite infection

病原体	保菌動物	ヒトの疾病
<i>Spirillum minor</i>	ネズミ類	発疹・リンパ節炎
<i>Streptobacillus moniliformis</i>	ネズミ類	局所・リンパ節炎・関節炎, Haverhill fever
<i>Pasteurella multocida</i>	イヌ・ネコ	皮膚化膿性炎・敗血症
DF-2 (defective fermenter)	イヌ・ネコ	炎症・敗血症など
<i>Bacteroides spp.</i> など	イヌ・ネコ	"
<i>Neisseria cati</i> など	ネコ	"
<i>Actinomyces pyogenes</i>	ブタ (ウシ)	化膿性炎
<i>Rhodococcus equi</i>	(ウマ)	"
<i>Corynebacterium ovis</i>	(ヒツジ)	"

付表 2 動物から感染する皮膚真菌症の病原

Dermatophyte (keratinophilic fungi) 白癬菌	
conidia の形態から (fungi imperfecti)	学名
<i>Microsporum canis</i>	<i>Nannizzia spp.</i>
<i>Trichophyton mentagrophytes</i>	<i>Arthroderma spp.</i>
<i>Epidermophyton</i>	未定

< 第 3 7 回 研 究 会 >

日時： 平成 5 年 3 月 5 日 (金)

場所： 京大会館

学術講演会

* ラットにおける生化学的遺伝子座の開発から *
* 染色体地図の作成まで *

京都大学医学部 附属動物実験施設

山田 淳三

ラットにおける生化学的遺伝子座の開発から染色体地図の作成まで 山田淳三

私が京都大学医学部附属動物実験施設に赴任したのは、1973年2月の事である。共同利用施設である動物実験施設の教官であったが、教官は教官として先ず自分の研究テーマを考える事にした。京都大学医学部では、何と云っても岡本耕造先生、青木久三先生らが開発された、自然発症高血圧ラット SHR があり、そのもととなった Kyo:Wistar 系、その由来した W 系（北海道大学）、その兄弟系統である WM 系（国立遺伝学研究所）等の遺伝的差異を調べることにした。

その当時、ラットの isozyme 等の遺伝的変異についてはあまり報告がなかった。1978年 Womack の報告では、染色体は $2n=42$ 本あるにもかかわらず、ラットの遺伝的連鎖群 (linkage group, LG) は 6 組で 26 個の遺伝子座しかマップされておらず、そのうち生化学的遺伝子座は 7 個に過ぎなかった (1)。そこでマウスでは、すでに多く報告されている isozyme 等生化学的遺伝子座の開発に取り組み始めた。先ず、家森幸男先生らの、SHR と Kyo:Wistar で、腎、小腸の esterase に異なる isozyme があるという報告 (2) の追試から始めた。これらの系統間で、毛色 (*c, a, b, d, h*) 遺伝子座、esterase を中心に *Es-1*、*Es-2*、*Es-3*、*Es-4*、*Es-Si*、*Amy-1*、*Hbb* 遺伝子座等を調べたところ、系統の由来とは関係なく、かなり大幅に異なっていることが判明した (3)。

そこで、Wistar 系といってもかなり異なるものがあるのではないかと考え、なるべく由来の異なる Wistar を販売している 4 業者から Wistar ラットを導入し、これらラットについて 5 つの esterase 遺伝子座に *Amy-1* 遺伝子座を加えた 6 遺伝子座の変異を調査した。これら 6 遺伝子座で各系統間で大きく異なり、対照に調べた SD 系ラットと比較しても、大きなバラツキがあることが判明した (4)。このことから、Wistar ラットというものは、各業者とも販売、取り扱いをしているものの、業者毎に別の系統と考えた方がよいことが示された。

Esterase 遺伝子座は *Es-1*、*Es-2*、*Es-3*、*Es-4*、*Es-Si* 等があるが、これらは全てラット LG V に属している。そこで 4 つの近交系からなる 3 組の戻し交配子を調べることで、相対的位置を推定した。その結果、*Es-1* - (4.8cM) - *Es-4* - (0.0cM) - *Es-2* - (4.8cM) - *Es-3* - (8.3cM) - *Es-Si* の位置にあることが推定された (5)。

新しい遺伝子座を開発する試みでは、先ず赤血球中の catalase における多型の発見があげられる。系統により、電気泳動度の早い A 型と、遅い B 型があり、両者の F1 は B 型となり、B 型が優性であった。この遺伝子座には *Cs-1* と名付けたが、F1 が B 型と同じであることから、この遺伝子座は恐らく構造遺伝子座ではないと思われる。他の 13 遺伝子座との linkage は、3 組の戻し交配子について調べたが、何れとも有意な連鎖は検出されなかった (6)。

次に、マウスで多型がみられる尿蛋白について、ラットで検討した。ラットでは尿をそのまま電気泳動し、Coomassie Brilliant Blue で染色しても蛋白は検出されなかったので、尿を 25-50 倍に濃縮したところ、雄ラット尿ではっきりとバンドが検出された。ラッ

ト尿中で量的に最も多い蛋白は albumin で、それより泳動度の早い所に 2 本のバンドが検出され、このバンドに系統間で多型が見つかった。このバンドは雄にしか認められなかったもので、Male urinary protein (*Mup-1*) と名付けたが (7)、一般にはマウスと同じ Major urinary protein を使用している様である。残念ながら、この多型の発見はオランダの van Zutphen 等 (8) に先を越されてしまったが、我々はマウスと同様、この *Mup-1* 遺伝子座と毛色遺伝子座 *b* と 8 cM の連鎖があることを見付け、ラットの *Mup-1* はマウスの *Mup-1* と homologue であることが推定できた。その後、この蛋白は雌でも、尿を更に濃縮することにより検出可能で、泳動像は雄と雌で異なるものの、雌の対立遺伝子は雄の対立遺伝子と全く一致していることを証明した (9)。

尿中の pepsinogen (*Pg-1*) に関し、アメリカの Cramer は多型を発見し、毛色遺伝子座 *c* とのゆるい連鎖を報告した (10)。我々はこの結果の追試を試みたが、多型は検出されたものの、*c* 遺伝子座との連鎖は検出されなかった。Pepsinogen については、その生産場所である胃粘膜 homogenate についても調べたが、尿中 pepsinogen (*Pg-1*) の他に、バンドの有無による他の pepsinogen (*Pg-2*) が見つかり、*Pg-1* との強い連鎖 (3.7cM) があることが判明した (11)。

このような研究が軌道に乗り始めた頃、国立遺伝学研究所の故吉田俊秀先生から、ラットの遺伝に関する科学研究費の班を組むようご示唆を頂き、昭和 55 年度から 57 年度にかけて、総合研究 (A) の代表者を勤めさせて頂いた。この班は 9 名の班員で組織され、下顎骨の形態、生化学的遺伝子、体細胞交雑法、免疫遺伝子、寄生虫抗原に対する免疫反応、ミトコンドリア DNA 切断型、核型、染色体転座・逆位系統につきそれぞれ研究を進め、かなりの成果が得られた。

生化学的遺伝子座については、世界各国でそれぞれ独自に開発されるに従い、遺伝子座名及び対立遺伝子名に関する混乱が生じ始めていた。そこで Freiburg 大学 (ドイツ) の Bender を中心とする国際研究班が組織され、同一の試料について、それぞれの研究グループがタイピングを行い、統一を計る計画が出された。この班には、我々も含め 9 ヶ国から 11 のグループが参加して行われ、その結果は 28 の生化学的遺伝子座について 93 近交系の遺伝的 profile のデーターとして、1984 に Immunogenetics 誌 (12)、又その追加が Rat News Letter (13) に公表された。

その後、生化学的遺伝子座については、涙液蛋白に 2 つの多型遺伝子座を発見した (14)。そのうち *Rtp-1* 遺伝子の産物 RTP1 は *Mup-1* 遺伝子の産物 MUP1 と同じ抗原性を持つバンドがあり、戻し交配子の中で、*Rtp-1* 遺伝子座と *Mup-1* 遺伝子座との遺伝的組み替えは認められず、同一の遺伝子座である可能性が示唆された。しかし、34 近交系ラットの間で、組み替え型の遺伝子型を持つ 3 系統が見いだされ、その蛋白の抗原性は同じものがあるが、それぞれ別の遺伝子座であることが判明した (15)。*Rtp-2* はバンドの有無に関する多型で、ラット LG I に属し、マウスの *Mtp-1* と相同な遺伝子座であることが確定された (16)。

先の総合研究 (A) に次いで、2 回目の総合研究 (A) が、再び私を代表者として、「ラットにおける遺伝特性の開発・利用と近交系ラットの遺伝モニタリング方法の確立」という題の下に、昭和 60 年から 62 年にかけて行われた。この班は 12 名の班員と 4 名

の班友の編成で行われ、それぞれ大きな成果が得られた。その中では、我が国で維持されている近交系ラットの由来を明らかにすると共に、亜系も含めた 121 系統について 35 の生化学的遺伝子座についての profile が作られた。これにより、ラットでもこれらの遺伝子座により、遺伝モニタリングが可能であることが示された。

それまで、主に生化学的遺伝子座を取り上げてきたが、これらはそれぞれの遺伝子が作った遺伝子産物で多型を見付けていたのであるが、より多くの多型が期待される DNA 配列自体の変異を見付ける方向へ研究が発展した。先ず第一に取り上げたものは、ラットの angiotensinogen 遺伝子で、その cDNA をプローブとして、系統間の restriction fragment length polymorphism (RFLP) を調べる事であった。HindIII、PstI、PvuII の 3 つの制限酵素を用い、Southern 解析を試みたところ、11 近交系間に 3 つの対立遺伝子が検出された。しかし、2 組の戻し交配子で他の 17 遺伝子座との連鎖を調べたが、Es-3、Es-4 遺伝子座と弱い連鎖があるようであったが、何れとも強い連鎖は検出されなかった。しかし、この cDNA をプローブとして、ラット染色体標本に対して、*in situ* hybridization を試みたところ、この遺伝子は第 19 染色体 q 腕にあることが確かめられた (17)。後に、Es-3、Es-4 との間に認められた弱い連鎖があったことは、別の実験で確かめられ、ラット LG V は第 19 染色体にあることが確認された。

生化学的遺伝子にしても、DNA プローブを用いた RFLP にしても、連鎖の検索はできても、染色体への当てはめは *in situ* hybridization による他、方法はなかった。そこで体細胞交雑細胞クローンの作成に取り掛かった。雄ラットの胸腺細胞と、マウスのミエローマ細胞を融合させ、Y01 から Y18 の 18 クローンが作成された。これらのクローンについて、ラットの染色体の有無を調べたところ、それぞれのクローンは保持するラット染色体の組み合わせが全て異なり、しかもクローン全体として、ラットの全ての染色体が含まれていることから、この雑種細胞クローンを用いることにより、ラットのあらゆる遺伝子を染色体に当て嵌めることができるようになった。早速、23 の生化学的遺伝子 (18)、及び 17 個の DNA プローブを用いて 17 の構造遺伝子と、それに関連した 11 の DNA fragment を各染色体へ当て嵌めることができた (19)。更に、tachykinin 受容体遺伝子 TAC1R、TAC2R、TAC3R をそれぞれ第 4、第 20、第 2 染色体へ当て嵌めた (20)。

その後、*in situ* hybridization も、DNA プローブの大きさが十分であれば、蛍光色素を用いる fluorescence *in situ* hybridization (FISH) を用いることが可能となり、この方法により精度及び感度が向上した。FISH を用いて、insulin 1 (*INS1*) 遺伝子座を第 1 染色体 q55 へ (21)、renin (*REN*) 遺伝子座を第 13 染色体 q13 (22) へ、又 serine:pyruvate aminotransferase (*SPAT*) 遺伝子座を第 9 染色体 q34-36 へ当て嵌めることができた (23)。

このようにして、18 個の体細胞交雑細胞クローン、及び今まで分かっている遺伝子座がすでに typing されている戻し交配子群の 7 組の核 DNA の保存という蓄積を持つ中で、更に新しい方法を導入する事により、今までの蓄積は一挙に花を咲かせた。その方法は microsatellite に存在すると期待される多型を利用するもので、polymerase chain reaction (PCR) による多型の検出であった。この研究はフランスの C. E. P. H. の Lathlop、Beckmann との共同で行われたものである。先ず遺伝子データベース GenBank 及び EMBL から 4 bp 以下のモチーフで、20 回以上の繰り返し配列 (microsatellite) を持つ 174

個の遺伝子を選び出し、その配列中にある microsatellite 領域をはさむ様に primer を合成した。次に、体細胞交雑細胞クローンの DNA を template として、PCR で増幅することにより、ほとんどの遺伝子を各染色体へ当て嵌めた。次いで、8 近交系の核 DNA を template として、PCR で増幅した各 DNA fragment を電気泳動し、DNA 染色することにより、長さの多型の有無を調べたところ、約 82% の遺伝子に多型が検出された。そこで、多型のみられた遺伝子座について、我々の保持していた戻し交配子群 7 組、及び別の F2 交配子群 2 組の DNA を用いて、連鎖を検索した。これにより一挙に 110 個の遺伝子座の連鎖が各染色体にわたり、24 組の LG として同定された。他に 33 個の遺伝子は染色体へは当て嵌められたものの、今のところ連鎖群には当て嵌められてはいない。もっとも、一つの染色体へ 2-3 個の LG が当て嵌められているものもあり、又第 15 染色体及び Y 染色体には何れの遺伝子も当て嵌められなかった (24)。

このようにして、ラットの遺伝子地図も、やっと染色体番号で行えるようになり、一部の染色体を除き、アンカーとなる遺伝子座が確定されたので、今後この地図を基として、世界各地で続々とラットの遺伝子地図が拡充されて行くことは間違いないと思われる。

参考文献

1. Womack, J. E.: Linkage map of the rat. Rat News Letter No. 3: 12、1978.
2. Yamori, Y., and K. Okamoto: Zymogram analysis for various organs from spontaneously hypertensive rats. Lab. Investigation 22: 206-211、1970.
3. 山田淳三: ウイスター系ラットの標識遺伝子. 実験動物 28 (1): 156-161、1979.
4. Yamada, J., H. Nikaido, S. Matsumoto: Genetic variability within and between outbred Wistar strains of rats. Exp. Anim. 28 (2): 259-265、1979.
5. Yamada, J., H. Nikaido, S. Matsumoto: Linkage analyses among five esterase loci in the laboratory rat (*Rattus norvegicus*). Biochem. Genet. 18 (5/6): 433-438、1980.
6. Yamada, J., H. Nikaido, and Y. Kondo: Genetic studies of RBC catalase in the rat (*Rattus norvegicus*). Jpn. J. Genet. 56 (5): 447-455、1981.
7. Nikaido, H., J. Yamada, and Y. Kondo: Male urinary protein-1 (*Mup-1*) in the rat: *Mup-1* assigned to linkage group II. J. Hered. 73: 119-122、1982.
8. van Zutphen, L. F. M., A. Lagerwerf, J. Bouw, and M. G. C. W. den Biemann: Biochemical polymorphism in the rat: genetics of three electrophoretic variants and characterization of inbred strains. Biochem. Genet. 19: 173-186、1981.
9. Kondo, Y., and J. Yamada: Male urinary protein-1 (*Mup-1*) expression in the female rat. J. Hered. 74 (4): 280-282、1983.
10. Cramer, D. W.: Genetic variation of urinary pepsinogen and its probable linkage to albinism in the rat. Immunogenet. 13: 555-558、1981.
11. Hamada, S., J. Yamada, K. Bender, and M. Adams: A new polymorphic pepsinogen locus (*Pg-2*) in the rat (*Rattus norvegicus*). Exp. Anim. 36 (3): 267-272、1987.
12. Bender, K., P. R. Baverstock, M. C. W. den Biemann, S. Bisbort, R. Brdicka, G.

- Butcher, D. W. Cramer, O. von Deimling, G. P. Fuller, E. Gunther, R. D. Guttman, H. J. Hedrich, P. B. Kendall, R. Kluge, M. R. Moutier, B. Simon, J. E. Womack, J. Yamada, and L. F. M. van Zutphen: Biochemical markers in the inbred strains of the rat (*Rattus norvegicus*). *Immunogenet.* 19 (3): 257-266, 1984.
13. Bender, K., E. Gunther, M. Adams, P. R. Baverstock, M. den Biemann, S. Bisbort, R. Brdicka, G. W. Butcher, D. W. Cramer, O. von Deimling, M. F. W. Festing, R. D. Kluge, R. Moutier, J. E. Womack, J. Yamada, and B. van Zutphen: Characterization of rat inbred strains: report of a joint program and details on six additional polymorphic markers. *Rat News Letter*, No.13: 183-188, 1984.
 14. Kondo, Y. S. Hamada, T. Serikawa, and J. Yamada: Two polymorphic genetic loci of rat tear proteins. *Transpl. Proc.* 19 (3): 3146-3147, 1987.
 15. Kondo, Y., S. Hamada, T. Serikawa, and J. Yamada: Genetic polymorphisms of tear proteins in the rat. *Biochem. Genet.*, 26 (11/12): 683-691, 1989.
 16. Kondo, Y., S. Hamada, T. Serikawa, and J. Yamada: Second genetic polymorphism of tear proteins in the rat (*Rtp-2*). *Exp. Anim.* 38 (4): 327-331, 1989.
 17. Mori, M., K. Ishizaki, T. Yamada, H. Chen, T. Sugiyama, T. Serikawa, and J. Yamada: Restriction fragment length polymorphisms of the angiotensinogen gene in inbred rat strains and mapping of the gene on chromosome 19q. *Cytogenet. Cell Genet.* 50 (1): 42-45, 1989.
 18. Yasue, M., T. Serikawa, and J. Yamada: Chromosomal assignment of 23 biochemical loci of the rat by using rat x mouse somatic cell hybrids. *Cytogenet. Cell Genet.* 57 (2-3): 142-148, 1991.
 19. Yasue, M., T. Serikawa, T. Kuramoto, M. Mori, T. Higashiguchi, K. Ishizaki, and J. Yamada: Chromosomal assignment of 17 structural genes and 11 related DNA fragments in rats (*Rattus norvegicus*). *Genomics* 12 (4): 659-664, 1992.
 20. Mori, M., Y. Yokota, M. Yasue, T. Serikawa, and J. Yamada: Assignment of the rat genes coding for substance P receptor, substance K receptor and neuropeptide Y receptor to chromosome 4, 20, and 2, respectively. *Cytogenet. Cell Genet.* 60 (3-4): 222-223, 1992.
 21. Mori, M., K. Ishizaki, T. Serikawa, and J. Yamada: Localization of the rat insulin I gene (*INSI*) to chromosome 1q55 by fluorescence *in situ* hybridization. *Cytogenet. Cell Genet.* 59 (1): 31-33, 1992.
 22. Mori, M., K. Ishizaki, T. Serikawa, and J. Yamada: Instability of the minisatellite sequence in the first intron of the rat renin gene and localization of the gene to chromosome 13q13 between *FH* and *PEPC* loci. *J. Hered.* 83 (3): 204-207, 1992.
 23. Mori, M., T. Oda, K. Nishiyama, T. Serikawa, J. Yamada, and A. Ichihara: A single serine: pyruvate aminotransferase gene on rat chromosome 9q34-q36. *Genomics* 13 (3): 686-689, 1992.
 24. Serikawa, T., T. Kuramoto, P. Hilbert, M. Mori, J. Yamada, C. J. Duby, K. Lindpainter, D. Ganten, J. -L. Guenet, G. M. Lathrop, and J. S. Beckmann: Rat gene mapping using PCR-analyzed microsatellite. *Genetics* 131 (3): 703-723, 1992.

＜その他＞

関西実験動物研究会だより

関西実験動物研究会会報 第13号に掲載した第39回研究会以後、以下の研究会が開催された。

1) 第40回研究会及び創立10周年記念大会（平成5年12月11日 於京大会館）

＜会員の研究発表会＞ 14題

＜特別講演＞

「ICH-2における安全性試験およびトキシコキネティックスの動向」

宮脇宏彰（武田薬品工業（株）薬剤安全性研究所）

＜10周年記念講演＞

「関西実験動物研究会10周年によせて」

松本清司（信州実験動物研究会、信州大・医・動物実験施設）

織田銃一（東海実験動物研究会、名古屋大・農）

佐藤勝紀（岡山実験動物研究会、岡山大・農）

「関西実験動物研究会10周年のあゆみ」

山田淳三（京都大・名誉教授）

2) 第41回研究会（平成6年3月4日 於大阪大学医学部）

＜講演会＞

1. 高血圧モデルラット（SHRSP）の病態に及ぼす飼料の影響

大原忠雄（塩野義製薬（株）油日ラボラトリーズ）

2. II型糖尿病モデル動物 Wistar fatty ラットの病態に対する食餌成分の影響

池田 衡（武田薬品工業（株）創薬第二研究所）

3. 糖尿病モデルラット（WBN/Kob）の病態に及ぼす飼料の影響

西村正彦（浜松医科大学医学部附属動物実験施設）

＜維持会員ニュース＞

1. （株）大気社

「エアーカーテン方式によるケージラック」

2. 日本チャールスリバー（株）

「生産業者における品質管理…これからの課題」

総会、評議員会の議事概要

1) 第 11 回総会概要（平成 6 年 3 月 4 日 於 大阪大学医学部）

(1) 役員の異動

評議員の新任に 4 名が推薦され、又 2 名の退任がそれぞれ承認された。

(2) 平成 5 年度事業報告（会誌発行）が行なわれ、承認された。又 山田名誉会員、古河氏より AALAS ツアーに関する報告が行なわれた。

(3) 平成 5 年度決算（10 周年記念大会含む）の報告が行なわれ監事の監査の結果適正であったことが報告され、承認された。尚、第 39 回研究会（平成 5 年 9 月 17 日）の会員外参加費が 2,000 円であったことの理由が補足説明された。

(4) 平成 6 年度事業計画案と維持会員ニュース（今回からの試み）が説明され、承認された。

(5) 平成 6 年度予算案が報告され、承認された。

2) 第 12 回評議員会の概要（平成 6 年 3 月 4 日 於 大阪大学医学部）

1. 出席：阿部、飯田、石川、内海、海野、及川、川俣、黒澤、小嶋、佐藤、志村、芹川、相馬、鳥居、新谷、西宗、古河、増岡、松村、三日月、宮脇、宮嶋、宮脇、森井、森岡、森本、安田、山中、山本、山田（30 名）

2. 議事

(1) 役員の異動

新任：宮脇会長より下記の会員を評議員に推薦したい、との申し出があったことが報告され、承認された。

小泉 勤（福井医科大学医学部附属動物実験施設、助教授）

山本 博（富山医科薬科大学動物実験センター、助教授）

岡本宗裕（大阪大学医学部附属動物実験施設、助手）

前田敏宏（大日本製薬（株））

退任：吉田幸雄、戸田 昇評議員より退任の届け出があり、受理された。

訂正：芹川幹事（庶務）より第 13 号会報の会員名簿に安田正秀、谷村 孝評議員の評議員印（○）の記載もれ及び谷本純一氏の誤記入について、お詫びと訂正があった。

(2) 平成 5 年度事業報告

海野幹事（集会）より平成 5 年度事業報告が行なわれ、承認された。

(3) 機関誌発行報告

宮脇幹事（編集）より第 12 号（平成 5 年 5 月）、第 13 号（平成 5 年 12 月）会報の発行について報告された。

(4) 平成 5 年度決算報告

芹川幹事（庶務）より平成 5 年度収支決算報告及び 10 周年記念大会収支決算報告が行なわれ、又監事より監査の結果適正であったことが報告され、承認された。

(5) 平成 6 年度事業計画案

海野幹事（集会）より第 41 回（3 月総会時）：疾患モデルの病態に及ぼす飼料の影響（3 題）、を含む年 4 回の研究会についての計画案が提出された。

又、維持会員ニュースについても計画案が提出され、それぞれ承認された。

(6) 平成 6 年度予算案

芹川幹事（庶務）より平成 6 年度予算案の説明が行なわれ、承認された。

《会員の移動》

(平成5年11月～平成6年5月)

入会者

榎本 康弘	日本農産工業(株)
石割 秀樹	日本クレア(株)
遠藤 敏	加商(株) ライフサイエンスグループ
大島 洋次郎	武田薬品工業(株)・薬安研
岡田 いすづ	ラボリックサービス(株)
葛岡 勝則	(株)新薬開発研究所・関西事業本部
高橋 明之	(財)たばこ産業弘済会 高槻事業所
曾我 正彦	塩野義製薬(株) 油日ラボラトリーズ
中川 洋子	田辺製薬(株) 安全性研究所
千葉 薫	(財)たばこ産業弘済会 高槻事業所
藤田 和男	(株)大気社
安原 吉高	武田薬品工業(株) 医薬開発本部・薬安研
吉岡 勝	武田薬品工業(株)・薬安研
山本 博	富山医科薬科大学動物実験センター

退会者

石井 純一	
鳶本 薫	東レ(株)安全性研究室
田賀谷 修	エーザイ(株)安全性研究センター
戸田 昇	滋賀医科大学 薬理学的研究室
西端 良治	日本臓器製薬(株)生物活性科学研究所
橋野 秋彦	
樋ノ上 ひろみ	田辺製薬(株) 安全性研究所
山本 保信	小野薬品工業(株)研究推進部
吉田 幸雄	京都府衛生公害研究所
吉村 章子	ラボリック・サービス(株)

《関西実験動物研究会 維持会員》

(五十音順) (平成6年5月現在)

社名	〒	住所
(株) 大塚製薬工場・鳴門研究所	772	徳島県鳴門市撫養町立岩字芥原 115
オリエンタル酵母 (株) 大阪営業所	564	吹田市江坂 1-12-28 大昇ビル
加商 (株)	103	東京都中央区日本橋 2-14-9
鐘紡 (株) 薬品安全性研究所	534	大阪市都島区友淵町 1-5-90
北山ラベス (株)	615	京都市右京区西京極葛野町 28 番地
(株) ケアリー	531	大阪市北区豊崎 4-12-1
(株) ケー・エー・シー	567	摂津市鳥飼本町 5-3-4
参天製薬 (株) 中央研究所	553	大阪市東淀川区下新庄 3-9-19
塩野義製薬 (株) 油日ラボラトリーズ	520-34	滋賀県甲賀郡甲賀町五反田 1405
(株) 実医研	377-09	群馬県吾妻郡吾妻町大字大戸字花立 3303-58
白井松器械 (株)	540	大阪市中央区森ノ宮中央 1-19-16
白銀工業 (株)	547	大阪市平野区加美北 4-6-19
(株) 新薬開発研究所 関西事務所	601-13	京都市伏見区醍醐僧尊坊町 1-47-1
(株) 大気社 大阪支社	530	大阪市北区中之島 3-2-18 住友中之島ビル7F
大日本製薬 (株) 総合研・安全研	564	吹田市江の木町 33-94
武田薬品工業 (株) 研究開発本部技術総務	532	大阪市淀川区十三本町 2-17-85
田辺製薬 (株) 研究統括センター	532	大阪市淀川区加島 3-16-89
(株) 夏目製作所	113	東京都文京区湯島 2-18-6
日本エスエルシー(株)	601	京都市南区上鳥羽塔ノ森東向町 93-8
日本クレア (株)	550	大阪市西区京町堀 1-13-2
日本商事 (株) 医薬研究所	567	茨木市庄 2-24-3
日本新薬 (株) 研究開発室	601	京都市南区吉祥院西ノ庄門口町 14
日本チバガイギー (株) 前臨床研. 薬安研	665	宝塚市美幸町 10-66
日本チャールス・リバー (株)	550	大阪市西区西本町 1-11-7
日本ベーリンガーインゲルハイム (株)	666-01	川西市矢間字高田 103
藤沢薬品工業 (株) 実験 サービスセンター	532	大阪市淀川区加島 2-1-6
扶桑薬品工業 (株) 研究開発 センター	536	大阪市城東区森の宮 2-3-30
(株) 船橋農場 京都営業所	607	京都市山科区御陵鴨戸町 46-6
丸石製薬 (株) 中央研究所	538	大阪市鶴見区今津中 2-2-18
(株) ミドリ十字 安全性研究所	679-22	兵庫県神崎郡福崎町山崎 214-1
(株) 美濃ラボ	503-03	岐阜県海津郡平田町今尾 1195-1
(株) ラビトン研究所	677	兵庫県西脇市中畑町 718

編集後記

保革逆転劇にて自民党一党支配体制が崩れた昨秋には、多くの国民がある期待を抱いたことは記憶に新しい。しかし、新生の連立政権には基盤が堅固になるまでもなく約10ヵ月の短期間で再び、自民党が仇敵であったはずの社会党と組んでこのたび政府与党に返り咲いた。国民には単なる椅子取りゲームに映った政権交代劇であった。

医薬品承認申請資料等のハーモナイゼーションのための日米欧の三極の官民による国際会議(ICH)は2回の会合を終え、「品質」、「安全性」、「有効性」の3部門で逐次ガイドラインが作成合意されるに至り、益々ICHの役割がクローズアップされてきた。次回、横浜会議では非臨床試験実施のタイミングの調和が進められる予定であり、成果は、試験の科学的レベルの向上とともに新薬開発のリスク、コスト、時間の効率に寄与するものと期待されている。

医薬品研究開発の国際競争とは別に、審査行政上の国際協調は、我が国における政権抗争とは違って人類(国民)の健康保持に貢献する目標に向かって着実に成果が示されており、今、日本が求められている市場開放にもいい結果として繋がるものと思われる。

(H. Y記)

平成6年7月25日 印刷
平成6年7月28日 発行

編集兼発行者 宮 嵩 宏 彰
発行所 関西実験動物研究会
〒606 京都市左京区吉田近衛町
京都大学医学部附属動物実験施設
印刷所 関西ナショナル印刷株式会社
〒532 大阪市淀川区十三本町3-4-23