

関西実験動物研究会会報

Kansai Journal of Laboratory Animals

平成7年2月 15号

関西実験動物研究会

Kansai Laboratory Animal Research Association

目 次

講演記録

< 第38回研究会 >

1. HFRS 抗体陽性ラットの摘発事例
芹川忠夫 (京都大学 医学部) ----- 1
2. 腎症候性出血熱について
堂前嘉代子、西宗義武 (大阪大学 微生物病研究所) ----- 4

< 第39回研究会 >

1. 実験動物臨床検査の問題点
米澤秀利 (小野薬品工業 (株)) ----- 7
2. 毒性試験における臨床検査の国際ハーモナイゼーション
野村 護 (第一製薬 (株)) ----- 15

< 第40回研究会 >

- 会員の研究発表 ----- 21

< 第41回研究会 >

1. 脳卒中易発症モデルラット (SHRSP) の病態発現に及ぼす
飼料の影響
大原忠雄 (塩野義製薬 (株)) ----- 37
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)) ----- 43
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) ----- 47

< 第42回研究会 >

1. 実験動物学領域でのカリニ肺炎研究とヒト臨床医学への応用
北田一博 (京都大学 医学部) ----- 54
2. エキノコックスの生物学
ー 包虫症の研究と実験動物の関わり ー
岡本宗裕 (大阪大学 医学部) ----- 74
3. 実験動物と Yersinia
杉山芳宏 (筑波大学 動物実験センター) ----- 87

関西実験動物研究会だより ----- 96

会員の動き ----- 97

「HFRS 抗体陽性ラットの摘発事例」

芹川忠夫（京都大学医学部附属動物実験施設）

京都大学医学部における「HFRS 抗体陽性ラットの摘発事例」については、「実験動物」誌の資料「京都大学医学部におけるラットおよびヒトの腎症候性出血熱ウイルス抗体陽性例の検出とその対策に関する報告」（Exp Anim 42 (4): 665-670, 1993）とアニテックスの特集：腎症候性出血熱（HFRS）、最近の話題「ウイルス抗体陽性事例」（5 (6): 294-298, 1993）において詳細に報告しているので、本稿では、その概要を最初に述べ、その後の様子について書き加えることにする。

1992 年 11 月、ある研究グループが維持していた近交系ラットについて、動物実験施設への導入可否を調べるため微生物学的検査を行った。その結果、腎症候性出血熱の原因であるハンタウイルスに対する高い抗体価が検出された。次いで、医学部内においてラットとヒトの抗体調査（B-1 株による間接蛍光抗体法、大阪大学微生物病研究所、西宗・堂前両先生によって判定）を詳細に行ったところ、複数のコロニーから摘出した 316 匹のラットのうち、29 匹（9%）に高い抗体価が検出され、41 匹（13%）に低い価ながら抗体が検出された。ヒトについても 452 名のうち 5 名（1%）が高い抗体価で、24 名（5%）が低い価ながら抗体が検出された。しかし、幸いにも発病者は見い出されなかった。抗体陽性のラットが見つかった実験コロニーでは、すべての飼育ラットを安楽死処分した後に焼却して、飼育室の消毒、廃棄または更新を行った。ハンタウイルスがどこから侵入したかは、不明であった。しかし、最初に感染ラットが見い出された研究グループから医学部内の他の研究グループにラットが分与されていたケースでは、分与されたその飼育室からもこのウイルス抗体が陽性のラットが検出された。この汚染ルートとは全く関係のない飼育室からも抗体陽性例があった。野鼠の侵入が疑われたコロニー（このコロニーは、消毒した後に使用禁止とした。）もあったが、その関与は明らかではない。抗体陽性のラットが多く検出された実験飼育室から、フロアーは異なるが、同じ建物内のラット繁殖室に汚染が広がったと思われる例があった。これは、空気調和機の異常という背景があったからではないかと推察している。抗体調査の結果を

コロニー単位でみると、陽性コロニーには高い抗体価をもつラットが高頻度に見い出されるものと、散発的に抗体陽性例が見い出されるものとに分けられた。前者では、繁殖がおこなわれているか、または多数のグループによって共同利用されており、後者は繁殖がおこなわれていないコロニーであった。系統維持コロニーへのハンタウイルスの侵入を懸念して、ハンタウイルス抗体が陰性であることを確認した後、複数のアイソレータに一部のラットを避難した。隔離して数カ月後から、再びアイソレータ内のすべてのラットの抗体検査を行ったところ、一部のラットにハンタウイルス抗体の陽性化が観察された。これらは隔離前にこのウイルスに暴露されたものと考えられ、そのアイソレータ内のすべてのラットを安楽死処分した。残ったラット系統については、アイソレータから出すことなく子宮切除術によって無菌動物化した後、バリヤーシステムの飼育室に移し SPF 動物にすることを順次おこなっている。もちろん、この無菌動物と SPF 動物についてはハンタウイルスの抗体検査を行ない陰性であることを確認している。汚染があった動物実験施設のラット飼育実験室は、大きな2部屋からなり、約20年前からベルト式の糞尿運搬装置と、自動給水装置をもつラット自動飼育装置が備えられていた。老朽化していることもあり飼育室をクリーンアップするこの機会に、すべて撤去することにした。消毒処置したこの飼育室は、床、天井を張り替え、間仕切りをして5室の飼育室と2室の実験室に細分して、空気調和機に高性能フィルターを組み込んだ。そして飼育作業からラットへの一方向気流式給排気システムを取り入れた飼育装置を設置した。これは、万が一汚染ラットが侵入することがあってもヒトに伝播する危険を最小限に抑えること、及びラット間に汚染を広げないことをねらいとするものであった。導入動物については、従来通り、SPF ラットに限りハンタウイルスの抗体検査を定期的に提出してもらうことを求めると共に、大阪大学微生物病研究所の西宗教授から B-1 株抗原を分与して頂き、自家検査ができる体制を整えた。

1) 搬入される動物がハンタウイルスフリーであること。2) 飼育環境の微生物学的バリヤーが完全であること。3) 適正な飼育管理の規則があり、これが遵守されていること。以上の3点が満たされていれば、ハンタウイルスが飼育室から再び見い出されることはないはずである。とは言え、微生物的モニタ

リング用に飼育されているラットを用いた3カ月毎の定期抗体検査の結果が出される時に、いつも不安をいただき、陰性であるとの報告を受けてホッとするのが正直な気持ちである。共同利用の動物実験施設を管理する立場は、本当に気が休まらないものである。残念ながら、今回のハンタウイルスの汚染源は、まだ完全には明かにできていない。それゆえ、常に万が一のことを考えておく必要がある。その場合に、第一に優先すべきことはヒトの安全であることは言うまでもない。過去に多数の感染者を出し、特に札幌医科大学における1名の技官が不幸にもこのハンタウイルス感染による腎症候性出血熱で亡くなったこと、当時その施設を管理されていた先生が多数の汚染ラットの処分にあたられ、その先生自身も感染され命を危うくされたことを忘れてはならない。我々がハンタウイルスに対する正しい認識と対処法を獲得するには、ハンタウイルスの生態が早急に明かにされることが是非必要である。

腎症候性出血熱について

堂前 嘉代子 西宗 義武 (阪大 微研)

腎症候性出血熱 (Hemorrhagic Fever with Renal Syndrome HFRS) は、主として野生げっ歯類動物から人の感染発症にいたる人獣共通感染症である。1930年代には、韓国¹⁾、中国北東部、北欧、旧ソ連邦において一地方病としてこの疾病が報告されていたが、1978にLee等によりチョウセンセスジネズミ (*Apodemus agrarius*)からvirus が分離され、その後、世界各地より患者発生、抗体保有動物の存在やvirus 分離が報告されており、しかも宿主動物により virusのtypeが分かれ、人における病態もかなり異なることが明らかにされている。このようにHFRSは全世界的に広く見られる人獣共通感染症である。わが国におけるHFRSの患者発生は1940年代に中国に進出した旧大日本帝国陸軍関係者におけるもの²⁾、1960年代の大阪梅田地区におけるもの³⁾、及び1970年代～80年代にかけて全国動物実験関係者における発症⁴⁾の3度に渡っている。動物実験関係者の発症は1984年を最後に報告はないが、1993年に至り再び実験動物、特にratでのHFRS抗体保有個体の存在が全国の動物実験施設において判明し汚染の疑いのあるratの排除に努力が払われている。

このvirus はブンヤウイルス科 Hantavirus 属に分類され、直径約100nmの球形粒子で、エンベロープを被り、表面に約10nmスパイクを有するRNA型 Virus である。(表1) 従来、人への感染の有無、毒力の強弱、宿主動物、抗原性から4つのSubtype に分類されていたが1992年に新たなtypeとしてスロベニア国でのYellow-necked mouse(*Apodemus flavicollis*)を宿主とするDobrava virus が分離され、バルカン半島地域での重症型HFRS患者から分離されたBelgrade virusと同一の物である事が1993年に明らかとなった。

更に、1993年春にアメリカ西南部、通称Four corner 地方に不明の感染症が発生し、その後この地方に生息する white footed-deer mice (*Peromyscus maniculatus*)を宿主とするHantavirus属のvirus によるものであることが遺伝子解析により明らかとなっている^{6), 7)}これは肺疾患を主とした病状を示すことからPulmonary Hantavirusと命名されており、Prototypeである Hantaan virus によるHFRSの死亡率が10数%であるのと比較して、このvirus によるものは50%を越え従来のものと異なる非常に危険な新たなtypeのvirus である。この様に今後も従来の分類から外れたSubtypeの virus株及びそれらによる疾病が明らかになる可能性がある。

また、わが国においても Hantavirus に対する高抗体価を保有する野生のドブネズミ、クマネズミが確認されており、人への感染が起り得る可能性も考えられ、十分な警戒が必要である。

我々は、実験室環境における rat 間の Hantavirus の伝播様式の解明を目的として、水平感染、垂直感染について種々実験を行ってきたがいずれの場合においても健常 rat 間での virus 感染は証明されなかった。むしろ、感染母獣に哺育された新生仔は感染を防御されることが明らかとなり⁸⁾ また感染 rat との同一ケージ内飼育をした正常 Rat には感染の成立は見られなかった。しかし、1970年代～80年代に起こった感染発症は Hantavirus に感染した rat からのものであり、抗体検査の結果、汚染 Rat の存在した飼育室にいる rat の陽性率が際だって高かったことから現実の動物実験施設内において Rat 間の伝播が起っていたことは明らかである。

最近、再びこの Hantavirus に対する抗体を保有する rat が検出され、その後の検査で多くの動物実験施設に汚染の広まっていることが明らかとなった。この原因については不明であるが、前回の流行時から続いているものか、新たに購入あるいは移入した動物が汚染していたか、或いは、野生動物からの汚染によるものか、等が考えられる。しかし、抗体価は前回の発症時に比べいずれも低値であり、多くは陽性 rat が 1 飼育室に集中したものではなく散発的である。しかし、この抗体保有 rat が virus を排出しない安全な rat であるとの証明もなされていない。

今後、これら低抗体価陽性 rat の virus 感染との関係、特に感染源となり得る危険性の有無について明らかにしていく必要がある。

そこで、本年より再び文部省科学研究総合 (A) の研究班が組織され、Hantavirus に対する低抗体価陽性 rat の virus 汚染との関係を解明すべく、血清学的検査法や、病理学的解析を始めとして PCR 法やその他の分子生物学的手法を駆使した研究が進められている。

表 1 Recognized Hantaviruses

Virus	Disease	Principal Reservoir	Distribution
Hantaan	HFRS*	Striped field mice	Asia
Seoul	HFRS	rats	Cities worldwide
Dobrava	HFRS	yellow-necked mice	Yugoslavia
Puumala	nephropathia epidemica	bank voles	Europe
Prospect Hill	non-described	meadow voles	United States
Thottapalayam	non-described	shrews (sunks)	India
Thailand	non-described	bandicoots	Thailand
Pulmonary hantavirus	Pulmonary HFRS	deer mouse	United States

*HFRS: hemorrhagic fever with renal syndrome

参考文献

- 1, Lee, H. W., Lee, P. W. and K. M. Johnson: Isolation of the etiologic agent of Korean hemorrhagic fever. *J. Infect. Dis.*, 137, 298-308, 1978
- 2, 伊吹 月雄: 流行性出血熱に就いて 陸軍軍医団雑誌 346:361-371 1942
- 3, 田村 雅太: 流行性出血熱、特に大阪市に流行する軽症例について。臨床科学 1:905-909, 1965
- 4, Kawamata, J., Yamanouchi, T., Lee, H. W.: Outbreaks of "epidemic hemorrhagic fever" in animal laboratories in Japan. *Proc. 7th ICLAS Symp., Utrecht*, 235-238, 1979, Gustav Fischer Verlag, Stuttgart, New York, 1980
- 5, Avsic-zupanc T, Xiao S. Y, Stojanovic R., et al. Characterization of Dobrava virus A Hantavirus from Slovenia Yugoslavia. *J. Med. Virol.* 38, 132-137 1992
- 6, James M. Hughes, C. J. Peters, Mitchell L. Cohen, et al: Hantavirus Pulmonary Syndrome: An Emerging Infectious Disease. *Science*: 262, 850-851, 1993
- 7, Stuart T. Nichol, Christina F. Spiropoulou, Sergey Morzunov, et al: Genetic Identification of a Hantavirus Associated with an Outbreak of Acute Respiratory Illness, *Science*: 262, 914-917 1993
- 8, Dohmae, K., Koshimizu, U., Y. Nishimune: In utero and mammary transfer of Hantavirus antibody from dams to infant rats. *Labo. Anim. Sci.* (in press)

実験動物臨床検査の問題点

米澤 秀利

小野薬品工業株式会社

福井安全性研究所

1. はじめに

新医薬品の安全性の評価にあたっては、動物を用いた安全性試験の実施を厚生省の『毒性試験法ガイドライン』に従い、またGLP (Good Laboratory Practice) 規制に従って実施することが義務付けられています。しかし、動物を用いた安全性試験の結果をそのままヒトに外挿することはできません。動物で出現した反応が種特異的なものであるのか、惹起される毒性の用量反応性はどうか、ヒトでの暴露量と動物での毒性発現量との関係は、など種々な要因を考慮して、ヒトでの安全性を予測します。もし、評価を間違えばヒトの臨床において重大な問題が発生する場合もあり、また逆に有益な医薬品の開発をドロップアウトする可能性もあります。

動物を用いた安全性試験においては、臨床検査だけでなく、最終的には病理学的な検査も実施し、これらの結果を総合的に評価することができます。しかし、ヒトでは、簡単に病理学的な検査ができませんので、臨床検査はヒトでの病態を予測する上で重要な指標の一つになると思います。ここで問題となりますのが、動物実験における安全性試験での臨床検査値の変動が、即ちヒトにおける医薬品の副作用としてとらえることができるかということです。臨床検査はもともとヒトの病態を予測する検査として開発されたものであります。しかし、動物における臨床検査値の変動が必ずしも器質的变化を伴わず、どのような病態を反映するか、またヒトと同様な病態を反映するかは疑問であります。

安全性試験における臨床検査の項目は我が国のガイドラインにおいて、血液化学検査では蛋白、アルブミン、A/G比、蛋白分画、ブドウ糖、コレステロール、トリグリセライド、ビリルビン、尿素窒素、クレアチニン、トランスアミナーゼ (GOT/ASAT、GPT/ALAT)、アルカリフォスファターゼ、電解質 (ナトリウム、カリウム、塩素、カルシウム、無機リンなど) が、血液学的検査では赤血球数、白血球数、血色素量、ヘマトクリット、血小板数、血液像 (白血球型別分類)、網赤血球数、プロトロンビン時間、活性化部分トロンボプラスチン時間が、尿検査では

尿量、pH、蛋白、ケトン体、ビリルビン、潜血、沈渣、比重または浸透圧、電解質(ナトリウム、カリウムなど)が推奨されています。

これらの測定項目については、各国での推奨項目が異なるため国際的なハーモニゼーションを実施すべく、International Harmonization of Clinical Pathology Testing (IHCPT)の活動が始まっています。

近年、臨床検査は自動分析機器の普及により一度に多項目の、しかも短時間に測定が簡単に実施できるようになってきている。しかし、臨床検査には正常値、統計処理法、精度管理など、多くの問題点があります。とりわけ動物実験における正常値につきましては、施設間のバラツキが大きく、各施設においてバックグラウンドデータの蓄積が必要とされています。臨床検査値の施設間のバラツキの原因の一つには、測定の表現法に問題があると考えられます。測定の表現法には測定原理あるいは測定試薬に基づく表現、人名に基づく表現、この両者を用いた表現あるいは各国の臨床化学会の提唱する表現など種々であります。次の項の各検査項目の測定法の後の括弧内に示した様に、測定の表現法は同じでも、実際の測定法には種々の方法があります。このため測定の表現法には注意を払う必要があります。また、測定法が同じであっても使用する試薬が異なれば同じ値にならないのは当然のことかもしれません。

2. 臨床検査の動物における測定法と測定上の問題点

血清蛋白については、ビューレット法での測定が主ですが、その他にフェノール試薬法(Folin法、Lowry法)、屈折法、Kjeldahl法などの測定法があります。

アルブミンについては、BCG(6-bromocresol green)法(Rodkey法、Doumasらの改良法)が主な測定法です。BCG法では、動物種によりクエン酸のpHを変える必要があります、呈色1分以上で α -グロブリンが呈色し、プラス誤差を生じると言われています。その他に、HABCA(4-hydroxyazobenzene carboxylic acid)法、BCP(6-bromocresolpurple)法があるが、動物での測定には不適であります^{1), 2), 3)}。

蛋白、アルブミンはイヌにおいて給餌条件により影響を受け、また日内変動がある⁴⁾といわれており、評価には採血時刻を一定にする必要があります。

蛋白分画については、セルロースアセテート膜電気泳動法が主な測定法です。動物種により泳動距離、泳動パターンが異なり、動物での評価は難しいものがあります。また、動物種により緩衝液の種類、濃度、泳動時間、染色液、泳動膜の種類などを検討する必要があります¹⁾。

A/G比については、蛋白量とアルブミン量から計算する方法と蛋白分画から計算する方法があります。しかし、特にラットの場合には、蛋白量とアルブミン量から計算すると蛋白分画から計算するより高値になる傾向があります。

ブドウ糖については、酵素法 (GOD-POD法、HK-G6PD法) が主な測定法です。その他に縮合法としてオルトトルイジンホウ酸 (O-TB) 法、オルトアミノピフェニールホウ酸 (O-AB) 法がありますが、ビリルビンの高い血清ではO-TB法が適しています⁵⁾。測定値は麻酔の深度、摂餌条件により影響され⁵⁾、また血清分離まで長時間放置すると測定値が低下します⁶⁾。

コレステロールは酵素比色法、トリグリセライドは酵素法が主な測定法です。コレステロールの酵素比色法では溶血により正誤差が生じ、またビリルビン、尿酸などの還元物質により影響を受けます。しかし、ラット、イヌではビリルビン、尿酸は低値であり問題とはなりません。トリグリセライドはヘパリン血漿では lipoprotein lipase が活性化され低値を示すことがあります⁷⁾。コレステロール、トリグリセライドなどの脂質は飼料の影響を受け易く、個体差が大きい。脂質の変動については、動物における病態との関連性が明確でない部分もあり、測定意義の検討が必要と考えられます。

ビリルビンについては、ジアゾ法で測定されています。ビリルビンは動物、ラット、イヌでは低値であり、測定意義は少ないと言われています。しかし、肝胆道系の障害の指標としては測定意義はあるかもしれません。

尿素窒素については、酵素法 (ウレアーゼ・インドフェノール法、ウレアーゼ・GLD法) が主な測定法であります。尿素窒素は下痢や嘔吐などによる脱水状態で尿素の再吸収により高値を示すことがあります⁸⁾。重度の腎障害では著明な上昇を示すが、腎毒性の検出には次のクレアチニン (血中及び尿中) と合わせて評価すると比較的感度がよくなると考えられます。

クレアチニンはJaffe反応を用いたアルカリ性ピクリン酸法が主な測定法であります。この測定法では還元物質、セファロスポリン系抗生物質、BSP、ニトロフラン誘導体が測定に影響すると言われています^{5)、9)、10)}。

トランスアミナーゼについては、酵素共役紫外部法 (Karmen法、Henry法、Wroblewski法) が主な測定法であります。トランスアミナーゼは古典的な測定項目であり、評価は比較的高井ものであります。しかし、ラットの長期試験で肝臓などには病理組織学的にはなんら異常所見がみられないのに、高値を示す場合が

あります⁴⁾。このトランスアミナーゼの原因不明の上昇については、採血手技、採血条件などの影響とは考えられず、その原因を究明することは、長期の安全性試験を評価する上で必要があると考えられます。ヒトでは長期間の拘束によりこれら酵素が上昇することが報告¹¹⁾されており、サルでも同様なことが言われています¹²⁾。逆に、トランスアミナーゼなどの酵素活性が低値を示すことを経験します。セファロスポリン系抗生物質の様に低値を示す原因が知られている¹³⁾ものもありますが、多くの場合は原因不明です。トランスアミナーゼは細胞逸脱酵素であり、低下については毒性学的な意義がないと言われていますが、検討を要する事項と考えます。また、血清分離までの放置時間により測定値が影響される^{6), 14)}。

アルカリフォスファターゼはP-ニトロフェニルリン酸法、フェニルリン酸基質法が主な測定法であります。しかし、肝臓の特異酵素ではなく、ラットでは小腸由来のものが主であり、給餌の有無などにより変動します。

ガイドラインの推奨項目ではないが、LDHはピルビン酸を基質とした紫外部測定法、クレアチニンキナーゼは紫外部吸収法が主な測定法であります。これらの項目は、血清を分離するために血液を凝固させる間に血小板からこれらの酵素が遊離し高値を示すため、特に、ラットの場合では血漿でしか測定意義がないと言われています。しかし、血清の分離を工夫すれば、例えば採血後、氷冷下保存30分以内に一度遠心し、血小板を除去し、それから血清を得るというようなことを行えば、血清での評価も可能であると思います。この場合、氷冷による溶血のため血清カリウム値へ影響することを考慮する必要があるかもしれません。LDHなどの酵素活性はシュウ酸塩、EDTAの抗凝固剤により影響されるため、抗凝固剤使用の場合には注意が必要であります。

尿酸については、ウリカーゼによりイヌ、ラットでは尿酸はアラントインにまで分解されるため、動物ではその測定意義は乏しいものであります。

コリンエステラーゼ^{2), 3), 5), 18)}、LAP³⁾は動物種により基質特異性があり、 β -リポ蛋白は動物での測定法に疑問があり、また γ -GTPは動物では肝障害との関連性に乏しく、動物におけるこれらの項目の測定意義は乏しいと考えられます。

血清あるいは尿の電解質については、ナトリウム、カリウムは炎光光度法、イオン電極法が、塩素は電量滴定法が、カルシウムはOCPC法が、無機リンはリンモリブデン酸還元法(Fiske-Subbarow法、Taussky法、Lowry-Lopez法)、リンモリブ

デン酸定量法が主な測定法であります。電解質は血清分離までの時間⁵⁾、溶血などで影響を受けます。

血液学的検査については、赤血球数、白血球数、血小板数は電気抵抗方式、レーザー光散乱方式が、ヘモグロ빈はシアンメトヘモグロ빈法、酸化ヘモグロ빈法が、ヘマトクリットは電気抵抗方式を用いた自動分析機器による測定が主であります。赤血球数、ヘマトクリット、ヘモグロ빈は、イヌではショック、ストレスで増加することが知られており¹⁵⁾、採血時には注意が必要であります。また白血球数は動物の系統、性、年齢、採血部位、飼育状態などにより変動します。血小板については、その機能、数、寿命などが動物とヒトでは異なっています。

血液像（白血球型別分類）は、視算法が主な測定法であります。近年自動分析機器による測定も可能となってきています。イヌではヒトと同様に好中球優位であります。ラット、サルなどの動物の多くはリンパ球優位であり、病態における変動がヒトと異なることがあります。

網赤血球数はニューメチレンブルーによる測定が主であります。血液像（白血球型別分類）と同様に自動分析機器も普及しつつあります。赤血球の寿命は、動物ではヒトに比べ短く、網赤血球数も多いものです。

プロトロンビン時間、活性化部分トロンボプラスチン時間は電気抵抗方式、光散乱方式など、フィブリノーゲンはUV法、粘度追跡法などによる自動分析機器の普及により、データのバラツキは少なくなっています。これらの凝固時間は絶食により延長することが知られています。採血後6～8時間までに測定する必要があり、溶血は変動の原因となるので注意する必要があります。

尿検査については、尿量は一定時間における排泄量で測定されています。尿量は採尿条件などによるバラツキ、個体によるバラツキなどがみられますが、腎毒性の検出には比較的適切な項目であります。

pH、糖、蛋白、比重または浸透圧、ビリルビン、ケトン体、潜血、ウロビリノーゲンについては、ほとんどの施設が試験紙によって測定しています。pH、比重、浸透圧については、それぞれpHメータ、比重計、浸透圧計での測定も行なわれています。イヌの場合には、試験紙による蛋白測定では偽陽性となることがあり、不适当であります¹⁶⁾。また試験紙法では、尿の色調により測定結果が影響を受け易いものです。これらの項目の変動については、安全性試験においては毒性学

的意義が乏しいと考えられます。

沈渣については、ラットの様な小動物では採取できる尿が少なく、少量の尿で検査可能な方法¹⁷⁾もありますが、その検査価値には疑問が残ります。また尿採取後、速やかに処理することが必要であり、大量の動物を使用するラットの安全性試験では検査が難しいのが現状であります。またイヌでは、正常でも白血球、上皮などが出現するため、その検査結果について満足な評価ができないと言う問題があります。

3. まとめ

以上、血液化学的検査、血液検査、尿検査について述べてまいりましたが、前述した項目以外の測定あるいは酵素のアイソザイム分析などが実施されています。ヒトにおいては、臨床検査は病態を把握するための重要な位置付けにあります。近年、検査機器の自動化が進歩、普及したことにより、臨床検査は簡単、迅速に、しかも一度に多項目を測定することができるようになってきています。そのため、動物での医薬品の安全性試験においても、多くの項目が測定される傾向がみられます。しかし、これら自動検査機器、測定試薬はヒトのために開発されたものであり、動物での測定に適しているかは疑問な項目もあります。また、報告されている安全性試験において、臨床検査値の変動は大部分のものが生理的範囲内の変動あるいは毒性学的に意義のない変動と考察されています。測定項目をむやみに増やすことは、評価の精度を上げるよりむしろ評価を煩雑にするだけであると考えられます。単にガイドラインに規定されているから測定したということではなく、科学的根拠に基づいた、安全性を評価できる必要最小限度の測定項目の選択が重要と考える。

4. 参考文献

- 1) 谷本義文(1982): 実験動物の電気泳動法、p7~20、ヘレナ研究所、埼玉(浦和)
- 2) 松本一彦(1985): 初めて実験動物の臨床生化学検査をする人のために、ラボラトリーアニマル、2(4)、26~29
- 3) 松本一彦(1983): 連続講座、医薬品の毒性評価(4)、臨床化学所見の評価、トキシコロジーフォーラム、6(6)、690~699

- 4) 松本一彦(1983): 連続講座、医薬品の毒性評価(4)、臨床化学所見の評価、トキシコロジーフォーラム、6(6)、690~699
- 5) 松本一彦(1981): 臨床生化学検査法、図説動物実験の手技手法(井上正、松本一彦編)、p77~120、共立出版、東京
- 6) 池田茂美子、津田修治(1985): 血液学的検査、臨床生化学的検査、新毒性試験法(白須康彦、吐山豊秋編)、p106~134、リアラリス社、東京
- 7) Whayne, T. F. Jr. and Felts, J. M. (1970): Activation of lipoprotein lipase comparative study of human and animals. Circulation Res., 26, 545~551
- 8) 谷本義文(1984): 血液学的、血清生化学的立場からみた外挿、実験医学をめざす外挿、実験動物からヒトへ(戸部満寿夫、堀内茂友編)、p76~95、清至書院、東京
- 9) 玄番昭夫(1975): クレアチニン、クレアチン、臨床化学検査Ⅱ(石井暢編)、p57~64、医学書院、東京
- 10) 林 康之(1979): 臨床検査成績に影響を及ぼす薬剤一覧、Medicina、16、2021~2029
- 11) 東 純一、瀬戸米蔵、望月則子、丸山一伸、小椋盛孝(1993): 約2週間拘束時の健常人肝機能系検査値の変動とその予測因子の回顧的探求、GOT、GPT、 γ -GTP、LDH、ALP、LAPの変動、臨床薬理、24(2)、385~396
- 12) Robinson, R. F., Gislre, B. D. and Dixon, F. D., Jr. (1964): Factors influencing "normal" S-GOT levels in the rhesus monkey., Lab. Anim. Care、14、275~282
- 13) 谷本義文(1988): 検体の採取・保存・測定、薬物干渉、実験動物の血液・尿生化学、P20~22、ソフトサイエンス社、東京
- 14) 谷本義文(1981): 血清酵素、実験動物の臨床化学、p81~p115、清至書院、東京
- 15) 光岡知足、波岡茂郎、興水馨、前島一淑 編(1990): 獣医学実験動物学、p26~88、川島書店、東京
- 16) 平田真理子、森田晴夫、中西秀樹、谷本義文(1986): 試験紙法によるイヌ尿蛋白測定の問題点、医学のあゆみ、139(2)、129~130

- 17) Hayashi, S. and Sakaguchi, T. (1975): Capillary tube urinalysis for small animals. Lab. Anim.、Science、25(6)、781～782
- 18) 長瀬すみ、田中寿子(1976): 実験的急性肝障害・実験動物の臨床生化学データ、p220～230、ソフトサイエンス社、東京

1993年9月17日

毒性試験における臨床検査の国際ハーモナイゼーション

第一製薬(株)開発研究所

安全性研究センター

野村 護

非臨床安全性試験における臨床化学検査は世界各国でさまざまな手法で評価されている。アメリカの臨床化学会の動物臨床化学部門の提唱で1991年7月にワシントンにおいて第1回目のワークショップが開催された。提案は3部に分かれ世界のガイドラインと実施状況としてHall(Hazleton, Wisconsin)とWaner(LSR Israel)が、科学的な関連についてCarakostas(SKB), Thompson(NIEHS), Riley(Roche), Davis(ICI)が、規制関連としてStonard(ICI), Weissinger(FDA), Irausquin(FDA), Cavagnaro(FDA), Fenner(EPA), Mueller(HW, Canada), Matsuzawa(山之内), Kanno(東京医歯大)らが口演し討議が加えられた。これらの詳細はToxicologic Pathology 20, (3), 1992に掲載されているので参照されたい。

FDAのDr. Irausquinは添加剤のガイドラインとしてのRed Book IIを改訂中であるが医薬品(Red Book I)と歩調を合わせつもりであることを述べた(表1)。毒性スクリーニングに用いられる臨床検査パラメーターに対し、1)これ程大量のデータが安全性評価に必要なのか、2)臨床化学検査値は体重や病理組織検査よりも感度が高いのだろうか。また、体重や組織に変化がみられなければ臨床検査は不要となるのか、3)生物検定はヒストリカルデータと比較してもよいのか、4)毒性機作解明に臨床検査は使えるのか、5)他にもっと感度のよい検査項目はないのか、6)臨床検査で有害作用検出のために高用量群は10匹でよいのかなど現状の問題点を挙げ、アメリカでしばしば使われている組織障害の指示酵素であるornitine decarboxylaseよりもornitine carbamyl transferaseの方が感度の良いことを述べた。

一方、NIEHSのDr. Thompsonは、NTPの臨床病理について触れ、投与期間は14日間、13週間、2年間としている理由として14日間は13週間の用量設定根拠に、また毒性の検出力は13週間が一番高く、2年間では加齢性変化が起き、特に腎病変、白血病、自然発生腫瘍、偶発性病変のため毒性評価が難しくなることを指摘した。必須検査項目として表2の項目を挙げた。他の検査として1)骨髄の細胞数と分類、2)各組織のコリンエステラーゼ活性を挙げ、尿検査では16時間尿を集め、比重、尿量、色調、尿沈渣が必要であり、尿試験紙の検査は不要とした。13週間試験での検査条件として表3の内容を提示した。

HazletonのDr. HallはFDAのRed Book, EPAのFIFRA, TSCA, OECD, MOHW(厚生省ガイドライン), MAFF(農水省ガイドライン)を比較し、厚生省ガイドラインの項目は多過ぎると指摘した。しかし、世界各国でそれ程の相違はないと結論された。

これらの討議を踏まえ、新たに提案された検査法を表4に示す、げっ歯類においても途中採血と眼窩静脈叢採血が含まれ日本の実情と隔差がみられる。これらの検査項目を厚生省ガイドラインと比較したものを表5に示す。血液検査では自動分析装置が採用されており、MCV, MCH, MCHCなどの演算値は自動的に算出されている。血液生化学でのsorbitol

dehydrogenase(SDH), total bile acid(TBA), γ -glutamic transpeptidase(GGT), 5'-nucleotidase(5Nase)などは、むしろ日本での測定実績に乏しく他の検査でフォローされているとみなされる。したがって、厚生省ガイドラインに従った検査であればIHCPTの推奨と大きな差はないと考えられる。しかし、厚生省ガイドラインにあるように「ガイドラインは標準的な実施方法を示し、医薬品の安全性の適正な評価に資することを目的とする。しかし、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、試験の進展に応じた新たな実験を追加する必要があることも少なくない。」と言及されているように、毒性試験は適性な方法で評価することが肝要と考えられる。

その後、1992年9月にイタリアのパルマ、1993年4月にイギリスのノッチングムで検討が加えられ最終的な推奨がされる予定である。IHCPTへの参加団体は、日本以外全て学会の代表が討議に加わっている。日本も日本製薬工業協会(JPMA)以外に、基盤となる学術団体が参画することが望まれる。

一方、ICHによって生殖試験の世界的な歩み寄りによる共通的なガイドライン策定が検討され、使用動物数の削減が唱えられている。その反面、新たにICHで討議されているトキシコキネティクスガイドライン案では各種毒性試験における留意事項として、サテライト群を設置する毒性試験案が提示されているが、世界的な動物愛護の面からみて、むしろ退行している気がする。今後、ICHで検討されているTKのガイドラインの進展に注目する必要があるだろう。

表 1 .—Guidelines in Redbook I.

Ophthalmology
Hematology
Hematocrit
Hemoglobin
Erythrocyte count
Total and differential white blood cell count
Clotting potential
Clinical chemistry
Calcium
Inorganic phosphate
Chloride
Sodium
Potassium
Urea nitrogen
Creatinine
Total bilirubin
Fasting glucose
Alanine aminotransferase
Aspartate aminotransferase
Ornithine decarboxylase
Gamma-glutamyl transpeptidase
Albumin
Total serum protein
Optional clinical chemistry
Lipids
Hormones
Acid/base balance
Methemoglobin
Cholinesterase
Urinalysis
Volume
Appearance
Specific gravity
Sediment
Crystalluria
Uroginogen
Glucose
Occult blood
Protein
pH
Ketones

NTP AND CLINICAL PATHOLOGY

表 2 .—Clinical pathology variables in core.

Clinical chemistry
Alanine aminotransferase
Sorbitol dehydrogenase
Alkaline phosphatase
Total bile acids
Urea nitrogen
Creatinine
Total protein
Albumin
Creatine kinase
Hematology
Automated analysis
Erythrocyte count
Leukocyte count
Platelet count
Hemoglobin concentration
Hematocrit
Mean corpuscular hemoglobin
Mean corpuscular volume
Mean corpuscular hemoglobin concentration
Leukocyte differential and morphologic evaluation of blood cells
Manual microhematocrit
Reticulocyte count

表 3 .—Features of clinical pathology investigations in 13-wk studies.

Animals
Fischer-344 rats, male and female
Time-points
4 ± 1 day—special study rats
21 ± 2 days—special study rats
Study termination (~90 days)—basic study rats
Sample collection
Time—3 hr time period in morning
Random collection
All rats of same sex on same day
Animal nutritional status—fed (nonfasted)
Anesthetic—70% CO ₂ ; 30% O ₂
Bleeding site—retroorbital sinus
Sample analysis
Day of collection with some time restrictions
Data reporting
Unaudited results within 7 days

THOMPSON

表 4. Clinical Pathology Testing in
Nonclinical Safety Studies

Blood Sampling	
1) 絶食	: 12-18時間
2) ランダム化	: 採血・分析とも
3) 個別測定	: プールしない
4) 事前検査	: 非ゲッ歯類のみ
5) 検査回数	: 2回(2-4W), 3回(13W), 4回(26W以上),
6) 採血部位	: 眼窩静脈叢, 静脈穿刺(凝固系)
Hematology	
1) Core Test	: WBC, DIFF, RBC, PLT, HGB, HCT MCV, MCH, MCHC, PT, APTT
2) Option	: RET, Bone marrow
Blood Chemistry	
1) Core Test	: GLU, UN, CRE, TP, ALB, GLB, Ca, IP Na, K, Cl, TCHO
2) Option	: AST (GOT), ALT (GPT), SDH, TBA, ALP, GGT, 5-Nase,(CPK, LDH, ODC, OCT, Protein fraction)
Urinalysis	
1) Core Test	: Urine Vol., SG/Osmo
2) Option	: ((Dipstick Test, Sediment, Electrolyte)

< 第40回研究会 >

会員の研究発表

日時：平成5年12月11日（土）

場所：京大会館

1. 体毛ずい質の電顕観察に基づくヒヒ連サル的位置づけの試み
2. 実験用ビーグル犬に見られた腎性骨異栄養症の一例
3. ホームケージによる自発運動測定法とその応用
4. ラット静脈内注射用装置の考案
5. シークエンス特異 PCR プライマーの単独利用による新しい DNA マーカーの開発
6. SAMP8/Ta マウスに発現した貧毛ミュータントについて
7. フィリピンにおけるカニクイザルの繁殖
8. ラットの胎子成長に与える母親ラットの影響
9. 病態動物の近交系での Vitrification 法による保存 — SHR・SP ラットの過排卵, 体外受精および凍結保存法の検討 —
10. ネコ繁殖コロニーにおけるコロナウィルス感染について
11. 腫瘍細胞株の汚染状況
12. 腎症候性出血熱 (HFRS) の伝播 — Rowett 系 Nude Rat について —
13. SER 系統のてんかん様発作非発症型における Phenobarbital 誘起心室中隔欠損の低発現率について
14. 3-acetylpyridine 投与ラットにおける行動発達の遅滞



関西実験動物研究会
創立 10 周年記念大会（第 40 回研究会）にて
平成 5 年 12 月 11 日

1

体毛ずい質の電顕観察に基づくヒヒ連ザルの位置づけの試み

稲垣晴久・山下武夫（シオノギ油日ラボ）

【はじめに】

オナガザル亜科・ヒヒ連のサル類は一般に、ヒヒ類3属（ヒヒ属、ゲラダヒヒ属、マンドリル属）、マカク属、マンガベイ属の5属に分類される。それらの系統関係についてはさまざまな角度から研究されているが、マカク属サルを除きサル間の位置づけには相違が認められる。本研究では、分類に一致して差異が見られることがあり、毛を特定する上で有力な情報になるとされている体毛のずい質の構造に焦点を当て、その電顕像を基に議論のあるヒヒ連ザルの系統関係について考察した。

【材料と方法】

ヒヒ連に分類されるサル類のうち、ヒヒ属3種（マントヒヒ、ギニアヒヒ、ドグエラヒヒ）、ゲラダヒヒ属1種、マンドリル属2種（マンドリル、ドリル）、マカク属2種（ニホンザル、アカゲザル）、マンガベイ属4種（シロエリマンガベイ、シロカンムリマンガベイ、ゴールデンマンガベイ、ブラックマンガベイ）の計5属12種の体毛を使用した。検査に供した毛は、ケタラール麻酔下で動物の背部から引き抜くことによって得た。ただ、シロカンムリマンガベイを除く3種のマンガベイについてはその機会がなく、それぞれの飼育ケージ内で採取した。それらの毛は中央部をカミソリで斜断、もしくは、セルロイド板に包埋後、ミクロトームで縦断してずい質を露出させ、走査型電子顕微鏡で観察した。

【結果および考察】

大きくわけて2つの異なる構造のずい質、①厚く空隙に乏しい壁と、比較的大きさの揃った縦長の腔とが交互に配列する梯子様、②空隙のある壁で囲まれた、大きさも形も様々な腔から成るスポンジ様、が認められた。前者はマンドリル、ドリル、シロエリマンガベイ、シロカンムリマンガベイの毛で、後者はヒヒ属サル、マカク属サル、ゲラダヒヒ、ゴールデンマンガベイ、ブラックマンガベイの毛で見られた。ヒヒ類3属の系統関係については、ヒヒ属と他2属との近縁性が議論のわかれるところである。今回観察したヒヒ類3属の中で、マンドリル属のずい質が他2属と異なる形態をしていたことは、前者は後2属と遠縁であるとするタンパク分子研究の成果を支持するものと考えられた。また、今日マンガベイ属はシロエリマンガベイ群とホオジロマンガベイ群の2つのグループ（もしくは2属）にわけられることが多いが、今回おこなった電顕観察でもその分類に一致した形で異なるずい質像が認められ、マンガベイ属を2分する見解は支持されたと思われる。さらに興味深いことに、マンドリル属とマンガベイ属・シロエリマンガベイ群サルは属を越えて類似した構造のずい質を持ち、両者が近縁であることの可能性が示唆された。同様の結果はタンパク分子研究においても得られており、ヒヒ連内属間関係を検討する上で参考になる知見だと考えられた。

2 実験用ビーグル犬に見られた腎性骨異栄養症の一例

鈴木淳也、松本正博、義澤克彦、中野一雄、福原良文（藤沢薬品工業・安研）

当研究所において、無処置対照として観察中の10ヵ月齢（46週齢）ビーグル犬♂が急激な全身状態の悪化を呈したため屠殺剖検した。その症例について臨床検査値を含め、病理組織学的、電顕的検索の結果について報告する。

本症例は40週齢時の検査により無機リンとBUNが高値を示し、以後暫増し、屠殺直前（46週齢）には、無機リン（22.6mg/dl）、BUN（208mg/dl）に達していた。また、カルシウムは40週齢時は10.6mg/dl、42週齢時は11.4mg/dlと上昇傾向を示していた。〔正常値：Ca 10.0-11.6mg/dl、無機リン 5.1-8.0mg/dl、BUN 8.0-22.0mg/dl〕しかし、一般状態、摂餌量、体重は屠殺直前まで、特に変化は認められなかった。検索方法としては、剖検により全身諸臓器の肉眼的観察を行い、常法に従ってホルマリンにて固定後、H.E（ヘマトキシリン・エオジン）染色により病理組織学的検索を実施した。また、併せて腎臓、肺については電子顕微鏡による検索を行った。

肉眼的観察においては、両側の腎臓は白色を呈し、硬度を増し、上皮小体は両側とも腫大していた。また、心臓、腎臓、脳に白色点が多数見られた。更に、全身にわたって骨の脆弱化を認め、特に上顎骨が顕著であった。

光顕所見では、腎臓は慢性間質性腎炎の像を呈し、リンパ球・形質細胞を主体とする細胞浸潤と間質の著しい線維化が、また上皮小体では主細胞の過形成が両側性に見られた。全身各部の骨には著しい骨吸収と線維化を、心臓、肺、腎臓、胃、脳などの全身諸臓器には石灰沈着を認めた。腎臓および肺の電顕所見では、腎臓は尿細管上皮のミトコンドリアに、肺は毛細血管基底膜にそれぞれ石灰沈着を認めた。以上より、本症例を腎疾患に伴って起こる代謝性骨疾患である腎性骨異栄養症と診断した。

○河谷善則¹⁾、藤淳一郎¹⁾、木梨英一²⁾、大島洋次郎¹⁾

(武田薬品、薬剤安全性研究所・光支所¹⁾、研究システム部²⁾)

実験用小動物の自発運動量の測定には、アニメックス、オープンフィールドあるいは回転ケージなどを用いた方法があり、いずれの装置も広く用いられている。しかし、これらの装置を用いた場合、動物は飼育環境と異なった状況下にさらされ、その動物の本来の行動をとらえ難い。我々はホームケージで24時間の運動量を測定する装置を用い、若干の成績が得られたので報告する。

本装置は、ホームケージの中央に光センサーをセットし、ケージ内でセンサーを遮断した回数を1時間毎に記録する。照明は 7:00 ~ 19:00 点灯とし、固型飼料及び水道水を自由に摂取させた。

4 ~ 8 週齢の無処置Jcl:Wistarラットを用いて、成長過程での行動変化を観察した。その結果、2 相性の行動を示し、点灯前及び消灯後にピークがあった。また、明期・暗期の行動量の比及び行動量の日内リズムも安定していた。更に、6 週齢のラットを用いて動物室を消灯し24時間暗期状態で測定した結果、1 日に約30分のリズムの遅れが生じ体内時計を反映していた。

一方、レチノイン酸の 10 mg/kg/日をJcl:SDラットに妊娠14日から16日までの3日間経口投与し、その出生児の自発運動を測定した結果、明期の行動量には変化はなかったが、暗期、特に、点灯前及び消灯後のピーク時に行動量の減少がみられた。

以上の様にラットの自発運動量については、ホームケージ内での24時間の行動パターンを含めた評価が必要であると考えられる。

○谷村勇治、高村等、大島洋次郎

(武田薬品、薬剤安全性研究所、光支所)

毒性試験は臨床での使用経路に準じ種々の投与経路により行われている。これら投与経路のうち、ラットを用いた静脈内注射は高度な技術を要する方法の一つである。また、毒性試験ではより高用量の投薬を必要とすることから、静脈内注射では投与液量が多く、一匹当たりの投与時間が長くなること、更に、一群当たりの匹数が多いことから、投与者の人数も必要であり、かつ、長時間の作業が要求される。そこで、我々は、インフュージョンポンプを用い、簡便で、複数のラットに並行して投与することが可能な装置を考案したので報告する。

本装置は、シリコンゴムを用いた尾保持装置とそれを水平に保つ支持体からなる尾保定器及びシリンジを応用した静脈内刺針確認装置で構成される。尾保持装置は、シリコン製のゴム管の一端約30mmにスリットをいれ、それに続く残りの部分のゴム管の上部を開放にしたものであり、まず、スリット部分でラットの尾根部を固定する。次いで、尾静脈に注射針を刺入し、上部を開放した部分で尾を包みこむ様に保持する。尾保持装置は支持体に固定して尾を水平に保つ。尾保持装置はシリコンゴム製なので尾を圧迫することなく、ラットが尾を動かした場合もその動きはこの保持装置が吸収し投与中に注射針が抜けることはない。注入開始時には確認装置を用い静脈内に注射針が刺入されていることを確認することができ、かつ投与中に静脈外に洩れが生じた場合にも確認することができる。また、薬液注入中担当者はそのラットへの操作は不要なため、同時に別のラットの投与を行うことが可能である。

当研究所では、本装置を用い、インフュージョンポンプを使用して一名の担当者が複数のラットに並行して投与しており、省力化に貢献している。

シーケンス特異PCRプライマーの単独 利用による新しいDNAマーカーの開発

真下知士、庫本高志、芹川忠夫 (京大・医・動物実験施設)

マウス、ラット等の遺伝マーカーの一つに 10 mer のオリゴヌクレオチドを PCR プライマーに用いて検出する RAPDs (Random Amplified Polymorphic DNAs) マーカーが報告されている。今回、我々は 10 mer のオリゴヌクレオチドの代わりに、ラットのマイクロサテライトあるいはマウスの癌遺伝子領域を増幅するために準備された約 20 mer のプライマーセットの片方のみを用いて、新たな DNA マーカーがラットにおいて開発できるか否かについて検討した。〈材料と方法〉 36 個のプライマーに関して検討した。テンプレートにはラットの近交系 8 系統を用いて多型検索を行ない、Chromosomal Assignment には、ラット×マウス体細胞交雑クローンを用いた。プライマーの濃度は 2 μ M とした。G+C の含有率が 50% 以上のプライマーを用いる場合にはアニーリング温度を 50℃として、50% 未満の場合には 45℃とした。PCR は、(94℃ - 30 秒、50℃ 又は 45℃ - 1 分、72℃ - 2 分) の 7 回に続いて (94℃ - 30 秒、60℃ - 1 分、72℃ - 2 分) の 28 回からなるプログラムで行なった。得られた PCR 産物は、1.4% のアガロースゲルを用いる電気泳動によって解析した。〈結果〉 検索した 36 個のプライマーにより増幅された PCR 産物のうち、体細胞交雑クローンパネルにより特定の染色体にあてはめられたものが 10 遺伝子座、8 近交系間で多型が検出されたものが 5 遺伝子座あり、そのうち 3 遺伝子座が連鎖地図上にマッピングされた。これらの遺伝子座はすべてプライマーのシーケンス特異性に依存しなかった。本法は、既存のプライマーを用いて新たな DNA マーカーを比較的容易に開発できる点ですぐれた方法であると評価できる。

Table List of Polymorphic Products in Various Strains of Rats

Primer name	Locus name	Size (bp)	Positive strains	Negative strains	Mapping panel
FGR-A	D20KY02	0.62	All strains examined		Hybrid cell lines
R6-A	DYKY01	0.15	All strains examined		Hybrid cell lines
R6-B	D9KY05	0.28	All strains examined		Hybrid cell lines
R6-B	D15KY02	0.20	All strains examined		Hybrid cell lines
R7-A	D0KY05	0.40	ACI, F344, SHR	BN, IS, TM, WTC, ZI	(ACI x WTC)F1 x WTC
R10-B	D5KY03	0.55	ACI, BN, IS, WTC, ZI	F344, SHR, TM	(ACI x F344)F1 x F344
R10-B	D12KY01	0.70	All strains examined		Hybrid cell lines
R10-B	D0KY04	0.32	ACI, BN, F344, IS, SHR, TM, WTC	ZI	(ZI x TM)F1 x ZI
R23-A	D1KY02	0.82	ACI, BN, F344, TM, ZI	IS, SHR, WTC	(ACI x WTC)F1 x WTC
R25-B	D11KY01	0.61	All strains examined		Hybrid cell lines
R29-A	D3KY06	1.10	All strains examined		Hybrid cell lines
R47-A	D1KY03	0.51	All strains examined		Hybrid cell lines
R159-A	D4KY03	0.45	All strains examined		Hybrid cell lines
R159-A	D19KY02	0.50	BN, F344, SHR, TM, ZI	ACI, IS, WTC	(SHR x WTC)F1 x WTC
R159-B	D3KY07	0.48	All strains examined		Hybrid cell lines

PCR の温度条件については、国立がんセンター研究所 長尾美奈子研究室の方々に多くのご教示を頂きました。ここに深く感謝致します。

6

SAMP8/Taマウスに発現した貧毛ミュータントについて

○大森吉明、細野和裕、嶋川幸三、阿部敏男（武田薬品・実験動物管理室）

老化促進モデルマウスのSAMP8/Taに発現した貧毛ミュータントについて、本系統の特性である学習・記憶障害の検査、病理組織学的検査および遺伝的解析を行った。

【発見経緯】本例は生産コロニーの雄1匹に見いだされ、被毛密度が粗の特徴を示した。この貧毛個体と正常被毛（以下正常）を示す同コロニーの雌を交配させたところ、生まれた仔の約半数が貧毛を示し、さらに貧毛どうしの交配で、一見したところ無毛（以下無毛）の個体も発現した。

【臨床所見】貧毛個体は10日齢頃に識別され、全身の被毛は密度が粗で伸長するが軽度縮れて細く、以降もこの状態で経過した。無毛個体は10日齢頃に識別され、微細な短毛がまばらに生えるのみで、滑らかな皮膚が露出し、以降もこの状態で経過した。4～18週齢における体重増加は貧毛、無毛および正常個体で有意差を示さなかった。

【学習・記憶障害の検査】0.4mAのfoot shockを条件付けとした受動的回避反応学習では貧毛、無毛および正常個体の学習・記憶障害は同程度であった。

【剖検】貧毛および無毛個体では全身性の上記皮膚変化を除き異常はなかった。

【病理組織学的検査】5週齢の雌雄の背部皮膚および胸腺について検査した。雌雄ともに無毛個体では毛包の拡張、毛包内の変性角質様物質および毛質の角化不全などの毛質形成異常が認められた。貧毛個体では上記所見が極軽度に認められた。胸腺についてはいずれも異常は認められなかった。

【遺伝解析】SAMP8/Taどうしを交配させ、F1からF5の仔について観察した。雌雄ともに貧毛どうしの交配では正常：貧毛：無毛＝1：2：1、無毛と貧毛の交配では貧毛：無毛＝1：1に分離し、無毛どうしの交配では全例が無毛を示した。また、ICR/Taマウスと貧毛との交雑では正常：貧毛＝1：1に分離し、無毛との交雑では全例が貧毛を示した。

以上の結果から、SAMP8/Taマウスに発現したミュータントは毛包の形成不全および毛質の形成異常を示し、被毛異常の形質は常染色体上の単一不完全優性遺伝子により支配されていると推定される。また、貧毛個体の遺伝子型はヘテロ接合体であり、無毛個体はホモ接合体であると考えられる。

7 フィリピンにおけるカニクイザルの繁殖

遠藤 敏、市川 一 (加商ライフサイエンス) R. R. G. Resuello, J. B. Nazareno (Siconbrec)

数年来、野生動物保護の観点から、また様々な動物愛護活動から、実験用霊長類についても繁殖・育成された動物を使用するということに、関心が高まっている。そこで今回は、世界で最大規模のカニクイザル繁殖施設をもつフィリピンのSiconbrec, Inc.の現状について報告すると共に、そこで繁殖・育成されたカニクイザルの品質について、B virus抗体の保有状況および血液像から、評価・検討を行った。

B virus抗体の検出にはDIA dot - B virus (*Herpesvirus simiae*), (Viratest International, Inc.)を用いた。3歳齢以下の3, 521頭の検査例のうち、陽性例は15であった。野生捕獲猿373例についても、同様の検査を行ったところ、陽性例は335であった。繁殖猿において陽性率がここまで低く抑えられているのは、適切な離乳時期の設定とSiconbrec, Inc.の品質管理体制が反映されたものと思われた。

血液像の評価に際しては、日本国内において屋内で繁殖・育成されたカニクイザルのデータとの比較を行った(下表)。Siconbrec, Inc.の動物のデータは、日本国内へ同時に輸入された40頭(雌雄各20頭)を、約6カ月間飼育したのち検査して得られたものであり、検査時の年齢は雌雄ともに約3歳5カ月齢であった。SD値から判断すると、日本国内で繁殖・育成されたものと、Siconbrec, Inc.の動物の値の間には明確な差異は認められなかった。

育成カニクイザルの血液像 (3~4歳齢、N=20)

		RBC ($\times 10^4/\mu l$)	WBC ($\times 10^3/\mu l$)	Hb (g/dl)	PCV (%)
Siconbrec, Inc.					
オス	平均値	620	12.5	12.0	41.6
	$\pm$ SD	52	3.5	0.9	2.9
メス	平均値	624	11.3	12.2	42.5
	$\pm$ SD	36	2.9	0.6	1.9
TPC (*)					
オス	平均値	599	12.2	12.3	43.7
	$\pm$ SD	61	2.1	1.0	3.2
メス	平均値	595	11.4	11.6	42.5
	$\pm$ SD	74	3.1	0.9	3.1

*: Honjo, S *et al.*: Normal Hematologic Values in the Cynomolgus Monkeys

Aged from 1 to 18 years. *Exp. Anim.* 35(4), 443-447, 1986

○森岡宏至・江崎孝三郎（大阪府大・農・実験動物）

出生時の新生子体重やその後の成長は、胚ならびに胎子が暴露される母体の子宮内環境に影響されることがマウスなどの胚相互移植法によって調べられ、母親の遺伝的要因の重要性が指摘されている。しかし、この点に関するラットの研究は極めて少ない。本研究はラットでの胚相互移植法によるこれらの研究に先立ち、成体重の異なるラットを用い、同系統および異系統間交配後の胚発育、胎子成長などの特性を調べ、胚移植に際して資する知見を得ることを目的とする。

先に、妊娠期間と体重の異なる Dark Agouti (DA) ラットと Sprague-Dawley (SD) ラットの同系統ならびに異系統間交配後の胚発育度、着床時間および妊娠10日の受胎物重量などについて報告した。今回は、妊娠15日と18日の胎子成長について調べたので先の妊娠10日の受胎物重量ならびに1日齢の新生子体重と併せて報告する。

〔方法〕使用動物はDAとSDラットで、ラットは午前5時点灯、午後7時消灯の14時間明時、10時間暗時の照明下で飼育した。交配組合せは、DA♀×DA♂(DA)、DA♀×SD♂(DS)、SD♀×SD♂(SD)、SD♀×DA♂(SA)の4群を設け、発情前期に交配させ、翌日の精子確認日を妊娠第1日とした。動物は妊娠15日および18日にエーテル過剰麻酔にてと殺し、胎子の頭胴長(Crown-rump length)体重および胎盤重量を測定した。なお、左右の子宮角に胎子数が2個以下の場合は計測より除外した。

〔結果〕 1) 先の結果で、DA、DS、SD、SAの妊娠期間はそれぞれ22日、22日、23日、22日であった。2) 妊娠10日、15日、18日の平均黄体数はDA母体群(DAとDS)では9.7~10.3個、SD母体群(SDとSA)では12.3~13.3個、平均受胎数はDA母体群では6.9~9.6個、SD母体群では9.0~11.4個で、黄体数と受胎率において、両群間に有意差が見られた。3) 妊娠10日から18日までの受胎数の減少率は17~21%、また黄体数当たりの妊娠18日までの減少率は22~33%で、4群間に差はなかった。4) 妊娠15日：胎子サイズはDA、DS、SD間には差がなく、SAは他の3群よりも有意に大きかった。胎子重量はDAよりDSの方が重い傾向を示し、SDよりSAの方が有意に重かった。DAとSD間およびDSとSA間には差がなかった。胎盤重量は胎子サイズと同様の傾向を示した。4) 妊娠18日：胎子サイズはDAよりDS、SDよりSAの方が有意に大きく、DAとSD間、DSとSA間には差はなかった。胎子重量は、DAよりDS、SDよりSAの方が有意に重く、またSDはDAより有意に重くなった。DSとSD間には差はなかった。胎盤重量はSAが他の交配群よりも重く、SDはDAとDSより重かったが、DAとDS間には差はなかった。

〔考察〕以上と先の結果から、交雑群の胎子成長と1日齢の体重が有意であったことは、ヘテロシス効果による胎子成長の促進を示唆し、胎子成長は子宮内環境の物理的な狭さによってのみ抑制されないことを示唆する。また、妊娠期間との関係から、DAとSDでは胎子成長に対する母体の調節機構に差異があり、その差異が妊娠期間に関与する可能性が推察された。

以上、invivoでの結果は、胚の交換移植法により母体の遺伝的要因を追求するに当たり、胚移植に際して考慮すべき知見を提供するものと考ええる。

9

病態動物の近交系でのVitrification法による保存

— SHR・SPラットの過排卵, 体外受精および凍結保存法の検討 —

○ 椋本末男、森 桂子、石川 尚明（藤沢薬品 開発第一研）

病態動物を近交系の受精卵として凍結保存することは、新生仔の発生率を考えると非常に困難なことである。我々は、幼若ラットの過排卵, 体外受精により効率的に受精卵が得られることを報告しており、今回は、同一両親による1産目の雄(12週齢以上)と2産目の雌(4週齢)との兄妹による体外受精を前提に、当該動物での関連技術の予備検討を行った。

動物はSHR・SPラットで雌は8～13週齢, 雄は8～19週齢の動物を使用し, 雌の過排卵処置に対する感受性をみると共に, 雄の週齢による受精能の検討を行った。PMSG/hCGの150/75 iu/kg BW投与(i.p.- i.p.)による過排卵誘起処置後, 自然交配し採卵したもの, あるいは採卵後体外受精したものの受精能を検討し, 得られた受精卵をDAP 213凍結保存液を用いてVitrification法により凍結保存した。この保存卵を凍結・融解し, in vitroでの2-cell胚への発生能を調べると共に, 一部をレシピエントの卵管に移植して新生仔への発生を検討した。

過排卵処置による排卵数(例数=9)は, 平均43.4個, 正常卵率98.2%, 体外受精率は13, 14週齢の雄を使用した場合には97.5%と自然交配の受精率(94.4%)とほとんど差を認めなかった。

凍結保存卵180個を凍結融解し, 回収率96.1%, 生存卵率90.0%, 正常卵率88.3%で, その内99個を卵管移植し, 残り57個を培養した結果, 78.9%が2-cell胚へ発生した。

新生仔への発生は, 17匹(17.2%)と低かったが, 今回は前核形成卵での凍結・融解・移植であり, 2-cell胚を使うことにより発生率を上げることは可能と思われる。

しかし, 一般に成熟ラットの過排卵, 体外受精は幼若ラットに比べて容易ではないと言われており, 幼若ラットでは更に成績が上回ると予測されるので, 今回の成績から充分, 幼若SHR・SPラットを用いての近交系でのVitrification法による保存が可能であると考えられる。

平沢 勉、大原眞代子、余野清香、三日月勝見、神田政典、神田 恵、
中尾博之（シオノギ油日・実験動物研究センター）

ネコ伝染性腹膜炎(Feline infectious peritonitis:FIP)はコロナウイルス感染によるネコのウイルス性疾患である。現在のところ有効な治療法、予防法はなく、発症したネコのほとんどが死亡する。病原はコロナウイルス属のネコ伝染性腹膜炎ウイルス(Feline infectious peritonitis virus:FIPV)である。ネコのコロナウイルスとしてはこのほかにFeline enteric coronavirus(FECV)が知られている。両ウイルスは極めて近縁であるが、FECVは病原性が弱く感染したネコがFIPに至ることはないと考えられている。演者らの施設の繁殖コロニーでは、1991年以降FIPを疑われる症状を呈したネコ3匹の死亡が認められている。このため、コロニーにおけるコロナウイルスの感染状況を把握する目的で抗体調査を実施した。

材料および方法：ネコの自家繁殖を本格的に開始したのが1986年であるため、1985年までの検体は外部からの導入ネコのもののみである。また、これ以降の検体は繁殖ネコおよび導入ネコの両者に由来している。特にことわりのない限り、導入ネコの検体は導入後6週間以上飼育された個体のものに限定した。抗体の検出は間接蛍光抗体法によった。FIPV-URI株感染CRFK細胞をアセトン処理したものを抗原として用い、検体(ネコ血清)、FITC標識抗ネコIgGの順に反応の後、蛍光顕微鏡で観察した。バックグラウンドが高く判定の困難な検体についてはCRFK細胞のアセトン処理パウダーで吸収の後、再度試験した。

結果および考察：導入ネコは1984、1985、1988、1989、1992および1993年の検体について、また、繁殖ネコは1988～1990、1992および1993年の検体について調べた。ネコの由来、採血時期にかかわらず抗体陽性率は極めて高かった。つぎに長期間飼育されている抗体陽性のネコについて1988～1993年にかけて複数回検査した結果、抗体価にほとんど変動は認められなかった。1988～1993年の間に導入されたネコの一部について導入直後に検査し、陰性例については一定期間(9ヵ月以上)飼育後再び調べたところ、全例が陽転していた。さらに、仔ネコ4匹について抗体価の推移を追ったところ、8～10週齢時に全例抗体価が上昇した。内1例は6.5ヵ月齢時にFIPを疑われる症状を呈し死亡した。

以上の成績より、コロナウイルスがコロニーに常在しほとんどのネコが感染しているが、発症率は極めて低いものと考えられた。また、抗体陽性のネコの中にウイルスのキャリアーが存在し、これらが感染源になっているものと推測された。

○中井伸子、柏本知子、前川美津子、道田成好、小林忍、名和孝二、長沢久充
(日本新薬、安全研)

マウス、ラット、ハムスターおよびヒト由来の腫瘍細胞株56株について、mouse antibody production(MAP)試験、血漿LDH測定および培養法により、ウイルスおよびマイコプラズマ汚染の有無を調べた。

Sendai virus(HVJ)およびMouse hepatitis virus(MHV)は、56株中、いずれからも検出されなかった。また、Pneumonia virus of mice(PVM)、Minute virus of mice(MVM)、Mouse polio(GDVI)、Reovirus Type3(Reo3)、Lymphocytic choriomeningitis virus(LCMV)、Ectromelia(Mouse pox)、Mouse pneumonitis virus(K virus)、Polyoma virus、Mouse adenovirus(MAD)、Epizootic diarrhoea of infant mice(EDIM)、Mouse cytomegalovirus(MCMV)およびHantann virusも23株のいずれからも検出されなかった。しかし、Lactate dehydrogenase elevating virus(LDV)は、42株中4株から検出された。また、マイコプラズマに関しては、MAP試験でMycoplasma pulmonis(M.p.)を検査した結果、53株中3株が陽性であった。しかし、培養法では、これらのM.p.陽性を示した3株のうち、2株はM.p.以外のマイコプラズマであり、他の1株は陰性であった。したがって、M.p.は53株とも陰性と判断された。M.p.以外のマイコプラズマは、培養法で検査した結果、12株中5株から検出された。なお、LDV汚染株は全例とも動物への移植により継代維持されている株であるのに対し、マイコプラズマ汚染株は、全例とも培養により継代維持されている株であった。

以上の結果より、腫瘍細胞株はかなりの高頻度でウイルスおよびマイコプラズマ汚染を受けていることが分かった。腫瘍細胞株の汚染に関しては、現在までに、マイコプラズマはもとより、MHV、MVM、Reo3、LCMV、Mousepox、K、Polyoma、HantannおよびLDVなどのウイルスについても各国で報告されているが、これらの報告からも、今回の結果からも、腫瘍細胞株の汚染検査は実験動物施設を清浄に維持する上で必須であると思われる。また、腫瘍細胞株のみならず、臓器材料やモノクローナル抗体などについても汚染の報告があるので、これらについても同様に注意を要すると考えられる。

腎症候性出血熱 (Hemorrhagic fever with renal syndrome:HFRS)は、主として野生げっ歯類動物から人への感染発症に至る人獣共通感染症である。1970～80年代にかけてのわが国の動物実験関係者におけるHFRS患者の発生は、実験動物、特に汚染ラットによるものである事が明らかになっている。更に実験室環境におけるラットrat間の水平感染、垂直感染は共に健常野生型Fischer rat間では証明されなかった。

そこでRowett系Nude ratを用いて実験室内感染モデルの確立を試みた。このラットはホモ(rnu/rnu)個体では胸腺の発育不全で先天性免疫不全症となるがヘテロ(rnu/+)個体は正常野生型ratと変わらない。そこでvirus接種したホモ又はヘテロ個体の感染性を追求した。感染の成立、不成立は経時的な抗体価の測定、及びvirus分離により判定した。

結果

- 1 virus接種したホモ個体は2週目より抗体価が上昇し始め4週目をピークにその後下降し、7週以降10週までには全例死亡した。

一方ヘテロ個体では健常Fischer ratと同様4～5週で最高値に達し、以後長期間高抗体価を維持し持続感染が成立するが死亡する事はない。

- 2、virus接種したホモ個体は同一ケージ内で飼育したホモ、ヘテロラット共に感染を成立させ5週目より抗体の上昇がみられた。

また、virus接種したヘテロラットは同一ケージ内で飼育したホモ個体にのみ10週以降において感染を成立させヘテロ個体に対しては感染を成立させなかった。

- 3、ケージ内感染の成立したラットの各臓器からは高率に活性virusが分離され、特にホモラットの脳、肺、脾、肝からは多量のvirusが検出された。

以上、免疫不全動物であるホモ個体では接種virusは体内で増殖し、ケージ内は濃厚に汚染されホモ、ヘテロの別なく感染を成立させる。更にホモラットはHFRS virusの感染に対しても高い感受性を示すことが明らかになった。一方、ヘテロ個体では健常ラットに感染を起こすに十分なvirusの排出は見られないが高感受性のホモラットには感染を成立させる事からvirusを排出し続ける持続感染状態である事が証明された。

13

SER系統のてんかん様発作非発症型におけるPhenobarbital誘起心 室中隔欠損の低発現率について

中川洋子、浅野裕三、野口通重、田中公基（田辺製薬・安全研）

芹川忠夫、山田淳三（京大・医・動物実験施設）

自然発症てんかんラット（SER; zi/zi, tm/tm）とその関連系統ラットの生物学的特性を明らかにする研究の一環として、今回の実験では、Phenobarbital（PB）による心室中隔欠損（VSD）の誘発および妊娠母体におけるPBの血中濃度の推移を検討した。

〔材料および方法〕

動物はCrj:CD（CD）系、Slc:Wistar-KY（KY）系およびSERの同腹児であるてんかん様発作非発症型のNonS（zi/zi, tm/+）ラットを用いた。対照（蒸留水）、PB60 mg/kg（妊娠7～11日投与）およびPB120 mg/kg（妊娠9～10日投与）の3群を設定した（ただし、NonSラットについては対照群とPB60 mg/kg群のみとする）。妊娠母体は妊娠21日に剖検し、生存胎児数の算定、胎児体重の測定を行い、その後に胎児はブアン固定し実体顕微鏡下で内臓の異常、特に心奇形の有無について精査した。また、投与開始日の投与1, 4, 7および24時間後に尾静脈より約0.5 ml採血し、PBの血中濃度をHPLC法によって測定した。

〔結果〕

生存胎児数および胎児体重においては3系統ともに投与による差はみられなかった。またPB60 mg/kg投与においては、NonSラットで他の2系統に比べて低い値を示した。胎児体重においては3系統ともに差はなかった。VSDの発現頻度においてはCD系およびKY系ラットでは用量依存的に増加したが（CD: 対照=2.2%、PB60 mg/kg=16.5%、PB120 mg/kg=23.2%；KY: 対照=3.6%、PB60 mg/kg=23.4%、PB120 mg/kg=30.6%）、NonSラットでは投与による差はみられなかった（対照=2.2%、PB60 mg/kg=2.6%）。また、PB60 mg/kg投与においてはNonSラットで他の2系統に比べて低い値を示した。血中濃度において、PB60 mg/kg投与でNonSラットはCD系およびKY系ラットに比べると、投与1時間後の濃度は同レベルであったが、4, 7および24時間後にはCD系ラットに比べて有意に低かった。

以上の結果からNonSラットにみられるPB誘発VSDの低発現率は母体におけるPBの血中濃度推移と関連しているように思われた。

浅野裕三、小口敦、田口葉子、川合是彰（田辺製薬株式会社・安全性研究所）

3-Acetylpyridine（以下 3-AP）は 補酵素 NAD および NADP の主要構成成分の Nicotinamide の代謝拮抗物質で、これを投与することにより、種々の動物の脳、主に延髄・神経核領域の神経細胞に変性・脱落の起ることが報告されている。また、行動学的な特徴としてはラットで歩行異常、2-way 式回避反応による学習能の発達遅滞、自発運動の低下、マウスで Jump-box 法による回避学習能の障害が報告されている。この病態モデルは現在ヒト脊髄小脳変性症の有用なモデルの一つとして評価されている。今回、3-AP 投与ラットの行動発達の障害を指標にして、行動発達の総合的な評価方法を確立する目的で、3-AP 投与ラットの情動、学習および自発運動について検討した。

〔材料および方法〕 実験には Slc:Wistar 系雄ラット（Slc から 6 週齢で購入）24 匹を用いた。投与は注射用蒸留水に溶解した 3-AP の 20 および 40mg/kg を 8 週齢時に 2ml/kg の液量で単回腹腔内投与した。対照群には注射用蒸留水を同様に投与した。行動発達の観察として、オープンフィールドテスト（OFT）では 9 週齢時に 1 日 1 回 3 分間の中央潜時、通過区画数および移動距離を観察した。シャトルボックス法による回避反応では 9 週齢時に 1 日 30 試行で 連続 3 日間の回避率、回避潜時、逃避率、逃避潜時および試行間移動数を測定した。自発運動量では 9～11 週齢時に哺育用ケージに個別収容して、暗期 12 時間の運動量を測定した。動物は行動観察終了後の 11 週齢時にエーテル麻酔下で全例剖検し、大脳、小脳、橋および延髄の H. E. 染色標本を作製して、病理組織学的に観察した。

〔結果〕 一般状態では、実験期間中 40mg/kg 群で歩行異常がみられたが、20 mg/kg 群の歩行状態は正常であった。OFT では、用量依存的に中央潜時の延長および通過区画数の減少がみられたが、群間に有意な差はなかった。移動距離は用量依存的に減少する傾向にあり、40mg/kg 群で有意に減少した。回避反応では、40mg/kg 群で試行 2 および 3 日目の回避率の有意な低値および逃避率の有意な高値がみられた。回避および逃避潜時は 40mg/kg 群で延長する傾向にあり、試行 2 日目の逃避潜時は有意であった。試行間移動数では試行 3 日目に 20 mg/kg 群が高値であったことを除いて、群間に差はなかった。自発運動では 3-AP 投与による影響はみられなかった。中枢神経系の病理組織学的な検査では、40mg/kg 群で延髄下オリーブ核に局限した神経細胞の変性・脱落が観察されたが、20mg/kg 群では異常を認めなかった。

以上の結果、3-AP 40mg/kg 投与ラットは中枢神経系の病理学的な病変に関連した歩行異常に基づく種々の行動発達の障害が定量的に確認された。また、20mg/kg 投与ラットにみられた軽微な変化は、中枢病変が出現しない軽微な異常を行動学的に検出できることを示唆するものと考えられた。

脳卒中易発症モデルラット（SHRSP）の病態発現に及ぼす飼料の影響

大原忠雄（塩野義製薬・実動研）

1. はじめに

SHRSP ラットのように、脳卒中を発症した個体から仔が得られない疾患モデル動物を繁殖育成し研究に用いる場合、繁殖育成の立場と研究の立場で矛盾が生ずることがある。すなわち、前者の立場では、多くの仔を得るため発症日齢の遅延が望ましいが、研究の立場では効率良く研究を進展させるため若齢発症の動物を望むからである。双方の立場を両立させるためには、SHRSPラットの病態発現が飼料等の環境要因で修飾出来ることが望ましい。

高血圧の発症、進展に食物因子の関与を示唆する報告は多い^{1) 2) 3) 4)}。とくに食塩負荷による高血圧の進展、病態の増悪はよく知られている。そこで我々は飼料により SHRSPラットの病態発現を修飾出来るか否かを調べてみた。

飼料は入手が容易で、次の特徴を持つ市販の3種類の飼料、A飼料（蛋白含量：27%、Na/K：0.268）、B飼料（蛋白含量：19%、Na/K：0.262）、C飼料（蛋白含量：18%、Na/K：0.434）を選び（表1）、SHRSPラットの血圧値および脳卒中出現におよぼす影響を比較してみた。その結果、飼料によりSHRSPラットの病態発現が顕著に修飾されることがわかった。

2. 発育に及ぼす影響

3種類の飼料を与えた時の10週齢までの発育を図1に示す。SHRSPラットの10週齢までの発育には飼料間で差はみられなかった。

3. 血圧に及ぼす影響

血圧測定は、非観血血圧測定装置（PE-300、Narco社製）にて5回測定し、その平均値を血圧値とした。図2、3に示すように、雌では10週齢までの血圧値に飼料間による差はみられなかった。しかし、11週齢になると、AおよびB飼料に比べC飼料が有意に高い血圧値を示した。雄においても雌と同様の傾向がみられ、10週齢になるとAおよびB飼料に比べC飼料が有意に高い血圧値を示した。すなわち、A飼料群の血圧値が185mmHg、B飼料群の血圧値が194mmHgであったのに対し、C飼料群のそれは204mmHgであった。C飼料群では11週齢に

なると脳卒中症状を示す個体が出現し、群間の血圧値には統計的な有意差はみられなくなった。

4. 寿命に及ぼす影響

寿命の観察では、動物の衰弱が著しく翌日まで生存することが困難と思われる例については切迫屠殺し、屠殺時までの日齢を寿命とした。死亡および屠殺ラットは剖検し、肉眼的観察をおこなった。図 4. 5. に示すように、寿命には飼料間で顕著な差がみられた。すなわち、50%の動物が脳卒中により死亡する週齢は、雌ではA飼料群が34週齢であるのに対し、B飼料群では22週齢、C飼料群では18週齢であった。雄ではA飼料群が26週齢、B飼料群が20週齢、C飼料群が14週齢と雌に比べ短命であった。これらの成績はSHRSP ラットの脳卒中発症時期を飼料の種類により変化させ得ることを示唆している。

5. 主な肉眼病変とその出現率

剖検時の各臓器の肉眼観察では、大脳の出血および軟化、延髄の出血、腸管膜の結節性動脈周囲炎が認められた。これらの病変の出現率を表 2. 3. に示す。

A飼料群の雌では、大脳出血が40%、結節性動脈周囲炎が10%、B飼料群の雌では、大脳出血が40%、大脳軟化が10%、結節性動脈周囲炎が20%、C飼料群の雌では、大脳出血が36%、大脳軟化が18%、結節性動脈周囲炎が18%で、飼料群間の出現率はほぼ同等であった。しかし、雄の病変の出現率には飼料群間で顕著な差を認めた。すなわち、A飼料群では、大脳出血が10%、大脳軟化が30%、結節性動脈周囲炎が10%であったのに対し、B飼料群では、大脳出血が27%、大脳軟化が36%、C飼料群では、大脳出血が64%、大脳軟化が18%、延髄出血が18%で、C飼料群の雄には90%の脳病変が観察された。

6. まとめ

SHRSP ラットの脳病変の発現時期および発症率は、蛋白含量及びNa/K比率の異なる市販飼料を用いることにより変化させ得ることが判明した。SHRSP ラットを利用する場合、繁殖用動物と実験用動物の飼料を変更することによりbreederとuserの両者の立場を満足させ得ることが可能である。

表1. 固型飼料分析成績

飼料	処理※	水分 %	粗蛋白 %	粗脂肪 %	粗繊維 %	粗灰分 %	Na mg/100g	K mg/100g	Na/K
A	前	8.0	27.3	5.4	5.2	7.8	299	1,050	0.285
	後	9.2	27.3	5.3	4.4	7.4	268	1,000	0.268
B	前	11.3	19.9	4.7	3.0	4.7	207	730	0.284
	後	13.0	19.2	4.3	2.7	4.5	189	721	0.262
C	前	10.8	18.1	4.7	3.3	4.5	340	692	0.491
	後	11.9	18.2	4.3	2.8	4.4	307	708	0.434

※: 121℃, 7分オートクレーブ

分析は日本食品分析センターに依頼した

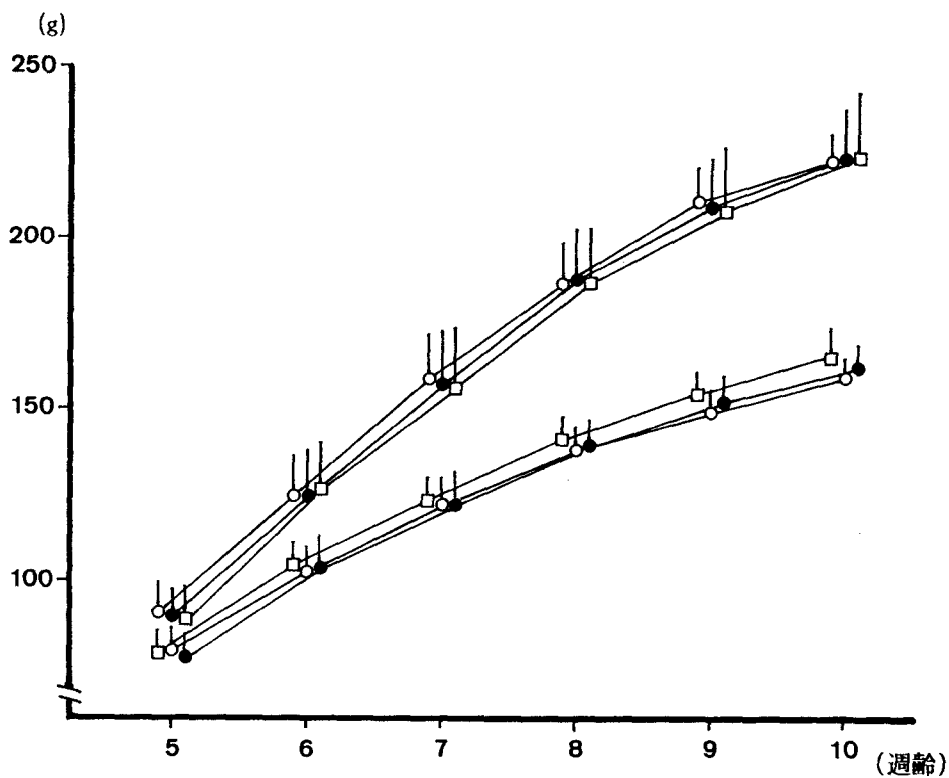


図1. SHRSPの発育曲線

○: A飼料群 ●: B飼料群 □: C飼料群

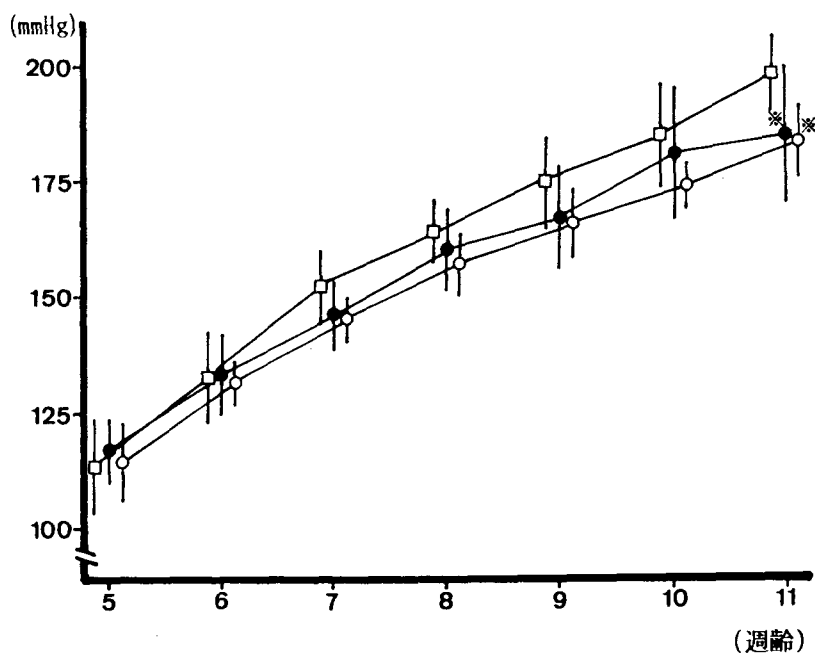


図2. SHRSPの加齢に伴う血圧値の推移 (雌)

○: A飼料群 (n=10) ●: B飼料群 (n=10) □: C飼料群 (n=11)
 ※: C飼料群にくらべ統計的な有意差を示す ($P < 0.05$)

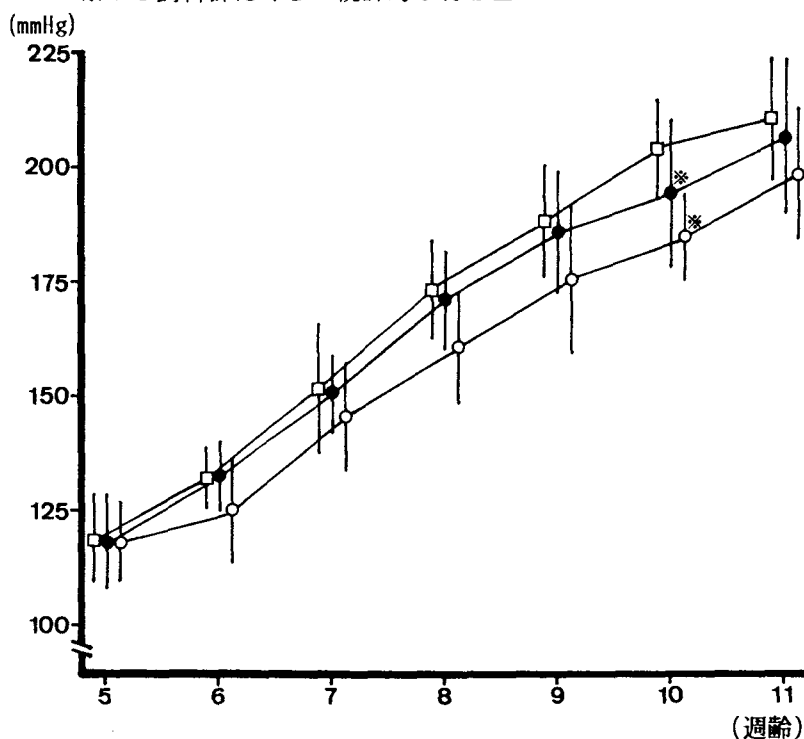


図3. SHRSPの加齢に伴う血圧値の推移 (雄)

○: A飼料群 (n=10) ●: B飼料群 (n=11) □: C飼料群 (n=11)
 ※: C飼料群にくらべ統計的な有意差を示す ($P < 0.05$)

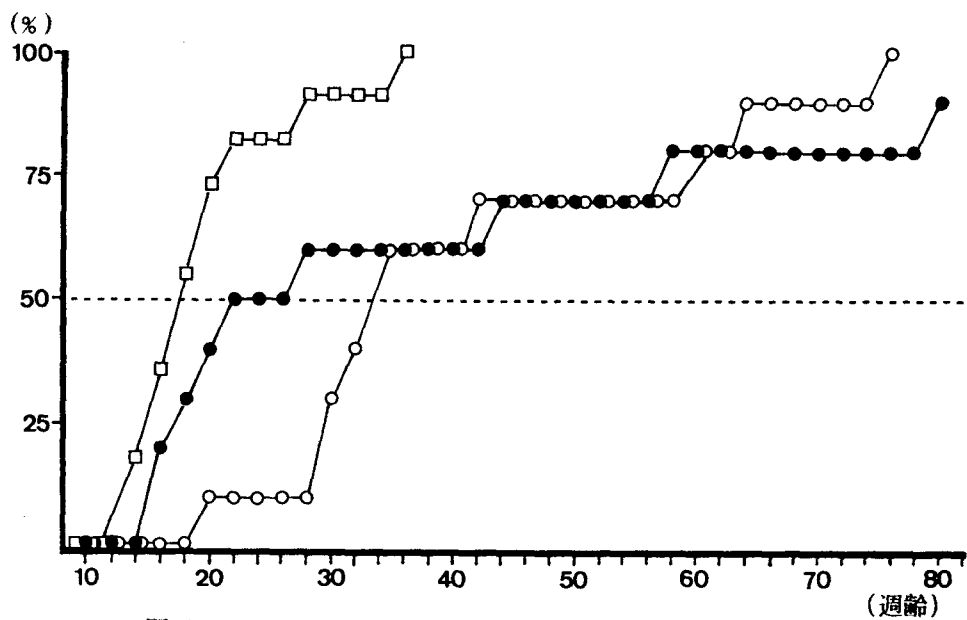


図4. SHRSPの加齢に伴う累積死亡率(雌)

○: A飼料群 (n=10) ●: B飼料群 (n=10) □: C飼料群 (n=11)

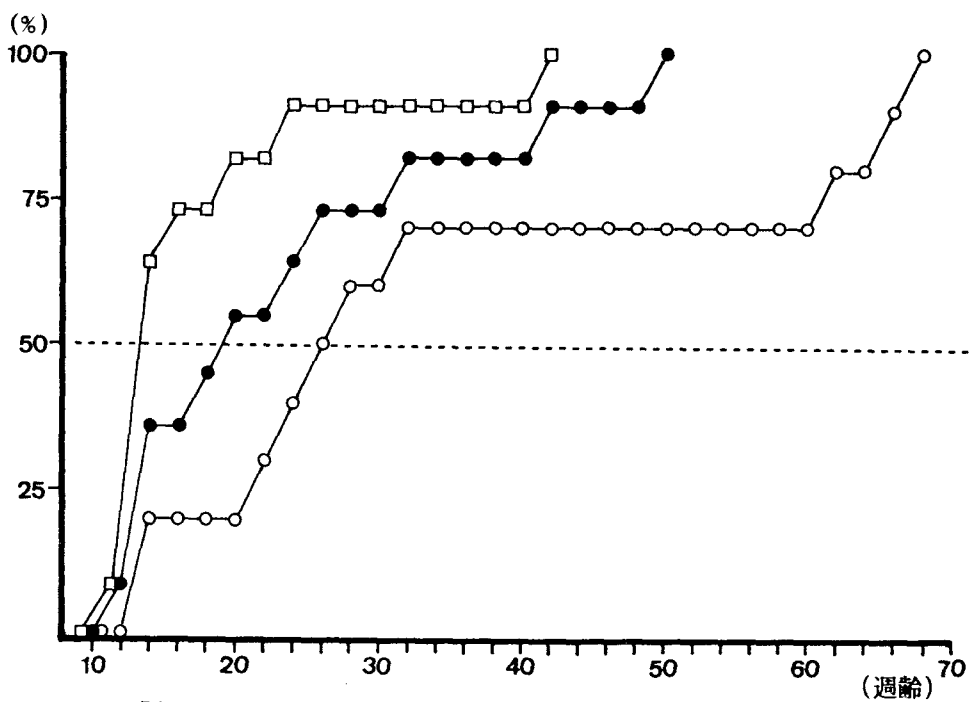


図5. SHRSPの加齢に伴う累積死亡率(雄)

○: A飼料群 (n=10) ●: B飼料群 (n=11) □: C飼料群 (n=11)

表2. 主な病変とその出現率（雌）

飼 料	A (10)	B (10)	C (11)
大脳出血	40% (4)	40% (4)※	36% (4)
大脳軟化	0% (0)	10% (1)	18% (2)※
延髄出血	0% (0)	0% (0)	0% (0)
結節性動脈周囲炎 (腸管膜動脈)	10% (1)	20% (2)※	18% (2)※
肉眼病変なし	50% (5)	50% (5)	36% (4)

():動物数 ※ : 同一個体に複数の病変を認めた

表3. 主な病変とその出現率（雄）

飼 料	A (10)	B (11)	C (11)
大脳出血	10% (1)※	27% (3)※	64% (7)※
大脳軟化	30% (3)※	36% (4)※	18% (2)※
延髄出血	0% (0)	0% (0)	18% (2)
結節性動脈周囲炎 (腸管膜動脈)	10% (1)※	0% (0)	0% (0)
肉眼病変なし	70% (7)	36% (4)	9% (1)
観察不能	—	9% (1)	—

():動物数 ※ : 同一個体に 複数の病変を認めた

参考文献

- 1) 伊藤敬一, 池田正男: 血圧に対する食物の影響, 医学のあゆみ, 128 (3), 1984.
- 2) 奈良安雄, 家森幸男: 遺伝性高血圧における電解質バランスの重要性, 最新医学, 38 (4), 1983.
- 3) 佐々木直亮: 高血圧と食塩摂取, 栄養と食糧, 3 (4), 1978.
- 4) 奈良安雄, 家森幸男: アミノ酸と高血圧, 代謝, 28 (2), 1991.

1. はじめに

我が国における糖尿病患者数はこの20年間で急増しており、現在、未受診者を加えると600万人を越えると推定されている。大部分の患者が属するインスリン非依存型糖尿病(NIDDM)は遺伝因子と環境因子が重なって初めて発症することが知られている

(図1)¹⁾。環境因子の関与している

ことは、食糧事情の悪化した第一次及び第二次世界大戦中と、その後数年間その発症が激減したことからも明らかである。

両因子の相互関係により糖尿病が発症することをヒトで証明することは極めて困難であるが、これまでの糖尿病モデル動物における多くの優れた報告はこの点を見事に実証している^{2, 3)}。

我々も1970年代の中頃からひとつのチャレンジを開始した。それはインスリン感受性の劣る系統のラットに肥満を発症させれば、肥満と糖尿病の併有するⅡ型糖尿病モデルラットを作成出来るのでは言うことであつた。そこで、インスリン感受性の鈍いWistar Kyoto ラットに単純肥満モデルZucker fattyラットの肥満発症遺伝子faを移行させることにより、予想通り肥満と糖尿病を併有したWistar fattyラットを1981年に確立した⁴⁾。面白いことに糖尿病の発症には性差があり、雌性Wistar fattyラットでは200 mg/dlを越える高血糖は稀であつた。

本稿では、食餌成分を変えることにより①雌性Wistar fattyラットにおける高血糖の惹起及び②雄性Wistar fattyラットにおける糖尿病性腎症の増悪と軽減について述べる。

2. 雌性Wistar fattyラットにおける高血糖の惹起

5週齢の雌性Wistar fattyラットを2群(各5匹)に分け、1群には市販の飼料(CE-2: 345.2 Kcal/100 g、組成: 炭水化物 56.5%、脂肪 4.8%、蛋白質 27.2%、灰分 7.7%、繊維 3.8%)を、他群には高蔗糖食(sucrose: 414.2 Kcal/100 g、組成: 炭水化物 67.6%、

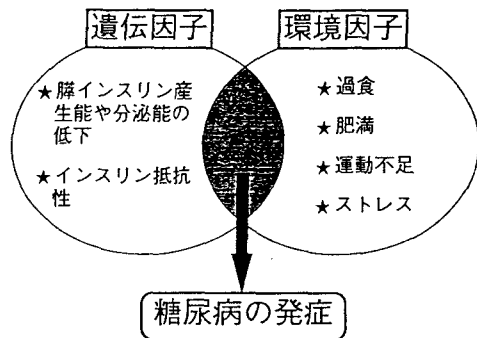


図1. 糖尿病の発症に関わる因子

脂肪 8%、蛋白質 18%、灰分 4.0%、繊維 1.5%、ビタミン混合 0.6%) 4 週間与えた。対照として同週齢の同腹の lean ラットを同様に飼育した。成績は図 2 に示す。

両ラットのいずれにおいても、体重増加及びカロリー摂取量には飼料の差による影響はなかった。市販飼料で飼育された fatty ラットでは、血漿インスリンとトリグリセリド値は上昇したが、血糖値は正常であった。一方、高蔗糖食で飼育した fatty ラットでは血漿インスリンとトリグリセリド値はさらに上昇し、加えて血糖値も 300 mg/dl まで上昇し、全例で尿糖の陽性が認められた。高蔗糖食は単純肥満モデル Zucker fatty ラットにおいては高血糖を惹起しなかった。この事実は遺伝的背景がもうひとつの要因であることを如実に示す。高蔗糖食がなぜ雌性 Wistar fatty ラットで高血糖を惹起するか明確でないが、肝臓におけるグルコキナーゼが関与していると考えている。グルコキナーゼはインスリンにより誘導される酵素で肝臓での糖の取り込みに重要な役割を果たしている。雄性 Wistar fatty ラットでは高インスリン血症にもかかわらずその酵素活性は誘導されず⁵⁾、lean ラットとほぼ同じであった。結果として、肝臓での糖の取り込みが低いため、過食を示す雄性 Wistar fatty ラットでは高血糖が発症すると考えられる。一方、雌性 Wistar fatty ラットではグルコキナーゼの活性が高く⁶⁾、過食を示しても市販飼料では高血糖を発症しないが、高蔗糖食ではグルコキナーゼの活性が低下する⁶⁾ため高血糖が惹起され则认为している。高蔗糖食でなぜグルコキナーゼの活性が低下するか今後明確にする必要がある。

3. 雄性 Wistar fatty ラットにおける糖尿病性腎症の増悪と軽減

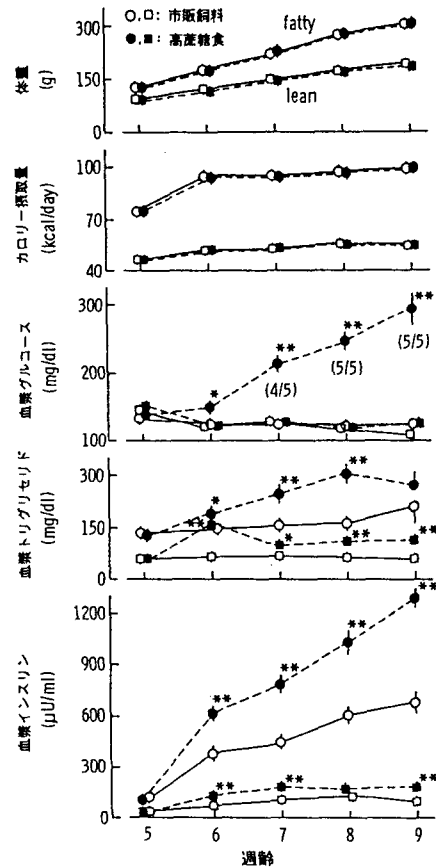


図2 雌性Wistar fatty ラットの体重、カロリー摂取量および血漿成分に対する高蔗糖食の影響。Mean ± SD, n=5
市販飼料および合成飼料で5週齢から4週間飼育した。

雄性Wistar fattyラットは9週齢を越えると300 mg/dl 以上の高血糖を示し、次いで尿中へのアルブミンの排泄が漸増し、病理組織的には糖尿病性腎症の初期病変が見られる⁷⁾。薬剤等により高血糖の発現を抑えるとアルブミン尿や病変も抑えられる⁸⁾ことから、本ラットは糖尿病性腎症のモデル動物と考えられる。

8週齢の雄Wistar fattyラットを2群（各5匹）に分け、1群には市販の飼料（345.2Kcal/100 g、組成：炭水化物 56.5%、脂肪 4.8%、蛋白質 27.2%、灰分 7.7%、繊維3.8%）を、他群には合成飼料（基本飼料：387 Kcal/100 g、組成：炭水化物 65.5%、脂肪 5%、蛋白質20%、灰分 3.5%、繊維 5.0%、ビタミン混合 1.0%）⁹⁾を8週間与えた。対照として同週齢の同腹のleanラットを市販飼料で同様に飼育した。成績は図3に示す。

8週間の両飼料の飼育により血糖値は影響を受けなかった。一方、尿への蛋白及びアルブミンの排泄は合成飼料飼育群で顕著に抑えられた。本成績は本ラットの糖尿病性腎症が高血糖以外に食餌成分でも影響を受けることを如実に示す。両飼料の差が何によるか不明であるが、主栄養素よりも無機成分の含量差による可能性が考えられた。市販飼料は合成飼料に比べ、Ca:P:Mg・Na等を3倍以上含有していた。そこで、合成飼料に食塩を添加したところ、本ラットの腎症は著しく悪化した。本ラットの腎症は高蛋白食と高脂肪食でも悪化し、逆に低蛋白食では軽減された⁹⁾。

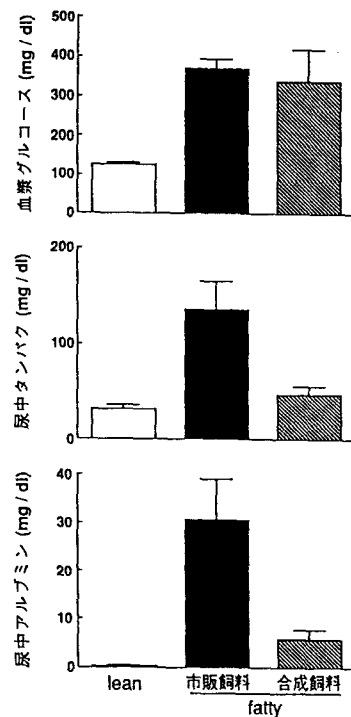


図3 雄性Wistar fatty ラットの腎症に対する市販飼料と合成飼料（基本食）の比較。Mean ± SD, n=6
市販飼料および合成飼料で8週齢から8週間飼育した。

4. 結論

以上の成績から、Ⅱ型糖尿病は遺伝因子と環境因子が重なった時に発症し、その病態の進展に食餌成分が大きな寄与をしていることが理解される。主栄養素ばかりでなく無機成分も重要な因子であることが分かる。

5. 謝辞

本ラットの確立に貢献され、現在も本ラットの生産・供給をいただいている当社実験動物室主任研究員嶋川幸三氏及び研究技員大森吉明氏に深謝します。

6. 文献

- 1) 池田衡：KKマウスおよびWistar fattyラットの肥満と糖尿病発症。病態生理 13: 27, 1994.
- 2) Matsuo T. et al.: Factors affecting development of hyperglycemia in KK mice. J. Takeda Res. Lab. 30: 307, 1971.
- 3) Matsuo T. et al.: Induction of overt diabetes in KK mice by dietary means. Endocrinol. Jpn. 17: 477, 1970.
- 4) Ikeda H. et al.: A new genetically obese-hyperglycemic rat (Wistar fatty). Diabetes 30: 1045, 1981.
- 5) Noguchi T. et al.: The regulation of gene expression by insulin differentially impaired in the liver of the genetically obese-hyperglycemic Wistar fatty rat. FEBS LETTERS 328: 145, 1993.
- 6) Sugiyama Y. et al.: Derangement in hepatic enzymes caused by sucrose-drinking and its implication for the development of hyperglycemia in female Wistar fatty rats. Endocrinol. Jpn. 36: 245, 1989.
- 7) 山田幸男ら：遺伝性肥満糖尿病ラット：Wistar fattyにおける糖尿病性腎症。糖尿病動物 5: 132, 1991.
- 8) 鈴木正美ら：Wistar Fattyラットにおけるボグリボース (A0-128) 連続投与による食後高血糖および糖尿病性腎症発症の抑制。薬理と治療 22: 3479, 1994.
- 9) 山田幸男ら：食餌によるWistar fattyラット腎症の変動。Diabetes Frontier 14: 611, 1993.

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)

1.はじめに

自然発症糖尿病動物の糖尿病発症率は一様ではなく、たとえ近交系として遺伝的に固定されていても維持機関を異にすれば発症率が異なることは、KK系マウス、NOD系マウス、BB系ラットで経験してきた。糖尿病発症に至るまで長期間を要するWBN/Kob系ラットでは生産コロニー間における糖尿病の発症および膵病変の発現に著しい差があることが報告されている¹⁾。通常の固型飼料には長期飼育用、繁殖用、特殊繁殖用という用途別に製造販売されているが、WBN/Kobラットを繁殖しない時には長期飼育用、繁殖させる時には繁殖用飼料を与えていたところ、糖尿病発症率に大きな差が生じ、繁殖用飼料は長期飼育用飼料よりも糖尿病発症を促進する結果となった。我々はこの現象を実験的に確かめるために、長期飼育用、繁殖用、特殊繁殖用の3種類の市販固型飼料を使って比較した。また、糖尿病発症に及ぼす市販飼料の違いが何に起因するかを探るために、繊維含量の違う精製飼料を作成して繊維の影響を調べた。

2.材料と方法

実験動物は日本SLC (株) から購入したWBN/Kob系の雄ラットを用い長期飼育を行った。毎週体重を測定し尿糖をテストテープで調べ +++ 以上の尿糖陽性をもって糖尿病発症とみなした。血中グルコース、総蛋白、総脂肪、総コレステロール、インスリンおよび摂餌量、摂水量を測定した。

3.結果

3 種類の市販固型飼料の影響²⁾

飼料は船橋農場 (株) 製の3種類の固型飼料、すなわち長期飼育用 (MM-3)、繁殖用 (F-1) 及び、特殊繁殖用 (MB-3) を用いた。表1に粗成分とエネルギー含量を示した。体重は図1に示したようにMB-3群が最も大きくF-1群が中間でMM-3群は低かった。MB-3群では糖尿発症開始時期と一致して体重低下が始まった。WBN/Kob系ラットの糖尿病発症率は図2に示したように、飼料の種類によって著しく異なり、MM-3群では、52週齢まで1匹も糖尿病を発症しなかったのに対し、MB-3群では27週齢で発症開始した後、急激に発症匹数が増加し、35週齢で50%、41週齢で100%の発症率に達した。F-1群ではそれらの中間となり、33週齢で最初の発症個体が出現し、41週齢62%の発症率を示し、48週齢で100%に到達した。MM-3群でもさらに長期飼育すると、51週齢に至って最初の発症例がみられ、54週齢で50%の発症率となり、64週齢ではほぼ100%に達した。いずれの群も糖尿病発症後は体重が低下

し、死に至るまでやせ続けたが、3群の間で比較すると、F-1群、MB-3群は激しい体重低下を示したが、MM-3群ではよりゆるやかな体重低下を示した。

糖尿病発症前・後の食餌摂取量を図3に示した。発症前に比べ発症後は、いずれの群も、摂餌量は倍近くに増加したが、3群間には差はなかった。発症後の摂水量は図4に示すように、MM-3では約2倍、F-1とMB-3では、3～4倍に増加した。45週齢における3群の血液生化学値を表2に示した。血中総蛋白、脂肪、総コレステロール値はいずれも糖尿病発症後は著しい高値を示し、血漿インスリン値は低値を示した。

食餌繊維の影響³⁾

表3のように船橋農場(株)にて繊維含量が異なる3種類の精製飼料、A群(3.5%)、B群(2.5%)、C群(0%)を作成して、WBN/Kobラットを長期飼育した。46週齢における糖負荷試験の結果は、図5に示したように、繊維0%のC群は糖負荷後30分、60分、120分値において200mg/dlを越える高い血糖値を示したが、AおよびB群は糖負荷後も低い血糖値レベルを示した。

表4に46週齢のWBN/Kobラットの血液生化学値を示した。体重及び糖負荷後血糖値と同様に、血中遊離脂肪酸、血糖、中性脂肪、総コレステロール、血漿インスリン値はいずれもC群で高く、AとB群はかなり低い値を示した。糖尿病発症はどの精製飼料群でも全く促進されることはなく、A、B群では全然糖尿病発症が見られず、C群において軽度糖尿がようやく59週齢から見られ始めたのみで、しかもそれ以上重症化することはなかった。

4. 考察

市販されている飼料は、普通正常な系統を健康に保つことを目的に作られており、繁殖に用いる場合は、妊娠、哺育等に必要とされる栄養が加算されている。ところが、WBN/Kob系ラットのような糖尿病の疾患モデル動物の場合は、繁殖用飼料では糖尿病が発症し易く、一般用飼育飼料では糖尿病が抑えられ、糖尿病が発症してくれなくては困る飼育用で発症せず、発症しないほうが都合のよい繁殖用で発症してしまうという、本来の用途と逆の結果になる。疾患モデル毎に動物と飼料が密接に関係し合っているので、このWBN/Kobラットには特殊繁殖用飼料というようにセットで使うようにしたほうがよい。また、市販固型飼料の組成から繊維含量を違えた精製飼料で実験したが、繊維0%の飼料にても糖尿病を発症させることができなかった。現在、日本農産工業(株)の協力を得て、エネルギーレベルを一定にして、蛋白あるいは脂肪含量を段階的に変化させた飼料を慣用原料を用いて作製し実験中である。

文献

- 1) 七戸和博他：WBN/Kobラットの糖尿病発症におけるコロニー差について。
糖尿病動物 第2巻、pp104-110, 1988.後藤由夫編、医薬ジャーナル社
- 2) 西村正彦他：WBN/Kob系ラットの糖尿病発症に及ぼす市販固形飼料の影響。
糖尿病動物 第5巻、pp222-225, 1991.糖尿病動物研究会編、医薬ジャーナル社
- 3) 西村正彦：自然発症糖尿病WBN/Kobラットに及ぼす食餌繊維の影響。
厚生省特定疾患「難病の疾患モデル調査研究班」平成3年度研究報告書、
pp106-110, 1992.

表 1 . 市販固型飼料の粗成分とエネルギー含量

Diet	MM-3	F-1	MB-3
水分	7.0	8.0	8.0
粗蛋白質	20.1	21.3	28.1
粗脂肪	4.4	5.1	6.0
可溶無窒素物	54.5	57.5	48.9
粗繊維	5.2	3.1	2.6
粗灰分	8.8	5.0	6.5
総エネルギー	4.09	4.18	4.36 kcal/g

船橋農場（株）パンフレットより

表 2 . 3 種類の市販固型飼料における糖尿病発症率及び血液生化学値（45週齢）

Diets	Incidence of diabetes	Total Protein mg/dl	Glucose mg/dl	Triglyceride mg/dl	Total Cholesterol mg/dl	Insulin μU/ml
MM-3	0%	6.0 ± 0.6 (12)	187.0 ± 24.6 (12)	171.5 ± 49.3 (12)	59.4 ± 8.2 (12)	12.5 ± 3.8 (7)
F-1	75%	7.0 ± 0.6 (11)	387.7 ± 146.6 (16)	186.4 ± 76.4 (16)	77.2 ± 21.6 (16)	16.0 ± 6.7 (13)
MB-3	100%	—	408.5 ± 124.6 (17)	195.6 ± 79.8 (17)	117.2 ± 20.4 (17)	9.2 ± 2.4 (17)

(): Number of rats examined

表 3 . 繊維含量別の精製飼料の粗成分表

成分	C 群 (精製 繊維 0%)	B 群 (精製 繊維 2.5%)	A 群 (精製 繊維 3.5%)
水分	8.05	8.12	8.35
粗蛋白質	28.51	28.49	28.48
粗脂肪	6.11	6.12	6.13
粗繊維	0.05	2.55	5.17
粗灰分	4.13	4.14	4.15
可溶無窒素物	53.15	50.58	49.75
代謝エネルギー	3.84	3.85	3.87

表4. 繊維含量の異なる飼料における未発症46週齢WBN/Kobラットの血液生化学値

Group	NEFA	Glucose	Triglyceride	Total Cholesterol	Insulin
	mEQ/l	mg/dl	mg/dl	mg/dl	μ U/ml
A	0.92 ± 0.11 (10)	97 ± 25 (11)	40.7 ± 4.9 (10)	74.4 ± 14.5 (11)	1.9 ± 1.0 (11)
B	1.0 ± 0.1 (11)	95 ± 16 (12)	46.2 ± 3.6 (12)	72.3 ± 9.9 (12)	2.1 ± 0.9 (11)
C	1.78 ± 0.22 (8)	115 ± 14 (8)	81.7 ± 8.8 (8)	104.3 ± 9.2 (7)	2.8 ± 0.7 (8)

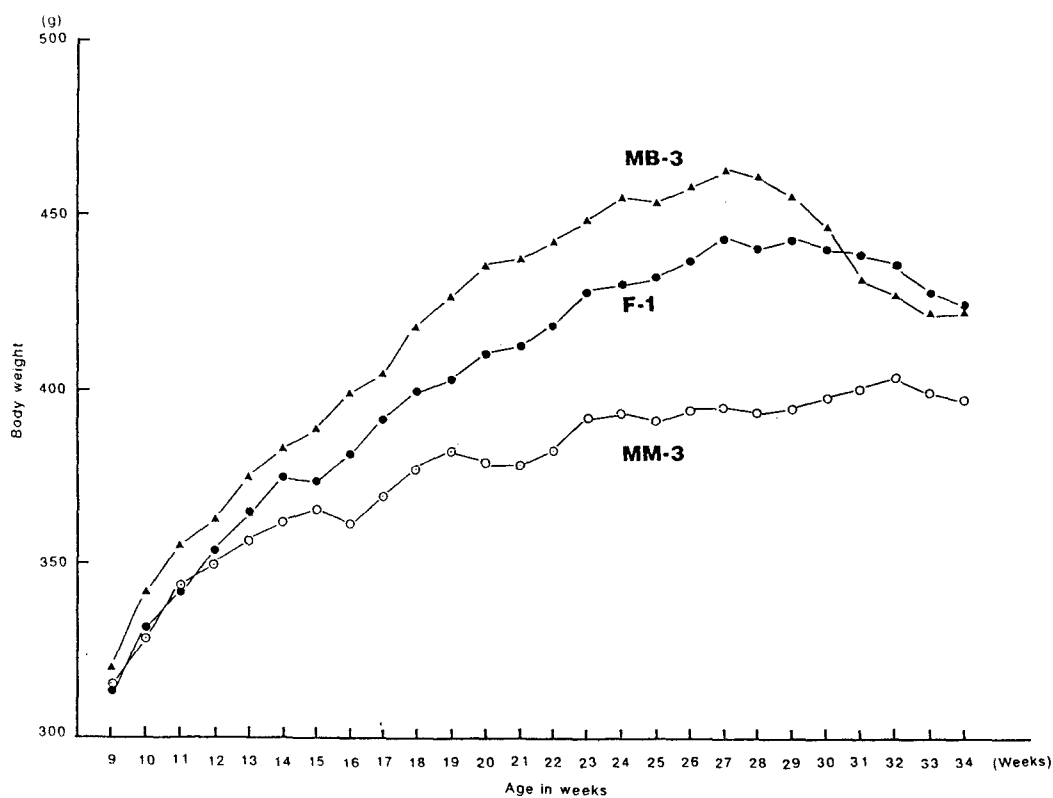


図1. 3種類の市販固型飼料におけるWBN/Kobラットの体重変化

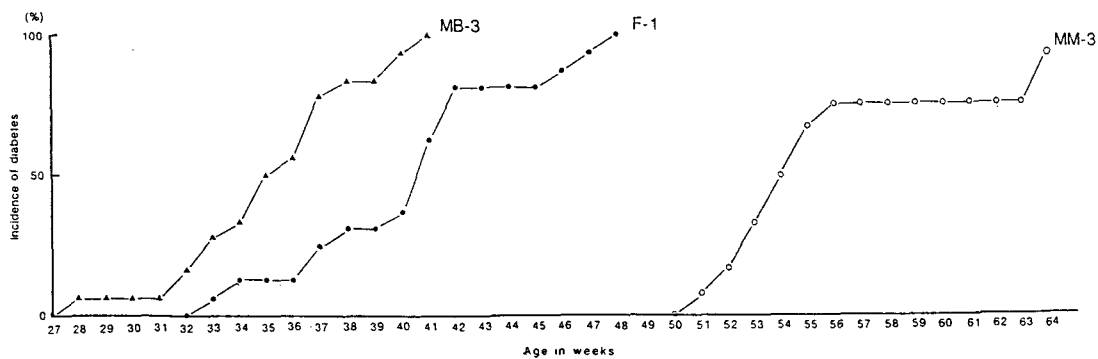


図2. 3種類の市販固型飼料のWBN/Kobラット糖尿病発症率に及ぼす影響

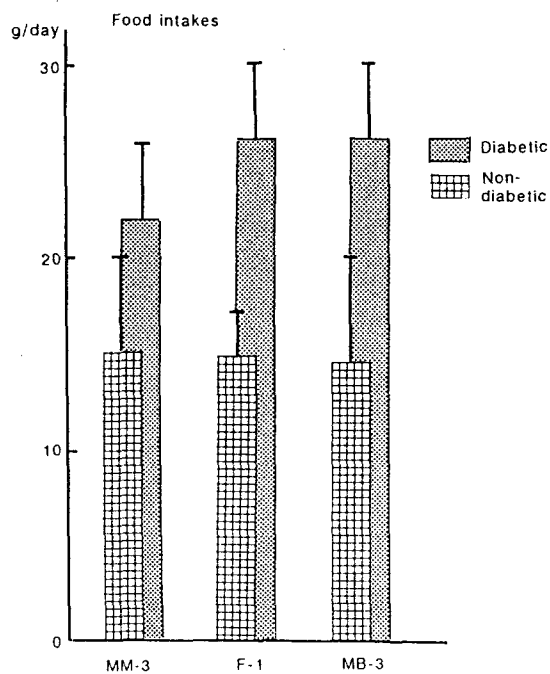


図3. 3種類の飼料給与群における
糖尿病発症前・後の一日平均食料摂取量

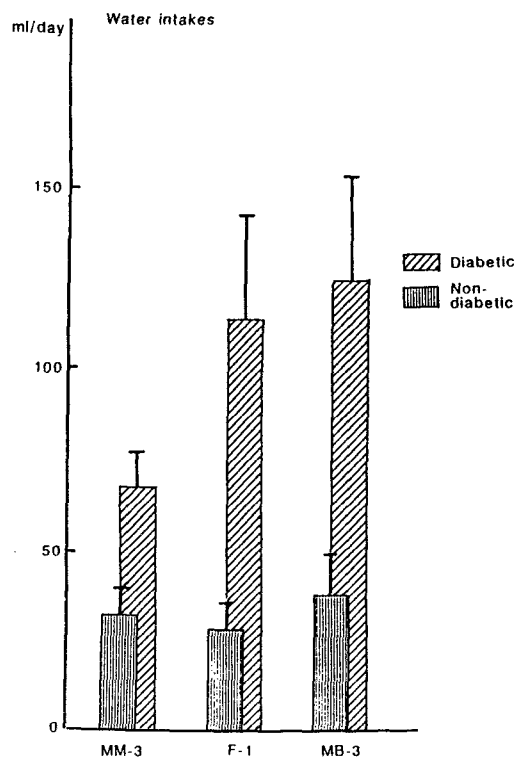


図4. 3種類の飼料給与群における
糖尿病発症前・後の一日平均摂水量

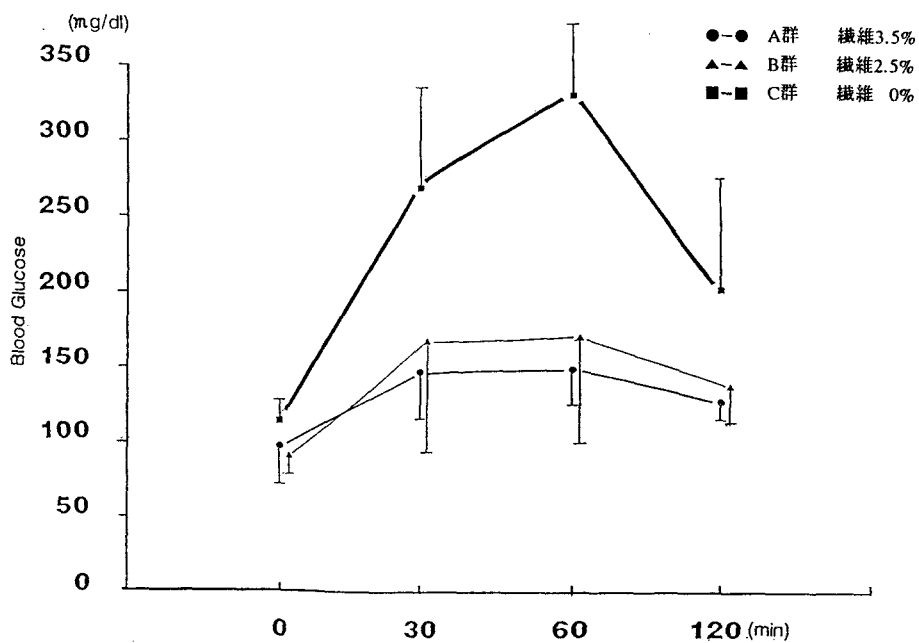


図5. 繊維含量の異なる飼料における未発症46週齢WBN/Kobラットの糖負荷試験

実験動物学領域でのカリニ肺炎研究と ヒト臨床医学への応用

京都大学医学部附属動物実験施設
北田一博

- I. はじめに
- II. 実験動物におけるニューモシスチス・カリニ肺炎
 - 先天性免疫不全動物における自然発症例
 - ヌードマウスによる感染実験系
 - 全国の動物実験施設に対する汚染調査
 - カリニ肺炎の動物モデルとヒト臨床医学
- III. ニューモシスチス・カリニの分子生物学
 - ニューモシスチス・カリニの系統分類
 - 表面抗原 MSG 遺伝子のクローニング
 - 組替え MSG 抗原の微生物モニタリングへの応用
 - ニューモシスチス・カリニのゲノム解析
- IV. ニューモシスチス・カリニ肺炎のPCR診断
 - 動物検体への応用
 - ヒト臨床検体への応用
 - 環境から得た検体への応用
- V. 今後の展望

I. はじめに

ニューモシスチス・カリニ (*Pneumocystis carinii*、Pc) は、典型的な日和見感染病原体で (1、2)、免疫機能が正常な宿主に感染しても通常は不顕性に経過するが、ヌードマウスやSCIDマウスのような免疫不全ミュータント、もしくはコーチゾン投与動物のような免疫抑制動物に対しては、致死的な肺炎 (*Pneumocystis carinii* pneumonia、PCP) を発症させる (3-7)。従って、これらの動物を繁殖、または長期飼育する際には、本病原体を完全に除外しておく必要があると認識されている。

また、Pc は、実験動物のみならずヒトにも感染し、AIDS患者や腎移植患者のようなimmunocompromised host に対して重篤な肺炎を発症させる (8、9)。

特に、AIDS患者においては、予防を行わないかぎり70%にのぼる症例でPCPの併発することが知られている(2)。このことから、ヒト臨床医学分野においても、PCPの診断、治療、予防法を標準化する研究が急務であるとされてきた。

以上のような状況に鑑み、著者はこれまでに、特定の分野、手法にとらわれることなく、広くニューモシスチス・カリニに関する研究を行ってきたつもりである。そして、その研究は、(i) 実験動物の感染症としての研究、(ii) 実験動物のモデルを利用したヒトの感染症としての研究、(iii) (ii)で得られた知見を実証するためのヒトの臨床的研究、に大別される。本稿では、「実験動物学領域でのカリニ肺炎研究とヒト臨床医学への応用」と題し、主に著者らの上記(i)と(ii)の研究結果をまとめてみた。

II. 実験動物におけるニューモシスチス・カリニ肺炎

先天性免疫不全動物における自然発症例

著者らは、1987年、セミバリアー形式で維持されている共同利用のSFマウス飼育室で、Pcによる汚染事故を経験した。参考となるよう、以下に詳しく経過を記述することにする。

この事例は、同年4月、繁殖を行なっている飼育室の高週齢ヌードマウスに、消瘦、異常呼吸を呈し、その後死亡する動物が散見される様になったことに始まる。6月には、同様の症状を示すヌードマウスの死亡例が多発するようになり、繁殖の続行が困難になった。なお、若週齢ヌードマウスや胸腺を持つマウスには、このような症状は現われなかった。

そこで、PCPを疑い発症ヌードマウスを剖検したところ、肉眼的には、肺の退縮不良が認められ、病理組織学的には、肺胞壁の肥厚、小円形細胞の間質への浸潤を観察した。さらに肺胞腔内にはPAS弱陽性の蜂巢状構造物が充満しており、メテナミンシルバー染色にて黒染する球状もしくは三日月様の構造(シスト)も認められた。以上の結果より、Pc感染による間質性肺炎と確定診断されたわけである(1、2)。

そこで、この飼育室の全ての動物を淘汰した後、消毒作業を行なった。この汚染事故の時点においては、Pcに対する消毒薬の評価は報告されていなかったもので、消毒は本施設で他の病原体による汚染事故の際に通常行なっている方法に準じて実施した。すなわち、飼育室の床、換気口、及び飼育棚に70%エタノールを噴霧した後、部屋全体を水洗、続いて、空気調整機を停止させ、100ppm次亜塩素酸ナトリウム、100ppmヨードホルム、および両性界面活性剤の3種の薬剤を1日1種類ずつ交互に噴霧し、これを計4サイクル繰り

返した。

この飼育室を再開するに先立ち、清浄化されたことを確認するため、モニター動物によるPcの検査を実施した。飼育室に、モニター動物として、Pcの汚染が認められていない繁殖コロニー由来のヌードマウスを導入すると同時に、陽性コントロールとして、Pcに感染したヌードマウスを隔離飼育室に封じ込め、この飼育室に上記の繁殖コロニー由来のヌードマウス及びC3H/Heマウスを導入した。4か月の飼育観察の後、Pcに対する検査をおこなったところ、死後腐敗して検査の出来なかった1個体を除いて、陽性コントロールのヌードマウス9例全てからPcが検出されたのに対し、飼育室の全てのヌードマウスからはPcが検出されなかった(表1)。この検査成績より、全動物を淘汰し上記の消毒作業を実施することによって、汚染飼育室のPcが排除されたことが確認されたわけである。

著者らの施設では、この汚染事故を契機として、微生物モニタリングの項目にPcに対する検査を追加するようになったが、幸いなことに、この事故以来、一度の汚染も見られていない。

表1.モニターおよび繁殖コロニーのヌードマウス、C3H/Heマウスにおける
Pcの検索

室名	動物	肉眼所見	スタンプ法	集シスト法	病理標本
SPF-1a	ヌードマウス	0/10	0/10	0/10	0/10
隔離室b	ヌードマウス	0/8	8/8	9/9	8/8
	C3H/He	0/10	0/10	0/10	0/10
繁殖コロニーc	ヌードマウス	0/4	0/4	0/4	0/4

a: 消毒後、4か月間モニター動物を収容

b: Pc感染ヌードマウスを隔離後、4か月間モニター動物を収容

c: Pc汚染歴のないSPFコロニーの繁殖室

ヌードマウスによる感染実験系

現在、ヒトのPCP研究のモデルとして、マウス、ラット、フェットレット等を用いた感染動物実験が広く行なわれてはいる(10-12, 32)。しかしながら、これら多くの実験系は、潜在感染した動物にコーチゾンを投与することによりPCPを顕性化させるものであり、再現性や微生物統御の観点から問題がある。そこで、新たに、より有用なモデル系を構築すべく、Pc感染ヌードマウスを封じ込めたアイソレーターにPc非感染ヌードマウスを導入し、

その内部で自然同居感染させる方法を検討してみた。

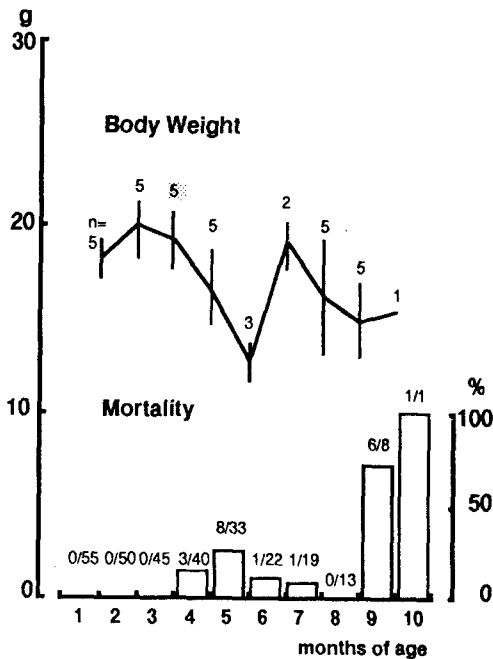


図1. P c 感染ヌードマウスの経時的な体重変化および死亡率

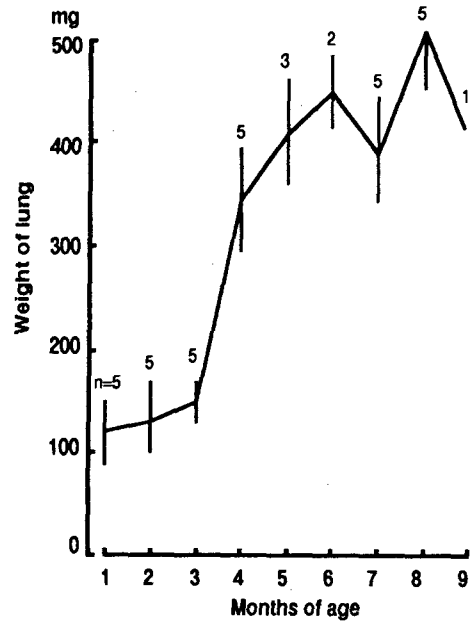


図2. P c 感染ヌードマウスの経時的な肺重量の変化

図1は、PCP発症マウスと同居したBALB/c-nu/nuマウスの体重変化と死亡率を表したものである。これらの動物は、同居後3カ月までは外見上何ら異常を示さずに経過したが、4カ月から一部の個体で顕著に体重が減少し、消瘦していることが気付かれるようになった。その後、消瘦が見られた個体に死亡例が現われ、5カ月における死亡率は33匹中8例(24.2%)に達した。その後、死亡個体は8カ月まで散発的に出現したが、9カ月に8匹中6例(75%)の個体が、そして10カ月に全個体が死亡した。一方、動物の肺は、同居後3カ月までは肉眼的に何ら異常を示さず経過したが、4カ月に5例中3例に肉ヅク肝様病変が観察され、顕著な肺重量の増加が始まった(図2)。6カ月には全例で明かな退縮不良を示すようになり、色調もアメ色から白色を帯びるようになった。また、同居後2カ月の動物から、集シスト法によって全例に若干の嚢子が検出され始め、3カ月以降はその他の検査においても多数の嚢子が検出されるようになった。以上の結果より、非感染マウスがPCP発症マウスと接触すると、同居後2カ月の時期までにP c 感染が容易に成立すること、また、肺炎の症状を発症させるまでには、同居後少なくとも4カ月以上の期間が必要であり、P c の感染経過は極めて緩慢であることが明かにされたわけである。

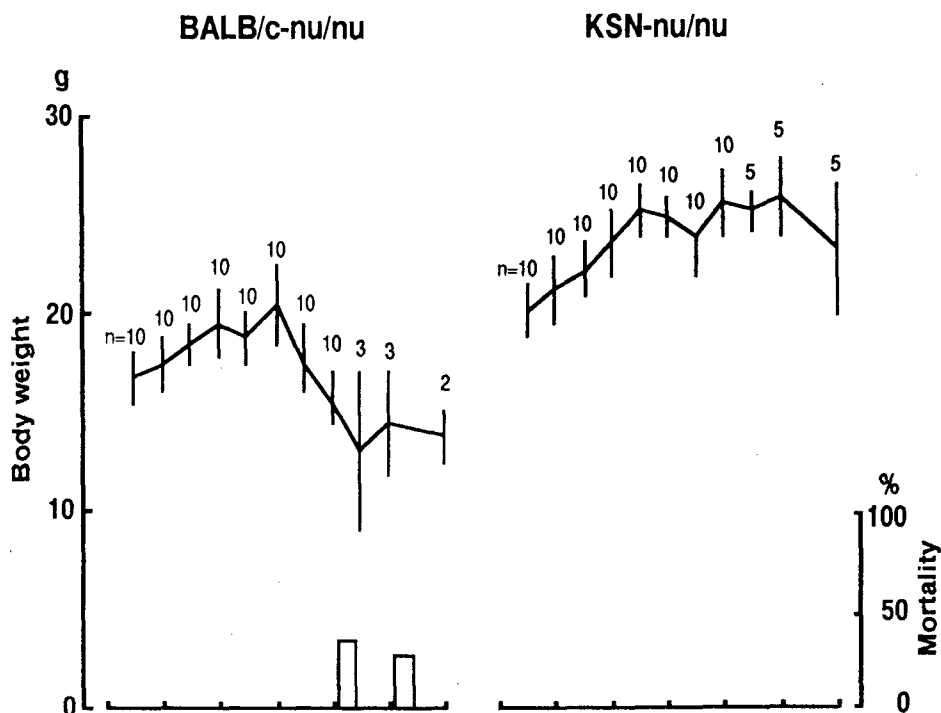


図3. P c 感染ヌードマウスにおける体重と死亡率の経時的変化 (系統差)

続いて、上記の感染経過に、系統差が観察されるか否かを検討してみた (図3)。BALB/c-nu/nu マウスでは、体重、死亡率ともに、上記と同様に推移し、14週目より顕著な体重の減少が始まり、死亡例も16週目に10匹中1例 (10%)、18週目に5匹中2例 (40%)、24週目に3匹中1例 (33.3%) に観察された。一方、KSN(nu/nu) マウスは、24週目までに死亡した個体は1例もなく、また、体重減少も、24週目に5匹中1例に見られ始めたのみで、残り4個体には全く観察されなかった。しかしながら、両系統ともに、16週目と24週目の両系統の肺に全例P cの嚢子が多数観察されている。上記の感染経過の系統差は、肺内におけるP c数に相関するものでなく、肺組織の炎症度の違いに起因するものである。換言すれば、PCPの直接の死因は、肺腔内に充満するP cが引き起こすACブロックではなく、むしろ、間質への細胞浸潤、それに引き続く肺の器質化、各種メディエーターによる組織障害による呼吸不全であることが理解される。この結果は、PCPの治療に抗炎症剤が有効であることを示唆しており、事実、現在では、重症のPCPに対しては、ステロイド剤が必須であるとされている (2)。

全国の動物実験施設に対する汚染調査

PCPの自然発症例が、Ueda らによって報告されて以来、日本と欧米のいくつかのヌードマウスやヌードラット、SCIDマウスコロニーでPcによる汚染例が見つけられている(3-7)。特に、実験動物中央研究所がSCIDマウスを導入した当初、PCPにより繁殖が著しく阻害され、その後、受精卵移植によってPc感染を清浄化することで繁殖効率を改善せしめたことは、注目すべきである。ただし、この様な実験動物コロニーにおけるPCP発症例は知られていたが、著者がPc研究を始めたころには、実験動物の飼育施設における汚染状況を十分把握し得る情報がなかった。そこで、全国のヌードマウス飼育施設を主な対象としてPcの汚染調査を実施したわけである(6)。

調査対象として、全国の医科系大学の共同利用動物実験施設から44大学の施設を選び、調査方法としては、Pcがフリーであることが確認されているヌードマウスをモニター動物として分配、それぞれの調査施設にて6カ月間飼育した後、京都大学においてPcの検査を行なった。4カ月以上飼育されたモニター動物の検査成績をもとに集計した結果は、表2に示した通りである。43調査施設に分配した435匹のモニター動物のうち、実に12施設(27.9%)の89匹(20.5%)の肺からPcが検出された。HVJ感染やマイコプラズマ感染がその群において1例も報告されなかったことから比べると、このPc汚染率は高い価であると言えよう。一般的に、ヌードマウスの消耗病の大半がMHV感染によるものと言われているが、長期飼育の際に出現した慢性的な消耗病の際には、むしろPc汚染の可能性を疑うのが妥当である。

続いて、Pcの汚染防止に効果的な飼育方法を検討する目的で、汚染状況と飼育管理方法を比較してみる。飼育管理方法とPc感染の因果関係については、各飼育管理方法が複雑に協同して働いているため解析は困難であるが、項目の細目に属する数が適当に分散して、かつ因果関係の疑いやすい飼育室内の収容動物の相違と飼育装置の相違について検討したものが、表3である。69例の有効調査飼育室のうち17室(24.6%)がPc陽性であったが、収容動物がSPF動物($10/57 = 17.5\%$)であるか、あるいはコンベンショナル動物か($7/12 = 58.3\%$)でその陽性率は大きく異なり、予測される通りであろう。また、SPF動物をその飼育室内で自家繁殖している場合は、市販のSPFのみを飼育している群と比較した場合、高いPc陽性率であり、ヌードマウスやSCIDマウスの自家繁殖を行う場合には、通常のSPF飼育実験室よりも一段と厳格な管理体制をとらねばならないことを示唆している。飼育装置についてみると、エアフローラック使用群と普通の飼育棚を使用している群とを比較すると前者が $10/53 (18.9\%)$ で、後者が $7/16 (43.8\%)$ と大きく異なり、その他の要因を加味する必要はあるが、エアフローラックの有効性が考えられる。特に、フィルターキャップを装着したケージをエアフローラックに収容してい

表2 動物実験施設等及びモニターヌードマウスあたりのPc陽性率

動物実験施設等	ヌードマウス
12/43 ^a (27.9%)	89/435 ^b (20.5%)

^a, ^b: モニターヌードマウスの飼育期間が4カ月以上で、集シスト法によるPc検査を行った動物実験施設等とヌードマウス

表3 飼育環境の相違によるPc陽性率の比較

	調査飼育室数	Pc陽性飼育室数
(A) 飼育室内の収容動物 ^a		
(1) 実験動物生産業者から購入したSPFマウスの飼育室	35	3 (8.6 %)
(2) 自家繁殖されているSPFマウスの飼育室	22	7 (31.8 %)
(3) コンベンショナル小動物の飼育室	12	7 (58.3 %)
(合計)	69	17 (24.6 %)
(B) 飼育装置		
(1) アイソレータ	7	1 (14.2 %)
(2) エアーフローラック	53	10 (18.9 %)
フィルターキャップあり	16	0 (0.0 %)
同上 なし	37	10 (27.0 %)
(3) 普通の飼育棚	16	7 (43.8 %)
フィルターキャップあり	4	2 (50.0 %)
同上 なし	12	5 (41.7 %)
(合計)	76	18 (23.7 %)

^a: (A) の分類ではアイソレータ群を除外

る16例の飼育群では、いずれにもPcは検出されなかったことは特筆すべきである。

カリニ肺炎の動物モデルとヒト臨床医学

先にも述べたように、著者らは、アイソレーターを用いたPcの同居感染実験系を既に確立している。カリニ肺炎の動物モデルのヒト臨床医学への応用として、ここでは、抗Pc剤の有用性の評価について記述することにする。本邦においても、抗Pc剤としてST合剤とペンタミジンが認可されているが、いずれも毒性が比較的強く、副作用が出現した場合に備え、それらの代替薬を用意することが重要である(2)。したがって、抗Pc剤の有用性の評価は、臨床医学上、極めて重要であると考えられる。

ベナノマイシンは、明治製菓が開発した抗真菌活性、抗HIV活性を持つ化合物で、真菌の細胞壁のマンナン部位にカルシウム依存的に結合し、殺菌的に作用するとされている。後に述べるように、Pcは原虫でなく真菌であること、またPcの総タンパク質の70%が高マンノース型の糖タンパク質であることを考え合わせ、ベナノマイシンに抗Pc活性があるか否かを検討する目的で、著者らの感染実験系を応用したのである。プレリミナリーな結果を表しているのが、図4および図5である。いずれもが、ベナノマイシン100mg/kg投与群と非投与群を比較したものであるが、両者に有為な差が認められる。Pcの*in vitro*での培養法は今だ確立されておらず、抗Pc剤のスクリーニング方法としては感染実験系で評価することが必要であり、ヌードマウスを用いた著者らの系は極めて有用であると言えよう。

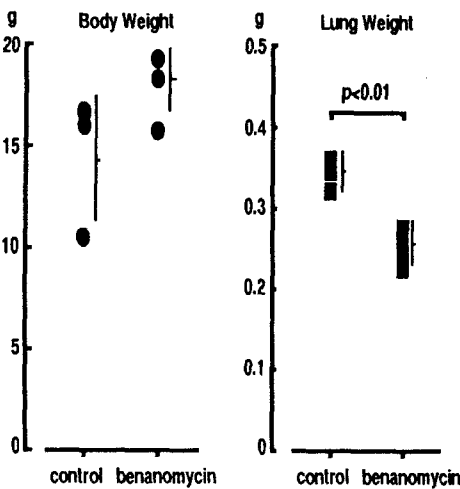


図4. PCP発症ヌードマウスに対するベナノマイシン投与の効果(体重および肺重量)

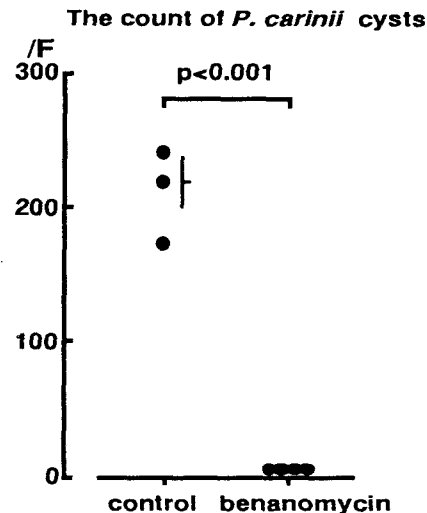


図5. PCP発症ヌードマウスに対するベナノマイシン投与の効果(シスト数)

III. ニューモシスチス・カリニの分子生物学

ニューモシスチス・カリニの系統分類

古くから、Pcが原虫であるのか、真菌であるのか、論争がなされていた。このような場合、近年は、種間に保存的な遺伝子の塩基配列を比較して系統樹を作成する分子進化的な方法が用いられる。Pcにおいても、複数のグループが、リボソームDNAやリボソームRNAの塩基配列を決定して、いずれもが真菌説の方がより確からしいとしている(13-15)。例えば、Watanabeらは、5SリボソームRNAの塩基配列を類似性マトリックスで解析した結果、典型的な原虫ではなく、原虫と真菌の中間に位置すると結論づけた。著者は、若干の塩基配列の誤りを指摘して、上記の結果を基本的に支持している(16)。

原虫説の最も重要な根拠として、PCPの治療にST合剤やペンタミジンが良く反応することが挙げられよう。しかしながら、ST合剤は広範囲な抗菌スペクトラムをもつ薬剤で、決して原虫説の根拠にはなり得ない。むしろ、ST合剤の標的分子と考えられるdihydrofolate reductase(DHFR)やthymidilate synthase(TS)遺伝子の解析結果によると(17、18)、Pcにおいては両遺伝子が同一染色体に存在せず、原虫の特徴であるDHFR-TS分子の性質(両活性の機能を同一分子が担う)から遠くはなれたものになっている。現在のところ、原虫説を支持する強力な根拠はないと言えよう。

表面抗原MSG遺伝子のクローニング

Pcの細胞表面には、MSG(major surface glycoprotein)と呼ばれる105～120kDaの糖タンパク質が多量に発現しており、強い抗原性を保持している(19-24)。この分子はハイマンノース型の糖鎖に修飾されており、これが肺胞マクロファージのマンノース・レセプターに認識され、マクロファージによる貪食を開始させると考えられている(25)。さらに、正常宿主のPc排除には、MSGを認識するT細胞の関与することが明かにされており(26)、MSGが宿主免疫防御機構の標的として重要な分子であることが推測される。これら免疫学的知見の他にも、MSGの別の機能として、肺胞上皮のフィブロネクチンを介して、Pcを上皮細胞と接着させるとの報告がなされており(27、28)、Pc感染時においても中心的役割を演じることが想定されている。以上のことから、MSGの分子構造と機能を明かにする目的で、MSG遺伝子のクローニングを行なったのである(29、30)。

まず、ランダムプライマーで合成したcDNAからPcの遺伝子発現ライブラリーを作製し、抗MSGモノクローナル抗体にてimmunoscreeingした。その結果、5つの陽性クローンが得られた。興味深いのは、これら5つのクローンが、シークエンス解析によって3つのグループに分類され、MSGの多型性が証明されたことである。表面抗原の可変性は、*Neisseria gonorrhoeae*のような原核生物

から、トリパノソーマのような寄生性原虫まで、広く観察されている事柄ではある。しかし、トリパノソーマ以外の病原微生物と同様、P cについても、この表面抗原の変異がどのような意義を持つものなのか不明である。ただ、DNAレベルの相同率 (83-87%) よりアミノ酸レベルの相同率 (65-76%) が低くなっていることから、MSGの変異が生存に有利に働く可能性が予想される。

続いて、N端特異的なプローブで、オリゴ (dT) プライマーを用いて合成したcDNAライブラリーをスクリーニングしたところ、完全長のクローンが得られた。このクローンには端から333番目にKozak's ruleに従う開始コドンが存在し、そこから1,076残基のポリペプチドをコードするopen reading frameが始まっている。このポリペプチドは、(1) 分子量が120,765Daであり、(2) C端に疎水性領域が存在して、ここで細胞膜と結合すると考えられること、(3) その他の領域は親水性であり、膜上に存在することが示唆されること、(4) 少なくとも4つのN-linked glycosylation siteを持つこと、などの特徴を持つ。注目すべきは、 α ヘリックス上で59残基のシステインが存在し、異なるグループに属するMSG間でその位置が保存されていることである。システインの多くは7残基ごとに現われており、立体的に隣り合った α ヘリックス間でS-S結合することが推測され、MSGは細胞膜上でコンパクトに存在すると予想される。

なお、参考までに、本邦のラットから分離されたP c、米国のラットから分離されたP c (31) およびフェレットから分離されたP c (32) の間で、MSGのアミノ酸配列を比較した結果を表4に示す。ラットP cのMSG間では高い相同性を示すのに対し、ラットP cとフェレットP cの間では、大きな相違が見られる。感染成立に重要な働きをされると考えられるP cの糖タンパク質に、感染宿種間で大きな違いが見られることは、違った宿種間ではP cの交差感染が制限される可能性を暗示し、実験動物学上、興味深い知見と言えよう。

組替えMSG抗原の微生物モニタリングへの応用

免疫能が正常なラットにP cが感染すると、最も早期に抗MSG抗体が出現することから(19-24)、この抗原を微生物モニタリングのための血清検査に使用するのが良いと思われる。しかしながら、P cの培養法が確立されていない現在、直接P cから大量のMSG抗原を調製することは不可能である。そこで、大腸菌に組替えMSG抗原を発現させ、その抗体反応性について検討してみたわけである。

まず、ウェスタンブロット法にて解析したところ(表5)、ラット由来のP cで免疫したウサギ抗体やP cに自然感染した免疫機能の正常なラットの血清はP cのMSGのみならず、大腸菌で発現させた組み換えMSG抗原とも反応した。さらに、マウス由来のP cで免疫したマウス抗体も、P cのMSGと組み換

表4. MSG遺伝子間のヌクレオチドおよび
アミノ酸レベルの相同性^a

	MSG1	MSG2	MSG3	MSG5	MSG100	gp116 ^b	gpA ^c
MSG1	1,004	83	85	86	86	89	57
MSG2	67	726	85	86	82	85	59
MSG3	68	70	728	84	84	85	57
MSG5	74	73	65	1,076	87	88	57
MSG100	73	66	68	76	1,083	86	58
gp116	80	72	69	78	74	1,089	57
gpA	33	36	35	32	34	34	790

^a 網掛けを施した対角線上の数値は、各MSGのアミノ酸残基数を表す。対角線の左下部の数値は、一致するアミノ酸残基の割合(%)である。対角線の右上部の数値は、一致するヌクレオチドの割合(%)である。

^b 米国のラットから分離したPc、参考文献(31)

^c フェレットから分離したPc、参考文献(32)

えMSG抗原の両方に反応した。しかし、PCPの治療後3週目のAIDS患者から得た血清は、PcのMSGには反応したが、組み換えMSG抗原には反応しなかった。したがって、この組替え抗原を使用することにより、ラットおよびマウスの微生物モニタリングも可能と考えられる。今後、抗体検出法の簡便化をはかり、多くの血清検体を用いて、実際に有用性を検証することが望まれよう。

また、上記の結果は、ヒト、マウス、ラットに感染するPcの間には、MSGの抗原性に変異が存在するものの、共通のエピトープも存在すること、また、ラットPcとヒトPcの遺伝的隔たりは、ラットPcとマウスPcとの隔たりより大きい可能性も示唆している。

ニューモシスチス・カリニのゲノム解析

パルスフィールド電気泳動法は、巨大なDNAを分離することが可能な電気泳動法である。この方法でPcの染色体を分析したところ、Pcゲノムは、400-700Mbpの範囲に10数本存在することが明かとなった(30)。特に、Pcのゲノムが約7Mbpであることが判明したことは、強調すべきである。この大きさは、近縁の*Saccharomyces cerevisiae*のゲノムの大きさ(20Mbp)と比較し、約3分の1の大きさになっている。おそらく、Pcが宿種に依存性を高めていった進化の過程で、物質代謝に関連する遺伝子が捨てられ、このような小さなゲノムになったのであろう。Pcの培養が不可能なことも、こ

表5. 様々な宿主由来の血清に対する組み換えMSG抗原の抗体反応性^a

血清	抗体反応性	
	ラットPcから直接精製したMSG抗原	組み換えMSG抗原(MSG1)
ウサギ抗組み換えMSG ^b	+	+
ウサギ抗ラットPc-MSG ^c	+	+
ラット抗ラットPc-MSG ^d	+	+
マウス抗マウスPc-MSG ^e	+	+
ヒト抗ヒトPc-MSG ^f	+/-	-

^a ウェスタンブロット解析により判定された。

^b 組み換えMSG (MSG1) を免疫原にして作製したウサギポリクローナル抗体。

^c Endo-F処理したラットPc-MSGを免疫原にして作製したウサギポリクローナル抗体。

^d 血清は、ラットを用いて感染動物実験を行っている部屋で1か月間以上飼育したモニター動物（免疫能の正常なラット、F344/N）から得られた。これらの動物において、PCR法の検査によって、潜在感染が成立していることを確かめている。

^e 抗血清は、マウスPcをマウスに免疫して得られた

^f 抗Pc剤投与後、PCPより回復した5人のAIDS患者より、血清を得た。5人分すべての血清が、80 kDaのヒトPc-MSGを認識した。そのうちの1人の血清が、特異的にラットPc-MSGを認識したが、残り4人の血清はラットPc-MSGと反応しなかった。また、すべての血清は組み換えMSG抗原と反応しなかった

の考え方で説明し得る。近年、DNA工学が驚異的に進歩したことから、Pcのゲノムプロジェクトも夢物語ではなくなっている。この方法論で、培養が不可能なPcの代謝系を究明することが可能となろうし、そうなれば、代謝系に参与する重要な酵素を標的点とした新規の薬剤の開発も容易になろう。今後、Pcのゲノムプロジェクトは、Pcに対する基礎研究と臨床研究との接点になり得ることが期待される。

なお、上記のMSGの多型性については、パルスフィールド電気泳動を用いた染色体レベルの遺伝子解析によって、同定できるすべての染色体上にMSG遺伝子が存在すること（30）、また、Pcゲノム上でのMSG遺伝子構造を解析した結果、確かにMSG遺伝子間のスペーサー領域が存在することから（30）、Pcゲノム上に既に多型を示す遺伝子群が存在すると考えるのが自然であり、それぞれの遺伝子が一緒に発現されてMSGの多型性が作り出されるものと解釈するのが良いと思われる（図6）。

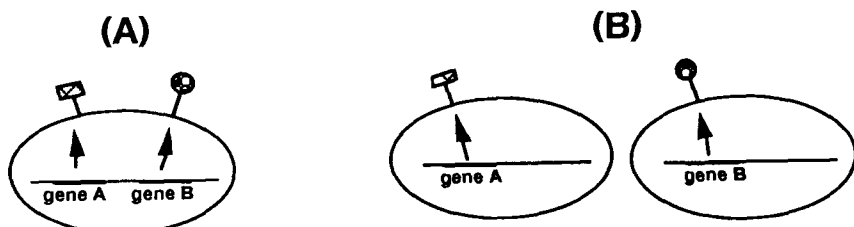


図 6. MSG 多型性の発現機構についてのモデル。

(A) それぞれの虫体が、多型を示す全てのMSG遺伝子群を持つ場合。

(B) それぞれの虫体間でMSG遺伝子に変異が見られ、全体として多型性が観察される場合。

IV. ニューモシスチス・カリニ肺炎のPCR診断

動物検体への応用

PCR (Polymerase chain reaction) 法は、短時間で特定のDNA断片を100万倍以上に増幅するのが可能な方法で、培養のできないPcの検出にも適用し得る。そこで、Pcの5SリボソーマルDNA (rDNA) 配列を増幅するPCR法を確立したわけである(16)。5SrDNAの塩基配列は、Pcゲノム上に重複して存在することから、この領域を増幅するPCR法は高感度のPc検出系となり得ることが予想される。

実際に試してみると、Pc感染ラット肺DNAからは、例外なく、PCRで120bpの産物が検出されるのに対し、非感染ラット肺DNAからは、いずれも増幅が見られなかった。また、ラットPcのみならず、抗原性に相違の見られるマウスPcやヒトPcからも、同様の結果を得ることができた。すなわち、Pc感染マウス肺やPCPヒト剖検肺からは、PCRで120bpの産物が検出されるのに対し、非感染マウス肺やPCPと無関係な剖検肺からは、増幅が見られなかった。特筆すべきは、 10^2 の虫体しか含まないPCP発症ヌードマウスの肺切片や、胸腺を持つPc潜在感染マウスの肺胞洗浄液からも、容易に増幅が確認されることである。この結果は、PCR法の高い感度を示すものと考えられる。事実、PCR法の検出限界を定量的に検討したところ、 10^0 オーダーの虫体、すなわち数匹分の虫体DNAからも、エチジウムブロマイド染色のみで検出が可能であった。また、特異性についても、*Candida albicans*、*Candida glabrata*、*Aspergillus fumigatus*、*Cryptococcus neoformans*の病原性真菌や実験動物の呼吸器感染症を引き起こす *Corynebacterium kutscheri*、*Pasteurella pneumotropica*、*Bordetella bronchiseptica*とも交差反応を起こさないことが証明された。

ところで、ラットPcや独立した12のマウスPcの分離株(既に述べた汚染調査の際に集めたもの)、および3人のPCP患者剖検肺から増幅された

PCR産物の塩基配列は、すべて同一であった。このことは、抗原性に相違の見られるマウスPc、ラットPc、ヒトPcの間でも、5SrDNA配列に関しては保存されていることを示すものである。

ヒト臨床検体への応用

上記で確立したPCR法によるPc検出系は、実のところ、実験動物学領域で必ずしも必須のものと言えない。今まで述べてきたように、実験動物学領域では、従来の形態学的方法で十分に対応し得るからである。むしろ、PCR法の確立の意義は、ヒト臨床検体へ応用するためのプレリミナリーな実験となっていることにある。

表6は、実際のST合剤の治験において、喀痰検体を材料にした時のPc検出率を、形態学的方法とPCR法との間で比較したものである。13例のPCP症例のうち、PCR法による検査でPc陽性となったのは9例であった。したがって、PCR法による検査の検出率は69%ということになる。一方、PCP症例から除外された12例には、PCRによるPc陽性例はなかった。したがって、PCR法によるPc検査の特異性は100%ということになる。これらの結果と比較し、従来の形態学的検査では、13例のPCP症例のうちPc検出例は1例のみであった。すなわち、検出率は8%であった。このことから、喀痰を材料とした場合、PCR法を用いることによって、従来の形態学的検査法より統計学的に有意に診断率を向上させ得ることが結論された（McNemar's Q test; $P<0.05$, $\chi^2=6.285$ ）。

表6. PCR法による検査と形態学的検査の比較

患者内訳	PCR		形態学的検査	
	+	-	+	-
PCP 確診例、 偽診例	9	4	1	12
非PCP	0	12	0	12

環境から得た検体への応用

鋭敏なPcの検出系がなかったために、直接Pcの動態を追跡した疫学的研究は皆無であった。そこで、極めて高感度な検出系であるPCR法を用いて、まったく知られていない環境中におけるPcの動態を解析してみた。

表7は、感染動物実験室内の様々な領域から採取したスワップ検体に対し、

表7. スワップ検体に対するPCRの結果[1]

領域	陽性率
床1	3/3=100%
床2	3/3=100%
床3	3/3=100%
台車上	3/3=100%
後室	1/3= 33%
清浄側廊下	0/3= 0%
汚染側廊下	0/3= 0%

3回繰り返して行なった検査結果である。PCP発症動物が飼育されている部屋のような領域（床1、床2、床3、台車上）すべてのスワップ検体から、全回、Pcが検出された。この結果は、感染動物実験室内中のすみずみに、Pcが飛散していることを示すものであり、一旦Pcが動物飼育室に侵入すると、容易に部屋全体に汚染の広がることが示唆された。

表8. スワップ検体に対するPCRの結果[2]

飼育装置	陽性率
エアーフローラック	0/3= 0%
エアーフローラックのプレフィルター	3/3=100%
フィルターキャップを装着したケージ	0/3= 0%
通常のラック	3/3=100%

また、表8は、感染動物実験室内に設置されている各種飼育装置内から採取したスワップ検体に対し、3回繰り返して行なったPCR法による検査結果である。通常のラック上からは、3回すべてに、Pcが検出されている。これに対し、エアーフローラック内やフィルターキャップを付けたケージ内では、いずれもがPCR法による検査の検出限界以下の状態にあった。実際にPcがフィルターにトラップされているか否かを調べるため、プレフィルターから得たスワップ検体に対しPCR法による検査を行なった結果、3回すべての検査でPcを検出している。

表9. ヌードラットの肺胞洗浄液からのPc検出

飼育装置		陽性率
エアーフローラック		0/2= 0%
通常のラック	フィルターキャップ有	2/2=100%
	フィルターキャップ無	4/4=100%

さらに、上記のPCR法による検査結果の信頼性を確認するため、また、PCR法による検査で検出されたPcに実際に感染性が保持されているか否かを検討するため、Pcフリーであることが確認されているヌードラットを培養器にみため、感染実験を行なった。すなわち、各飼育装置下で2カ月間飼育した後、肺胞洗浄液を採取、形態学的検査とPCR法による検査を行なった。その結果、通常のラック飼育群では4個体ともにPc陽性であったのに対し、エアーフローラック飼育群では2個体ともにPc陰性であった(表9)。このことから、PCR法によって検出されるPcに感染性が存在すること、Pcの感染予防にエアーフローラックが極めて有効なことが示唆された。一方、フィルターキャップを装着したケージ飼育群では、形態学的検査およびPCR法による検査で、肺胞洗浄液中でPcを検出した。したがって、フィルターキャップの有効性に関しては、今後、定量的な検査を試みて検討せねばならないと思われる。

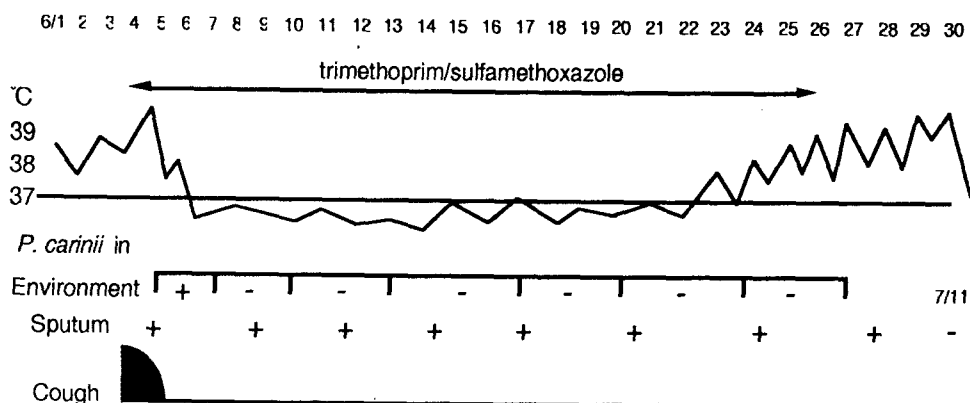


図7. 患者4の臨床経過と喀痰および環境中におけるPcの消長。
 喀痰および環境中におけるPcの消長は、PCR法により判定した。

最後に、上記で確立した方法を臨床の現場で応用し、PCP患者が入院中の病室について、Pcによる汚染状況を調査した結果を図7に示す。PCP患

者の周囲、特に咳嗽の存在する時期においては、実際にPcがばらまかれていることを表している。この結果は、ヒト臨床医学上極めて重要な意味を持っており、現在、医科学研究所においては、PCP発症患者とPCP非発症のimmunocompromised hostとは同室させないよう配慮している。

V. 今後の展望

著者が研究を始めた頃は、Pcについての知見は実に限られたものであった。しかし、ここ7年余りで、Pcに関する多くの基礎的・臨床的知見が集積された。ここでは、未だに解決されていない問題点を提議したい。

1. Pcに対する消毒薬の評価が、現在、急務であるように思われる。著者らの経験した汚染事故については、全動物を淘汰したうえで、アルコール、次亜塩素酸、ヨードホルム、両性界面活性剤を使用して清浄化することができた。しかし、どの薬剤が最も効果的であるかは判定し得ない。実中研の伊藤らは、SCIDマウスの感染系を用い、定性的な消毒薬の評価を試みている。それによると、クレソール石鹼、ハイアミン、ヨードホルム、70%エタノール、アルサイド、マイクロカット全てに有効性が見られたという。なお、消毒薬についての問題は、実験動物学領域にとどまるものではなく、PCP患者の周囲にPcが排出されていることが明かとなった現在、ヒト臨床医学の分野においても極めて重要な問題である。
2. Pcの感染源を明確に把握する必要がある。PCP発症動物が感染源となることは明かであるが、ではPCP非発症のPc潜在感染動物ではどうであるのか。また、他種動物間で交差感染するか否かの直接的証明も是非ほしい。言うまでもなく、これらの問題もヒト臨床医学の分野において、すこぶる重要な問題である。
3. 免疫能の正常な宿種において、何がPc感染に対する防御機構の主役となっているのか。この問題は、Pcに対する微生物統御の範囲を設定する上で重要である。もちろん、ヒト臨床医学の分野においても、PCPを疑う必要のある集団を明かにする上で重要である。

謝辞

ここに紹介した研究は、京都大学医学部山田淳三先生、芹川忠夫先生をはじめ、東京大学医科学研究所中村義一先生、岡慎一先生、その他多くの先生方の御指導によるものである。この場を借りて感謝申し上げます。

参考文献

1. 吉田幸雄 (1992). 図説人体寄生虫学. 南山堂.
2. 北田一博 (1993). 「今日のAIDS」ニューモシスチス・カリニ. モダンフィジシャン. 13:1279-1281.
3. Ueda, K., Goto, Y., Yamazaki, S. and Fujiwara, K. (1977). Chronic fatal pneumocystosis in nude mouse. Japan. J. Exp. Med. 47:475-482.
4. Weir, E. C., Brownstein, D. G. and Barthold, S. W. (1986). Spontaneous wasting disease in nude mice associated with *Pneumocystis carinii* infection. Lab. Anim. Sci. 36:140-144.
5. Walzer, P. D., Kim, C. K., Linke, M. J., Pogue, C. L., Huerkamp, M. J., Chrisp, C. E., Lerro, A. V., Wixson, S. K., Hall, E. and Shultz, L. D. (1989). Outbreaks of *Pneumocystis carinii* pneumonia in colonies of immunodeficient mice. Infect. Immun. 57:62-70.
6. Serikawa, T., Kitada, K., Muraguchi, T. and Yamada, J. (1991) A survey of *Pneumocystis carinii* infection in research mouse colonies in Japan. Lab. Anim. Sci. 41:411-414.
7. Deerberg, F., Pohlmeyer, G., Wullenweber, M. and Hedrich, H. J. (1994) History and pathology of an enzootic *Pneumocystis carinii* pneumonia in athymic Han:RNU and Han:NZNU rats. J. Exp. Anim. Sci. 36:1-11.
8. Selik, R. M., Starcher, E. T. and Curran, J. W. (1987). Opportunistic diseases reported in AIDS patients: frequencies, associations, and trends. AIDS 1:175-182.
9. Telzak, E. E., Cote, R. J., Gold, J. W., Campbell, M. S. W. and Armstrong, D. (1990). Extrapulmonary *Pneumocystis carinii* infections. Rev. Infect. Dis. 12:380-386.
10. Furuta, T. and Ueda, K. (1987). Intra- and inter-species transmission and antigenic difference of *Pneumocystis carinii* derived from rat and mouse. Jpn. J. Exp. Med. 57: 11-17.
11. Walzer, P. D. and Linke, M. J. (1987). A comparison of antigenic characteristics of rat and human *Pneumocystis carinii* by immunoblotting. J. Immunol. 138: 2257-2265.
12. Kovacs, J. A., Halpern, J. L., Lundgren, B., Swan, J. C., Parrillo, J. E. and Masur, H. (1989). Monoclonal antibodies to *Pneumocystis carinii*: identification of specific antigens and characterization of antigenic differences between rat and human isolates. J. Infect. Dis. 159: 60-70.
13. Edman, J. C., Kovacs, J. A., Masur, H., Santi, D. V., Elwood, H. J. and Sagin, M. L. (1988) Ribosomal RNA sequence shows *Pneumocystis carinii* to

- be a member of the fungi. *Nature*. 334:519-522.
14. Watanabe, J., Hori, H., Tanabe, K. and Y. Nakamura. (1989). Phylogenetic association of *Pneumocystis carinii* with the 'Rhizopoda/Myxomycota/Zygomycota group' indicated by comparison of 5S ribosomal RNA sequences. *Mol. Biochem. Parasitol.* 32:163-168.
 15. Stringer, S. L., Stringer J. R., Blase, M. A., Walzer P. D. and Cushion, M. T. (1989) *Pneumocystis carinii*: sequence from ribosomal RNA implies a close relationship with fungi. *Exp. Parasitol.* 68:450-461.
 16. Kitada, K., Oka, S., Kimura, S. Shimada, K., Serikawa, T., Yamada, J., Tsunoo, H., Egawa, K. and Nakamura, Y. (1991) Detection of *Pneumocystis carinii* sequences by polymerase chain reaction: animal models and clinical application to noninvasive specimens. *J. Clin. Microbiol.* 29:1985-1990.
 17. Edman, J. C., Edman, U., Lundgren, B and Santi, D. V. (1989) Isolation and expression of the *Pneumocystis carinii* thymidilate synthase gene. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 86:6503-6507.
 18. Edman, J. C., Edman, U., Cao, M., Lundgren, B., Kovacs, J. A. and Santi, D. V. (1989) Isolation and expression of the *Pneumocystis carinii* dihydrofolate reductase gene. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 86:8625-8629.
 19. Tanabe, K., Takasaki, S., Watanabe, J., Kobata, A., Egawa, K., and Nakamura, Y. (1989) Glycoproteins composed of major surface immunodominants of *Pneumocystis carinii*. *Infect. Immun.* 57:1363-1368.
 20. Radding, J. A., Armstrong, M. Y. K., Ullu, E., and Richard, F. F. (1989) Identification and isolation of major cell surface glycoprotein of *Pneumocystis carinii*. *Infect. Immun.* 57:2149-2157.
 21. Gigliotti, F., Stokes, D. C., Cheatham, A.B., Davis, D. S. and Hughes, W. T. (1986) Development of murine monoclonal antibodies to *Pneumocystis carinii*. *J. Infect. Dis.* 154:315-322.
 22. Graves, D. C., McNabb, S. J. N., Ivey, M. H. and Worley, M. A. (1986) Development and characterization of monoclonal antibodies to *Pneumocystis carinii*. *Infect. Immun.* 51:125-133.
 23. Lee, C., Bolinger, C. D., Bartlett, M. S., Kohler, R. B., Wide, C. E., and Smith, J. W. (1986) Production of monoclonal antibody against *Pneumocystis carinii* by using a hybrid of rat spleen and mouse myeloma cells. *J. Clin. Microbiol.* 23:505-508.
 24. Walzer, P. D., and Linke, M. J. (1987) A comparison of the antigenic characteristics of rat and human *Pneumocystis carinii* by immunoblotting. *J. Immunol.* 138:2257-2265.

25. Ezekowitz, R. A. B., Williams, D. J., Koziel, H., Armstrong, M. Y. K., Warner, A., Richards, F. F. and Rose, R. M. (1991) Uptake of *Pneumocystis carinii* mediated by the macrophage mannose receptor. *Nature* 351:155-158.
26. Fisher, D. J., Gigliotti, F., Zauderer, M. and Harmsen, A. G. (1991) Specific T-cell response to *Pneumocystis carinii* surface glycoprotein (gp120) after immunization and natural infection. *Infect. Immun.* 59:3372-3376.
27. Pottratz, S. T., and Martin W. J. II. (1990) Mechanism of *Pneumocystis carinii* attachment to cultured rat alveolar macrophages. *J. Clin. Invest.* 86:1678-1683.
28. Pottratz, S. T., Paulsrud, J., Smith, J. S., and Martin W. J. II. (1991) *Pneumocystis carinii* attachment to cultured lung cells by *Pneumocystis* gp120, a fibronectin binding protein. *J. Clin. Invest.* 88:403-407.
29. Wada, M., Kitada, K., Saito, M., Egawa K. and Nakmura, Y. (1993) cDNA sequence diversity and genomic clusters of major surface glycoprotein genes of *Pneumocystis carinii*. *J. Infect. Dis.* 168:979-985.
30. Kitada, K., Wada, M. and Nakmura, Y. (1994) Multi-gene family of major surface glycoproteins of *Pneumocystis carinii*: full-size cDNA cloning and expression. *DNA Res.* 1:57-66.
31. Kovacs, J. A., Powel, F., Edman, J. C., Lundgren, B., Martinez, A., Drew, B. and Angus, C. W. (1993). Multiple genes encode the major surface glycoprotein of *Pneumocystis carinii*. *J. Biol. Chem.* 268: 6034-6040.
32. Haidaris, P. J., Wright, T. W., Gigliotti, F. and Haidaris, C. G. (1992) Expression and characterization of a cDNA clone encoding an immunodominant surface glycoprotein of *Pneumocystis carinii*. *J. Infect. Dis.* 166: 1113-1123.

エキノкокスの生物学 ー包虫症の研究と実験動物の関わりー

大阪大学医学部附属動物実験施設 岡本宗裕

はじめに

関西に限らず北海道以外の地域では、エキノкокクス症（包虫症）という言葉を知り初めて聞く方も多いと思います。エキノкокクス症とは、エキノкокクスと呼ばれるサナダ虫の一種がヒトや家畜に寄生して引き起こす寄生虫病で、北海道ではその分布拡大が大きな問題となっています。今年8月には、旭川市内の動物園で飼育されていたゴリラからも感染が確認され、都市部においても確実に汚染が進行しており、その防遏対策が緊急の課題となっています。

実験動物に関わりのある寄生虫としては、*Entamoeba* や *Giardia* などの原虫、*Syphacia* や *Aspicularis* などの線虫、それから条虫では *Hymenolepis* などがよく知られています。また、最近では動物の管理が行き届いてきたためほとんど見られなくなっていますが、エキノкокクスと近縁な条虫としてネコから実験用の齧歯類に感染するネコ条虫(*Taenia taeniaeformis*)を記憶している方も多いと思います。後述する生活環からもわかるように、これらの寄生虫とは違ってエキノкокクスが実験用の動物に寄生することはほとんどありません。したがってエキノкокクスは、実験動物および実験動物技術者の健康管理という観点から問題になる寄生虫ではありません。しかし、培養によってエキノкокクスのすべての生活環を維持することはできないので、その研究において実験動物は欠かせないものとなっています。私は、北海道大学獣医学部に所属していた当時からこの寄生虫の研究を行って来ましたので、今回はその中から実験動物に関わるものについてお話ししたいと思います。前半ではこのエキノкокクスという寄生虫についての簡単な解説を、後半ではエキノкокクスの研究と実験動物の関わりについて、特に通常のウィルスや細菌に対するものとは少し異なった寄生虫虫卵に対するバイオハザード対策について取り上げようと思います。

1. エキノкокクスとは

分類：エキノкокクスと言うのは、扁形動物門(Platyhelminthes、プラナリア

がこれに属します)、条虫綱(Cestoda)、円葉目(Cyclophyllidea)、条虫科(Taeniidae)に属する条虫の属名で、正式には包条虫属(genus *Echinococcus* Rudolphi, 1801)となります。今までに、エキノコックス属として16種が報告されていますが、現在では次の4種に整理されています。

1) *E. granulosus* (Batsch, 1786) Rudolphi, 1801 単包条虫

終宿主：イヌ、中間宿主：ヒツジなどの有蹄類

2) *E. multilocularis* Leuckart, 1863 多包条虫

終宿主：キツネ、イヌ、中間宿主：野ネズミ（エゾヤチネズミなど）

3) *E. oligarthrus* (Diesing, 1863) Luhe, 1901

終宿主：ジャガー、ピューマ、中間宿主：パカ、アグーチー

4) *E. vogeli* Rausch & Bernstein, 1972

終宿主：ヤブイヌ、中間宿主：パカ

これらのなかで、後2種は分布が中南米に限局されています。単包条虫は、南北両半球に広く分布しており、日本でも成虫は発見されていませんが輸入家畜やヒトでの症例が散発しています。多包条虫は、北方圏を中心に北半球に分布しており、北海道で注目されているエキノコックスはこの多包条虫です。以下、特にことわらない限りエキノコックスと記述した場合、本種を意味することとします。

生活環：図1にエキノコックスの生活環を、図2に成虫の写真を示します。成虫は終宿主である肉食獣（多包条虫の場合は主にキツネですが）の小腸に寄生し、感染30日前後で最終片節中に虫卵が形成されます。他の条虫とは違って、エキノコックスの成虫は非常に小さく、2~4 mm 程度です。図2の成虫の写真の太い部分が最終片節で、中に見える丸いものが虫卵です。この最終片節は、虫卵が成熟すると虫体から離脱し、虫卵は糞便とともに終宿主の体外に排出されます。この虫卵が中間宿主である齧歯類に経口的に摂取されると、虫卵から幼虫が遊離し小腸粘膜に侵入後、門脈経由で肝臓に定着します。肝臓に達した幼虫は、シストに膨出し、その後芽出(budding)を繰り返して、多数の微小シストの集合体となります。好適な中間宿主（エゾヤチネズミなど）では、感染後60日で原頭節と呼ばれる成虫の頭部に当たる部分がシスト中に多数形成されます。図3は、実験的に感染させたラットの写真ですが、感染動物はこのように肝臓のみならず腹腔内にもシストの形成がみられ、数十万~数百万個の

原頭節を保有することになります。この写真の動物は、2次包虫症という方法で原頭節を腹腔内に移植したものであるので自然感染例ではありませんが、基本的にはこれと同じです。この原頭節を保有した齧歯類をキツネやイヌが補食すると、小腸で成虫となり、生活環が完成します。このように、終宿主は場合によっては一匹の野ネズミを補食しただけで数万～数十万匹の成虫の寄生を受けることになり、糞便とともに多量の虫卵を排出し環境を汚染します。

エキノコックス症：図1に示すように、ヒトや家畜は環境中の虫卵を偶然に経口的に摂取することによりエキノコックス症に罹患します。つまり、エキノコックス症とは多包条虫の幼虫の感染症であり、ヒトや家畜はちょうど生活環の中の齧歯類の位置を占めることになります。ただ、ヒトはエキノコックスの本来の宿主ではないので正常な発育が起こらず、原頭節の形成はほとんど見られません。この感染経路からもわかるように、ヒトが感染するのは虫卵からであり、感染野ネズミや患者からは絶対に感染しません。実際にヒトが虫卵から感染したときにどのような経過をたどるかを、図4に示しました。一般的にはこのようになかなか慢性的な経過をたどり、末期には図3のラットの例からも想像がつくように悪性腫瘍の様相を呈して死亡します。しかし、7才の感染例も見ついていますから経過にはかなり個人差があるようです。治療法についてですが、残念ながら薬物による治療はなく、外科的切除が唯一の根治療法です。したがって、早期発見、早期治療が原則でこれも悪性腫瘍と同様です。北海道で確認された新しい患者数の年度別の推移を表1に示します。

表1 北海道で確認された新しい患者数の推移

昭和21～41年	129	昭和50年	5	昭和59年	12
42	5	51	7	60	17
43	6	52	4	61	9
44	4	53	3	62	9
45	5	54	5	63	11
46	2	55	5	平成1年	14
47	8	56	4	2	19
48	9	57	6	3	6
49	8	58	6	4	9
平成4年度末の生存患者数			1 3 7 人		
平成4年度末の要観察者数			4 7 4 人 (5 4 人増)		

このように、意外と患者数は多くありませんが現在有効な治療法がないこと、近年増加の傾向がみられることもあり、北海道では大きな問題となっています。この患者数の増加傾向は、動物でのエキノコックス感染が確認された汚染地域の拡大とも一致しており、昭和57年の時点では道東の10市町村に限定されていた汚染地域が、平成4年度末には道内212市町村中189市町村にまで拡大しています。平成4年度に行ったエキノコックス症媒介動物の疫学調査の結果では、道内150市町村より集めた1004頭のキタキツネのうち202頭(20.1%)にエキノコックスの感染が認められています。北海道内のキタキツネも近年あきらかに増加しており、観光地などで餌をねだる姿をよく見かけます。しかし、5頭に1頭はエキノコックスの虫卵を排出している可能性があるということです。北海道観光に出かけたとき不用意にキツネにさわらないほうが無難でしょう。イヌの感染率は比較的低いのですが、キツネに比べヒトとの関係ははるかに密接ですから、ヒトへの感染源としては特に重要と思われます。このように日本では比較的稀な疾病ですが、世界的に見るとアラスカや旧ソ連などの北方圏では非常に重要な寄生虫病で、単包条虫とあわせてWHOにエキノコックス症の防遏対策のためのワーキンググループが設立されています。

2. エキノコックス症の研究と実験動物の関わり

一口にエキノコックス症の研究と言っても疫学、診断学からエキノコックス自体の生物学の研究まで多岐にわたっています。そこでここでは、ヒトへの唯一の感染源となる虫卵に関することに焦点を絞って話を進めたいと思います。図5にエキノコックスの虫卵の写真を示します。虫卵の直径はおよそ30 μ mで、細菌やウイルスに比べるとずいぶん大きいので一見扱い易そうな気がします。しかし、この虫卵にはいろいろと問題があります。

虫卵の抵抗性：一般に、寄生虫の虫卵は外部環境に対して抵抗性が強いとされています。回虫卵などは、外界で1年以上感染力を持続することが報告されています。虫卵を実験室内で扱う場合、どの様に処理すれば虫卵を殺滅できるかという情報は非常に重要です。エキノコックスの場合、虫卵はヒトにとって特に危険ですからこの情報は絶対に必要なわけですが、とにかく虫卵が危険なためこれらに関する実験はほとんど行われていません。そこで、エキノコックスに近縁のネコ条虫を用いて、虫卵の各種消毒薬に対する抵抗性を調べた結

果を表2に示しました。ネコ条虫は前述したようにエキノコックスとごく近縁な条虫で、その虫卵は図5に示したエキノコックスの虫卵と形態的には全く区別がつきません。

表2 ネコ条虫虫卵に対する各種消毒薬の効果

薬品名	処理時間			
	20分	2時間	4時間	24時間
100%エタノール		0	0	
50%イソプロパノール		117	72	
10%ホルマリン		12	4	
次亜塩素酸ナトリウム		73	7	
5%フェノール	1	2	0	0
3%クレゾール石鹼液	92	75	75	52
1%塩化ベンザルコニウム	46	33	39	28
ヨードホルム	60	68	62	20
ヒビテン	94	33	46	32

ネコ条虫虫卵300個経口投与したラットの肝臓のシスト数
無処理平均シスト数：39

このように、通常動物実験施設等で使用されている消毒薬はことごとく効果がありません。100%エタノールだけが有効ですが、この効果は脱水によるもので通常用いる70%エタノールではやはり効果がありません。したがって、いったん汚染すると、その処理はかなり困難となります。それでは、実験室などで用いられている殺菌灯および熱処理はどうかということ

表3 ネコ条虫虫卵に対する紫外線照射と加熱の効果

処理	シスト数
紫外線照射	3.5
無処理	50.5
50℃10分	0
70℃10分	0
90℃10分	0
無処理	39

ネコ条虫虫卵300個経口投与したラットの肝臓のシスト数
紫外線照射には通常の殺菌灯を使用し、距離1mから60分照射

このように、紫外線照射も完全には虫卵を殺滅しません。ところが、加熱に対しては比較的弱く、50℃程度に加熱すれば殺滅が可能です。しかし、後述するように、動物の糞便による汚染箇所すべてを加熱処理することは容易なことではありません。

エキノコックスの培養：環境中の虫卵の殺滅が困難でも、試験管やシャーレの中にある状態ならオートクレーブ等で容易に殺滅できます。そこで、培養によって虫卵を採取できないかということになりますが、エキノコックスの場合様々な試みがなされていますが、いまのところどの研究者も成功していません。したがって、虫卵を得るためにはどうしても終宿主動物への感染実験が必要となります。

終宿主としてのイヌやキツネへの感染実験：原頭節をイヌに投与した場合、その80%程度が小腸に定着しますし（もちろんこれは虫卵が形成される前に剖検した結果ですが）、原頭節は1匹のネズミから数十万個採取できるので単に虫卵を得るだけであれば比較的容易なことです。しかし、そのバイオハザード対策が大きな問題となります。虫卵は糞便内にあるのだから糞便さえ適切に処理すれば問題はないと考えられますが、なかなかそうもいきません。胞状条虫という寄生虫がいるのですが、これもネコ条虫のようにエキノコックスの近縁種で虫卵は形態的には全く区別できません。この胞状条虫を1匹のイヌに感染させて、未感染の7匹のイヌと同居させたところ、半日後には全てのイヌの顔面から虫卵が検出されたとの話をスイスの研究者から聞きました。もちろんこれはイヌがお互いのお尻の臭いを嗅ぎ合うという性質にもよるわけですが、体表からも虫卵は検出されますから糞便は思いのほか環境を汚染している訳で、当然飼育ケージ内も虫卵で汚染されます。前述のように、この虫卵汚染に対して通常の消毒薬は無効です。虫卵は比較的大きいので簡単なフィルターも通過できません。したがって、ビニールアイソレーターのようなものでも隔離することができますが、実際にイヌをビニールアイソレーター内で飼育することは非常に困難です。そこで、熱処理のできる飼育設備が必要になってきますが、虫卵は糞便という塊の中に入っていますから完全に殺滅するためには十分な加熱が必要になります。

1987年、北海道衛生研究所はエキノコックスの研究のため図6に示すような施設を作りました。この施設は、第一にエキノコックスの虫卵を外界に出

さない、次に実験者を感染から守ることを念頭に置いて設計されています。実験区域内はさらにいくつかの区域に分かれており、感染終宿主飼育室が一番奥に配置されています。実験区域内の気圧は虫卵による汚染の可能性の高い場所ほど低圧になるように調節しており、ドアの開閉時に埃等に付着した虫卵が拡散しないように工夫されています。給気は中性能フィルター(NBS95%)を通し、排気も同様に中性能フィルターを通して外部に排気しています。虫卵は細菌等に比べかなり大きいので、排気フィルターが中性能になっており、この点が通常のP3と大きく違う点です。この区域の排水はすべて地下に設置した排水タンクにまとめられ、121℃で30分加熱した後排出されるようになっています。また、通常のパスボックスは紫外線の殺菌灯がついていますが、この施設に備えられている2つのパスボックスはスチームによる加熱型となっています。感染終宿主飼育室には、図7に示すような終宿主動物の飼育チャンバーが設置されています。これは自動給水、自動洗浄のほか給餌が隣室の虫卵感染室からできるようになっており、糞便の採取や動物の剖検時以外研究者が直接感染源と接触することがないようにになっています。また、飼育終了後には飼育チャンバー内を蒸気で過熱処理できるようになっています。さらに、この飼育チャンバーの空調は全区域の中でもっとも陰圧になるように調整されています。北海道衛生研究所では、現在この施設を利用してエキノコックスの成虫や虫卵に関する様々な研究を行っています。エキノコックスの虫卵を扱える施設は日本はもちろんのこと世界的にもほとんどありません。実際、終宿主での感染実験が許可されない国も多いようです。

代替終宿主の利用：北海道衛生研究所の施設は、すばらしいものでありバイオハザード対策も十分に施されています。しかし、最大の問題は施設の建設費用です。この衛生研究所の施設の設置には数億円かかっているそうです。たしかに良いものではありませんが、我々が所属するような大学に設置できる施設ではありません。イヌを終宿主とした感染実験の最大の障害は、イヌが実験動物としては大型の動物であるということです。そこで、私が元所属していた北海道大学獣医学部家畜寄生虫病学講座では、生活環の中でのイヌに変わる、小動物の代替終宿主の探索を行いました。その結果、スナネズミは免疫抑制処置によりゴールデンハムスターは無処置のままでも、成虫がかなり高率に腸管に寄生し虫卵を排出することがわかりました。齧歯類は通常は中間宿主となる動

物で、これらの動物も自然界では決して終宿主となることはないのですが、実験的にはエキノкокスの終宿主となり得るわけです。図8はあるジャーナルの表紙になったものですが、ネズミのみでエキノкокスの生活環が成立しています。つまり、Aのところの終宿主が食肉類ではなくスナネズミになっているわけです。そこで、寄生虫病学講座では、図9に示すようなエキノкокス感染動物飼育実験装置を作成しました。この装置により、この内部だけでエキノкокスの全ての生活環を成立させることができるようになりました。もちろん、この場合も熱処理装置が付属していますが、衛生研究所の施設に比べ、はるかに簡単で低コストとなっています。

むすび

このように、北海道衛生研究所と北海道大学の2カ所で方法は違いますが終宿主を使った実験が可能になりました。さきほども書きましたが、エキノкокスの虫卵を扱うために造られた施設は、世界でもおそらくこの2カ所だけだと思います。虫卵を扱う実験は、エキノкокス症の予防や疫学的なコントロールのために必要不可欠な実験です。それだけに、これらの施設にかかる期待は大きなものがあります。両施設とも完成して数年が経ち、いろいろな研究成果が発表されるようになってきました。ここでその一例を紹介しておこうと思います。図10に示したものは、実際にエキノкокスの虫卵を用いて様々な温度における虫卵の生存率を調べ、その値からエキノкокス虫卵の生存曲線を推定したものです。これによると、エキノкокスの虫卵は回虫などと違って意外に弱く、北海道の夏期の温度条件でも十数日で、直射日光の下では2～3日で死滅することがわかります。これらのデータは、エキノкокスの疫学的コントロールにとってきわめて重要です。

今回は虫卵の採取ということに焦点を絞って話を進めましたが、動物を使って解明しなければならないことはまだまだたくさんあります。同じ虫卵に関することでも、例えば、ヒトやネズミは虫卵を食べると感染するのになぜキツネやイヌは感染しないのかとか、ネコ条虫でよく知られている虫卵感染に対する再感染防御がエキノкокスでも起こるのかなどはエキノкокス症の防除に直接関わる問題で、早急に解明する必要があります。最近、動物を用いた研究に対する批判が高まってきています。しかし、この分野の研究は動物無しにはとて

も成り立ちません。また、実験動物の話ではありませんが、エキノコックス症の防除にはキタキツネの駆除と野生動物保護という問題も絡んできます。動物愛護、動物の権利など考慮しなければならないことは当然ですが、エキノコックスがその本来の生活環を外れてヒトに感染してくる以上、何らかの形でその経路を断ち切る方策を考えねばならないと思います。

稿を終えるに当たり、貴重な写真と数々の資料をを提供していただいた北海道立衛生研究所の八木欣平研究員に感謝いたします。

文献

石下真通、伊藤拓也、八木欣平 (1993) 多包条虫卵の寿命とその温度条件. 道衛研所報 43、49-51

神谷正男 (1988) エキノコックス、とくに多包条虫の伝播における野生動物の位置づけ. モダンメディア、34、343-351

神谷正男 (1988) 微生物抵抗性試験法：寄生虫. 実験動物施設における滅菌・消毒マニュアルー標準操作手順ー 102-108、前島ら（編）、ソフトサイエンス社、東京

Kamiya M. & Sato H. (1990) Survival, strobilation and sexual maturation of *Echinococcus multilocularis* in the small intestine of golden hamsters. Parasitology 100, 125-130

片倉賢、浜田篤郎、小林昭夫 (1985) 野外土壤に撒布された回虫卵の発育と変性. 寄生虫学雑誌 35、1-9

大林正士 (1975) 包虫（エキノコックス）. 北獣会誌 19、126-135、146-175、166-177、183-192、248-257

大林正士 (1986) エキノコックス症 ー特に北海道における多包条虫を中心にー. 獣医学1986、伊沢・清水（編）、59-72、近代出版、東京

大林正士 (1988) エキノコックス症とその広がり. メディアサークル 33、81-88

Thompson R. C. A. (1986) The Biology of *Echinococcus* and Hydatid Disease. Ed. Thompson R. C. A., George Allen & Unwin, London.

八木欣平、伊藤拓也、石下真通、高橋健一、佐藤七七朗 (1988) エキノコックス実験区域における予備的多包条虫感染実験. 道衛研所報 38、55-59

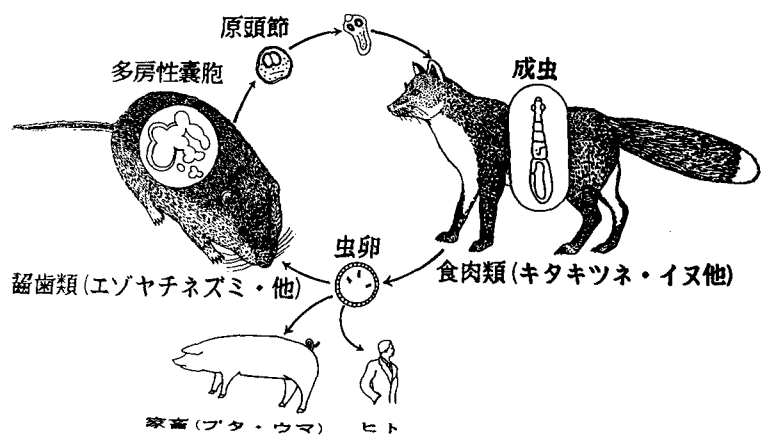


図1 エキノコックスの生活環

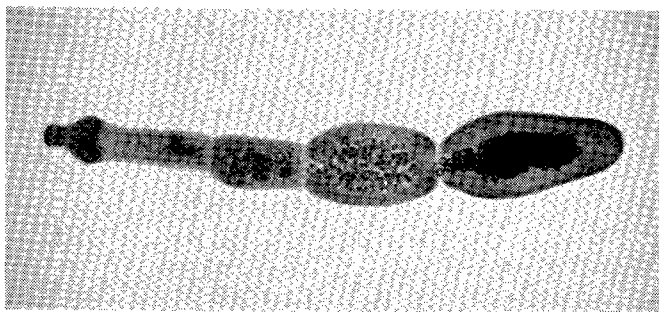


図2 エキノコックスの成虫



図3 ラットにおけるエキノコックス症（2次包虫症）

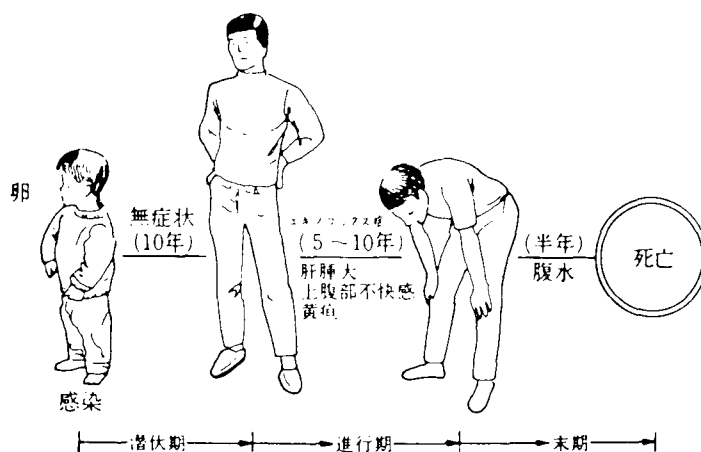


図4 エキノコックス症の経過

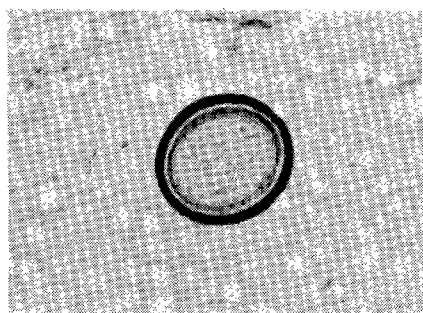


図5 エキノコックスの虫卵 (多包条虫)
他種のエキノコックスのみならず、ネコ条虫や胞状条虫などのたのテニア科条虫の虫卵とも形態的には区別がつかない。

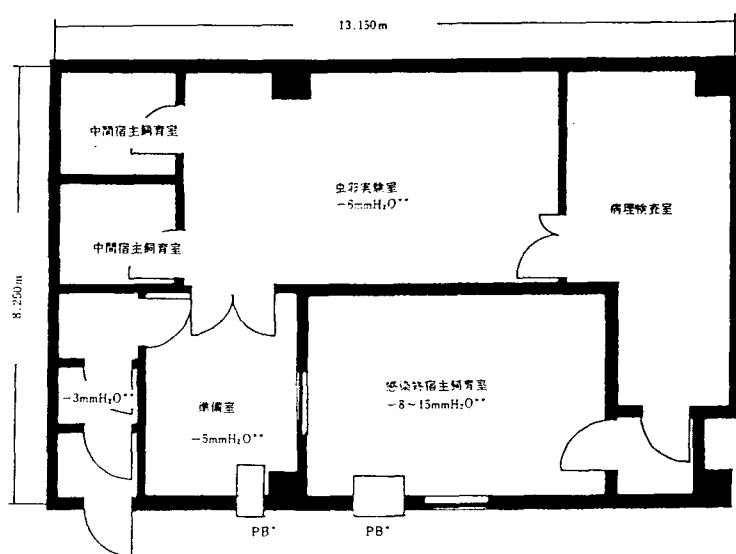


図6 北海道衛生研究所エキノコックス実験区域

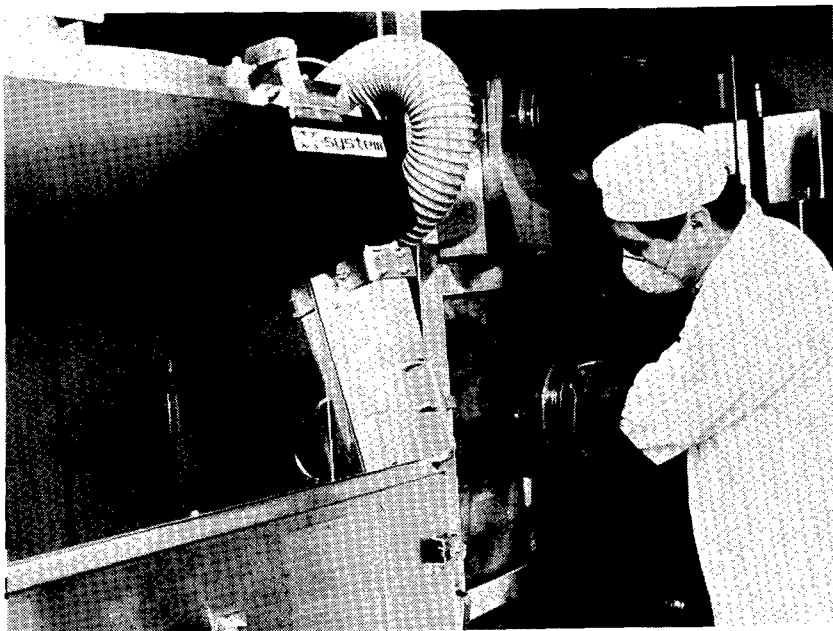


図9 小動物用のエキノкокクス感染動物飼育実験装置

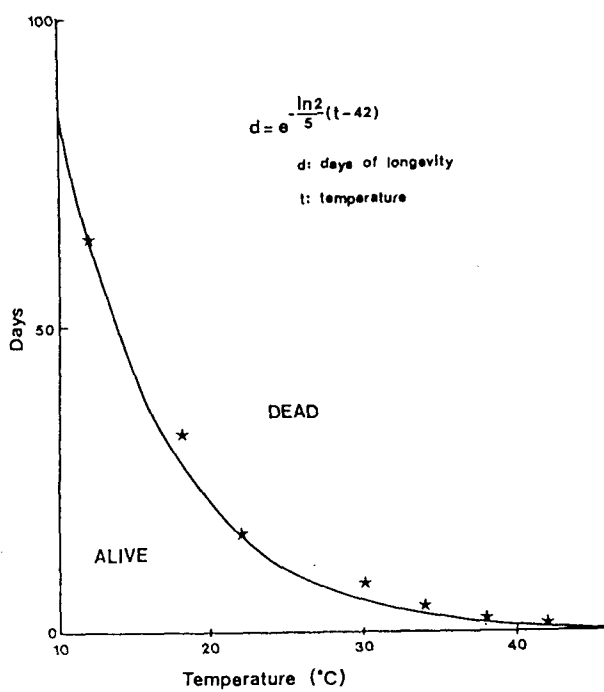


図10 エキノкокクス虫卵の生存曲線

1. はじめに

エルシニア属と命名されて約半世紀が、ペスト菌が分離されて約1世紀が経過した今日、以前はエルシニアといえばペストであったが、現在では世界的にも一部の地域に限定される伝染病となった。代わって、1970年代よりエルシニア感染症やエルシニア食中毒という言葉が聞かれるようになってきた。並行して日本で腸炎エルシニア菌の集団食中毒の発生が報告され、エルシニア属菌の世界的研究の進展に拍車を駆けた。同時に冷蔵庫の普及、低温輸送技術の発達などのエルシニア食中毒の発生する要因も加わり、エルシニア感染症の増加が認められるようになってきた。

一方ペスト菌の発見される以前に、仮性結核菌はモルモットの結核様結節より分離されていることや、1970年以前のエルシニア属菌が注目される前から動物生産施設ではウサギなどに感染報告があったこと、また現在の実験動物の参考書にもエルシニア属菌が人畜共通伝染病として紹介されていることなど、エルシニア属菌は実験動物とも少なからず関わりがある。本稿ではエルシニア属菌についてヒトでの感染症も含め紹介の方々、実験動物との関わりについて触れたいと考えている。

2. 分類と研究背景

エルシニア属菌は腸内細菌科に属し、代表的な菌はペスト菌である。ペストはもともとアジアを起源とした病気であり、中東を経てヨーロッパに広がって18世紀までにヨーロッパで幾度かの大流行をおこし、死者数千万（当時のヨーロッパ人口4分の1と言われる）の史上最悪の伝染病として知られている。日本でも江戸時代よりペストの小流行が記録されているが、1930年から現在まで発生報告はなく、日本はペストの存在しない国となった。

ペスト菌はYersinらおよび北里らによって1894年分離された。その点では仮性結核菌がモルモットの結核様結節より分離された1883年よりも10年以上遅かったが、当時の細菌学分野ではペスト菌のような致死率、伝染性の高い疾病が医学的に注目さ

れており、仮性結核菌には研究者の目が向けられていなかった。その後先進国での衛生知識の向上と共に伝染病の発生が減り、逆に食中毒が注目されるようになってから他のエルシニア属菌の研究が進み始めた。腸炎エルシニア菌がヒトから分離されたのは、1939年で昭和に入ってからであるが、研究は継続されず、1960年代になって再びヒトでの散発事例が報告され、1970年代になって本格的に研究され始めたのである。「1970年代からの細菌」と呼ばれるようにエルシニア研究は飛躍的に進展し、現在までに腸炎エルシニア類似菌が次々と分類されるに至った(図1)。

3. エルシニア属菌の病原性

エルシニア属菌の内、病原性を示すものはペスト菌、仮性結核菌、腸炎エルシニア菌(O3、O5、27、O8、O9の4血清型)の3菌種であるが、毒力、致死性の高さから考えてもペスト菌が別格である。他の2菌種の仮性結核菌と腸炎エルシニア菌では比較して仮性結核菌の方がヒトの感染例でも症状が重く、また実験的にもマウスを死亡させる菌数も少ない事が知られている。ただ両者ともそれほど強い病原性菌ではないために、成人より小児や老人が罹患し易く、特に小児の下痢症起因菌の重要菌種として挙げられている。また仮性結核菌は殆ど全ての分離株が病原性であるのに対して、腸炎エルシニア菌は血清型によって毒力が違う事が知られており、中でもO8は敗血症型で仮性結核菌と同等レベルの病原性と考えられている。O8菌は従来北米型とされ、日本でエルシニアの調査研究が始まった頃から近年まで分離報告がなかったが、1991年に青森で患者から分離され、日本にも存在すること(伝播した?)が明かとなった。他の腸炎エルシニア菌はO3、O5、27、O9などの血清型が病原性をもち、エルシニア3菌種ともに全ての病原性株は病原性プラスミド¹⁻³⁾を保有していることが知られている。病原性株は病原性プラスミドの脱落によって病原性を失い、またプラスミドの獲得により再び病原性を復活させることができる。しかし非病原性血清型の菌に病原性プラスミドを導入しても病原性を示すことはない。このプラスミドに支配されている病原性因子は、多くが菌が組織、細胞内に侵入してから作用するものであり、一方菌の染色体上には病原性を支配する遺伝子(吸着侵入遺伝子ail⁴⁾、侵入遺伝子inv⁵⁾など)が存在することが知られている。すなわちエルシニア属菌は少なくとも染色体上に付着侵入に関与する遺伝子という素質を持つことと、かつ病原性プラスミドを保有していなければ病原性を発揮することが出来ないわけである。

またこのプラスミドによって産生される蛋白は病原性と密接に関連している為、逆にこの蛋白をワクチンとして用いた感染防御試験の報告も数多く認められる。

さてヒトがエルシニア感染した場合、発熱、腹痛、下痢、嘔吐、発疹、肝障害、急性腎不全、関節炎、結膜炎、口内炎と多様な症状が認められる。発熱、限局性腹痛、嘔吐などから虫垂炎と診断されることもあり、さらに肝障害、腎不全を併発するとまれに死亡することもある。このエルシニア感染症の多様な症状はスーパー抗原に依存している可能性がある⁸⁾。スーパー抗原とはブドウ球菌で代表されるように直接的な毒性を示さずT細胞依存性の毒性を持つ細菌毒素であり、仮性結核菌の21Kdの蛋白(病原性プラスミド支配)が、同様の役割を果たしていると報告される。またこのT細胞依存性の毒性のため発現する臨床症状が、トキシックショック症候群、猩紅熱、泉熱、川崎病等のスーパー抗原の介在が疑われる他の類似疾患と混同する原因となっていると考えられている。さらに近年、ヒトのエルシニア感染症のトピックスとして、日本での報告はまだないが、輸血によりエルシニア感染で死亡する例があると云う。これは菌血症患者からの献血による汚染血液、およびその血液の低温保存することによる菌の増殖に起因していると考えられている。仮性結核菌や腸炎エルシニア菌O8では感染期間中に血液から菌が検出されることから、胃腸障害を起こしている人からの献血は注意を要することや、血液の保存液および低温保存期間の改良が要望されている。

次に動物がエルシニア感染した場合、モルモット、ウサギ、サルなどでは感染すると下痢、敗血症、死亡と言った激症が認められる。マウス、ラットなどでは時に死亡が認められる程度であり、イヌ、ネコ、ブタでは殆ど発症がみられず発症しても下痢程度である。広範囲の動物種でエルシニアの感染は成立するが、発症についてはかなり差があり、コンジェニックマウスを用いた実験感染から、エルシニアの感受性は単一の遺伝子ではなく複数の遺伝子によってコントロールされていることが報告されている。また激症を示さない動物は菌を糞便中に長期排出する伝播者となるために、本菌の自然界での感染サイクルの上で重要な役割を果たしている。感染した動物や死亡した動物の剖検所見は一般に肝臓、脾臓に細菌性の小膿瘍が認められ、脾臓は著しく腫大している。小腸の浮腫、腸管膜リンパ節の腫大、肛門部に血便が観察されることもある。血液検査の所見では貧血、肝障害、腎障害の徴候が認められることが報告されている。

4. エルシニア属菌の分布

本菌の自然界における分布と伝播様式について 一般に自然界ではネズミを筆頭に雑食性動物が重要な宿主であり、これら動物は汚染された水、食物等で経口的に感染が成立し、感染した動物は糞便に菌を排出し、他を汚染するという感染サイクルが考えられている。ヒトはこの感染サイクル内の汚染した水、食品などによって感染すると考えられる。

動物、環境等からの本菌の分離率は表1に示した。野生動物で問題となるのはネズミをはじめ雑食性の動物で、家畜ではブタ、ペットではイヌであり、いずれも10%以上の分離率が報告されるが、草食性の動物は一般的に1%以下と低い分離率を示し、自然界での感染サイクル上それほど重要な役割を担っていないと考えられている。ヒトでは健康者で0.004%と10万人に4人が保菌しており、さらに下痢をしている場合は1.3%であり、また切除された虫垂の5.9%から分離されたとの報告がある。環境では水の汚染が最も注目され、河川水、飲用水井戸水、出水などでも高い検出率がある。しかし、一般に水からは分離されても非常に少ない菌数の為感染することはほとんどないが、水の状態によっては多数の菌が検出されることがあり、感染源や汚染源となる可能性はあると考えられている。特に仮性結核菌の場合、病原性が比較的高いので井戸水、沢水などに含まれる比較的少ない菌数でも感染すると考えられているが、腸炎エルシニア菌では食品を介して増菌した場合でないと感染が成立する菌数に達しないと思われる。仮性結核菌では患者が飲用している井戸水で菌が検出された場合、血清型が一致する場合は65%あることが報告されている。本菌の場合、食肉等も高率に汚染しているが、一般には感染が成立しないほど少ない菌数である。ただしエルシニア属菌は冷蔵庫温度で1週間で菌数は約100倍以上に増殖する（ちなみにサルモネラ菌は冷蔵庫温度では増殖できない）。つまり汚染された食品などを冷蔵庫内で長期保存させた場合、感染を成立させるだけの菌数に増殖していることがあり危険である。

5. 実験動物学分野におけるエルシニア感染症

現在の動物実験施設でエルシニア感染症が蔓延していることはありえないが、施設外より感染動物や汚染物品が搬入される可能性がある。本稿で示したい内容は、「実験動物のエルシニア感染症」よりも「実験動物施設におけるエルシニア属菌の検疫方法」である。そこで、分離の為の手順を図2に示した。細菌の分離方法の書物として1990年以降出

版されたものでは本分離方法が紹介されているが、以前の方法として低温増菌後マッコンキーおよびSS寒天培地で分離すると記されている場合がある。現在ではCIN培地、アルカリ処理法により純培養に近い状態で、しかも容易に分離できるようになり、サル、ブタ、イヌ、ネコなどの検疫には常時使用されるべき方法であると考えられる、またマウス、ラット、モルモット、ウサギの定期的モニタリングにも組み入れても作業上手間とはならない。材料としては採集が容易、動物を死亡させないことなどから糞便が適切であるが、肝臓、脾臓なども分離材料となる。特に解剖後、肝臓や脾臓に細菌性の小膿瘍が疑われるときや、脾臓の腫大がある時など病変のある臓器をPBSに浮遊させ、細切または乳化したのち上清をアルカリ処理し、容易に分離材料とすることが出来る。分離菌の同定には微生物検査必携細菌真菌検査⁷⁾を参照して戴きたいが、簡易同定法としてCIN培地上で赤色コロニーを示し、TSI培地とLIM培地でエルシニア性状を示した菌を市販されている抗血清（デンカ生研）で血清型別を行い、菌が血清型別出来なければ病原性エルシニア陰性とし、型別された場合にはさらに分離菌の病原性をカルシウム依存性や自己凝集性などの病原性プラスミド確認試験⁸⁾で調べる。病原性血清型の菌で病原性プラスミド確認試験陽性の菌を一応病原性エルシニア属菌と断定して良い。さらにマウスに約 10^7 個程度の菌を腹腔内に接種すれば、病原性株の場合1週間以内で死亡するので分離菌の病原性を確定することができるが、検疫においては必要のない動物実験であると考ええる。

次に現在の動物実験施設で、動物がエルシニアに感染する可能性について示したい。動物施設が整備されるにつれ、施設内への野外の動物（特にネズミ）の侵入は困難となってきた。また市販されている動物の質も向上し、SPFまたはクリーンレベルとなり、感染したマウス、ラット、モルモット、ウサギなどが動物実験施設内に搬入される事はほとんど無くなり、エルシニア属菌の感染が実験用ゲッ歯類およびウサギで認められることは非常に少なくなった。ただSPFでないイヌ、ネコ、ブタ、サル、爬虫類では依然として保菌している可能性があり、これらが施設内に搬入された場合、その動物が発症したり、他への感染源となることがある。しかしこれは通常の実験動物維持管理上の衛生観念を持ってすれば、感染が広がる可能性はきわめて低いものであり、感染個体に対しても隔離およびペニシリン系以外の抗生物質の治療により完治する。一般的なエルシニア感染の防止対策としては、動物施設内に野生ゲッ歯類や鳥類の侵入防止措置、これは鳥や野生ゲッ歯類の糞によって施設内が汚染されるなど間接的なことも含んでいる。同時に飼料飲水の管理の徹底、感染している可能性のある動物とクリーンな動物との明確な区分、そして飼育担

当者や研究者への衛生教育などが挙げられる。以上、エルシニア感染症について簡単な紹介をさせて戴いたが、現在エルシニア感染症は実験動物施設内部で蔓延している感染症ではなく、施設外部に存在する感染症であり、外部から搬入される動物等の防疫、検疫の対象であることと同時に、食中毒菌としての一面もご理解いただけたかと思う。

本稿を終わるにあたり、機会を与えて戴きました研究会の方々に深謝致します。

参考文献

- 1)Zink, D.L. et al.(1980) Nature (London)283:224.
- 2)Gemski, P. et al.(1980) Infect.Immun.28:1044.
- 3)Ishiguro, N. et al.(1985) J.Clin.Microbiol.21:662.
- 4)Miller, V.L. et al.(1990) J.Bacteriol.172:1062.
- 5)Isberg, R.R. et al.(1987) Cell 50:769.
- 6)Miyoshi-Akiyama, T. et al.(1993) Infect.Immun.61:3922.
- 7)厚生省監修:微生物検査必携 細菌・真菌検査 第3版 日本公衆衛生協会出版
- 8)金子誠二(1988) メディヤサークル 33:312.

図1 エルシニアの分類

family :Enterobacteriaceae

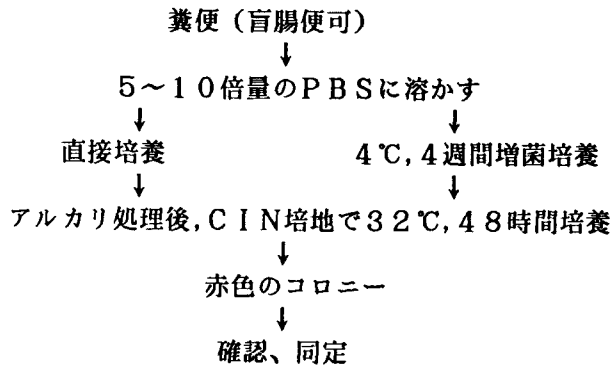
genus :Yersinia

species:	pestis	ペスト菌	病原菌
	pseudotuberculosis	仮性結核菌	
	enterocolitica	腸炎エルシニア菌	
	intermedia	腸炎エルシニア類似菌	
	frederiksenii	//	非病原菌
	kristensenii	//	
	aldovae	//	
	rohdei	//	
	mollaretti	//	
	bercovieri	//	
	ruckeri	魚病 (サケ、マス red mouth disease)	

表1 動物、環境等からのエルシニアの分離率

野生動物	ネズミ	5-40%
	タヌキ	10-30%
	イノシシ	5-15%
	サル	5-10%
	トリ	5%
	キツネ	10-15%
	テン	10-25%
家畜	ブタ	2-30%
ペット	イヌ	3-10%
	ネコ	3%
ヒト	健康	0.004%
	虫垂炎	5.9%
	下痢	1.3%
水	河川	10-65%
	井戸、出水	32-44%

図2 エルシニアの分離法



アルカリ処理：糞便浮遊液に等量の0.4% KOH加
生理食塩水を加えて30秒振盪

CIN培地：抗生物質を添加しない。選択性は劣るが
ほぼ全種のYersinia属菌が発育する。

＜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 14 号に掲載した第 41 回研究会以後、以下の研究会が開催された。

1) 第 42 回研究会（平成 6 年 6 月 17 日 於 楽友会館）

＜講演会＞

1. 実験動物学領域でのカリニ肺炎研究とヒト臨床医学への応用
北田一博（京都大学医学部附属動物実験施設）
2. エキノコックスの生物学－包虫症の研究と実験動物の関わり－
岡本宗裕（大阪大学医学部附属動物実験施設）
3. 実験動物とエルシニア
杉山芳宏（筑波大学 動物実験センター）

＜維持会員ニュース＞

1. （株）夏目製作所
「動物実験施設の自動化/省力化の可能性」
 2. （株）ケアリー
「実験用サルのウイルス抗体検査の諸問題」
- 2) 第 43 回研究会（平成 6 年 9 月 30 日 於 武田薬品工業（株）吹田研修所）

＜講演会＞

1. 免疫毒性－免疫学から免疫毒性学へ－
西条武俊（武田薬品工業（株）薬剤安全性研究所）
2. 免疫毒性の現状
牧 栄二（ヤンセン協和（株）研究開発本部）

＜維持会員ニュース＞

1. （株）ハイゲン
「実験動物の焼却の処理について」
 2. 日本エスエルシー（株）
「日本エスエルシー（株）の紹介」
- 3) 第 44 回研究会（平成 6 年 12 月 2 日 於 京大会館）
- ＜会員の研究発表会＞ 12 題
- ＜特別講演＞
- 「遺伝子ノックアウトマウスを利用した T 細胞の発生と機能の解析」
糸原重美（京都大・ウイルス研・高次生体情報部門）
- 「動物実験をめぐる法的規制 －廃棄物処理を中心に－」
海野 隆（鐘紡・薬品安全研）

《会員の移動》

(平成6年6月～平成7年1月)

入会者

北田 一博	京都大学・医学部・附属動物実験施設
水野 信哉	大阪大学・医学部・附属動物実験施設
吉澤 達	(株) ケー・エー・シー
近藤 正熙	武田薬品 (株) 実験動物管理室
市田 州	(財) たばこ産業弘済会 高槻事業所
中井 健史	塩野義製薬 (株) 油日ラボラトリーズ
山口 哲生	(株) CSKリサーチパーク
石束 丞治	(株) ハイゲン
川路 尚徳	(株) ケーエーシー京都技術センター
小村 宗平	鐘淵化学工業 (株) 高砂研究所
銀 一之	白銀工業 (株)
木村 和幸	(株) ミドリ十字安全性研究所
宮本 博好	(株) ミドリ十字安全性研究所
福永 裕樹	(株) ミドリ十字安全性研究所
方山 和幸	(株) ミドリ十字安全性研究所
柴田 博	(株) ミドリ十字安全性研究所
森本 宏一	日本チバガイギー (株) 薬剤安全性ユニット
武藤 通彦	塩野義製薬 (株) 油日ラボラトリーズ
千葉 博喜	塩野義製薬 (株) 油日ラボラトリーズ
牧野 奈津代	藤沢薬品工業 (株) 安全研・病理
森 崇子	日本チバガイギー (株) 薬剤安全性ユニット
長崎 徹	田辺製薬 (株) 安全性研究所
坂田 太二	マルゴ・リサーチサービス
喜多 正和	京都府立医科大学・実験動物室

退会者

石田 貢	日本医薬品工業(株)総合研究所
田倉 進	日本チャールスリバー(株)大阪営業所
土井 安	
林 幸之	塩野義製薬 (株) 油日ラボラトリーズ
寄本 智幸	清水実験材料 (株)
神山 八郎	(株) 環境バイリス研究所
松田 庄司	環境保険生物研究センター
山田 嘉美	ビューアムール
山田 純子	ビューアムール
中尾 嘉考	中尾 B.M.S.R. 研究所
植木 礼子	
吉田 誠	(株) オリエンタルバイオサービス
藤波 不二雄	田辺製薬 (株) マルゴリサーチサービス

《関西実験動物研究会 維持会員》

(五十音順) (平成7年1月現在)

No.	社名	〒	住所
1	(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
2	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
3	加商 (株)	103	東京都中央区日本橋 2-14-9
4	鐘紡 (株) 薬品安全性研究所	534	大阪市都島区友濃町 1-5-90
5	(株) オリエンタル・バイオサービス	615	京都市右京区西京極葛野町 28 番地
6	(株) ケアリー	531	大阪市北区豊崎 4-12-1
7	(株) ケー・エー・シー	567	摂津市鳥飼本町 5-3-4
8	参天製薬 (株) 中央研究所	553	大阪市東淀川区下新庄 3-9-19
9	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
10	(株) 実医研	377-09	群馬県吾妻郡吾妻町大字大戸字花立 3303-58
11	白井松器械 (株)	540	大阪市中央区森ノ宮中央 1-19-16
12	白銀工業 (株)	547	大阪市平野区加美北 4-6-19
13	(株) 新薬開発研究所 京都事務所	601-13	京都市伏見区醍醐僧尊坊町 1-47-1
14	(株) 成和実験動物研究所	871	福岡県築上郡吉富町大字小祝 955
15	(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
16	大日本製薬 (株) 開発研究所・安全研	564	吹田市江の木町 33-94
17	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
18	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
19	(株) 夏目製作所	113	東京都文京区湯島 2-18-6
20	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
21	日本クレア (株)	550	大阪市西区京町堀 1-13-2
22	日本商事 (株) 医薬研究所	567	茨木市庄 2-24-3
23	日本新薬 (株) 創薬研究本部	601	京都市南区西大路通八条下ル
24	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
25	日本チャールスリバー (株)	550	大阪市西区西本町 1-11-7
26	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
27	(株) ハイゲン	349-01	埼玉県蓮田市末広 1-2-7
28	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
29	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
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
31	丸石製薬 (株) 中央研究所	538	大阪市鶴見区今津中 2-2-18
32	(株) 三菱化学安全科学研究所大阪支店	541	大阪市中央区北浜三丁目 1-6
33	(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
34	(株) 美濃ラボ	503-03	岐阜県海津郡平田町今尾 1195-1
35	(株) ラビトン研究所	677	兵庫県西脇市中畑町 718

平成7年 2月20日 印 刷
平成7年 2月25日 発 行

編集兼発行者 山 田 淳 三
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