

関西実験動物研究会会報

Kansai Journal of Laboratory Animals

平成8年12月 17号

関西実験動物研究会

Kansai Laboratory Animal Research Association

目 次

講演記録

< 第44回研究会 >

特別講演

1. T細胞レセプター遺伝子変異マウスによる $\gamma\delta$ T細胞の
発生と機能の解析
糸原重美（京大・ウイルス研） 1
2. 動物実験をめぐる法的規制
海野 隆（鐘紡（株）） 10

< 第45回研究会 >

毒性試験の評価とヒトへの外挿

- 宮畠宏彰（（株）新日本科学） 19

< 第46回研究会 >

1. 実験用イヌの現状と将来展望
芹川忠夫（京大・医・動物実験施設） 27
2. 新しい医療器具の開発ーイノウエバルーンカテーテル
および経管的人工血管移植術ー
井上寛治（京大・医・第三内科） 32
3. 臨床用人工臓器開発における動物実験
ー人工気管・人工食道の開発ー
中村達雄（京大・生体医療工学研究センター） 36

< 第47回研究会 >

臨床試験との関わりにおける非臨床試験の実施タイミング

- 馬屋原宏（武田薬品工業（株）） 45

< 第48回研究会 >

- 会員の研究発表 51

特別講演

プリオン病と動物実験

- 毛利資郎（九大・医・動物実験施設） 63

< 第49回研究会 >

1. 実験動物の繁殖行動と飼育管理

- 斎藤 徹（日本獣医畜産大・実験動物学） 67

2. 動物実験の管理とサルの感染症

吉川泰弘（国立予研・筑波医学実験用霊長類センター）	79
---------------------------	----

< 第50回研究会 >

ハンタウイルス感染症と動物実験：腎症候性出血熱をめぐる 最近の話題

1. 新しいハンタウイルス感染症の病理	
倉田 毅（国立予研・感染病理部）	82
2. 動物実験施設におけるハンタウイルス抗体保持ラットと その対策	
芹川忠夫（京大・医・動物実験施設）	83
3. 実験的低抗体価ラットとその感染性	
堂前嘉代子（阪大・微生物病研究所）	84
4. PCR 法によるハンタウイルス RNA の検出	
伊勢川裕二（阪大・微生物病研究所）	85
5. ハンタウイルス感染の血清診断法の現状	
有川二郎（北大・医・動物実験施設）	86
6. まとめ	
山西弘一（阪大・医・微生物病研究所）	87

故山田淳三先生を偲んで

1. 山田淳三先生が始められたラット研究の展開	
芹川忠夫（京大・医・動物実験施設）	90
2. 山田淳三 名誉会員のご逝去を悼む	
宮蔭宏彰（（株）新日本科学）	101
3. 山田淳三先生を追悼する	
内海健二郎	103
4. 山田淳三先生との思い出 - 43rd AALAS Annual Meeting と 米国実験動物視察団に参加して	
阿部敏男（武田薬品工業（株））	105
5. 山田淳三さんを偲ぶ	
中山 亮	112

関西実験動物研究会だより	116
--------------	-----

会員の動き	123
-------	-----

T細胞レセプター遺伝子変異マウスによる $\gamma\delta$ T細胞の発生と機能の解析 糸原 重美（京都大学ウイルス研究所高次生体情報分野）

はじめに

T細胞は、それらが発現するT細胞レセプター（TCR）の種類（ $\alpha\beta$ 鎖あるいは $\gamma\delta$ 鎖）によって二群（ $\alpha\beta$ T細胞と $\gamma\delta$ T細胞）に大別される。そのうち $\alpha\beta$ T細胞は脊椎動物の免疫機構のなかで中枢的役割を果たすことが広く知られているが、 $\gamma\delta$ T細胞の発生分化機構と免疫上の機能については未知の部分が多い。

$\gamma\delta$ T細胞は胎児期の胸腺で $\alpha\beta$ T細胞に先行して発生する^{1, 2, 3)}。生後、 $\gamma\delta$ T細胞は胸腺およびリンパ節等では微小集団となり、主に粘膜および皮膚の上皮細胞間に分布する^{1, 5, 6)}。マウス $\gamma\delta$ T細胞は、それが分布する組織によって、明白に異なる四つのサブセットに分類される。末梢血およびリンパ系組織に分布する細胞が殆ど全てのV(variable) γ およびV δ 遺伝子を利用するのに対して、腸管上皮間に分布する細胞はV γ 7およびV γ 1を選択的に利用する⁷⁾。表皮間に分布する細胞はV γ 5とV δ 1を^{4, 6)}、また舌、膣および子宮に分布する細胞はV γ 6とV δ 1を利用する⁵⁾。表皮と舌、膣および子宮の両サブセット（以後V γ 5サブセットおよびV γ 6サブセットと呼ぶ）は、TCR γ および δ 鎖とも、それらが本来遺伝子再構成によって修飾されるものであるにも係わらず、全く均一である点で特殊である。また、両サブセットは、全く同一の δ 鎖を共用する。V γ 5サブセットは胎児胸腺に於て最も早く発生し^{4, 6)}、V γ 6が次に出生前後の胸腺で発生する^{8, 9)}。末梢血およびリンパ組織のサブセットは成熟した胸腺で発生する^{10, 11)}。腸管のサブセットは、胸腺外で発生すると考えられている¹²⁾。 $\gamma\delta$ T細胞の機能の解析は、その分布の特殊性と $\alpha\beta$ T細胞に比して数が著しく少ないことから来る困難さのせいで余り進展していない。我々は $\gamma\delta$ T細胞の発生機構と機能を解析する手段として、 $\gamma\delta$ T細胞のみ、もしくは $\alpha\beta$ T細胞のみを持つマウス系統を樹立することを計画した。胚性幹細胞（ES細胞）のTCR α , β , γ および δ 遺伝子の何れかをジーンターゲッティング法¹³⁾で破壊した後、その子孫を取れば上述のマウスが得られるはずであり、これまで、TCR α , β および δ 遺伝子それぞれに欠損変異を導入したマウスの樹立に成功している^{11, 15)}。ここでは、そのうちTCR δ 遺伝子変異マウスを中心として、 $\gamma\delta$ T細胞の発生と機能について解析した結果の一端を要約する。

$\gamma\delta$ T細胞と $\alpha\beta$ T細胞系列の独立性

T細胞の主な発生部位である胸腺において、TCR γ とTCR δ 遺伝子の再構成と発現はTCR α およびTCR β 遺伝子に先行して生じる。この結果として、幼若な胎児胸腺（13－16日胎令）では、 $\gamma\delta$ 胸腺細胞が多く、その後 $\alpha\beta$ 胸腺細胞が主構成細胞となる。両細胞は共通の前駆細胞から胸腺において両細胞系

列に分岐して発生分化する。両細胞系列の発生分岐の機構について、AllisonおよびPardollのグループはT C R 遺伝子の再構成が重要な意味を持つと考えた¹⁶⁾。すなわち、前駆細胞でまず γ および δ 遺伝子の再構成が生じ、それらがIn frameとなった場合、 $\gamma\delta$ T細胞となり、Out of frameとなった場合、 α および β 遺伝子の再構成が生じ、 $\alpha\beta$ T細胞となるとするものである。この仮説を検証するために、石田らは $\gamma\delta$ T細胞ハイブリドーマからIn frameに再構成した

V-J(joining)-C(constant) γ 1およびV-D(diversity)-J-C δ 遺伝子を得て、 $\gamma\delta$ トランスジェニックマウスを作成した¹⁷⁾。このマウスでは、 $\alpha\beta$ T細胞が正常に発生し、上述のモデルが成立しないことが明らかになった^{17, 18)}。同時にその研究では、V-J-C γ 1 遺伝子の周辺領域を長く含む構造で導入すると、その遺伝子は正常マウスにおけると同様に $\gamma\delta$ T細胞でのみ発現し、 $\alpha\beta$ T細胞では発現しなかった。一方、短い構造で導入したマウスでは、V-J-C γ 1 遺伝子は $\alpha\beta$ T細胞でも発現し、その影響として $\alpha\beta$ T細胞の発生が阻害されることが観察された。これらの成績に基づいて、石田らは長い構造のV-J-C γ 1 遺伝子内に $\alpha\beta$ T細胞で発現を負に調節するシスエレメント（サイレンサー）が存在し、 $\alpha\beta$ T細胞と $\gamma\delta$ T細胞の両系列の分岐に重要な役割を果たすとする考えを提唱するに至った¹⁷⁾。この考えでは、両系列の分岐はT C R 遺伝子の組換えの状態に関係なく、T C R の細胞表面への発現に先行して、すでに決定されていることになる。このモデルに一致して、VinotoらはT C R α 遺伝子領域に $\gamma\delta$ T細胞で α 遺伝子の発現を負に制御するサイレンサーの存在を指摘している¹⁹⁾。

両細胞系列の発生分化の過程におけるT C R を介した相互作用の可能性は、T C R 欠損マウスを用いて解析することができる。T C R α , β および δ 遺伝子それぞれの定常域に欠失変異を導入すると機能的なTCRは発現されず、前二者ではした $\alpha\beta$ T細胞が、後者では $\gamma\delta$ T細胞が完全に消失した^{14, 15)}。その一方、 α および β 遺伝子変異マウスでの $\gamma\delta$ T細胞は正常マウスと変わりなく発生分化し¹⁴⁾、 δ 遺伝子変異マウスにおける $\alpha\beta$ T細胞は正常に発生した¹⁵⁾。これらの結果は $\alpha\beta$ T細胞と $\gamma\delta$ T細胞はそれらの発生分化の過程で相互作用を必要とせず、相互に独立した発生分化過程を経ることを示している。

発生上プログラムされたT C R γ および δ 遺伝子の標的組換え機構による $\gamma\delta$ T細胞サブセット形成

表皮間に分布するV γ 5サブセット（Dec,s-IEL: skin-intraepithelial lymphocyteとも呼ぶ）と雌生殖器官および舌上皮間に分布するV γ 6サブセット（vut-IEL: vagina-uterus-tongue-intraepithelial lymphocyteとも呼ぶ）は、それぞれV 5-J 1-C γ 1あるいはV 6-J 1-C γ 1のみを発現する。両サブセットはV 1-D 2-J 2-C δ を共有する。これらのサブセットは使用するV遺伝子が均一であるのみならず、V-JあるいはV-D-Jの組換え部位の構造が均一である点で他のサブ

セットから際だった特徴を持つ。

これらのサブセットは、胎児期から新生時期の胸腺でのみ発生し、リンパ系組織のサブセットは成熟した胸腺で発生する。加齢にともなった変動の分子的基盤としては、大別して二つの可能性がある。一つは、胸腺の成熟に伴って変化するリガンドの存在を仮定し、T C Rの特異性にもとづくT細胞の選択機構による可能性であり、二つには、T C R発現以前からすでに前駆細胞内にプログラムされた機構が存在する可能性である。この点について、これまで種々の角度から解析が試みられてきた。

$\delta^{-/-}$ マウスでは、 $\gamma\delta$ T C Rの細胞表面への発現が完全に阻外されているが、V, D, およびJセグメントは保存されている。したがって、このマウスではT C Rによる選択機構の影響が無い条件下で生じるV-D-Jの組換えを解析できる。

T C R $\delta^{-/-}$ および正常マウスの胸腺を採取し、加齢に伴うT C R γ および δ 遺伝子の組換え頻度をP C R-Southern Blot法で定量的に解析した。この変異は γ および δ 遺伝子のいずれの組換えをも阻害せず、加齢による組換え頻度は、変異マウス正常マウスとも同様であった。V5-J γ 1, V6-J γ 1, V1-D-J δ 2, とV1-D-J δ 1の組換えは胎児期にほぼ限定された。一方、V4-J γ 1, V7-J γ 1とV1-J γ 4の組換えは生後に増加した。V4-D-J δ 1とV5-D-J δ 1は胎児期から生後を通じて形成されるが、特に後者で頻度が高い。

これらの結果は、T C R γ と δ 遺伝子それぞれの組換えは、発生過程で細胞内にすでにプログラムされていることを示唆する。そのプログラムの分子基盤はまだ不明であるが、 γ および δ 遺伝子座に幅広く分布するシスエレメントとそれらの結合蛋白質によって、組換え酵素への受容能が変化すると推察できる。これらの結果と関連して、生田らは胎児肝臓由来の前駆細胞と成体骨髄由来のそれとの間に質的差異があることを示している²⁰⁾。

胎児型 $\gamma\delta$ T細胞 (V 5およびV 6) サブセットのV 遺伝子選択性は、上述のプログラムされた組換え機構で説明できるが、Junctional sequenceの均一性はいかにしてもたらされるのだろうか？ $\delta^{-/-}$ および正常マウスの胎児胸腺DNAから再配列したV5-J γ 1, V6-J γ 1, V1-D-J δ 2, およびV1-D-J δ 1フラグメントをPlymerase chain reaction (PCR)で増幅後、クローニングし、それらの塩基配列を決定した。V 5-J γ 1、V 6-J γ 1、V 1-D 2-J δ とも、表皮あるいは舌および雌生殖器官上皮に分布するサブセットで利用されるIn frame sequence(Canonical sequence)⁹⁾が $\delta^{-/-}$ マウスの胎児胸腺でも高頻度に検出された。この結果は、特殊な両サブセットの形成はT C Rを介した細胞選択の結果ではないことを明白に示した。

この特殊な組換え機構を考察するために、我々がこれまで得ている全てのJunctional sequenceを再度分析した。その結果、Canonical sequencesの他にも高頻度に出現するJunctional sequenceが同定された。それぞれのV-J、V-D、およびD-J間の組換えごとに、2-3種類のSequenceが特定のセグメント間の

組換えの70%以上を占める。表1に切断点周辺の塩基配列をGermline sequencesおよび最終的Junctional sequencesと共に示す。Class Iに分類されるタイプは切断点に1-3塩基の相同配列が認められる。Pエレメントは、組換え酵素が切断した断端に、Germline sequenceに対してPalindromic sequenceとして形成されるものである⁹⁾。Pエレメントをも考慮にいと、Class IIのタイプでもまた2-6塩基の相同配列が形成される。またClass I⁺のタイプでは、1-2塩基のGermline sequenceの相同配列が、Pエレメントを考慮にいと3-5塩基の相同配列に拡張する。このように高頻度に生じる組換えは、全て何らかの相同配列が切断点に認められることから、この短塩基配列を介した組換え機構がV5およびV6サブセットを形成すると考えられる。このPエレメントを介した標的組換え機構は、D2-J δ ジョイントにNon-germline sequenceであるGが、なぜ必ず挿入されるのかを説明するのに都合がよい。稀に出現するJunctional sequenceの場合には、このような相同配列が認められない事実は、この考えを強化する。もちろん、これらの成績は短塩基配列のホモロジーがV(D)J組換えを誘導あるいは促進することの直接的証拠ではないが、この考えは十分説得力があるだろう。短塩基配列の相同性を介した組換えは、TCR γ および δ 遺伝子のみでなく、新生児のB細胞の発生過程でも認められる^{21, 22, 23)}。

TCR δ 遺伝子は二つのDセグメントを持ち、とりわけ大きな多様性を獲得する機構として知られている。成熟した個体の胸腺では、二つのDセグメントが共に利用されるのに対して^{11, 21)}、胎児胸腺ではD2のみが利用され、D1は殆ど全く利用されないことが、TCR δ 遺伝子の発見直後から知られていた^{3, 9)}。この機構は、D1とD2セグメントの組換え酵素への受容能の差で説明できるかも知れないが、上述の相同配列仮説は別の解釈をもたらした。図1に示すように、もしもV1が最初にD1と組換えが相同性領域で生じたとしても、その中間体はD2と相同性を持ち、そこで第二の組換えが起こるとすると、V1が直接D2と組換えを起こした構造と同一となる。また、D1とD2が最初に組換えを起こした後V1と組換えを起こすとしても同様である。

腸管上皮細胞の増殖分化と $\gamma\delta$ T細胞

$\gamma\delta$ T細胞の特色の一つは上皮組織への選択的分布能である。したがって、 $\gamma\delta$ T細胞は上皮組織において固有の機能を果たしていると考えられる。この可能性を検証するために、腸管上皮を組織学的に解析した。腸管上皮組織は整然として組織構築を取っており、分化過程を追跡するのに都合がよい。 δ 遺伝子変異マウスの小腸陰窩の上皮細胞数は有為に少なかった²²⁾。このような異常は β

変異マウスでは認められず、また、 $\gamma \delta$ T細胞を移植によって再構築した δ 遺伝子変異マウスでは回復した。これらの結果は、この異常が $\gamma \delta$ T細胞の欠損によることを示唆している。小腸陰窩は幹細胞の複製の場であり、変異マウスの細胞数の減少は細胞の複製能の低下による可能性が考えられる。この点を明らかにするため、BrdUを投与したマウスの小腸を解析した。小腸陰窩細胞のBrdU取り込み細胞数は δ 遺伝子変異マウスで有為に少なく、この考えを支持した²²⁾。

小腸の異常は柔毛上皮にも観察された。上皮細胞は通常、主要組織適合性抗原クラスII分子を発現するが、 δ 遺伝子変異マウスの上皮ではその発現レベルが著しく低下していた。この異常も δ 遺伝子変異マウスに特異的であり、 $\gamma \delta$ T細胞の欠失に依存すると考えられた²²⁾。腸管上皮における主要組織適合性抗原クラスII分子の発現が免疫機構の上で果たす意義についてはさらなる解析を待たねばならない。

以上の結果は、 $\gamma \delta$ T細胞が上皮細胞の増殖と分化を制御することによって、その恒常性の維持に貢献していることを示唆しており、 $\gamma \delta$ T細胞の上皮組織への分布特異性の意義を示すものとして興味深い。腸管上皮間 $\gamma \delta$ T細胞は胸腺外のおそらく腸管自身で発生すると考えられている。 $\gamma \delta$ T細胞は個体を防御する最前線の一つとして、上皮組織と共に進化してきたものと考えることが出来そうである。

引用文献

- 1) Itohara, S., Nakanishi, N., Kanagawa, O., et al., Monoclonal antibodies specific to native murine T-cell receptor $\gamma\delta$: analysis of $\gamma\delta$ T cells during thymic ontogeny and in peripheral lymphoid organs. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 86, 5094-5098, 1989.
- 2) Raulet, D. H., Garman, R. D., Saito, H. Y., et al., Developmental regulation of T-cell receptor gene expression. Nature 314, 103-107, 1985.
- 3) Chien, Y.-H., Iwashima, M., Wettstein, D. A., et al., T-cell receptor δ gene rearrangements in early thymocytes. Nature 330, 722-727, 1987.
- 4) Asarnow, D. M., Kuziel, W. A., Bonyhadi, M., et al., Limited diversity of $\gamma\delta$ antigen receptor genes of Thy-1+ dendritic epidermal cells. Cell 55, 837-847, 1988.

- 5) Itohara, S., Farr, A., Lafaille, J. J., Homing of a $\gamma\delta$ thymocyte subset with homogeneous T-cell receptors to mucosal epithelia. *Nature* 343, 754-757, 1990.
- 6) Havran W. L., and Allison J. P., Developmentally ordered appearance of thymocytes expressing different T-cell antigen receptors. *Nature* 335, 443-445, 1988.
- 7) Takagaki, Y., Decloux, A., Bonneville, M., et al., $\gamma\delta$ T cell receptors on murine intestinal intra-epithelial lymphocytes are highly diverse. *Nature* 339, 712-714, 1989.
- 8) Ito K., Bonneville M., Takagaki, Y., Different $\gamma\delta$ T-cell receptors are expressed on thymocytes at different stages of development. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 86, 631-635, 1989.
- 9) Lafaille, J.J., DeCloux, A., Bonneville, M., et al., Junctional sequences of T cell receptor $\gamma\delta$ genes: implications for $\gamma\delta$ T cell lineages and for a novel intermediate of V-(D)-J joining. *Cell* 59, 859-870, 1989.
- 10) Korman, A. J., Marusic-Galesic, S., Spencer, D., et al., Predominant variable region gene usage by $\gamma\delta$ T cell receptor-bearing cells in the adult thymus. *J. Exp. Med.*, 174, 769-773, 1991.
- 11) Takagaki, Y., Nakanishi, N., Ishida, I., et al., T cell receptor γ and δ genes preferentially utilized by adult thymocytes for the surface expression. *J. Immunol.*, 142, 2112-2121, 1989.
- 12) Bandeira, A., Itohara, S., Bonneville, M., et al., Extrathymic origin of intestinal intraepithelial lymphocytes bearing T-cell antigen receptor $\gamma\delta$. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 88, 43-47, 1991.
- 13) Capecchi, M. R., Altering the genome by homologous recombination. *Science* 244, 1288-1292, 1989.
- 14) Mombaerts, P., Clarke, A. R., Rudnicki, M. A., Mutations in T-cell antigen receptor genes α and β block thymocyte development at different stages. *Nature* 360, 225-231, 1992.
- 15) Itohara, S., Mombaerts, P., Lafaille, J. J., et al., T cell receptor δ gene mutant

mice: Independent generation of $\alpha\beta$ T cells and programmed rearrangements of $\gamma\delta$ TCR genes. *Cell* 72, 337-348, 1993.

16) Pardoll, D. M., Fowlkes, B. J., Bluestone, J. A., et al., Differential expression of two distinct T-cell receptors during thymocyte development. *Nature* 326, 79-81, 1987.

17) Ishida I., Verbeek S., Bonneville, M., et al., T-cell receptor $\gamma\delta$ and γ transgenic mice suggest a role of a γ gene silencer in the generation of $\alpha\beta$ T-cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 87, 3067-3071, 1990.

18) Bonneville, M., Ishida, I., Mombaerts, P., et al., Blockage of $\alpha\beta$ T-cell development by TCR $\gamma\delta$ transgenes. *Nature* 342, 931-932, 1989.

19) Winoto, A., and Baltimore, D., $\alpha\beta$ lineage-specific expression of the α T cell receptor gene by nearby silencers. *Cell* 59, 649-655, 1989.

20) Ikuta K., Kina, T., MacNeil, I., A., Developmental switch in thymic lymphocyte maturation potential occurs at the level of hematopoietic stem cells. *Cell* 62, 863-874, 1990.

21) Elliott, J. F., Rock, E. P., Patten, P. A., et al., The adult T-cell receptor δ -chain is diverse and distinct from that of fetal thymocytes. *Nature* 331, 627-631, 1988.

22) Komano, H., Fujiura, Y., Kawaguchi, M., et al., Homeostatic regulation of intestinal epithelia by intraepithelial $\gamma\delta$ T cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 92, 6147-6151, 1995.

TYPE	SEQUENCES	FREQUENCY			
		EXPERIMENTS			TOTAL (%)
		A	B	C	
1	V ₅ : TGCTGGG AT <u>CTAGATC</u> J ₁ : <u>GCTAT</u> AT AGCTCAG TGCTGGG AT AGCTCAG	<u>21</u> 58	<u>26</u> 45	<u>45</u> 139	<u>92</u> (38) 242
2	V ₅ : TGCTGGGATC <u>TAG ATC</u> J ₁ : <u>GCTATA</u> TAG CTCAG TGCTGGGATC TAG CTCAG	<u>13</u> 58	<u>6</u> 45	<u>32</u> 139	<u>51</u> (21) 242
3	V ₅ : TGCTGGG AT <u>CTAGATC</u> J ₁ : GCT AT ATAGCTCAG TGCTGGG AT ATAGCTCAG	<u>7</u> 58	<u>4</u> 45	<u>29</u> 139	<u>40</u> (17) 242
4	V ₆ : TGCTGGG ATA <u>TATCC</u> J ₁ : <u>GCTAT</u> ATA GCTCAG TGCTGGG ATA GCTCAG	<u>11</u> 38	<u>23</u> 39	<u>34</u> 140	<u>68</u> (31) 217
5	V ₆ : TGCTGGG ATATA <u>TCC</u> J ₁ : <u>GCT ATATA</u> GCTCAG TGCTGGG ATATA GCTCAG	<u>18</u> 38	<u>12</u> 39	<u>54</u> 140	<u>84</u> (39) 217
6	V ₆ : TGCTGGGA TATAT <u>CC</u> J ₁ : <u>GC TATAT</u> AGCTCAG TGCTGGGA TATAT AGCTCAG	<u>4</u> 38	<u>1</u> 39	<u>16</u> 140	<u>21</u> (10) 217
7	V ₈ : TCA GATAT <u>ATAIC</u> D ₈ : <u>CC GATAT</u> CGGAGGGA TCA GATAT CGGAGGGA	<u>34</u> 49	<u>33</u> 49	<u>67</u> 98	<u>119</u> (61) 196
8	V ₈ : TCAG AT ATATATC D ₈ : <u>CCGAT</u> AT CGGAGGGA TCAG AT CGGAGGGA	<u>8</u> 49	<u>4</u> 49	<u>1</u> 98	<u>13</u> (7) 196
9	V ₈ : TCAGAT ATAT <u>ATC</u> D ₈ : <u>CCG ATAT</u> CGGAGGGA TCAGAT ATAT CGGAGGGA	<u>1</u> 49	<u>4</u> 49	<u>5</u> 98	<u>10</u> (5) 196
10	D ₈ : GGAG GGA TACGAG <u>CTCGT</u> J ₈ : <u>A GGA GCTCCTGG</u> GGAG GGA GCTCCTGG	<u>19</u> 30	<u>13</u> 29	<u>58</u> 98	<u>90</u> (57) 157
11	D ₈ : GGAGGGATAC GAG <u>CTC GT</u> J ₈ : <u>AG GAGCTC</u> CTGG GGAGGGATAC GAGCTC CTGG	<u>5</u> 30	<u>7</u> 29	<u>16</u> 98	<u>28</u> (18) 157
12	D ₈ : GGAGGGATACG AG <u>CT CGT</u> J ₈ : <u>GGT AGCT</u> ACCGA GGAGGGATACG AGCT ACCGA	<u>5</u> 19	<u>6</u> 21	ND	<u>11</u> (28) 40

表1 短塩基配列の相同性を介したγ およびδ 遺伝子の組換え
上段および中段：生殖系列のの塩基配列、下段：組換え配列
下線はPエレメントを示す。

A	
V81	TGTGGGTCA G ATAT
D1	cactgtgGTGG C ATAT C Acacaggt
V81D1	TGTGGGTCA G ATAT C Acacaggt
D2	<u>CCG</u> ATAT C GGAGGGA
V81D1D2	TGTGGGTCA G ATAT C GGAGGGA
≡ V81D2 (Type 7)	
B	
D1	cactgtgGTGGC ATAT C Acacaggt
D2	<u>CCG</u> ATAT C GGAGGGA
D1D2	cactgtgGTGGC ATAT C GGAGGGA
V81	TGTGGGTCA G ATAT
V81D1D2	TGTGGGTCA G ATAT C GGAGGGA
≡ V81D2 (Type 7)	

図1 胎児胸腺におけるV81-D1-D2の組換え

上段から下段に向かって組換えが連続的に生じると考える。AおよびBのいずれにおいても最終配列が同一になり、D1の痕跡が消失する事に注目する。

動物実験をめぐる法的規制

「動物の保護及び管理に関する法律」と「廃棄物の処理及び清掃に関する法律」

鐘紡（株）薬品開発第一研究所 海野 隆

1、はじめに

広辞苑によれば「法」は「①物事の普遍的なあり方。ものごとをする仕方。また、それがしきたりとなったもの。のり。おきて。②社会生活維持のための支配的な（特に国家的）規範」とされており、別に仏教用語としての「法」としては「①真理。道理。正しい理法。存在の法則性。②ものの性質。特性。属性。③一切の存在するもの。④ 存在するものの分類。⑤真理を表現した教説。仏の教え。仏法。⑥仏の教えを記した聖典。⑦正義。善。正しい行為。」であるとされている。

われわれは一般的には「法律」を「社会生活維持のための支配的な（特に国家的）規範」ととらえているのではないかと思うが、「法律」の本質はむしろ仏教用語としての「法」の方にあるかもしれない。

本稿では、われわれ実験動物を取り扱うものが知っておくべき「法」として「動物の保護及び管理に関する法律（昭和 48 年）」および「廃棄物の処理及び清掃に関する法律（廃棄物処理法：昭和 45 年）」について述べることにする。

2、動物の保護及び管理に関する法律（昭和 48 年）

1) 基本原則

昭和 48 年に施行された「動物の保護及び管理に関する法律」はわれわれ人類が動物に対してとるべき基本精神を記述したバイブルのようなものである。実験動物教育の現場ではともすればこの法律の存在が忘れられ、「実験動物の飼養および保管等に関する基準（総理府告示第 6 号：昭和 55 年 3 月）」や「動物実験に関する指針（日本実験動物学会：昭和 62 年）」から講述されがちであるが、これら指針や解説のよりどころとして、この法律の示すところの意味は極めて深い。

この法律は「動物の虐待の防止、適正な取り扱いその他動物の保護に関する事項を定めて、国民の間に動物を愛護する気風を招来し、生命尊重、友愛及び平和の情操の涵養に資するとともに動物の管理に関する事項を定めて動物による人の生命、身体及び財産に対する侵害を防止する」ことを目的とし（第 1 条）、「何人も、動物をみだりに殺し、傷つけ、または苦しめることのないようにするのみでなく、その習性を考慮して適正に取り扱うようにしなければならない（第 2 条）」ことを基本原則とする。

2) 動物の飼養と保管

この法律では動物を適正に飼養及び保管するために「動物の使用者または占有者は、その動物を適正に飼養し、または保管することにより、動物の健康及び安全を保持す

るとともに動物が人の生命、身体若しくは財産に害を加え、または人に迷惑を及ぼすことのないように努めなければならない。内閣総理大臣は、関係行政機関の長と協議して、動物の飼養と保管に関し、よるべき基準を定めることができる。地方公共団体は、動物の健康と安全を保持するため、条例で定めるところにより、動物の飼養及び保管についての指導及び助言に関し必要な措置を講ずることができる。

地方公共団体は、動物による人の生命、身体または財産に対する侵害を防止するため、条例で定めるところにより、動物の所有者または占有者が動物の飼養及び保管に関し、遵守すべき事項を定め、人の生命、身体または財産に害を加えるおそれがある動物の飼養を制限するなど、動物の飼養及び保管に関し、必要な措置を講じることができる（第3.4.5条）」と述べている。

この法律の第3.4.5条を受けて前述の「実験動物の飼養および保管等に関する基準」のほか「犬及びねこの飼養及び保管に関する基準（総理府告示第28号：昭和50年7月）」「産業動物の飼養及び保管に関する基準（総理府告示第22号：昭和62年10月）」「動物の飼養及び保管に関する条例（各自治体）」「危険な動物の飼養及び保管に関する条例（各自治体）」「動物保護管理条例（各自治体）」が総理府や各自治体から示されている。

この中でもっともわれわれに関係が深いのが「実験動物飼養及び保管等に関する基準」である。この基準は冒頭に一般原則として「管理者等は、実験動物の生理、生態、習性等を理解し、並びに愛情を持って、飼養し、及び科学上の利用に供するよう努めるとともに、責任を持ってこれを保管し、実験動物による人の生命、身体又は財産に対する傷害及び人の生活環境の汚損を防止するよう努めること」が述べられ、それに続いて「定義」「導入にあたっての配慮」「実験動物の健康及び安全の保持」「実験等の実施上の配慮及び終了後の処置」「危害防止」「生活環境の保全」「実験動物生産者の採るべき措置」について言及されている。

この基準を受けて「動物実験に関する指針（日本実験動物学会：昭和62年）」「大学等における動物実験について（文部省学術国際局長通知：昭和62年）」「サルを用いる実験の遂行のための基本原則（日本霊長類学会：昭和61年）」「生理学領域における動物実験に関する基本的指針（日本生理学会：昭和63年）」などの指針や原則が定められている。

3) ヒトと動物との共存

先に述べたように「動物の保護及び管理に関する法律」の大きな目的は「動物の健康及び安全を保持するとともに動物が人の生命、身体若しくは財産に害を加え、または人に迷惑を及ぼすことのないように努めること」である。これらについては「獣医師法（昭和24年）」「家畜伝染病予防法（昭和26年）」「狂犬病予防法（昭和25年）」「犬の輸出入検疫規則（昭和25年）」「鳥獣保護及び狩猟に関する法律（大正7年）」「絶滅の恐れのある野生動植物の国際取引に関する条約（昭和55年）」

「水質汚濁防止法（昭和 45 年）」「下水道法（昭和 33 年）」「騒音規制法（昭和 43 年）」「悪臭防止法（昭和 46 年）」「へい獣処理場に関する法律（昭和 23 年）」「振動規制法（昭和 51 年）」「公害対策基本法（昭和 23 年）」「大気汚染防止法（昭和 43 年）」「廃棄物の処理および清掃に関する法律（昭和 45 年）」などの関連法規を参照し運用する必要がある。

ところで施設を新設したり増設したりする場合には、その立地条件によりさまざまな法律が関係してくる。「農地法（昭和 27 年）」「都市計画法（昭和 43 年）」「都市緑地保全法（昭和 48 年）」「消防法（昭和 23 年）」「建築基準法（昭和 25 年）」「建築物における衛生環境確保に関する法律（昭和 45 年）」などがそれで、これらは建築担当者のみならず、われわれ実験動物担当者も留意の対象として関心を払う必要がある。また、実験動物関係では「実験動物の飼育施設の建築及び設備計画の基準案（環境調節実験室委員会：昭和 41 年）¹⁾」「ガイドライン 実験動物施設の建築および設備（実験動物施設基準研究会議：平成 8 年）²⁾」といった基準案やガイドラインがある。

なお、上記「ガイドライン 実験動物施設の建築および設備」では実験動物に関する法律、基準、条例に関する詳細な一覧表が掲載されているので参照されたい。

4) 動物の処分

「動物の保護及び管理に関する法律」第 10 条及び第 11 条には、動物を殺す場合の方法、動物を科学上の利用に供する場合の方法及び事後措置が記されている。すなわち「動物を殺さなければならない場合には、できるだけその動物に苦痛を与えない方法によってしなければならない。内閣総理大臣は、関係行政機関の長と協議して、前項の方法に関し必要な事項を定めることができる（第 10 条）」「動物を教育、試験研究または生物学的製剤の用、その他の科学上の利用に供する場合には、その利用に必要な限度において、できる限り動物に苦痛を与えない方法によってしなければならない。回復の見込みがない状態に陥っている場合には、その科学上の利用に供したものは、直ちに、できる限り苦痛を与えない方法によって動物を処分しなければならない。

内閣総理大臣は、関係行政機関の長と協議して、第一項の方法及び前項の措置に関し、よるべき基準を定めることができる（第 11 条）」とされている。

これを受けて、先年「動物の処分方法に関する基準（総理府告示第 40 号：平成 7 年 7 月）」「実験動物の安楽死に関する指針（日本実験動物協会：平成 7 年 8 月）」などの基準や指針が提示されたところである。

5) 罰則規定

また最後に第 13 条には罰則として以下のように記載されている。

「保護動物（家畜、愛玩動物、実験動物など）を虐待し、または遺棄した者は、3

万円以下の罰金または科料に処する」

この罰則規定の有無に拘わらず、われわれが動物を倫理的、人道的に取り扱わなければならないことはいうまでもない。

3、「廃棄物の処理及び清掃に関する法律（廃棄物処理法）」

1) 廃棄物とはなにか

「廃棄物の処理及び清掃に関する法律（廃棄物処理法：昭和45年）」において「廃棄物とは、占有者が自ら利用し、又は他人に有償で売却することができないために不要になったものをいい、これらに該当するか否かは、占有者の意志、その性状を総合的に勘案すべきものであって、排出された時点で客観的に廃棄物と観念できるものではない。一中略一例えば、し尿であってもそれが原材料となって売買される場合には、その物は廃棄物とはいえない。他方、『自ら利用』とは、他人に有償売却できる性状の物を占有者が使用することをいい、他人に有償売却できない物を排出者が使用することは『自ら利用』には該当しない」と解説されている³⁾。

すなわち「廃棄物である」と定義づける重要なポイントは「有償売却できないもの」であることにあり、後述の実験動物死体を肥料原料として有償で引き取ることにより、廃棄物処理法の規制を免れうるとする根拠はここにある。ところで廃棄物は、図1に示すとおり、その帰属する処理体系によって「一般廃棄物」か「産業廃棄物」かに分類される。すなわち、日常生活から排出される「ごみ」や「し尿」そして、事業活動から生ずるものでも、環境汚染上の問題が少なく、一般的には市町村の処理能力をもって対処することが可能なものは「一般廃棄物」である。また、事業活動から生じる廃棄物で、量的質的に環境汚染の原因となる可能性のあるものを「産業廃棄物」として事業者自らが処理しなければならないとしている。産業廃棄物は燃え殻、汚泥、廃油、廃酸など図1に示す19種類であり、一般廃棄物は産業廃棄物以外の廃棄物をいう。

なお、畜産農業に係わる動物の死体は産業廃棄物とされているが、実験動物死体は魚市場、飲食店等から排出される動植物性残さ、又は厨芥類と同様に事業活動に伴った一般廃棄物に位置付けられている。実験動物死体が量的質的に環境汚染の原因となる可能性が少ないことからみて、この位置付けにはうなづくことができる。しかし「一般廃棄物」には前述のように「市町村の処理能力を持って対処することが可能な廃棄物」としての側面もあり、多くの自治体において実験動物死体処理用の施設を保有していないか、または十分でないという実態との間には大きな乖離（かいり）がある。

2) 実験動物死体等の処理に関する法的規制

廃棄物処理法によれば、実験動物死体は一般廃棄物（事業系一般廃棄物）である。事業系一般廃棄物は家庭から排出される一般ごみ（生活系廃棄物）と異なり、排出事業者自身の責任で処理されなければならない。処理の方法としては、①排出事業者自

身の処理施設において処理する。②外部の一般廃棄物処理場に処理を委託する。の2つの選択肢がある。また後者には、排出事業者自身が処理場まで廃棄物を搬送するか、一般廃棄物収集運搬業者に搬送を委託する。という選択肢がある。廃棄物処理法の趣旨に添えば、排出事業者が施設内に実験動物死体処理用の焼却炉を持つことがもっとも望ましいといえるが、事業場の立地条件や職員の確保、コスト的問題を勘案すると施設内に処理施設を設置できる事業場は恵まれているといえよう。

さて、廃棄物の収集運搬処理を外部業者に委託する場合に注意しなければならないのは、業者委託した場合でも排出事業者としての責任を免れることはできないことである。このため、収集運搬業者については実験動物死体を対象とした「一般廃棄物収集運搬業」の許可が自治体（市町村）から与えられているか否かを確認する必要がある。もし廃棄物の排出地の自治体と処理場のある自治体が異なる場合には、双方（廃棄物の積みおろしを行う区域）の許可を受けている必要がある。なお、廃棄物を搬送の過程で積み替えること（中継）は一般廃棄物収集運搬業者には許可されていないので注意を要する。処理業者についても同様に、実験動物死体を対象とした「一般廃棄物処理業」の許可を自治体（市町村）から受けている必要がある。

業者と契約する場合には、まず信頼できる業者を選択することから始めなければならない。契約に先立ち業者の事業場を視察し、収集運搬や処理の実態が適正であることを確認しておくべきである。留意点としては許可証の原本を確認し、その場でコピーを入手すること、「廃棄物の処理及び清掃に関する法律」、「同施行令」、「同施行規則」及び「市町村条例」を満たしている業者であること、廃棄物の処理ルートが明確にされその処理能力に無理がないこと、環境への配慮が万全で、地域住民の理解が得られていることなどがあげられる。なお、収集運搬業者と処理業者が異なる場合にはそれぞれの業者と2者契約をすることも忘れてはならない。

一般廃棄物の場合、収集運搬業および処理業の許可は毎年更新される。業者は更新の都度、委託者に許可証のコピーを提出するはずである。しかし一年に一度のことでもあるから業者の事業場に赴き、許可証の原本を確認するとともに、引き続き委託できる業務実態にあることを把握しておくことが望ましい。これは、業者との良好な信頼関係を保持するうえでも重要であり、排出事業者として果たすべき最小限の責任でもあろう。

実際の収集運搬処理の委託した後に注意すべき点としては、実験動物死体処理伝票（マニフェスト）を業者より確実に入手（提出がない場合には確実に処理されていることを調査する必要がある）し、保管しておくこと。自治体は排出事業者の実験動物死体の処理実態を問い合わせることがあるから、排出実績と排出計画を提示できるようにしておくこと。などがあげられる。

蛇足になるが、①実験動物死体を埋葬供養の対象と考えるなら廃棄物処理法の対象外となる、②肥料原料として有償で引き取るなら廃棄物処理法の対象外となる、③実験動物死体が感染性であると解釈するなら一定の条件下で特別管理産業廃棄物と一

緒に処理できる、などの論議が数年前に起こった。実験動物死体をどのように解釈し、取り扱うかは行政の指導に従うべきものであるが、われわれ排出事業者もその社会的責任を負うべき立場にあることから、どの解釈が正しいかを判断するために相当の知識を持つ必要がある。

①について、実験動物死体は一般廃棄物に該当するため、動物霊園業者が実験動物死体の処理を行う場合には一般廃棄物処理業の許可を得る必要があるというのが行政の見解である⁴⁾。

②の肥料原料とすることについては、任務を終えたあとの実験動物死体を売却し、さらに再利用するという行為に対し、強い心理的抵抗を表明する人々がいることを考慮すべきである。

③の実験動物死体における感染性の有無については、慎重に考える必要がある。

平成3年に「廃棄物処理法」が改正され、「爆発性、毒性、感染性、その他の人の健康または生活環境に係わる被害を生ずるおそれのある性状を有するもののうち、政令で指定されたもの」は「特別管理廃棄物」として取り扱われ、これに違反した排出事業者は1年以下の懲役、または100万円以下の罰金が課せられることになった。特別管理廃棄物のなかにも一般廃棄物と産業廃棄物が存在し、それぞれ「感染性一般廃棄物」、「感染性産業廃棄物」が包含される。これによると感染性の実験動物死体は、感染性一般廃棄物として処理されなければならない。

実験動物の感染性の目安については「人畜共通感染症に罹患している動物の排泄物（排泄物、分泌物及び滲出物）により人に感染症を生じさせるおそれがあると医師等が認める疾患及びその汚染物」とされている⁵⁾。したがって感染実験に用いられたウイルスや細菌が実験動物には病原性を示しても、人に対する病原性がなければ（すなわち人畜共通感染症でなければ）、その実験動物死体は単なる一般廃棄物として処理できると考えてよい。なお、人畜共通伝染病の詳細については成書⁶⁾を参考にされたい。また感染実験の現場では、バイオハザードコントロールの手順に従って安全度2以上の実験に用いた動物死体は高圧蒸気滅菌を行ったのち区域外に排出することが常識になっている。このような手順で滅菌処理された動物死体は一般廃棄物として取り扱うことができるため、感染実験の現場から感染性廃棄物としての実験動物死体の実験室外に排出されることは通常ないと判断される。人畜共通感染症の感染実験に使用された実験動物死体は滅菌されるまでは感染性一般廃棄物（特別管理一般廃棄物）として取り扱われなければならない⁷⁾。

むしろ注意すべき点は、感染実験以外の実験で用いる実験動物が人畜共通感染症に罹患している場合のことである。げっし類やイヌのように厳重に管理された動物業者からSPF動物やワクチン処置した動物を購入し、確実に微生物統御された動物飼育室で実験する限りにおいては、この可能性は極めて低いといえようが、サルの場合には検疫や飼育の過程で人畜共通感染症が発見される場合が皆無とはいえない。人畜共通感染症と診断されたり、その可能性があるとは判断され、安楽殺もしくは死亡した動物

は施設内で滅菌もしくは焼却処理するまで感染性一般廃棄物として取り扱われなければならない。

感染性一般廃棄物は感染性一般廃棄物処理業者が取り扱うことになっている。しかし感染性廃棄物が大量に排出される医療機関からはヒト血液が付着した脱脂綿やガーゼなどの「感染性一般廃棄物」と同じく、ヒト血液が付着した手術用手袋などの「感染性産業廃棄物」が分別されずに排出されることが多い。このため感染性一般廃棄物が感染性産業廃棄物とともに排出される場合には、感染性産業廃棄物業者がまとめて処理してもよいこととされている。

上記のように、ヒトの血液が付着したものは感染性廃棄物とされているが、「動物の血液等については、人の血液と比較して、人に感染症を生じさせる危険性が格段に低いことから、血液を介して人に感染する人畜共通感染症に罹患している場合を除き、感染性廃棄物として取り扱う必要はない」とされている。なお「動物の血液等が付着した鋭利なものについては、メカニカルハザードについても十分配慮する必要があることから、感染性廃棄物と同様の処理をすること⁸⁾」とも指示されているので注意を要する。すなわち注射針やメス刃など鋭利なものは、感染実験以外の通常の動物実験に使用されたものであっても感染性産業廃棄物として取り扱うことが求められている。これら損傷性廃棄物を感染性一般廃棄物としての実験動物死体とともに排出する場合には、上述のように特別管理産業廃棄物業者が処理できるとの解釈も可能かもしれない。しかし感染性でない実験動物死体を損傷性廃棄物とともに特別管理産業廃棄物業者に委託処理できるか否かについては、自治体により見解が異なる場合がある。排出事業者が独自の判断をせず、行政の担当窓口にご相談した上で対応を考えるべきであろう。

4. おわりに

われわれ研究者そして技術者は動物実験を通して、人類の健康と福祉に多大の貢献をしてきた。また今後もこの付託に応えていく任務を負っている。そのわれわれが社会的ルールとしての法律や種々の規制を遵守し、豊かな社会の樹立と環境の保全に努めていくことで動物実験への理解と期待は一層高まり、動物実験の必要性、重要性の認識はより一層深くなっていくはずである。

なお、高度な教育を受けた人ほど法律を自分勝手に解釈しがちである。しかし忘れてならないのは、われわれは実験動物や動物実験の専門家であり、法律の専門家ではないということである。したがって疑義や問題発生が予見されたときには、独断を避け積極的に行政のコンサルテーションを受けるとともに、行政へ能動的に働きかけていくことが重要である。

文献

- 1) 実験動物施設の建築および設備計画の基準案 環境調節実験室委員会・小動物班

実験動物 15 17-41 1966

- 2) ガイドライン 実験動物施設の建築および設備 日本建築学会編 1996アドスリー (東京)
- 3) 新廃棄物処理法の解説、厚生省水道環境部編 p A25
財団法人日本環境衛生センター (川崎) 1993
- 4) 厚生省生活衛生局水道環境部環境整備課長通知「研究機関等から排出される実験動物の死体の処理について」衛環第243号 平成6年8月12日
- 5) 感染性廃棄物処理マニュアルp44 社会保険研究所(東京)1993
- 6) 微生物によるバイオハザードとその対策、 岩田和夫編ソフトサイエンス社 (東京) 1980
- 7) 感染性廃棄物処理マニュアル p27 社会保険研究所(東京)1993
- 8) 感染性廃棄物処理マニュアル p8 社会保険研究所(東京)1993



図 1 廃棄物の種類と分類

毒性試験の評価とヒトへの外挿

宮嶋宏彰

1) はじめに

今日化学物質は、さまざまな形態をとって人間生活と密接にかかわっている。医薬品、食品添加物、化粧品、洗剤など人体にとって直接関係のあるもの、農薬、殺虫剤、動物薬など間接的に関係のあるものなど、その数は3万種類とも5万種類ともいわれている。これらの膨大な数の化学物質は、今日にいたるまで人間生活にはかりしれない貢献をもたらしたが、その反面、それらの化学物質のなかには、われわれの生活環境や人体それ自身に予期せぬ有害作用があることが、ここ数十年來にわたって次第に明らかになってきた。このような状況のなかで、医薬品を開発する立場から、どのようにとりくんでいるか、とくに医薬品の毒性試験成績をどのようにヒトへ対応しているかを考察してみたい。

2) 新薬の開発と動物実験

新薬の開発にあたっては、必ず動物実験が実施される。一般に新薬を開発する場合には、2つの柱が必要である。1つは他剤にはみられない新規な有効性があることであり、いま1つは副作用が極めて軽微であって安全性が高いことである。有効性に関する評価は、数多くの基礎的な薬効薬理試験を行い生物学的活性を確認し、次いで薬物の吸収、分布、代謝、排泄などを検索し、薬物の有効性に対応した動態が研究される。このような薬効評価のための試験は、すべて動物実験に依存している。一方、安全性の評価には、一般薬理試験や単回投与毒性試験、反復投与毒性試験、生殖・発生毒性試験、変異原性試験、がん原性試験、抗原性試験、依存性試験、局所刺激性試験など極めて多岐にわたっており、ときには、1つの薬物について30種類にもものぼる毒性試験によって、徹底的に安全性を検討したうえで総合的に評価される。このような安全性評価のための毒性試験もそのほとんどが動物実験によっておこなわれる。新薬開発の過程には、このように数多くの動物実験を通じて、詳細に薬物の有効性と安全性を確認して、はじめて新薬として臨床医の手に託し、ヒトにおける臨床試験が実施される。このような目的に使用される実験動物は、表1のように定義されているが、マウスにせよ、イヌにせよ、つい数十年前までは単なるペットであって、われわれにとって日常的な愛玩動物にすぎなかった。しかし、今日では、新薬の開発など現代科学の最先端に立って、人類の福祉に多大の貢献をしている。

表 1 実験動物の定義（田嶋を 1 部改変）

実験動物	検査、検定、診断、製造を含めて研究に重要であるとして飼いな らされ繁殖、生産される動物
家 畜	人類社会に重要であるとして、飼いなされ繁殖、生産される 動物で、研究用として使うために必要な厳しい遺伝、環境コン トロールはなされていない
捕獲動物	自然界から捕獲した野生動物で、人為的な繁殖、生産は行われ ていない

（前島）

3) 動物実験の限界

医薬品を開発する場合、対象にしているのはあくまでもヒトであり、他の動物種ではない。したがって、いくら動物実験で有効性が確認され、安全性が保証されていても、ヒトで無効であったり、強い毒性があっては、開発する意味がない。そこで、特定の動物実験から得られた成績をヒトにあてはめようとする試みがなされる。これを外挿（extrapolation）という。しかし、そこにはおのずから限界がある。田嶋ら（1979）は、ある実験処置に対する動物の反応 R を次式で表現している。

$$R = (A + B + C) \times D + E$$

A：動物の種(species)を超える共通の反応
B：動物の種または系統(strain)特有の反応
C：個体差または個体としての反応
D：環境因子
E：実験誤差

動物実験には、反応の種類によって大小の違いはあっても、必ず A(動物の種を超える共通の反応)が存在する。この共通性があるからこそヒトへの外挿も可能となり、この点にこそ、動物実験の存在意義がある。また、動物には、いうまでもなく種または系統特有の反応 B があるから、実験動物の反応からヒトの反応を予測(外挿)しようとするとき、種特有の反応のために、どうしても超

えることのできない動物実験の限界が存在する。この限界を可能な限り克服するために、いろいろな工夫がなされており、薬物の安全性試験に2種以上の動物を使用しているのもその工夫の1つである。いずれにせよ、新薬の有効性や安全性の最終的な評価は、ヒトによって検討する以外に方法がないのが現状で、ヒトで検討する場合には、人道上の理由から臨床試験に強い規制があって、臨床試験に入る前に十分な毒性試験が要求される。

4) 毒性試験の問題点

厚生省は昭和59年2月薬審第118号によって、一般毒性試験法（急性、亜急性及び慢性毒性試験法）及びがん原性試験法、生殖試験法、変異原性試験法のガイドラインを定め、医薬品の製造及び輸入の承認申請に必要な毒性試験法のガイドラインとして通知した。しかし、ガイドラインの解説でふれているように、この試験法は必要最小限の要求項目であり、科学的に適正な評価ができれば、必ずしも細部にわたってガイドラインに適合しなくてもよいと述べられている。また、厚生省は医薬品に関して、ガイドラインの適用範囲を以下のように示している。

臨床使用予想期間	毒性試験投与期間
単回または一週間以内の連続投与 一週間を超え、4週間までの連続投与 4週間を超える連続投与 臨床使用期間に関係なく特に必要と認められるもの	単回、1か月 単回、1か月、3か月 単回、1か月、6か月 単回、1か月、6か月 （非げっし類では12か月を考慮する）

例えば、ヒトに一週間以内で使用する医薬品については、単回と1か月の反復投与毒性試験が必要であるという。しかし、これについても、ヒトへの安全性を保証する点に関して、明確な科学的根拠があるわけではない。裏返せば、この適用範囲内で毒性試験を行っても、ヒトでの安全性を100%保証はできない。しかし、社会的要請が先行し、学問とりわけ毒性学が、それに追いついていけないのが現状である。

5) 毒性評価からヒトへの外挿の具体例

毒性試験の成績からヒトへの外挿を考えると、まず問題点の認識と整理が何

よりも肝要である。次いで、種によって反応に差がある理由、または、異なる種が同一の反応をする理由について、深く考察することが大切である。

問題点の認識と整理

1) 量の外挿（ヒトで発現する程度）

- i.) 質、量ともほぼ同一
- ii) 質は同一であるが、量が異なる
- iii) 量が大きく異なるために、質が異なるようにみえる

2) 質の外挿（別の形でヒトに発現するか全く発現しない）

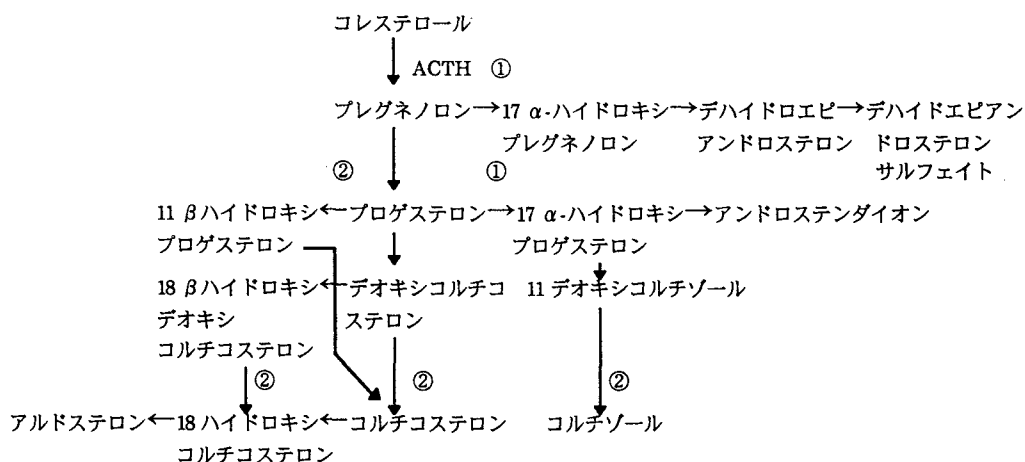
- i) 質、量ともに異なる
- ii) 対象が異なるために、質が異なるようにみえる

3) Simulation と Comparative approach

次に具体例について考えてみよう。テストステロンプロピオネイトのような男性ホルモンを、数か月間大量にラットに投与すると、多発性心筋炎が発現する。したがって、他種動物やヒトでも同じように男性ホルモンを投与すると、心筋炎が発現すると考えてよいだろうか。テストステロンには酵素阻害作用があることが知られており、副腎皮質では、ステロイドの合成過程の 11β -hydroxylase 活性を阻害することが知られている。図1はヒトの副腎皮質におけるステロイド合成経路を示している。コレステロールを前駆物質として、ACTHの支配下で、各種のステロイドを合成している。グルココルチコイドとしては、コルチゾールとコルチコステロン、副腎性男性ホルモンとしては、デヒドロエピアンドロステンサルフェイトを産生するが、ヒトでは、コルチゾールとデヒドロエピアンドロステンサルフェイトが圧倒的に多く産生される。この場合、グルココルチコイドとしては、コルチコステロン産生経路とコルチゾール産生経路があるが、ラット、マウス、ウサギではコルチコステロン産生経路が圧倒的に強い。一方、イヌ、ブタ、ウシ、モルモット、サル、ヒトではコルチゾール産生経路が強い。したがって、図1のなかで、デオキシコルチコステロンからコルチコステロンへ転換する場合、 11β -hydroxylase が必要であ

るが、テストステロンによって阻害されると、ラットでは、デオキシコルチコステロンが蓄積し、血中に放出される。デオキシコルチコステロンは、ミネラルコルチコイド活性をもっているため、高濃度で一定期間作用し続けられれば、多発性の心筋炎が発現する。事実、テストステロン以外の 11β -hydroxylase 活性阻害剤の投与でラットに多発性心筋炎を誘発できるし、副腎摘除ラットにテストステロンを投与しても心筋炎はおこらない。また、コルチゾール産生経路が強いイヌ、モルモットに大量のテストステロンを投与しても、血中デオキシコルチコステロン濃度の上昇も心筋炎も発現しない。したがって、コルチゾール産生経路の優位なヒトでは、大量のテストステロンを投与しても、多発性心筋炎は発現しないと考えられる。

図1、副腎皮質のステロイド合成



- ①：17 α ヒドロキシシレース マウス、ラット、 モルモット、イヌ、 ヒト、サル
②：17 β ヒドロキシシレース ウサギ ブタ、ウシ

6) 毒性試験からヒトの臨床試験へ

薬物に関する毒性、吸収、分布、代謝、排泄、薬効薬理作用など数多くの動物実験成績が得られると、次には、はじめてヒトに投与する臨床試験が行われる。それは、健康人（通常は男子）の比較的限定された人数について実施し、薬物を投与して、吸収、分布、代謝、排泄などに関して、各投与経路における薬物の生体内利用率 (bioavailability) を調べ、その薬物のヒトにおける薬効薬理量や投与量や投与間隔などを決める。このような臨床試験の開始にあたっては、ヒトの体内動態を予測することが重要であるが、現状では、動物実験の成績が

らヒトの体内動態を推測（外挿）する以外に方法がない。しかし、動物実験からヒトへの外挿は、依然として科学的に確立された方法や学問体系が不十分で、動物における体内動態や作用機序や類似化合物からの情報などを根拠に、絶対に安全と思われる低用量から試行錯誤のうえ、最初の臨床試験を実施しているのが実情である。このように、現在のところ、全ての薬物において動物実験の成績をヒトへ正確に外挿する方法はない。それほどに、実験動物とヒトとの間における生体内動態とくに代謝速度や代謝経路や薬物に対する感受性には歴然とした種差が存在する。例えば、フェニルブタゾンの代謝半減期は下表のように、ヒトでは他の動物種と比較して極めて長い。しかし、その活性代謝物のパラハイドロキシフェニルブタゾンノ代謝半減期は、ヒトではフェニルブタゾンと同じ 72 時間であるが、イヌでは 30 分にすぎない。

フェニルブタゾンの代謝速度に関する動物種差	
動物種	代謝半減期（時間）
ヒト	72
サル	8
イヌ	6
ウサギ	3
ラット	6
モルモット	5
ウマ	6

(越前)

このような動物種間の薬物動態の違いは、単に代謝速度による量的な差だけではなく、代謝経路の違いのような質的な差にもよるのである。臨床試験の実施に当っては、毒性試験の成績やこれまでに臨床でヒトに使用されてきた類似薬を参考にしてヒトへの投与量がきめられる。その際、下にみられるように、はじめてヒトへ投与する用量として、Hahneman Medical College の内科研究委員会の基準が参考にされる。

初回投与量は最も感受性の高い動物の

-
- 1) LD50 値の 1/600 以下
 - 2) 亜急性毒性試験における最大無毒性量の 1/60 以下
 - 3) ED50 値の 1/60 以下
-

しかし、この基準の科学的根拠は薄弱で、経験則にもとずいて設定されたものである。このように、動物実験の成績をもとに、ヒトの安全性や有効性を正確に予測しうる十分な研究はない。Litchfield らは6種類の薬物について、ラット、イヌ、ヒトでそれぞれ認められた副作用を比較した。下の表は、ラットまたはイヌのみでみられた毒性試験成績から、ヒトの副作用を予測できる確率は、それぞれ7%、26%と低いですが、ラットとイヌの双方ともにみられた毒性がヒトで副作用として認められる確率は68%と高いことを示している。しかし、客観的に数字で表現できる検査項目は、動物種間でも容易に比較できるが、吐気、めまい、頭痛などの主観的な副作用を動物の毒性として正確に評価するのは極めて難しい。

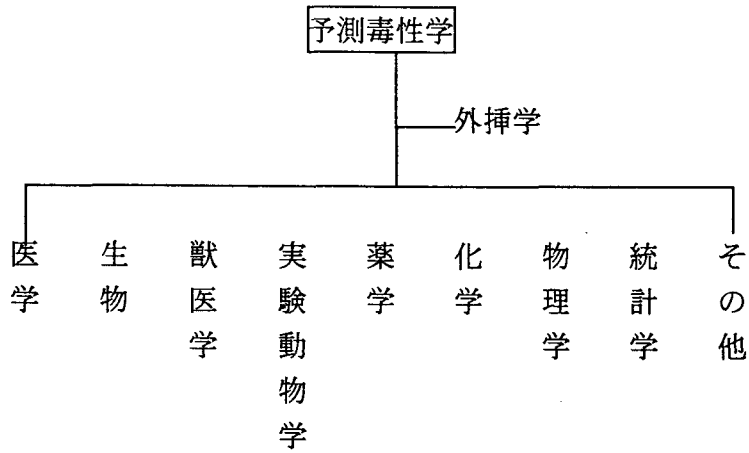
動物実験による薬剤の安全性の評価 (Litchfield)				
89 項目の作用の出現 (6 種類の薬剤)				
動物種	頻度	動物種	頻度	合計
		ヒト	42	
ラット	13	ラット、ヒト	1	14
イヌ	25	イヌ、ヒト	9	34
ラット、イヌ	12	ラット、イヌ、ヒト	26	38
合計	50		78	
				ヒトの出現
				7 (%)
				26 (%)
				68 (%)

多くの実験動物のなかで、サル類は系統発生上ヒトに最も近いので、臨床試験に入る前に、サル類で試験を行うのが望ましいが、全ての動物実験をサル類で行うべきであると考えるのは危険である。例えば、モルヒネ拮抗薬の鎮痛効果はサル類よりも、マウス、ラットのほうがヒトに近いという。ヒトに限らず各種動物への外挿の際の実験動物の選択は、それぞれの実験によって異なり、一概に、特定の動物種に特定することはできない。

7) 今後の毒性試験の課題

毒性試験に使用する実験動物に、より高い精度とより高い再現性を求め、さらに、使いやすく経済的に手ごろな実験動物を開発する努力は、今後ともなされようが、近年、動物愛護運動の影響もあって、動物実験にかわる代替え法による毒性試験の試みがなされるようになってきた。このような *in vitro* の試験は再現性が高く、限定された特定の生物現象を解析するには都合が良いが、薬

物の毒性試験にみられるように、個体としての生物の反応を検索するには不適當である。 いずれにしても、今後の毒性試験は、科学的、倫理的な動物実験を通じて行われていくであろう。 また、下に示すように、科学の進歩とともに毒性学が発展し、外挿の科学が学問として体系づけられた後に、予測毒性学ともいふべき学問が確立し、もっと動物実験から確度の高いヒトへの外挿が可能となる日がくることが切望される。



企画にあたって 「実験用イヌの現状と将来展望」

芹川忠夫（京都大学医学部附属動物実験施設）

今回の研究会は、「医療の発展における実験用イヌの貢献」というテーマを選び、2名の先生方にご講演をお願いした。この機会に、そのキーワードの一つである実験用イヌの現状と将来展望について、「実験動物検討会報告書（平成7年2月）、実験動物検討会」の資料などを参考に問題点を取り上げてみた。

まず、なぜ実験用にイヌが用いられるかという、素朴な疑問を改めて問うことにする。その答えの一つとして、このことが、種々の議論の原点にもなっているのであるが、広い意味で身近な動物であることが挙げられる。もう少し、実験動物として利用する科学的なあるいは具体的な面から答えると、非齧歯類の汎用性がある動物であり、調教が可能なこと、血液などの生体試料が経時的に容易に採取できること、外科的処置が容易なことがその理由として挙げられる。今回の範疇である医学研究においては、マウスやラットのような小動物では目的が達成できない以下の研究への有用性を特に指摘することができる。すなわち、1) 臓器移植に向けた研究、2) 人工臓器、生体材料の開発・改良研究、3) 心臓血管系機能の研究、4) 消化器系機能の研究、5) 数年にわたる長期観察を要する研究などである。

それでは、実験用にどの程度イヌが使用されているか資料を調べてみることにする。図1は、1956年から1990年にわたる年間のイヌの使用数の推移である。1988年まで増加傾向が見られたが、この年をピークにやや下降傾向が伺える。実験用に販売されているイヌの内訳は、図2に示すように、1991年における調査では雑種犬（品種が同定されているものが、この中にも当然含まれているだろうから、ビーグル犬以外と捉えた方が正しいと思われるが）とビーグル犬がほぼ同じ割合であった。これを1990年について集計された利用機関別の犬種分類データ（図3）をもとに調べてみると、想像されたごとく大学関係ではほとんどが雑種犬を使用しており、製薬企業などでは半数以上がビーグル犬で占められていた。また、京都大学医学部においてイヌの常時飼育希望匹数を調査

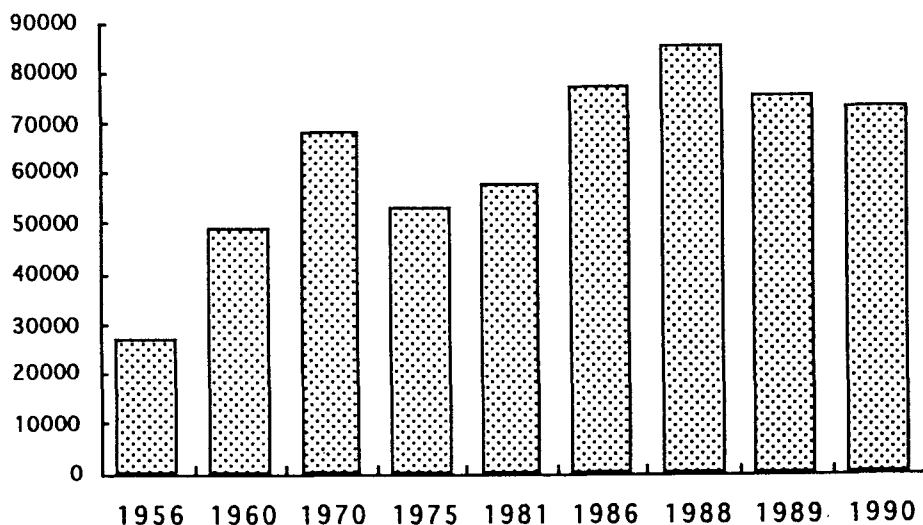


図1 イヌの使用数推移

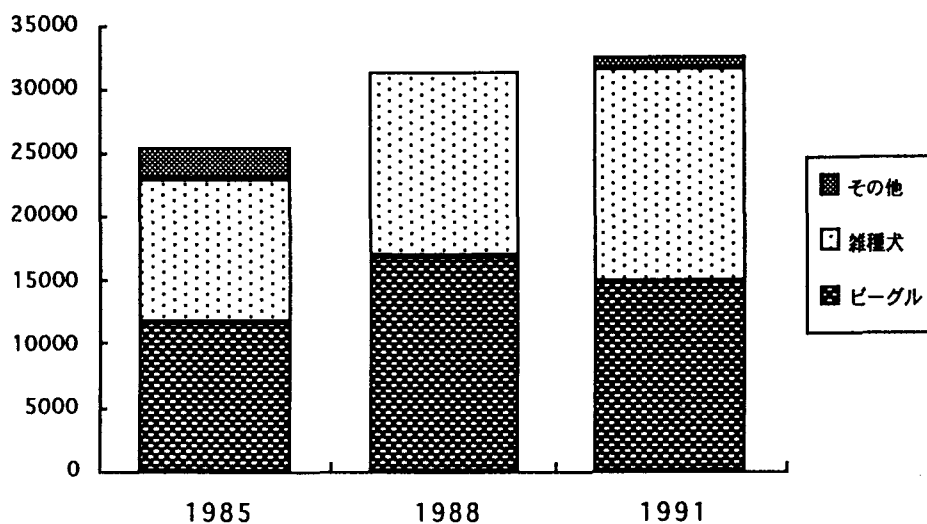


図2 販売イヌの推移

した1995年のデータでは、図4に示すように、ビーグル犬に加えて大型犬の飼育希望が挙げられている。実験用に利用されている雑種犬には、「試験研究若しくは生物学的製剤の製造の用その他の科学上の利

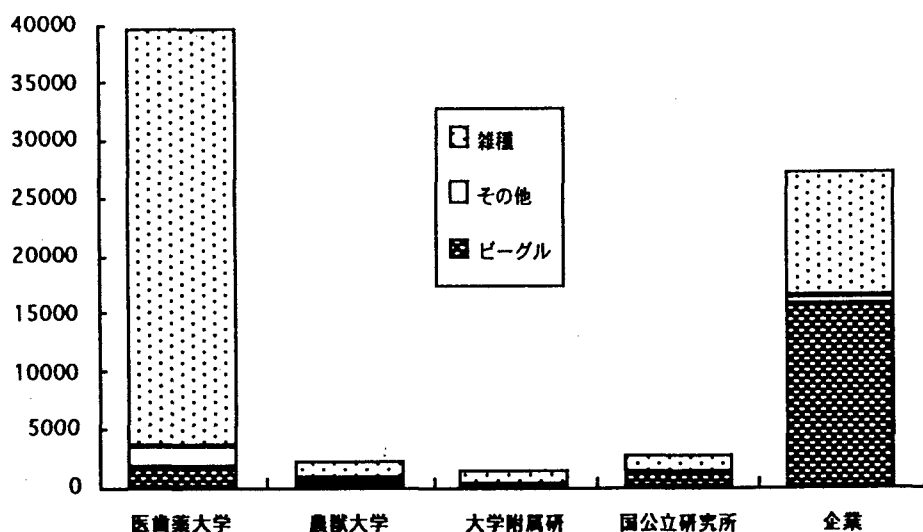


図3 使用された犬種

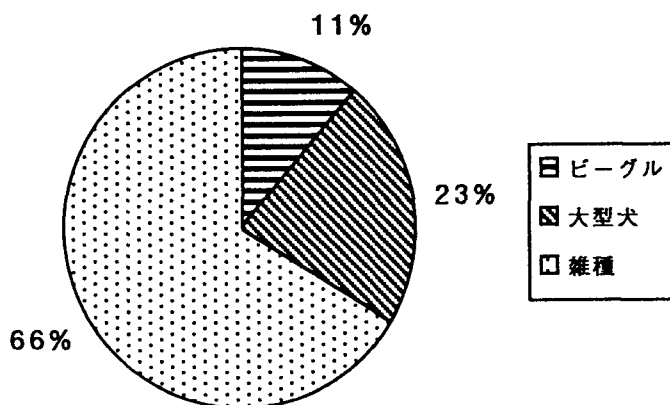


図4 イヌの常時飼育希望匹数の分類 (合計：97 匹)

用に供する者への譲渡」によるイヌが含まれる。この譲渡犬に関して、さまざまな議論がある。その中には、1) ただ、安楽死をさせるか、2) 動物実験を通じた人類および他動物への貢献かという2つの対比する問いに関するものが含まれている。また、科学的に信頼しうるデーターを求める意味から、3) 研究用途に適しているか、という問いもなされている。3) については、検疫、順化、駆虫薬投与によって実験動物とし

ての欠落部分の一部を補修することができる。このイヌの譲渡状況について、各都道府県市町村などを1単位としてまとめた国立大学動物実験施設協議会の調査・研究・調整小委員会の最近の調査によると、図5に示すように譲渡契約を中止したところが2割に及んでいることがわかる。京都大学医学部においては、これまで実験用のイヌの主な入手源であった兵庫県とのイヌの譲渡契約が1993年3月をもって停止され、一部継続されている滋賀県からの譲渡契約についても段階的削減が実施され、1996年度で停止されようとしている。

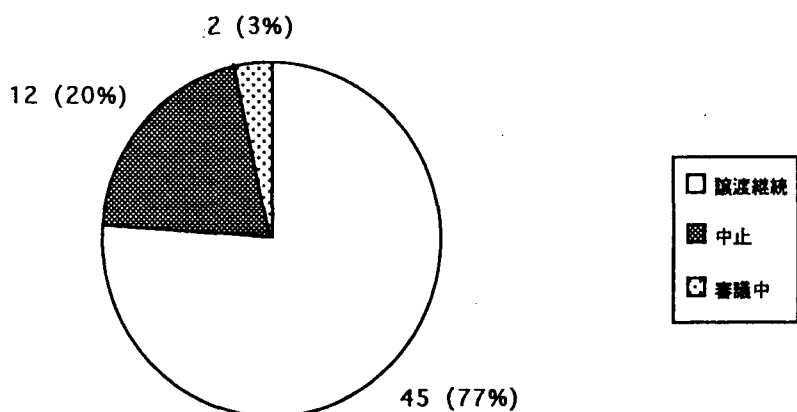


図5 イヌの譲渡状況調査の結果

このような現状を踏まえて、実験用イヌの将来展望について以下にまとめた。

1) 使用数の減少

コンパニオンアニマルとしてのイヌの位置づけからくるイヌを実験用に利用することに関する一般的な抵抗感を拭い去ることが困難であること、また、薬剤などの安全性試験における国際的ハーモナイゼーションにおける方向性や情報データベースの整備・活用がより一層進む傾向は、イヌの使用数の減少を導くであろう。

2) 研究用途に応じた犬種と動物種の選択

いわゆる実験用のパーパスブリードとして、ビーグル犬が繁殖、供給されてきた。その性格が温順で、短毛、多産、そして遺伝的

に固定されていることから、実験用イヌの代表とされ、医薬品の開発や安全性試験などに大いに利用されている。ビーグル犬以外には、ハウンド、ラブラドル・リトリバー、あるいはヘアレス犬（メキシカンヘアレスドッグのヘアレス遺伝子を交配によってビーグル犬に導入することによって開発された実験用イヌ）などがある。医学あるいは医療の研究領域においては、ヒトと同程度の大きさが大きな要因になる研究があるため、大型犬が求められるケースが少なくない。その利用にあたっては、入手源の確保、ハンドリング、飼育環境などについて準備が求められることに加えて、その研究用途にブタ、ヤギ、ヒツジなどを含めた他の実験用の大型動物と比較して、イヌが最適であるかどうかの評価が改めて必要であろう。譲渡犬の将来展望については、各都道府県の意向によって決定されるので、予測しがたい面が多い。

以上、実験用のイヌの問題点について概略的に述べてきた。関西実験動物研究会の会員においては、各自が扱っている動物種や、実験動物の使用目的もかなり異なっている。イヌについては、医薬品などの開発や安全性試験への利用以外に研究用に利用されていることは一般的に知られているが、我々自身が実験用のイヌの利用についてさらに理解を深めることは、実験動物分野のおかれている現況を考えると特に重要である。

今回、臨床への直接的な応用を念頭に、イヌを用いたすぐれた研究を熱心に実施されている先生方の研究内容を拝聴することから、実験用のイヌおよび譲渡犬の意義を改めて考える機会が提供できれば幸いである。

<参考資料>

「実験動物検討会報告書」平成7年2月、実験動物検討会（農水省畜産局家畜生産課）

新しい医療器具の開発

- イノウエバルーンカテーテルおよび経管的人工血管移植術 -

京都大学医学部 第三内科 井上寛治

I. Percutaneous Transvenous Mitral Commissurotomy

イノウエバルーンカテーテルの開発

1948年にHarkenおよびBaileyにより開発された非直視下僧帽弁交連裂開術は僧帽弁口を鈍的に押し広げて、僧帽弁狭窄症の癒着した交連部を裂開する単純な方法であるが、症例を選べば直視下僧帽弁交連切開術と同様の効果が得られる。筆者はこの僧帽弁交連裂開術を開胸手術を施行せずにカテーテルを使用してできないものかと考え、1975年から僧帽弁交連裂開用の特殊なバルーンカテーテルの開発に取り掛かった。

基本的には下肢動脈血栓除去術に用いるFogartyのバルーンカテーテルからアイデアを得たものであるが、Fogartyの方法のようにバルーンカテーテルを引き抜いて弁口を拡大しようとする、弁の腱索などを傷つける恐れがあるので、バルーンを弁口で膨張させることを考えた。弁口でうまく膨張させるには、強い内圧に対して耐久性のあるバルーンでなければならない。そこで、バルーンを耐圧構造にするため合成繊維性のメッシュをゴムに被せることにした。メッシュがむきだしになると血栓が新生しやすくなるので、さらにその上をゴムで覆った。弁口から滑り落ちないための工夫としてバルーンにくびれをつけ、弁口に固定するためくびれの前後が順次膨らむような構造にした。こうしてイノウエバルーンカテーテルは完成した。

動物実験

バルーンカテーテルの開発と平行して成犬を用いバルーンカテーテルの挿入経路の検討と心房中隔穿刺孔の残存について調べた¹⁾。最初の実験計画では、バルーンカテーテルを内頸静脈より挿入し心房中隔を経て僧帽弁へ挿入する経路をとったが、技術が大変難しくこの経路では僧帽弁口へバルーンカテーテルを挿入することは容易でないことがわかったので大幅な見直しを行い股静脈か

ら挿入する方法に変更し実験を再開した。その結果この方法だと中隔穿刺法もバルーンカテーテルを左室へ挿入する操作も容易であることが判明した。挿入経路の実験と平行して、心房中隔穿刺孔の残存について調べた。心房中隔穿刺孔の位置と大きさを調べるために、実験終了後に犬を屠殺し、心臓を摘出した。摘出した心臓の穿刺孔の大きさは直径5mmで、この大きさは術後に自然閉鎖する可能性が高く、また仮に残存しても血行動態的には有意な影響を残さないと判断した。従って、大腿静脈より経心房中隔的に僧帽弁口へ到達する経路は、方法論的に可能であることが証明された。

臨床実験

次の実験段階として直視下僧帽弁交連裂開術中にバルーンカテーテルを臨床応用し、その裂開能および癒着交連部の裂開様態について検討した。その結果、有意な僧帽弁逆流を合併せず癒着した交連部はその自然なラインに沿って裂開されることが確認された。

臨床応用

1982年に経皮経静脈的僧帽弁交連裂開術の臨床応用に踏み切った²⁾。これは非手術的僧帽弁拡大術の世界で最初の成功例であり、後にPercutaneous Transvenous Mitral Commissurotomy : P T M C と名付けられた。以後、P T M Cは多数の臨床施行の結果、その有効性、安全性および操作の容易さが認知され国内のみならず広く世界で施行されつつある³⁾⁴⁾。現在、約65カ国にて年間約10、000本のイノウエバルーンカテーテルが使用されている。

II. Transcatheter Endovascular Graft Placement

経管的人工血管移植術

1990年より開胸手術を施行せずに動脈瘤を治療するための特殊な人工血管およびその運搬用システムの開発を開始した。この新しい人工血管の安全性を確認するため成犬を用い動物実験を施行した。正常血管、解離性大動脈瘤または大動脈穿孔作成後の血管に人工血管をカテーテルを使用し移植し、種々の合

併症の有無（1.人工血管の閉塞、2.人工血管からの漏れ 3.人工血管の破損 4.人工血管内血栓生成 5.宿主動脈の損傷）を検討した^{5)~7)}。その結果、合併症の発生は至適サイズの人工血管を使用すれば防止できることが判明した。また動物実験において最長5年の移植後生存が確認された。

5年に渡る長期の動物実験を積み重ねた後、1993年より経管的人工血管移植術の臨床応用を開始した。現在までに解離性大動脈瘤、腹部大動脈瘤等の16例に対し人工血管を移植し良好な結果を得ている。この手技は今後、大動脈瘤の外科手術に代わりうる治療法になるであろうと考えられる。

新しいDeviceの開発における動物実験の役割

1985年に米国のLock JEがポリエチレン性のバルーンカテーテルを使用する経皮経静脈的僧帽弁交連裂開術を開発した⁸⁾。1986年にはサウジアラビアのZaibag MAが同様のカテーテルを2本使用するダブルバルーン法を発表した⁹⁾。順行性ダブルバルーン法は筆者と同様の経路をとるが、異なる点はガイドワイヤーの誘導により僧帽弁に至る点であった。これは現在でも米国を中心として使用されているが、臨床施行の結果ガイドワイヤーによる左室穿孔が報告されている¹⁰⁾。このような致命的ともなりうる合併症発生の有無は動物実験を積み重ねれば判明することである。実際誰も行ったことがない治療法を行うのであるから、理論的に考える合併症については動物実験を行い十分に検討し安全性を確認した後、臨床施行すべきである。また、これまでの筆者の経験から新しい治療法を開発する場合、初めに明確な方針を立てることはいうまでもないが、実験によりその方針が間違っていることが判明したら、即座に軌道修正できる態度をとることが重要であると思われる。臨床での検討は慎重に慎重を重ねて行うべきであるが、動物実験では積極的な検討を行うべきである。

参考文献

1. Inoue K, Kitamura F, Chikusa H, et al: Atrial septostomy by a new balloon catheter. *Jpn Cir J* 45:730-738, 1981.
2. Inoue K, Owaki T, Nakamura T, et al: Clinical application of transvenous mitral commissurotomy by a new balloon catheter. *J Thorac Cardiovasc Surg.* 87: 394-402, 1984.
3. Inoue K, Hung JS: Percutaneous transvenous mitral commissurotomy (PTMC): the Far East experience. In Topol EJ (ed). *Textbook of Interventional Cardiology*. 1st ed. Philadelphia: WB Saunders Co, 887-899,1990.
4. Inoue K, Hung JS, Chen CR, et al: Mitral stenosis: Inoue balloon catheter technique. In Cheng TO (ed): *Percutaneous Balloon Valvuloplasty*. New York , Igaku-Shoin Medical Publishers, Inc, 237-279,1992.
5. Inoue K, Htay T, Kida M, et al: Percutaneous implantation of aortic endovascular graft for created aneurysm: Animal experiment . *Circulation*. 84 (Suppl II): II-421,1991.
6. Inoue K, Htay T: Long-term follow-up of percutaneously placed aortic endovascular graft: Animal experiment. *Circulation*. 86 (Suppl I): I-636,1992.
7. 井上寛治, Than Htay, 藤原久義: 新開発の経皮的人工血管移植術: 動物実験による長期予後の研究. *Jpn Cir J*.57(Suppl I):109,1993.
8. Lock JE, Kalilullah M, Shrivastava S, et al: Percutaneous catheter commissurotomy in rheumatic mitral stenosis. *N Engl J Med*. 313:1515-1518,1985.
9. Zaibag MA, Ribeiro PA, AL Kasab SA, et al: Percutaneous Double-balloon mitral valvotomy for rheumatic mitral-valve stenosis. *Lancet*. 1:757-761,1986.
10. Palacios IF, Block PC: Acquired mitral stenosis: Double balloon catheter technique. In Cheng TO (ed): *Percutaneous Balloon Valvuloplasty*. New York , Igaku-Shoin Medical Publishers, Inc, 221-236,1992.

臨床用人工臓器開発における動物実験

—人工気管・人工食道の開発—

京都大学 生体医療工学研究センター

生理系人工臓器学領域

中 村 達 雄

細胞や血球の大きさに関しては、ゾウでもネズミでも動物間でほとんど差がないのに、からだの大きさや形状に関しては驚くほどの差が動物間で認められる。同じ動物種内においてもたとえば手のひらにのせることも出来るほど小さなイヌもいれば、体重40kg以上もあるセントバーナードのような大きなイヌもいる。このような個体や臓器の大きさを制御するメカニズムに関しては、生命現象の遺伝子のレベルの解析が進みつつある現在においてもまだ何もわかっていないといっても過言ではないのが現状である。これまで医薬品の開発や安全性の検討にはその実験個体数が多いほど信頼性が高いので、マウスやラットなどの小動物が使われることが多かった。もちろん人間はこれらの実験結果から大きな利益を得てきた。体内での物質代謝や血管透過性、組織での生化学的な挙動に関しては、細胞の大きさに大差がないようにヒトでもネズミでも哺乳類であればほぼ同じであるという前提で、実験が行われてきたわけである。

しかしながら我々が現在開発している人工臓器の分野、とりわけ生体の再生能力をひき出すことによって新しい臓器を再生させる研究においては、動物の大きさが実験設計における決定的な要素になる。つまり、人間の臓器の再生を目指す人工臓器の開発研究ではマウスやラットを用いた実験では十分な評価ができないのである。

もう一つ人工臓器開発の動物実験で大きな要素となるのが使用動物の寿命である。幸か不幸か人間は哺乳類の中でもずば抜けて寿命の長い生物である。ほとんど例外的と言ってもよいほど長い寿命を誇る特殊な生物である。体内に埋め込む形式の人工臓器は、多くの場合入れ替え手術に危険が伴うため、長い耐久性が要求される。心臓の人工弁など特に直接生命にかかわるような臓器の代用として使う場合は、長期の埋込み実験が欠かせない。少なくとも5～6年の耐久力は要求される。急性実験はともかく、寿命が2年のラットやマウスでは、こういった埋入型の人工臓器の十分な評価ができないのである。動物実験一般に関してはこの他にも種々の要素が考慮されるが主に表1に示すような点が考

慮されている。

表1 動物実験選択
臨床応用のモデルとしての意味
科学的評価が可能か
経済的側面
心情的側面

特に人間モデルとしての動物種の考慮の際には（１）解剖学的構造（２）大きさ（体重と臓器重量）（３）生理的特性が重要な項目になり、現在人工臓器開発のための動物実験では表２のような動物が使われることが多い。

表2 人工臓器開発における動物の選択	
人工心臓	ヤギ、ウシ、イヌ
人工肺	ヒツジ、イヌ
人工肝臓	ブタ、バグーン
人工食道	ラット、イヌ
人工神経	ラット、ネコ
人工気管	ラット、イヌ、ブタ

以下は人工臓器の開発研究の見地から人工気管と人工食道について紹介し、動物実験の意義などについても考えてゆきたい。人工気管と人工食道はそれぞれ我々のグループの寺町政美先生、滝本行延先生が中心になって研究が進められており、この分野では世界でも他に例をみない優れた成果をあげている。

人工気管

気管は口や鼻から吸った空気が肺まで通る道で、構造上は単なる管であり、一見したところ簡単に人工物で置き換えが可能であるように思える。実際１９

40年代より、ゴム管、ビニール管、プラスチック、ガラス管など様々の人工物によって気管の置換が試みられてきた。しかしながらこれらの試みはことごとく失敗に終わった。人工血管が早くから成功したのに比べると人工気管は大きく遅れてしまったのである。

その原因は人工物の置かれる位置のちがいであった。すなわち、人工血管が体内に完全に埋入してしまうのに対して、人工気管は内腔が気道に接する部位に留置されるからである。生体は異物である人工気管を体外に排除して出してしまうという力が常に働くのである。この力のために術後数週間から数カ月で縫合部よりはずれてしまうのである。これに対して人工気管の縫合部を改良して生体と堅固に接着させることにより、人工気管の離脱をなんとか防止しようという試みも長年続けられた。しかし、外界と人工物の接点における異物排除の力は強力で、とうとうこれを克服することはできなかった。

そこで異物と外界の接点を残さない人工気管^{1)~4)}が考案された。これは生体のもつ自己修復能を利用して、人工物を完成時には全て自己組織でおおわせて、異物排除が起こらないようにするものである。体内に埋入したプラスチックなどの人工物の一部が直接外界に顔を出している場合、生体はここから人工物を体の外に出してしまうとする。体外に露出しそうな人工物をあらかじめコラーゲンなど生体親和性の高い生体由来物質で覆っておくと、この部分に自己の組織がすみやかに再生し人工物は外界から隔離される。一度自己組織で覆われた人工物は排除されない。新しいタイプの人工気管はこの現象を利用したものである。この方法は、異物排除をおこさせないという点でたいへん優れており、自己組織が人工物上を完全におおう形で再生しさえすれば理想的な人工気管となる。しかしこれまでコラーゲンの処理方法や成形加工がたいへん難しく、人工臓器への応用はおくれていた。というのは、たとえばウシやブタなどの皮膚や足の腱から抽出されたコラーゲンはそのままでは生体内でただちに体液に溶け、さらにコラゲナーゼなどの酵素で分解して消失してしまうからである。これを防ぐためコラーゲンを溶け難くする必要性が生じてくる。即ち、コラーゲン分子間に架橋を入れて結合を強固にすればよい。この際コラーゲン本来のもつ生体親和性を失わせることなく、しかも一定期間コラーゲンが解けないような状態にしなければならぬ。このコラーゲンの選択と架橋条件の調節が難しかったのである。架橋が弱いとコラーゲンはすぐ溶解してしまい自己組織でおおわれる前に人工物がむき出しになるし、逆に架橋を入れすぎるとコラーゲンはなめした皮のように固くなってしまい、いつまでも異物として体内に

とどまり新しい組織は再生しない。

異物に対する生体の反応は、試験管の内の化学反応や単純な物理実験と異なり、やってみないと分からない世界である。これは生体内ではまだ解明されていない無数の因子が、お互い複雑に幾重にも影響を与えあっている。したがって動物実験はいわば生体というブラックボックスを外から叩いて何が出てくるか観察しているようなところがある。人工気管の開発でも、最適なコラーゲンの架橋条件1つを決めるにしても、架橋の方法や強度を様々に変えて、何度も動物に埋入実験を行い手探りで行わねばならなかった。このような実験系を組む場合は、いかに臨床と近い条件で実験系が組めるかが、最も重要なポイントとなる。まず、動物の種類である。人間に一番近いとされるチンパンジーやゴリラなどを用いることは現在の日本の人工臓器開発では経済的な問題だけをとっても無理である。

科学的な研究は、言いかえれば再現性のある結果を出すことで、再現性を保証するには実験数 n を増やして、何度やってもそれが再現できることを示さねばならない。高価な動物や飼育に手間のかかる動物を実験動物として選べば、この n 数を増やすことが困難になる。かと言って患者さんに使う人工臓器の試験をシャーレの中の培養細胞やカエルやイモリ、マウスやラットだけでやっていると、いつまでたっても研究と臨床の間は埋まらない。この2つの矛盾する要請の間を右に左によろめきながら進んでいるのが研究費の乏しい医科学者の姿である。

そこで人工気管である。人間の気管は平均長さ16 cm、太さ18 mm直径ほどの大きさがある。ところが幸いなことにほぼこの太さと長さを持つのが犬の気管である。犬は体重が約10kgで人間の体重のおよそ1/5～1/6程度であることを思えば、いかに犬の気管が太いかわかると思う。したがって人工気管の研究には以前よりこの犬が使われることが多い。ただし犬の気管にも人間と大きく異なる点がある。それは人間に比べると気管軟骨の数が倍の40以上もある点である。したがって人間に比べて容易に伸びるために、気管を一部分管状に切り取り端端吻合を行っても、吻合部にかかる張力が人間の同リング数切除に比べ低くなってしまう。このため、切除限界の決定などに関しては注意を要する。

さて、そこで現在、我々の開発している人工気管の構造とその成果を紹介する。我々の人工気管はFig 1のような構造をしている。

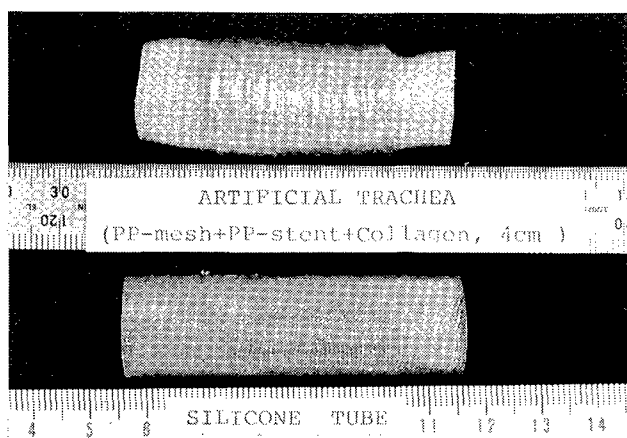


Fig 1：人工気管（上段）と内腔に留置するシリコンステント（下段）。人工気管を生体気管に端々吻合し、その際内腔にステントを置いておく。

筒に相当する部分はプラスチック（ポリプロピレン製）の糸で編んだメッシュでできており、これだけでは圧迫するとつぶれてしまうのでこの外側に太いポリプロピレン糸を螺旋状にまいて補強してある。その外をコラーゲンコートして、さらにこのコラーゲンに適度の架橋をほどこしたものを使用している。コラーゲンはブタの皮膚から抽出したものを使っている。コラーゲンコートすることにより気密性が得られる。犬の首の気管をある長さ輪状に切除して、その部分にこの人工気管を入れると、約3ヶ月で人工気管のコラーゲン部分にイヌの組織が侵入して、さらに内面を上皮がおおう。この時点で内挿してあるシリコンステントを内視鏡で覗きながら脱落させると人工気管が完成する（Fig 2）。

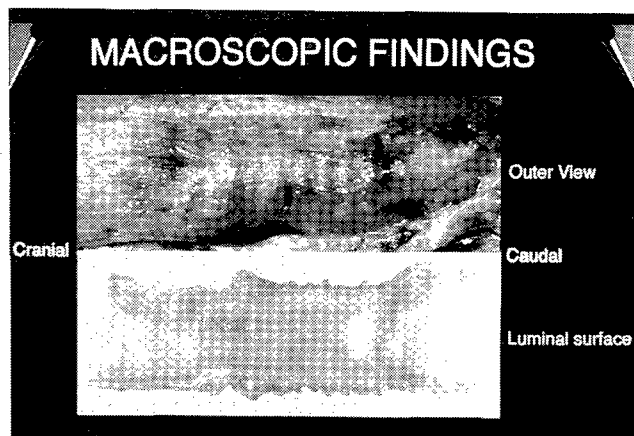


Fig 2：手術後数ヵ月すると上段の写真の様に人工気管は生体組織と一体化した管になる。内腔は粘膜が張っている（下段）。このようになればもう脱落することはない。

これまでのチューブ式的人工気管で必発していた吻合部の離解は長期観察しても全く起きない。しかも2cm程度の短い距離の置換では上皮には生体本来の線毛が再生してくることが判明した（Fig 3）。その後5cm程度の長い距離やさらに胸腔内の気管の置換にも安全にこの人工気管が使用できることが明らかになりつつある。

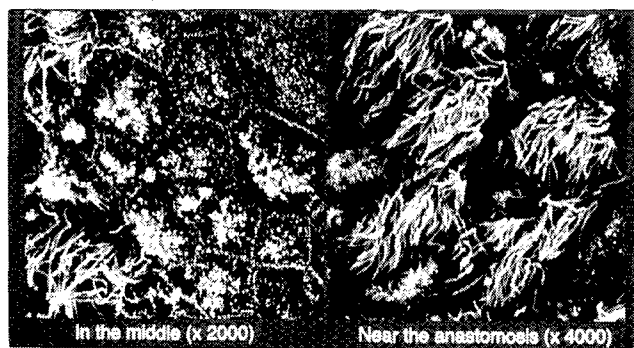


Fig3：長い人工気管で再建した場合、気管の内面は気管粘膜が再生するがこの走査電子顕微鏡写真でわかるように吻合部に近い部位では（右）丈の高い線毛を持つ気管粘膜が再生し、中央部（左）でも上皮細胞に線毛が再生しはじめているのが見られる。

人工食道

人工食道も半世紀ほど前よりゴム管をはじめとして、ありとあらゆる人工材料のものが考案されたが、それらはことごとく失敗に終わった。理由は簡単で、どの人工食道も縫合部で外れてしまうのである。そこで外界に面した縫合部が残らないタイプの人工食道の開発が現在すすめられている。

人工気管と同じ方法がここでも応用可能である。Fig 4 は我々の開発している人工食道である。

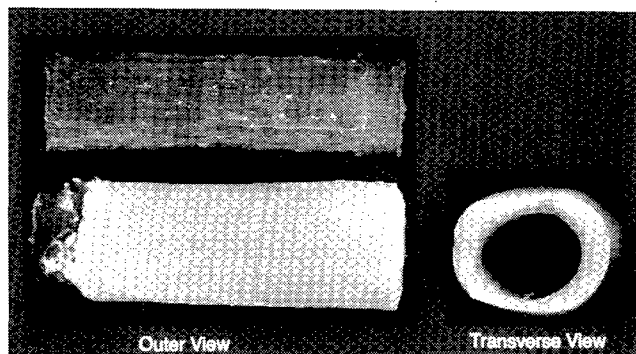


Fig 4：上段は芯になるシリコンシートチューブ、下段はこの外側をコラーゲンスポンジで覆った人工食道。断面から見ると（右下）内腔が平滑なシリコンシートで覆われたスポンジのチューブであることがわかる。このスポンジ部分に組織が再生して新しい食道が完成する。

外側はコラーゲンスポンジで内腔はシリコンシートで覆われている。内腔面をシリコンシートで覆った理由はコラーゲン部分を唾液などで汚染させないためである。食道内腔は術後絶食にしているにもかかわらず嚥下される唾液などで感染を起こしやすいからである。コラーゲンスポンジ部には周囲から細胞が侵入してコラーゲンを足場にして結合組織が新生し管状の新しい筒が出来る。その管の内面が上皮に覆われて、新生食道が完成する。この新しい食道管の完成を確認した後、シリコンシートを内視鏡下に抜去する。

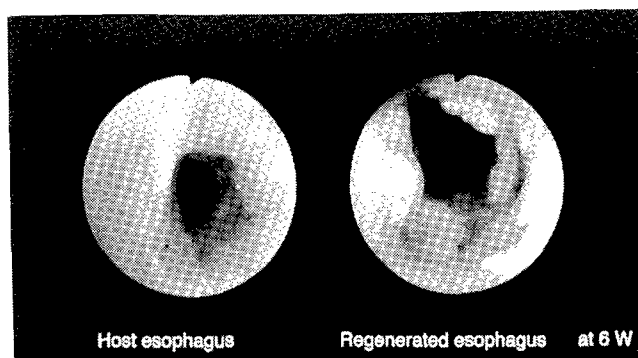


Fig.5:シリコンシート抜去直後の食道内視鏡所見。左は口側から吻合部を見たところ。右は再生した食道部分である。新生した食道は内面が粘膜に覆われ、筒状の消化管として完成している。
(文献17より)

これによって、コラーゲンが自己組織と置きかわった後は異物が残らない新しい食道が出来るのである。こんなことが実際にうまくいくのであろうか、と誰もが思うが、それがうまくいくのである。しかも、再生した組織には本来の食道がもつ粘液腺や筋肉組織に近い構造までもが見られるのである (Fig.6)。生体組織のもつ治癒再生能には目を見張るものがある。



Fig.6：再生した食道組織。上が食道内腔面。食道内腔面は連続した扁平上皮に覆われている。その下には食道粘液分泌腺が見られ、さらにその下には疎な結合組織の中に筋肉組織が見られる。高度に分化した組織はこれまでは再生しないと考えられていたが、このようにコラーゲンを足場に用いると再生が見られることが判明した (文献17より)。

人工臓器の開発における動物実験の意味

このように生体に備わった能力をひき出し自己組織を再生させるタイプの人工臓器は、これまでのプラスチックや合成材料をもちいて永久的に欠損部分を置換するタイプの人工臓器にかわって、新しい研究の中心になっていくことと思われる。しかしながら何でもかんでもこの方法で人工臓器が作れるかというと、そうはいかない。心臓全体を切りとってしまえばそれが再生することはないであろうし、再生能にもおのずと限界がある。その限界を見極め能力を最大

限に引き出す方法を開発しなければならない。

このような器官の再生、臓器の再生をひき出す研究においては、組織の再生能力の評価が不可欠であり、これには人間に近い大きさの動物による臨床前評価がどうしても必要である。そのため一般に愛玩用に飼われることもあるイヌやネコなどの動物が、ショウジョウバエやアフリカツメガエルにかわって用いられる。高等な動物、下等な動物という考え方はDNAや遺伝子のメカニズムの解析が進んだ今日では生物学的にほとんど何の意味もないことは明らかであるが、進化的に人間に近い動物はこれまで一般に高等動物と呼ばれてきた。この高等動物を用いた動物実験に対して動物愛護団体を中心に根強い反対運動があり、動物実験による安全性の評価は十分でないことを指摘している。そういった時、よく例として持ち出させるのは化粧品の検定に用いられるウサギの角膜投与の実験 (Draize Test) と四肢短縮児いわゆるアザラシ児(phocomelia)を発生させたサリドマイドである¹⁸⁾。化粧品の開発は医学とはまた別の問題なので、ここではとりあげない。サリドマイドは動物実験では副作用が少なく安全域が広い催眠剤として認められたにもかかわらず、人間ではこれを服用した妊婦から四肢短縮児が多数生まれてしまったという不幸な歴史がある。

したがってという言葉で動物実験に意味がないと主張する人々がいる。動物実験ではなく人間のボランティアで実験を行うべきだという意見もある。なるほど動物実験は安全性を100%保証するものではない。これは実験者が忘れてはならないことである。しかしながら動物実験は臨床へ移行する前提になるスクリーニングの意味で行うものである。動物実験で安全性評価が出来なかった例があるからといって、動物実験自体を否定することにはならないのである。信号のついている交差点で交通事故があったからといって、信号をとってしまえという議論にはならないのと同じである。

新たに開発した人工臓器を臨床に用いる際、工場や研究室で作ったばかりの人工臓器をいきなり臨床に使わず、まず人間に近い動物で動物実験を行い、それによって安全で効果のあることが判明したものだけを使うべきであることは論をまたないであろう。それさえせずに、開発した人工臓器をいきなりボランティアの人間に試すなどということは、危険極まりないことであり、人体実験に関する人類初の規範であるニュールンベルク綱領でも厳しく禁止している¹⁹⁾。この精神を受け継ぐ現在の有名なヘルシンキ宣言²⁰⁾でも人体実験に先行して動物実験を行う必要があるということが明示されているのである。

参考文献

- 1) 中村達雄、人工気管、手術 44 (6) : 803-807、1990
- 2) 清水慶彦、人工気管、日本外科学会雑誌 92 : 70、1991
- 3) 奥村典仁、中村達雄、清水慶彦 他、meshによる人工気管の実験的研究、呼吸器外科、4 : 126-131、1990
- 4) N. Okumura, T. Nakamura, Y. Shimizu et al, Experimental study of a new tracheal prosthesis made from collagen-grafted mesh, ASAIO Transactions; 37;317-319, 1991
- 5) 奥村典仁、中村達雄、清水慶彦、筏 義人、コラーゲン加工メッシュによる人工気管の実験的研究、人工臓器 20 : 635-640、1991
- 6) 奥村典仁、中村達雄、清水慶彦、筏 義人、吸収性meshによる気管補填における創傷治癒に関する検討、人工臓器 21 : 328-333、1992
- 7) N. Okumura, T. Nakamura, Y. Shimizu, Y. Ikada, et al, The repair of tracheal defects using bioabsorbable mesh, ASAIO Transactions; 38(3); M555-559, 1992
- 8) 奥村典仁、中村達雄 他、コラーゲン加工製人工気管の実験的研究—高張力下での吻合に関して—、人工臓器 22 : 1025-1030、1993
- 9) N. Okumura, T. Nakamura, Y. Ikada, Y. Shimizu, A new tracheal prosthesis made from collagen grafted mesh, ASAIO Journal 39(3);M475-M479, 1993
- 10) 奥村典仁、中村達雄、筏 義人、清水慶彦、人工気管による気道再建の研究、気管支、15 (8) : 772-777、1993
- 11) 奥村典仁、中村達雄他、コラーゲン加工メッシュ製人工気管の実験的研究—胸腔内気管への応用に関して—、人工臓器 23 ; 878-882、1994
- 12) N. Okumura, T. Nakamura et al, Experimental study on new tracheal prosthesis made from collagen-conjugated mesh, J. Thorac. Cardiovasc. Surg. 108: 337-45. 1994
- 13) N. Okumura, M. Teramachi, Y. Takimoto, Tatsuo Nakamura, Y. Ikada, Y. Shimizu, Experimental reconstruction of the intrathoracic trachea using a new prosthesis made from collagen grafted mesh, ASAIO Journal 40; M834-M839, 1994
- 14) M. Teramachi, Y. Takimoto, T. Nakamura, Y. Shimizu, A new porous tracheal prosthesis sealed with collagen sponge, ASAIO Journal, 41, M306-310, 1995
- 15) Y. Takimoto, T. Nakamura, Y. Shimizu, Relationship between stenting time and regeneration of neoesophageal submucosal tissue, ASAIO Journal 40;793-797, 1994
- 16) Y. Takimoto et al, Long-term follow-up of the experimental replacement of the esophagus with a collagen-silicone composite tube, ASAIO Journal 39:736-739, 1993
- 17) Y. Takimoto, et al, Replacement of long segments of the esophagus with a collagen-silicone composite tube, ASAIO Journal, 41(3), M605-608, 1995
- 18) 山本喜代子、実験動物の犠牲と生命倫理、動物実験は悪魔の所業か 対話を求めて…手紙 (北 徳 編著) P16、ISBN4-89620-004-7, 1993
- 19) Monica Keller, Der Wert des Menschen-Medizin in Deutschland 1918-1945, Edition Hentrich, 1989, Berlin
- 20) Basic Principles 1, World Medical Association Declaration of Helsinki, adopted by the 18th World Medical Assembly Helsinki, Finland, June 1964

「臨床試験との関わりにおける非臨床試験の実施タイミング」

武田薬品工業（株）馬屋原 宏

1. ICHの現状

ICHの活動はますます大きくなり加速されている。

ICHとは、医薬品の承認申請に必要なデータの基準を日・米・欧（EU加盟15カ国）で共通化することにより、海外データの相互受入れ、審査期間の短縮、試験の重複や資源の浪費の防止を図り、結果として優れた医薬品を早く患者のもとに届けることを目的に6年前に発足した国際会議である（ただし、この表向きの目的の他に、海外企業が海外の試験データのみで直接厚生省に新薬承認申請することを可能にすることにより、米国に次ぐ大きさを持つ日本の医薬品市場を開放させるための、欧米からの外圧という側面があることも無視出来ない）。

ICHでは品質・安全性・有効性（臨床試験）の3分野の多数のテーマ（topics）に分かれ、各 topics 毎に産・官・学から成る専門家会議を年に数回開催して3極共通ガイドラインを作成する。また、2年に1回、各 Topic の進捗度を確認するための総会が開催される。

去る1995年11月29日から12月1日にかけて、ブラッセル、オーランドに続く3回目の総会であるICH-3が横浜で開催され、44カ国から約2500人が参加した。この時採択された4テーマを加えるとテーマ数は品質・安全性・有効性がそれぞれ13、境界領域が3の、合計42となり、そのうち19テーマがステップ4（最終合意成立）または5（国内規制化完了）の段階に達している（表1参照）。

2. 臨床試験との関わりにおける非臨床試験の実施タイミング（ICH Topic M3）

このテーマは、安全性と有効性の両方にまたがる境界領域テーマのひとつであり、各段階の臨床試験の実施のために必要な非臨床試験（主として毒性試験）の種類とその実施タイミングを共通化しようとするものである。このガイドライン案の本格的検討が始まったのは1995年3月からで、以来4回の専門家会議を経て、ガイドラインの内容のほぼ80%以上（16項目のうち13項目）が合意に達した。しかし不一致点がいくつか残り、今回もStep 2（暫定合意段階）に上げることはできなかった。

2. ガイドライン案の内容

ガイドライン案 (Draft #6) の内容を簡単に紹介すると、緒言には本ガイドラインの目的、背景、適用範囲および基本的原則が記されている。続いて各非臨床試験の項目毎に、臨床試験の各段階に必要なデータの内容が述べられている (表 2 参照)。

最初の臨床試験までに実施すべき非臨床試験としては、vital な機能への影響を見る安全性薬理、2 種による単回投与毒性試験、in vitro 2 種の遺伝毒性試験、局所刺激性試験のほか反復投与毒性試験と生殖毒性試験がある。

初期の臨床試験では、投与期間が 2 週間まで、1 か月まで、3 か月までおよび 3 か月を超える臨床試験の実施に必要な反復投与毒性試験の最少投与期間は、それぞれ 2 - 4 週間 (合意不成立・後述)、1 か月、3 か月および 6 か月である。後期のより拡大された臨床試験では、2 週間まで、1 か月まで、および 1 か月を超える臨床試験を支える反復投与毒性試験の最少投与期間は、それぞれ 1、3、6 か月である。

男性による初期の臨床試験および妊娠可能性のない女性の臨床試験に必要な生殖毒性試験については、反復投与毒性試験の中で主に病理検査により生殖器官毒性を評価しておけばよいとされた (ただしこの反復投与毒性試験の最少投与期間については合意が成立していない)。また、妊娠可能性のある女性に必要な生殖毒性試験についても合意が成立していない (後述)。

ADME はヒトのデータと比較可能な時期、即ち Phase I 終了までに、遺伝毒性試験の標準的組み合わせは Phase II の開始までに、がん原性試験は申請までに実施する。

3. ガイドライン案の主な不一致点

ガイドライン案の中の 3 極の主な不一致点を挙げると、以下の 3 つとなる：

①最初および初期の臨床試験の開始に必要な反復投与毒性試験の最少投与期間：

(4 週間を主張する厚生省と、現行の 2 週間でよいとする欧米とが対立)

②最初および初期の臨床試験を開始するために必要な雄生殖毒性の評価方法：

(少なくとも 4 週間の反復投与毒性試験のなかでの病理検索を主とした評価の必要性を主張する厚生省と、2 週間試験での評価でよいとする欧米とが対立)

③妊娠可能性のある女性を含む最初および初期の臨床試験に必要な雌生殖毒性試験：

(全ての雌生殖毒性試験が必要とする EU および厚生省と、信頼度の高い受胎調節があれば必ずしも全ての生殖毒性試験が終了していなくてもよいとする米国とが対立)

4. 「タイミング・ガイドライン」の合意が困難な理由

上記の不一致点は、全て最初の臨床試験の実施に必要な毒性試験の要求に関係するものであることに注目されたい。では最初の臨床試験の実施に必要な毒性試験の要求が地域によって大きく異なり、特に日本の要求が欧米に比べ重いのはなぜだろうか。これには主として3つの理由が考えられる。

第1の理由は「最初の臨床試験」の内容が日本と欧米で異なることである。日本の「臨床試験一般ガイドライン」によれば、Phase I 試験の実施目的は Phase II 試験の実施に必要なデータを得ることにあり、Phase I 試験は「ヒトに対する医薬品として開発に値するとの結論が得られた候補化合物についてのみ実施すべきである」と付記されている。日本の Phase I 試験では、単回投与に引き続いて1～2週間の忍容性試験が実施される場合が多く、必要と考えられる非臨床試験データはADMEも含め当然多くなる。

これに対し例えばFDAは、「スクリーニングのための Phase I 試験」を公認している。この試験は複数（10種以下程度）の候補化合物の中から薬物動態学的に最もヒトへの投与に適したものを選択する目的で行われるもので、通常、予想臨床投与量以下の用量が単回投与される。このような臨床試験は最少2週間の反復投与毒性試験で実施可能と考えられており、ADMEデータも必須でない。

第2に、臨床試験に対する規制当局の関与の内容が異なるため、「必要な非臨床試験」という場合の「必要」の意味が日・米・欧で異なることである。日本では治験届けに際し非臨床試験成績は概要の記載で済むが、FDAへのIND申請には最終報告書の提出が必要である。従って米国では、これまで特に提出が義務づけられていなかった試験の必要性がガイドラインに記載されると、最終報告書の提出が新たに義務づけられることになるので、実際に実施しているかどうかは別にして、ガイドラインへの新たな要求の記載にはどうしても慎重にならざるを得ないのである。

第3に、米国では30年以上前に認可され、現在1000万人以上が服用していると言われる経口避妊薬が日本ではまだ認可されていないなど、国情に大きな相違があることで、この違いが例えば生殖毒性試験の要求の違いに表れている。

5. 日本における臨床開発と「タイミングのガイドライン」

横浜ICH-3のシンポジウムにおいて、臨床試験の実施に必要な非臨床試験の3極の現状での相違を解説したグラクソ・ウエルカム社の Dr. Scale氏は、臨床試験を開始する

にはヨーロッパが、延長するには米国が最も有利であり、日本はそのいずれにも不利であると結論した。

日本の臨床開発が海外に比べて不利な点は、臨床試験の開始や延長の際に必要なデータが欧米に比べて多いことの他にも、臨床試験に時間がかかるとか、日本の臨床試験データが海外申請に使えない、などいろいろあるが、「タイミングのガイドライン」の合意を難しくしている原因の1つでもあるという意味で特に強調しておきたい点は、前述のように日本ではスクリーニングのための臨床試験が認められていないことである。このため日本では候補化合物の最終選択は動物を用いて行われるが、この方法は動物とヒトの代謝特性にしばしば大きな相違があることが知られていなかった時代の遺物ともいうべき非科学的かつ効率の悪い方法である。代謝特性が異なる場合は、動物の薬効や安全性データをヒトに外挿するのは困難であり、このため臨床試験がかなり進んでから薬効や毒性学的にヒトに合わない化合物であることが判明して開発が中止される率が高くなる。これは結局、ヒトを用いたスクリーニングを非常に能率悪くやっているのと変わらない。例えばヒト肝細胞やヒト由来代謝酵素を用いる代謝研究が自由に出来たとしても個体における吸収や排泄の特性、曝露量等は個体からでないと得られない。候補化合物を一つに絞る前に、少数のヒトにごく低い用量を単回投与して、薬物動態学的に最もヒトに合ったものを選んで本格的臨床試験に進めるという欧米の方法は、その後の開発成功率が高くなるため、結局はより多数のヒトの安全につながる科学的な方法である。ヒトによるスクリーニングが日本で実施されないのは、それに人体実験のイメージがあるからかもしれないが、臨床試験なしでは新薬開発は不可能であること、いかなる臨床試験も人体実験に他ならないことを被験者が正しく理解することが重要であり、これを隠すことは臨床試験の正しい発展にはつながらない。「タイミングのガイドライン」の合意の前に、まず「スクリーニングのための臨床試験」を含め、Phase I 試験の概念を3極で共通化することが必要であろう。

6. 結語

上記のように「タイミング・ガイドライン」には各地域の臨床試験制度や新薬承認申請制度あるいは社会風土の違いを反映した不一致点があり、一見合意が困難であるかのように見える。しかしICHの各テーマは多かれ少なかれ同様の困難を抱えつつ、それらを解決して合意に向かいつつある。本テーマも何とか1996年5月に予定されているワシントンEWGでStep 2の合意を達成したいものと考えている。

以上

表1 ICH各テーマの進展状況 (1995年12月現在)

Step 5	
Q1A	安定性試験法ガイドライン; 新有効成分
Q2A	分析法のヴァリデーション; 用語とその定義
Q3A	不純物に関するガイドライン; 原薬
S4	単回および反復投与毒性試験
S5A	医薬品の生殖毒性試験ガイドライン
E1A	臨床試験; 症例数と投与期間
E2A	臨床試験データの取り扱い; 定義と緊急安全性報告の基準
E4	臨床試験; 用量反応試験方法
E7	臨床試験; 高齢者における臨床評価ガイドライン
Step 4	
◎Q5B	バイオ医薬品の品質; 細胞株の遺伝的安定性
◎Q5C	バイオ医薬品の品質; 安定性試験
◎S1A	がん原性試験; 試験が必要な場合
S1C	がん原性試験; 用量設定のためのガイダンス
S2A	遺伝毒性試験; 特定項目に関するガイダンス
S3A	トキシコキネティクス; 毒性試験における全身的曝露のガイダンス
S3B	ファルマコキネティクス; 反復投与臓器分布試験のガイダンス
◎S5B	生殖毒性試験; 雄授精能試験
◎E3	臨床試験データの取り扱い; 取りまとめ方法と様式
Step 3	
E6	臨床試験; GCP
Step 2	
◎Q1B	安定性試験法ガイドライン; 光安定性試験
◎Q1C	安定性試験法ガイドライン; 新剤型および一部変更
◎Q2B	分析法のヴァリデーション; 方法論
◎Q3B	不純物に関するガイドライン; 製剤
◎Q5A	バイオ医薬品の品質; ウイルスの安全性評価
◎E2C	臨床試験データの取り扱い; 安全性情報の定期的報告
Step 1	
Q3C	不純物に関するガイドライン; 残留溶媒
Q4	薬局方
Q5D	バイオ医薬品の品質; 細胞株管理
S1B	がん原性試験; 2種の必要性
◎S1C'	がん原性試験; 用量設定のためのガイダンス・投与限界量
S2B	遺伝毒性試験; 試験の基本的組み合わせ
S4'	反復投与毒性試験; 非げっ歯類の投与期間
S6	バイオ医薬品の安全性試験
E1B	臨床試験; 症例数と投与期間・前向き研究
E2B	臨床試験データの取り扱い; 報告書の形式
E5	海外臨床試験データの相互受入れにおける人種的要因
E8	臨床試験; 一般ガイドライン
◎E	臨床試験; 統計法ガイドライン
◎E	臨床試験; 特異な新規医薬品開発
M1	薬事関連用語集
M2	緊急安全性情報の電子媒体による交換
M3	臨床試験との係わりにおける非臨床試験の実施時期

テーマ数: 品質13, 安全性13, 有効性13, 共通3, 合計42
◎は今回ステップアップしたもの

表 2 臨床試験の開始に必要な非臨床試験のガイドライン（案）の現状（Draft #6）

試験の種類	Human Pharmacology and Therapeutic Exploratory Studies	Therapeutic Confirmatory Studies
安全性薬理	Vital functions につき最初の臨床試験までに実施	
ADME	曝露量のデータは最初の臨床試験までに得ておく。 ADME は Human Pharmacology Studies の終了までに実施	
単回投与毒性試験	哺乳類 2 種（漸増投与試験も可）	
反復投与毒性試験	哺乳類 2 種（1 種は非齧歯類）	
	臨床試験期間 単回 2 週まで 1 か月まで 3 か月まで 3 か月を超える （* 合意成立せず）	毒性試験期間 2 - 4 週間* 2 - 4 週間* 1 か月 3 か月 6 か月 臨床試験期間 2 週まで 1 か月まで 1 か月を超える 毒性試験期間 1 か月 3 か月 6 か月
局所刺激性試験	最初の臨床試験までに臨床投与ルートで実施	
遺伝毒性試験	変異原性および染色体障害性 （共に in vitro） 異常があれば追加試験	Therapeutic Exploratory Studies までに遺伝毒性試験の標準的組み合わせを実施
がん原性試験	がん原性試験が必要な医薬品につき、申請までに実施	
生殖毒性試験 （男性）	反復投与毒性試験で生殖器官の病理検査（投与期間は合意が成立せず）	雄生殖毒性試験
（妊娠可能性のない女性）	反復投与毒性試験で生殖器官の病理検査	
（妊娠可能性のある女性）	遺伝毒性試験の標準的組み合わせ及び生殖器官の病理検査	
	全生殖毒性試験（日本・EU） 以下の条件下では生殖毒性試験は未了で可（米国） ・ 妊娠していないことを確認 ・ 適切な受胎調節の実施 ・ 月経期間直後の参入	全生殖毒性試験
（妊娠中の女性）	全生殖毒性試験及び遺伝毒性試験の標準的組み合わせ	
その他の毒性試験	必要に応じ実施	
小児の臨床試験	・ 全生殖毒性試験（周産期／授乳期試験を含む） ・ 必要に応じ成人の臨床試験成績及び幼若動物反復投与毒性試験	

< 第 48 回 研 究 会 >

会員の研究発表

日時：平成 7 年 12 月 8 日（金）

場所：楽友会館

1. 無菌ラットを SPF 飼育室に導入した際に生じた急性下痢症
について
2. 胃粘膜の腸上皮化生と増殖率
3. 老齢マウスにみられるサーカディアンリズム制御機構の加齢変化
について
4. 調教がサルに及ぼす影響について — カニクイザルにおける
保定台調教の成績
5. ライノ様突然変異マウスの精子凍結保存
6. ラットの新生子成長におよぼす母体内環境の影響
7. 大阪産野生マウスに発見された毛色突然変異
8. 大阪産野生マウス (*Mus musculus molossinus*) 由来の短尾
突然変異
9. *Pgi* 遺伝子座のラット第 9 番染色体上への mapping
10. ネフローゼ自然発症 ICGN マウスにおける腎炎病態の自然経過
11. ネフローゼ自然発症 ICGN マウスにおける腎炎病態の化学修飾

1 無菌ラットを SPF 飼育室に導入した際に生じた急性下痢症について

○藤井修、村口武彦、中島一男、山崎賢一、北田一博、芹川忠夫(京大、医、附属動物実験施設)

1993年3月、当施設の SPF ラット飼育室でハンタウイルス抗体陽性ラットが検出されたため、飼育室を全面閉鎖、消毒を行った後に再開することにした。再開にあたっては、新たに給気口と排気口にヘパフィルターを設置、導入動物は帝王切開由来の無菌動物で、ハンタウイルス抗体陰性であることを確認したものに限定した。飼育室再開後、5 カ月間は、何ら異常が観察されずに経過したが、1994 年11月、突然下痢(水様性もしくはタール状)を発症し、2～3 日後に死亡する例が多発するようになった。発症個体に対する剖検では、腸管の拡張もしくは弛緩が顕著で、漿膜面に明瞭な出血斑が観察された。腸管以外の臓器には、著変が見られなかった。病理組織学的には、腸管粘膜の陰窩が広範囲で拡張もしくは消失しており、粘膜固有層や粘膜下織は浮腫状であった。糞便に対する細菌学的検査を行ったところ、腸内菌叢は著しく単純で、わずかに *Clostridium perfringens*, *Enterobacter cloacae*, *Lactobacillus* sp が検出されるのみであった。以上の知見から、この下痢症は、*C. perfringens* による出血性壊死性腸炎であると推測した。

下痢症の症状が極めて急性で致死的であったため、特殊系統の存続が危ぶまれた。そこで、アイソレーター内で維持されている SPF ラットの盲腸内容物を飲水に混和し、生存しているラットに投与した。その結果、投与後の下痢及び死亡例が激減した。盲腸内容物投与から5ヶ月後の腸内菌叢の検索において、すべての個体から *Eubacterium*, *Lactobacillus* および *C. perfringens* 以外の *Clostridium* が優先的に検出された。他に、*Enterobacteriaceae* と *Streptococcus* が確認された。また、盲腸内容物投与6ヶ月以降の培養検査においては、*C. perfringens* は全く検出されなくなった。これ以降、現在までの8ヶ月間において、1ヶ月毎の微生物モニタリングを行ってきたが、異常個体は検出されなくなった。

我々の知る限り、今回の報告が、世界で最初のラットにおけるクロストリデュウム病の自然発生報告例である。

2 胃粘膜の腸上皮化生と増殖率 (MNNG誘発胃癌の検索)

○湯浅啓史^{1,2}、川合是彰¹、立松正衛² (1田辺製薬・安全研、2愛知がんセ・一病)

ヒトの胃がんには様々な分類があるが、形態学的な分類としての中村・菅野らの分類において、未分化型胃がんは胃の固有腺部から、分化型胃がんは胃の腸上皮化生部から発生する概念が確立されている。しかし、一般的に分化型の胃がん組織においても胃の特徴を示す粘液を持つがん細胞と小腸の特徴を持つがん細胞が存在し、全ての分化型胃がんが腸上皮化生部から発生するという概念に疑問を感じている。実験動物では自然発生的な胃がんは稀で、杉村らの方法によりラットの腺胃部に実験的に誘発することが多い。それらの胃がんは、ヒト胃がんの実験モデルとして利用されているが、多くの腫瘍は分化型の胃がんで腺管を形成して増殖する。今回は、この誘発胃がんモデル (N-methyl-N'-nitro-N-nitrosoguanidine(MNNG)誘発ラット胃癌) を用いて胃がん組織における小腸上皮の出現とその増殖率について検討した。

MNNG誘発ラット胃癌においても腫瘍細胞が産生する粘液あるいは腫瘍細胞の特性により胃型と腸型の形質に区別することができる。胃癌における腸型の形質としては、Galactose oxidase Schiff (GOS) 陰性、Sialidase-GOS 陽性の小腸杯細胞粘液や小腸の吸収上皮に存在する腸型アルカリホスファターゼ(I-ALP)の発現などがある。また、これらの陽性腫瘍細胞は形態的にも杯細胞や小腸吸収上皮細胞に類似している。

【材料および方法】

MNNGを100 mg/lの割合で混入した飲料水を7週齢の雄ラット70匹に30週間にわたって与え、その後20週間無処置で飼育した。試験期間終了後、動物を屠殺し、胃に発生した腫瘍について検索を行った。検索にあたっては、腸型形質を確認する目的でGOS染色、S-GOS染色、アルシアン青-PAS重染色および抗腸型アルカリホスファターゼ抗体を用いた免疫染色を施して観察した。また、細胞増殖を調べる目的で、抗PCNA抗体を用いた免疫染色も行った。個々の腫瘍組織について腸型形質を有する部分を同定し、腫瘍組織内における分葉状況に応じて増殖帯を定義し、その増殖帯に属する腺管のPCNA陽性細胞を測定した。胃型と腸型の腫瘍増殖率 (PCNA陽性細胞/(PCNA陽性+陰性細胞)) の比較は、固定状況によって抗原性が変動するため同一の腫瘍内で実施した。

【結果】

発生した腫瘍42例のうち、腸型形質を発現した腫瘍は22例であった。その全てが分化型の腺癌で、I-ALPおよび粘液は増殖帯から離れ、より分化した腫瘍細胞の増殖率の低い部分で発現した。このうち、今回の増殖率の検討に用いた8個の腫瘍での腸型の11小葉での増殖率平均値は37.4であった。また、これらの腫瘍での胃型組織での増殖率平均値は24.1であった。同一の腫瘍内での腸型/胃型の比率は1.14から3.15といずれの腫瘍においても腸型上皮の増殖率が高かった。

我々は胃癌の進展に伴い腸型細胞の出現率と占有率が増大すると報告してきた。今回、PCNAを用いて細胞増殖率を比較することによっても、胃型の腫瘍組織において出現する腸型上皮の増殖率が高いことはこれらの報告を支持する結果と考えられた。

3 老齡マウスにみられるサーカディアンリズム制御機構の加齢変化について

○大島五紀、曾我正彦、牧野 進（塩野義製薬・実動研）

サーカディアン・リズム制御機構の加齢変化について検討してきた過程で、老齡マウスでは若齡マウスと比較して、外界の明暗周期への同調能が低下していることが明らかとなった。そこで、本研究では、より詳細な検討を行うために、行動リズムを指標にして、恒暗条件下での光パルスに対する位相反応曲線(PRC)を記録すると共に、光照射により脳内の計時中枢である視交叉上核(SCN)に誘起される、Fos蛋白の発現を免疫組織学的に検出し、老齡群と若齡群の差異について検討した。

＜方法＞ 老齡群として、28ヶ月齢、対照群として5ヶ月齢のB6D2F1雌マウスを使用した。飼料と水は自由摂取とし、室温 $24\pm1^{\circ}\text{C}$ 、湿度 $55\pm10\%$ の飼育室内に設置した密閉式飼育ラック内で個別飼育し、焦電型赤外線センサーを用いて一般行動量を経時的に測定、記録した。(1)PRCの作製：老齡群、対照群各42匹について、LD12:12条件(9:00-21:00点灯)で約2週間、恒暗(DD)条件で11日間行動リズムを記録した後、DD条件下12日目にCT2からCT24までの12ポイントについて、約700Lux、15分間の白色光照射を行い、PRCを作製した。(2)Fos蛋白発現の観察：LD12:12条件で約2週間マウスを飼育した後、DD条件に移して2日目の主観的明期(CT7)および暗期(CT17)に約800Lux、60分間の白色光照射を行い、ただちに4%パラホルムアルデヒドで灌流固定、脳を取り出し、 $20\mu\text{m}$ の凍結切片を作製した。切片は抗*c-fos*抗体(ウサギ・ポリクローナル抗体)を用いたABC法により免疫染色し、一部は1%メチルグリーンで後染色した。

＜結果・考察＞ 老齡群では若齡群と比較して位相前進、後退共にPRCの振幅が減少する傾向が認められ、振幅の減少は位相前進で顕著であった。また、老齡群の4例中1例で、光照射により誘起される、SCNにおけるFos蛋白の発現が、若齡群と比較して大きく低下していた。以上の結果は、老齡マウスにおいて、(1)概日振動体(SCN)への光情報の入力系が機能低下をきたしている可能性、(2)概日振動体自体の位相変移量が減少している可能性のどちらか一方、あるいは両方を示唆するものであると考えられる。(1)または(2)のいずれが同調能低下の主な要因であるかは、今後さらに例数を増やし詳細な検討を行う必要があると思われる。本研究の結果は、加齢に伴う、明暗周期への行動リズムの同調性低下の原因を検討する上で、今後どのようなアプローチで研究を進めて行くかという指針を考える際に、重要なヒントを与えてくれるものであると考えられる。

4

調教がサルに及ぼす影響について

カニクイザルにおける保定台調教の成績

○武藤通彦、土屋栄一、田中洋之、中井健史、高木英敏、稲垣晴久、山下武夫

(塩野義油日・実動研)

【はじめに】

我々は、既にアカゲザルが保定台調教によって受ける影響を行動学的・生理学的な指標に基づいて評価した。その結果、本調教はサルに及ぼす影響が少なくその調教法が有効であることを明らかにした。今回、その調教法が若齢～成熟（3.5 ～6 才）の雄カニクイザルに対しても有効であるのか、また、どれ程のストレスを与えているかという点を調教の順応性および生理学的検査に基づいて検討した。

【材料と方法】

動物は体重3.60～4.70kgの6頭を用いた。実験は4週間の調教期間と6か月のフォロー期間からなり、フォロー期間では1か月間隔と2か月間隔群に分け調教を継続した。保定台調教は、サルを①ケージドアに引き寄せる ②ケージから出す ③保定台上に伏せさせる ④15秒後にケージに帰すの4つの操作からなり、これを5回繰り返して1日の調教とした。順応性は4つの調教操作へそれぞれ1～3点の得点をつけて評価した。調教に要した時間も測定した。生理学的指標として血漿コルチゾール濃度を検査した。そのための採血は、調教期間中では週に3回（月・水・金）の計12回、フォロー期間は毎行行った。1回の採血ポイントは調教の直後、調教1時間後および2時間後で毎ポイント共1.3ml 採血した。

【結果と考察】

調教開始当初、サル達は調教操作を嫌がり抵抗が大きかったものの、調教期間の終了時には、調教者の軽い補助だけで保定台へ乗り移るようになり調教に対する順応性は向上した。それに伴って、調教に要した時間の短縮が認められた。血漿コルチゾール濃度の直後値は調教1週目を除いて、他の採血ポイントより高く推移したことから調教の影響をより反映したものと考えられた。その直後値（6頭の平均）は調教2週目まで上昇し、それ以降徐々に減少する傾向にあり調教最終日にはコントロール値まで回復した。このことは、調教が与えたストレスはアカゲザルでの成績と同じく調教に順応していくと共に小さくなる傾向にあることを示すものであった。以上のことから、保定台調教が与える影響はそれ程大きなものではなく、カニクイザルに対しても本調教法は有効であると考えられた。

5

ライノ様突然変異マウスの精子凍結保存

いまひ え

新比恵 啓志、坂田 太二*、本田 勝也、藤原 利久、浅野 裕三

(田辺製薬・安全研、*マルゴ・リサーチ・サービス)

【目的】ライノマウスは体毛を欠き皮膚に著しい皺を有しサイ (rhinoceros) のような外観を呈する。本マウスの皮膚の表現形質は劣性遺伝子の支配を受け、ホモ個体のみが脱毛とサイのような肌を示すことが知られている。肥満型糖尿病形質を有するKK-Cマウスの兄妹交配を重ねたところ、第5代目で全身の体毛が脱落する突然変異の子孫が生まれた。脱毛は生後3週頃より始まり6~7週で完全にヘアレスの状態となり、生後9週頃より皮膚に「たるみ」ないし皺が現れ始め、外観はライノマウスに酷似した¹⁾。本研究ではこのライノ様突然変異マウスの遺伝子を保存することを目的に精子の凍結保存を行った。さらに凍結融解精子を用いて体外受精・胚移植を行い、次世代以降でのライノ様形質の発現の有無を調べた。

【材料および方法】精子の凍結融解操作は竹島ら²⁾ および中潟ら³⁾ の方法に従った。すなわち、左右の精巢上体尾部を18%ラフィノースに3%スキムミルクを加えた保存液中で細切し、この精子浮遊液をプラスチック製ストローに吸引して両端を封じた。液体窒素ガス中にストローを静置した後、液体窒素中に浸漬し凍結操作を完了した。凍結2.5カ月後に精子を融解した。融解は30℃の温水中に液体窒素から取り出したストローを直接漬けることによって行った。融解した精子はTYH培養液で約200倍希釈し、この精子希釈液中でICR系マウスの未受精卵と体外受精を行った。受精卵は胚盤胞期に偽妊娠マウスの子宮に移植し、得られた次世代仔 (F₁) の兄妹交配を行った。

【結果および考察】融解後の精子の生存率は約20%、受精率は14%であったが、受精卵13個のうち12個が胚盤胞へと発生した。この12個の胚盤胞を偽妊娠マウスの子宮に移植したところ、9匹 (雄7匹雌2匹) が新生仔 (F₁) として誕生した。これらライノ様遺伝子をヘテロに持つ新生仔には脱毛およびライノ様形質は認められなかったが、成熟後、兄妹交配を行ったところ計39匹の仔 (F₂) が得られた。メンデル遺伝に従い、このうち約1/4にあたる11匹 (雄5匹雌6匹) に生後2~3週時に脱毛が認められ、これらのF₂マウスには成長とともにライノ様形質が発現した。6カ月時のライノ様マウスの病理組織学的観察では皮膚は全体的に肥厚し籬壁の形成が認められた。また皮膚表層部では角化亢進に起因すると思われる pilary canal cyst が、また中、深層部では毛嚢末端部の残存に起因すると思われる dermal cyst が認められた。これらはいずれもライノマウスで報告されているものとはほぼ同様の組織像であった。以上の結果からライノ様突然変異マウスの遺伝子の保存および形質の再発現が可能ながことが明らかとなった。

¹⁾ 岩崎ら, 日医学録, 10: 44 (1994)

²⁾ 竹島ら, 実験動物, 40: 493-497 (1991)

³⁾ 中潟ら, 家畜繁殖学会要旨, 10 (1993)

○森岡宏至・江崎孝三郎（大阪府大・農・実験動物）

マウスでは、体重の軽い系統より重い系統の母体の子宮内で発育した胎子の方が出生時での体重が重く、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、ラットでの影響は明らかではない。そこで、成体重の軽い Dark Agouti (DA) 系ラットと成体重の重い Sprague-Dawley (SD) 系ラットを用い、同系統ならびに異系統間交配後の妊娠末期の胎子重量ならびに新生子の体重について調べた。

〔方法〕使用動物はDA系とSD系ラットで、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。交配は、DA♀×DA♂(DA)、DA♀×SD♂(DS)、SD♀×SD♂(SD)、SD♀×DA♂(SA)の4群の組み合わせで行った。いずれも発情前期の日に交配させ、翌日の精子確認日を妊娠第1日とし、分娩日を0日とした。各交配群の妊娠21日の胎子重量および分娩後の新生子1日、7日、14日、21日齢の体重を計測した。

〔結果〕

- 1) 4交配群において、妊娠21日齢の胎子重量および新生子1日、7日、14日、21日齢の体重に雌雄間の差はほとんど見られなかった。
- 2) 妊娠21日齢の胎子重量はDA群が最も軽く、DS群とSD群に差はなかったが、これら両群もSA群より有意に軽かった。
- 3) 新生子1日齢の体重においても、DA群が最も軽かったが、DS群よりSD群が重くなりDS群とSA群およびSD群とSA群の間に差は見られなかった。
- 4) 7日齢の新生子体重では、DA群は他の3群より有意に軽く、またDS群もSD群およびSA群より有意に軽く、SD群とSA群間に差は見られなかった。以後14日と21日齢の新生子体重は7日齢の体重差を反映した成長(体重増加)を示した。

〔結論〕以上の結果、交雑のDS群の胎子重量および分娩後の新生子体重はともにDA群のそれらより有意に重かったことから、体重の軽い小型系統の同一母体の子宮内環境にあっても、交雑F₁胎子ならびに分娩後の新生子は、母親の遺伝的要因の一つである子宮内環境による抑制的影響に対抗して発育・成長することが示唆された。

7

大阪産野生マウスに発見された毛色突然変異

○和田あづみ 藪中淳 國東由布子 都築政起

(大阪府大 農 実験動物)

1992年大阪府堺市で捕獲した72匹の野生マウス (*Mus musculus molossinus*) 中に、背部被毛色が野生型よりも淡い雌1個体を発見した。この個体の子孫に同様の異常毛色をしめす個体が出現したことから、この形質は遺伝性のものであると考えられた。そこで、この突然変異形質の遺伝様式を解析するとともに、兄妹交配による毛色突然変異近交系の育成を開始した。

本突然変異個体の背面は明るい淡褐色を呈し、耳介および尾の色は野生型のものよりわずかに明るい色調を示した。一方、腹面は通常の日本産野生マウスと同じく白色で、眼の色にも異常は認められなかった。被毛を光学顕微鏡下で観察した結果、メラニン顆粒の大きさおよび量は正常であるものの、黄色メラニンの分布域が野生型に比べて広いことが判明した。

遺伝様式：正常対照個体との間で交配実験を行った結果、F₁世代186個体全てが正常毛色を示した。F₂世代196匹においては、正常毛色個体142例、異常毛色個体54例であり、戻し交配世代188匹においては、正常毛色個体89例、異常毛色個体99例であった。また、いずれの交配においても、毛色の分離に性による偏りは認められなかった。以上の結果から、この異常毛色は常染色体性の単一劣性遺伝子によって支配されていると考えられた。

また、対立性検定のため、DBA/2系統 (*a/a, b/b, d/d*) との交配を行った結果、F₁個体は全て正常毛色を示した。従って、本突然変異遺伝子は *agouti*、*brown*、および *dilute* 遺伝子座の対立遺伝子ではないと考えられた。

現在、生化学的マーカーおよびマイクロサテライトマーカーを用いた連鎖解析を遂行中である。また、この突然変異系統は近交第13世代に達している。

○藪中 淳、和田あづみ、都築政起 (大阪府大・農・実験動物)

【緒言】 1991年11月、系統育成途上にある、大阪産野生マウス (*Mus musculus molossinus*) 由来のラインに、通常よりも尾の短い個体が出現した。以来、短尾個体同士を兄妹交配することにより突然変異系統の育成を試みている。現在近交第9世代に達しているが短尾形質には固定していない。本研究は、この短尾形質の特徴および遺伝様式を明らかにすることを目的とした。

【材料と方法】 短尾マウスと対照個体との間で交配実験を行い、 F_1 、 F_2 、および戻し交配世代を得た。各個体の全長および尾長を離乳時に計測し、尾率 (尾長/全長) を求めて正常・短尾の判別基準とした。また、本短尾マウスと $T+$ 遺伝子型を持つマウスとの間で交配を行い、子孫の表現型を調査した。短尾マウスの骨格に対し、アリザリンレッド S およびアルシャンブルー 8GX による骨・軟骨分染を施し、骨格の異常形態を観察した。

【結果と考察】 短尾の程度には大きな個体差がみられた。すなわち、ハムスター様の極めて短い尾を持つものから正常に近いものまで存在した。最も異常程度の激しい個体においても、異常が仙骨に及ぶことはなく、少なくとも1個の尾骨が存在した。尾部以外の骨格に異常は存在しなかった。

(遺伝様式) 短尾マウスと正常対照マウスとの F_1 世代はすべて正常であった。 F_2 世代における短尾形質出現頻度は 17.6% (15/85)、戻し交配世代においては 32.6% (43/132) であった。これらの値は、常染色体性の単純劣性遺伝において期待される F_2 世代での出現頻度 25%、および戻し交配世代での出現頻度 50% よりも低い。一方、短尾個体同士の交配で得た仔においても短尾形質出現頻度は 67.5% (260/385) であった。この事実から、本突然変異遺伝子の浸透度が 67.5% であると仮定すれば、 F_2 および戻し交配世代における短尾形質出現期待頻度は 16.9% および 33.8% であり、それぞれの観察頻度と近似した。 $T+$ 遺伝子型マウスと本短尾マウスとの交配から得た F_1 個体に、無尾個体は分離しなかった。以上の結果より、本形質は t -complex には属さない、70% 程度の浸透度を持つ、常染色体性の単一劣性遺伝子によって支配されていると考えられた。

現在、マイクロサテライトマーカーを用いることによって本遺伝子の染色体上の位置決定を試みている。また今後、発生学的検討を行うことにより、中胚葉分化過程における異常発生モデルとしての評価を行う予定である。

9 *Pg1* 遺伝子座のラット第9番染色体上への mapping

毎原敏郎^{1,2} 庫本高志¹ 近藤靖^{1,3} 北田一博¹ 芹川忠夫¹
(京都大学医学部附属動物実験施設¹ 同附属病院小児科²
田辺製薬・安全性研究所³)

ラット *Pg1* (Pepsinogen-1) は尿および胃粘膜に存在する pepsinogen の多型を支配する遺伝子座である。ラット *Pg1* には近交系間で広く多型が存在することからラットの遺伝的モニタリングにおける標識遺伝子の1つとして有用であることが報告されてきた。しかしながら現在までの報告では他の遺伝子座との連鎖を認めず、その染色体上の位置は不明であった。

我々はラット遺伝子連鎖地図の拡充のために microsatellite markers の開発を行なってきたが、今回その marker の1つである *D9Kyo8* と *Pg1* が有意の連鎖を示し *Pg1* がラット第9番染色体上に存在することが明らかとなったので報告する。

[材料・方法] pepsinogen の電気泳動は Samloff(1969) らの方法に準じた。*D9Kyo8* は当施設で開発した microsatellite marker である。AC ないし AG repeat をもつ rat cosmid genomic library の clone の染色体上の位置を FISH (Fluorescence in situ hybridization) によって確定し、その塩基配列からプライマーを設計するという方法で marker の開発を行ってきた。*D9Kyo8* はラット第9番染色体 centromere 側に存在する clone (AD159) から得られた marker である。*Pg1* および *D9Kyo8* のタイピングは (SHR x BN)F₁ x BN の戻し交雑仔 88 個体を用いて行なった。連鎖解析には GENE-LINK program を用いた。

[結果] *Pg1* についてはホモ型 42 個体、ヘテロ型 46 個体で分離比はほぼ 1:1 となり、single autosomal locus によって支配されるという従来の報告と一致していた。*Pg1* は *D9Kyo8*, *D9Mgh5*, *D9Mit6* と 0.1% 水準で有意の連鎖を示し、以下のように mapping された。

cen - *D9Mgh5*, *D9Mit6* - (3.4 ± 1.9 cM) - *Pg1* - (2.3 ± 1.6 cM) - *D9Kyo8* -
- (32.3 ± 4.8 cM) - *D9Mgh3* - (13.0 ± 4.9 cM) - *Gls* - tel

[考察] *Pg1* 遺伝子座はその染色体上の位置が確定したことにより、遺伝的モニタリングにおける標識遺伝子としてさらに有用なものになったと考えられる。

ネフローゼ自然発症ICGNマウスにおける腎炎病態の自然経過

○水野信哉，谷内孝次，岳飛乗，岡本宗裕，黒澤努（阪大・医・動物実験施設）

1. はじめに

ICGNマウスはネフローゼ症候群（NS）を自然発症する。今回，このマウスに発現する腎炎の自然経過を病理組織学的に観察し，血清および尿の生化学検査の所見と関連づけた結果，興味ある知見が得られたのでその概要を報告する。

2. 材料および方法：

- 1) 動物：発症（牝）および非発症（ヘテロ）のICGNマウス（3, 4, 6, 14, 26週齢），各週齢ごとに雌雄各5匹ずつを用いた。
- 2) 検査項目：
 - (1) 病理組織学的検査：HEまたはPAS染色標本を作製し，光顕観察を行った。糸球体細胞外基質（ECM）指数，細胞数および面積を算出し，尿細管・間質病変は円柱出現，単核細胞浸潤，間質線維化によってスコア化した。
 - (2) 尿および血清の生化学：尿についてはアルブミン（Alb）およびクレアチニン（Cr）の濃度を求め，血清についてはAlbおよびCr以外にも，血中尿素窒素（BUN）と総コレステロールを測定した。
 - (3) 相関性：病理組織学的に算出したECM指数または尿細管・間質病変スコアと生化学的に測定した尿Alb濃度またはBUN値の相関性を調べた。

3. 結果

- 1) 糸球体および尿細管・間質病変

3週齢よりメサングウム細胞融解とECM過剰沈着によって特徴づけられる硬化病変が出現し，この病変は6週齢ではほぼ全ての糸球体に認められた。糸球体硬化過程において糸球体細胞増殖および糸球体肥大が観察された。14週齢時には円柱出現，尿細管萎縮，間質線維化，単核球浸潤が認められ，この病変は26週齢時にはさらに顕著に観察された。
- 2) 血清/尿の生化学所見の推移

低Alb血症，高脂血症およびAlb尿といったNSを特徴づける所見は3週齢より観察され，BUN値，血清Cr値の上昇，尿中Cr排泄低下といった腎不全発現を反映する所見は14週齢以降認められた。
- 3) 糸球体/尿細管・間質性病変と血清・尿の生化学所見の相関。

尿細管・間質性病変の強さとBUN値の間にのみ良好な相関が観察された。

4. 考察

腎不全の病態を反映するBUN値は糸球体硬化病変の程度を示すECM指数よりもむしろ尿細管・間質の病変スコアと良く相関した。このことから，重篤な糸球体硬化病変を発現する病態においても尿細管と間質が正常構造を保つ限りは腎機能は比較的良く保たれ，糸球体硬化病変に尿細管荒廃と間質線維化が加わる事によって腎不全の病態がもたらされる可能性が考えられた。

ネフローゼ自然発症ICGNマウスにおける腎炎病態の化学修飾

○谷内孝次，水野信哉，岳飛乗，岡本宗裕，黒澤努（阪大・医・動物実験施設）

1. はじめに：我々はネフローゼ発症ICGNマウスにおいて進行性の糸球体硬化病変とその後の尿細管・間質性病変の発現を明らかにしている。そこで今回，本マウスに諸種薬剤を投与し，腎炎の病態がどのように修飾されるかを調べた。
2. 材料および方法：以下の3剤を以下のプロトコールにしたがって投薬した。

	投与時 週齢	投与期間 (週)	用量	投与経路
エナラプリル	4	4	5mg/dl	PO (自由飲水)
プレドニゾロン	3	3	5mg/kg/day	SC
シスプラチン	6	単回	3, 6, 9mg/kg	IP

- 1) 病理組織学的検査：HEまたはPAS染色標本を作製し，光顕観察を行った。
 - (1) 糸球体病変；糸球体の硬化指数，細胞数および面積の計測。
 - (2) 尿細管・間質病変；変性/再生，細胞浸潤，線維化による数値化。
- 2) 尿および血清の生化学：以下の項目について濃度を測定した。
 - (1) 尿；アルブミン，クレアチニン。
 - (2) 血清；アルブミン，総コレステロール，BUNおよびクレアチニン。

3. 結果

- (1) エナラプリル：対照群では糸球体硬化を特徴づける基質の過剰沈着および糸球体面積増加が観察された。この他，尿細管萎縮/間質線維化を呈する個体も認められた。エナラプリル投薬群ではこれらの病変は軽度には抑えられていた。
- (2) プレドニゾロン：尿および血清の生化学検査結果からは投薬による腎炎の改善を示す所見は得られなかった。病理組織学的検査の結果，投薬による糸球体硬化の有意な抑制が認められた。
- (3) シスプラチン：9mg/kg群で被毛失沢，元氣消失，著しい体重減少が認められた。このことから投与量を6mg/kgに特定し，腎炎病態の変化を21日目まで追跡した。投与後4日目に著しい血清クレアチニン値およびBUN値が上昇し，組織学的には近位尿細管の壊死が顕著であった。7日目以降再生の経過を辿ったが，発症個体では21日目においても再生が強く残存しており，修復遅延による腎炎の増悪が認められた。

4. 考察：ICGNマウスの腎炎について薬物を用いてその病態を修飾した。その結果，腎炎病態のエナラプリルによる改善/シスプラチンによる増悪が認められた。本マウスはエナラプリルの腎保護作用機序解明上，有用なモデルと考えられる。さらにシスプラチン投与によって慢性腎不全を安定かつ早期に誘導できる可能性が期待される。

プリオンという言葉は、古くから伝達性海綿状脳症（TSE:Transmissible Spongiform Encephalopathy）として知られているヒト、および動物の病気の病原因子として、1982年にカリフォルニア大学のPrusinerによって提唱された¹⁾。プリオンは核酸をもたない感染性の蛋白粒子で、ホルマリン、クロロホルム、紫外線あるいは熱では不活化されにくい特異な物理化学的性質もっている。

プリオンという概念が定着し始めて、ヒトおよび動物のTSEはプリオン病と総称されている。そのプリオン病の中で最も古くから報告されているのがヒツジのスクレイピーで、1700年代にすでにヨーロッパで発生していたことが知られている²⁾。しかし、その病気に感染性があることが証明されたのは、1900年代半ばに跳躍病（louping ill）のヒツジの脳のホルマリン不活化ワクチンの事故により、7%のヒツジにスクレイピーが発生したことによる³⁾。面白いのは、この事故は単に処理が不十分なために起こったのではなく、おそらくホルマリン耐性というプリオン病病原体の特異な性質がこの事故を引き起こしたものと考えられることである。その後、ヒツジを用いた感染実験が盛んに行われ、ヒツジ順化株であるSSBP/1株が分離された⁴⁾。このような初期の感染実験からプリオンの生物活性、現在のプリオン蛋白（PrP）遺伝子発現の最前線の研究に至るまで動物実験は重要な役割を果たしてきた。プリオン病研究における動物実験はいろいろな分野を支えたり、繋げたりする支柱のような存在であり、実験動物・動物実験の発展がプリオン研究と相まっているといっても言い過ぎではない。それらの動物実験を中心に、大まかなプリオン病研究の歴史を表1にまとめた。

これらのうち、Chandler⁵⁾のマウスへの伝達は実験室レベルでの研究を飛躍的に進歩させたものである。なぜなら、ヒツジやヤギを用いた感染実験では取扱にも経済的にも大変であること、潜伏期間が長いこと（約6ヵ月から3年）、自然感染例があり、無処置コントロールも発症し、データの信頼性に問題があった。これは、まだ、実験動物学

が確立されていない1960年代の実験である。実験小動物に伝達できるようになり、マウスで120日、ハムスターでは60日程度の潜伏期間で発症させることが可能となり、動物実験のスピードも信頼性も向上した。また、マウスの系統間に歴然と潜伏期間の相違があることが判明し、Dickinsonら⁶⁾がSinc遺伝子を提唱し、その後、Carlsonら⁷⁾により、PrP遺伝子がSincと関連していることが明らかにされた。

プリオン病の最初のターニングポイントは、チンパンジーへの感染実験から、ヒトのプリオン病であるクルー（kuru）が、スクレイピーと類似の感染症であることが証明されたことである⁸⁾。クルーはアフリカ、ニューギニアのフォア族の間に死者を弔う儀式のなかで伝達されていた病気で、伝達要因となった儀式を止めることで発生が終息し、Gajdusekがノーベル賞を得ている。彼の共同研究者のGibbsがCJDにも感染性があることを同様にチンパンジーで証明した⁹⁾。その後、ヒトのプリオン病も実験小動物に次々と伝播されるようになり、CJD（Creutzfeldt-Jakob Disease:クロイツフェルト・ヤコブ病）¹⁰⁾、GSS（Gerstmann-Sträussler-Scheinker syndrome）¹¹⁾、FFI（Fatal Familial Insomnia:致死性家族性不眠症）¹²⁾などの感染性が証明され、詳細な実験的研究が出来るようになってきた。

1970年代から80年代の初めにかけては、実験動物学も確立し、一定の考え方や手順を用いて、プリオンの生物学的特性が調べられた。マウスの潜伏期間に影響をおよぼす因子を探すための様々な試みが行われ、プリオンの宿主内動態について一部が明らかにされてきている。さらに、ハムスターcDNAのクローニング¹³⁾以来、分子遺伝学的アプローチにより、ヒトのPrP遺伝子にも幾つかの変異があることが調べられ、その変異がプリオン病の症状や病理像を修飾していることも明らかにされている。これらのPrP遺伝子の変異を有するCJDのなかには実験動物に伝播出来ない例があること¹⁴⁾、トランスジェニックマウスで自然発症の報告もあることから¹⁵⁾、遺伝病として分類されているCJDもある。

はじめにも述べたように、カリフォルニア大学のPrusinerは、核酸をこわすような処置では感染力価はほとんど変化しないが、蛋白質を変性させるような処置をとると急激に感染力が失われるというバイオアッセイの成績などから、核酸をもたない蛋白粒

子が感染因子となり病気を引き起こす、というプリオン説を1982年に提唱した¹⁾。これがプリオン病最大のブレイクスルーであり、それ以降、プリオン (Prion) という語が使われ始めた。このプリオン説はセントラルドグマに反することから、多くのウイルス学者、分子生物学者から否定的にあつかわれた。しかし、1990年代になってのマウスを用いた分子遺伝学的アプローチの結果は、Prusinerのプリオン説を裏付けるものばかりである。

しかし、その伝達、発症のメカニズムはほとんど謎とっていいほど解明されていない。このメカニズムの解明には、PrP遺伝子の多数の変異とそれが修飾していると考えられる潜伏期間、病理のコンビネーションが明らかなヒトのプリオン病が適していると思われる。今後のプリオン病における動物実験の方向性は、ヒトのPrP遺伝子をもった遺伝子操作マウスをシステミックに作り上げる必要があると思われる。様々なタイプのヒト化マウスの系は、伝達、発症解明の強力な武器になるであろう。

そして、血液製剤、手術用硬膜などのヒト由来の医薬品、医療材料のプリオン汚染について、検出精度が飛躍的に向上すると考えられ、安全性試験におけるヒト化マウスの実用化が期待できる。

文献

- 1) Prusiner, S.B.: Science 216:136-144, 1982
- 2) Gibbs, C.J. Jr.: Ophthalmology 87:1208-1218, 1990
- 3) Gordon, W.S.: Vet. Rec. 58:516-520, 1946
- 4) Wilson, D.R. et al.: J. Comp. Pathol. 60:267-282, 1950
- 5) Chandler, R.L.: Lancet i:1378-1379, 1961
- 6) Dickinson, A.G. et al.: J. Comp. Pathol. 78:293-299, 1968
- 7) Carlson, G.A. et al.: Cell 46:503-511, 1986
- 8) Gajdusek, D.C. et al.: Nature 209:794-796, 1966
- 9) Gibbs, C.J. et al.: Science 161:388-389, 1968

- 10) Manuelidis,E.E. et al.:Proc.Natl.Acad.Sci. USA 75:3422-3436,1978
- 11) Tateishi,J. et al.:Ann.Neurol. 5:581-584, 1979
- 12) Tateishi ,J. et al.:Narure 376: 434-435, 1995
- 13) Oesch,B. et al.:Cell 40:735-746,1985
- 14) Tateishi,J. & Kitamoto,T.:Brain Pathol. 5:53-59, 1995
- 15) Hsiao,K.K. et al.:Science 250:1587-1590,1990

実験動物の繁殖行動と飼育管理

斎藤 徹

日本獣医畜産大学実験動物学教室

実験動物にとって最も身近な物理的環境は棲息場所となるケージであろう。動物福祉の観点からケージの広さが問題にされるのは当然のことと思われる。動物に必要なケージスペースについての厳密かつ合目的なデータは余りないようである。たとえ、ケージ内動物に影響する様々な要因が解明され、評価されたとしても理想的なケージを作出することは不可能であろう。しかしながら、生命科学実験の場にあっては、ある処置に対する動物が示す反応の均一性と再現性が強く求められる以上、実験条件は高度に統御されなければならない。

1985年に各種実験動物におけるケージの minimum space が U.S. Department of Health, Education, and Welfare から NIH Guideline として提出されている。この Guideline は10年に一度の見直し作業が行われており、当改訂版はいずれ National Academy Press から出版されると思われる。しかしながら、Guideline に述べられているケージは飼育ケージとしての規格であり、これ以外の特種な場合、例えば行動や繁殖に特別な条件を必要とする場合に関してのケージ規格については言及されていない。

本研究において、ラットの性行動パターンがケージスペースまたはケージ形状によって影響を受けるか否かについて検討した。性行動試験にラットを取り上げたのは、他の実験動物に比較して典型的な性行動パターンを示すためである。ここで、ラットの性行動パターンについて概略を述べてみる(Fig. 1参照)。成熟雄ラットは発情雌の会陰部を嗅ぐ行動 genital sniffing が見られる。この時、雌は雄を勧誘する行動 soliciting behavior 例えば ear-wiggling, hopping そして雄に突進し、その後急に向きをかえて逃げる行動 darting が見られる。雄は逃げる雌を追尾し、雌が立ち止まった時に、雌の腰部に後ろから乗りかかる mount 行動が見られる。この時、雌には臀部と頭部を持ち上げ

る arch 様の姿勢 lordosis 行動が見られる。

材料および方法

生後4週齢の雌雄 Wistar-Imamichi 系ラットを(財)動物繁殖研究所(茨城県)より購入し、金網ケージ(31 X 44 X 23 cm)に雌雄別に4匹ずつ収容した。動物室の環境条件は温度 $24\pm 2^{\circ}\text{C}$ 、湿度 $55\pm 10\%$ 、人工照明14時間(午前5時点灯)であった。飼料には MB-1 (船橋農場製)が用いられた。生後9~10週齢にて各36匹の雌雄が性行動の実験に供された。発情雌は実験に先立ち膣垢採取により選抜された。性行動用ケージには円筒型(半径12, 17, 34 cm, 高さ20 cm)および直方体型(16 X 27, 23 X 38, 46 X 76 cm, 高さ20 cm)が用いられた(Fig. 2)。雄は上記のケージに収容され、その5分後に発情雌が導入された。性行動の観察は午後7~9時の間の1時間赤色ライト下で行われた。性行動の測定は Heimer *et al.* の方法に従い、以下に示す指標を用いて定量的に行われた。

- 1) 乗駕回数(Mount frequency, MF); 挿入を伴わない乗駕のみの回数
- 2) 挿入回数(Intromission frequency, IF); 挿入を伴う乗駕回数
- 3) 射精回数(Ejaculation frequency, EF); 射精を伴う乗駕回数
- 4) 乗駕潜時(Mount latency, ML); 雄を雌と一緒にしてから最初の乗駕が起こるまでの潜伏時間
- 5) 挿入潜時(Intromission latency, IL); 雌と一緒にしてから最初の挿入が起こるまでの潜時
- 6) 射精潜時(Ejaculation latency, EL); 各交尾シリーズの最初の挿入から射精が起こるまでの潜時
- 7) 射精後挿入潜時(Post-ejaculatory interval, PEI); 射精から次のシリーズの最初の挿入までの潜時
- 8) ヒット レイト(Hit rate, HR); 挿入回数を乗駕と挿入回数の和で除した値
- 9) 挿入間隔(Interintromission interval, III); 射精潜時を挿入回数で除した値

性行動観察試験終了後、雌は膣垢中の精子および膣栓が調べられ、個別ケー

ジに収容された。分娩時に産子数が記録された。

データの統計処理には Mann-Whitney U test および Duncan's multiple t test が用いられた。

成績

各種ケージサイズの円筒型および直方体型ケージでの雄ラットの1時間における乗駕、挿入の各回数とヒット レイトの値を Fig. 3 に、射精回数をFig. 4 にそれぞれ示した。円筒型および直方体型ケージともケージサイズが大きい程、1時間に示す乗駕回数は顕著に減少したのに対し($P<0.05$; CS vs. CM, $P<0.01$; CS vs. CL, RS vs. RL)、挿入回数は増加する傾向が見られた($P<0.05$; RS vs. RL)。これを反映して、ヒット レイトの値は大きいケージ程高値を示した($P<0.05$; RS vs. RM, $P<0.01$; RS vs. RL, CS vs. CL, CM vs. CL)。射精はRS ケージでの1例(6例中)を除き、すべての雄に観察された。挿入回数もケージ形状の差異に関係なく、ケージサイズが大きい程高い値を示した($P<0.05$; CS vs. CL, RS vs. RL)。

Fig. 5 に各種ケージサイズの円筒型および直方体型ケージでの雄ラットの射精潜時、射精後挿入潜時および射精間隔の値を示した。これら3項目の値は、CLケージの方がCSケージに比較して有意に低値を示した($P<0.05$)。

産子数を Table 1 に示した。これはケージサイズ、ケージ形状による有意な差異は見られなかったが、両形状ともケージサイズが大きい程高値を示す傾向が認められた。

ほぼ同じケージサイズ(床面積)を示す円筒型と直方体型ケージ間における交尾行動パターンおよび産子数の比較において、両者間での著しい差異は観察されなかった。

考察

本実験において、冒頭に述べた様にケージサイズの違いが、またケージ形状

の違いが性行動にどの様に影響するかを、ラットを用いて検討した。実験開始直前まで、ラットは一定の環境統御下の動物室で飼育された。雄雌とも処女 (sexually inexperience) の個体を性行動試験に1回のみ使用した。さらに、午後7~9時の間、1時間の観察において、ある特定のケージサイズあるいはケージ形状が、ある特定の時間帯に偏らない様に配慮した。これは、雌の発情状態がこの時間帯に若干でも異なることを懸念したための処置である。

今回用いたケージサイズについて、著者は NIH Guideline の規格を参考に、まず CS, RSケージのサイズを決定した。それによると、雄ラット(300-400 g)、雌(200-300 g)、それぞれの1匹当たりの最小床面積は258.08, 187.11 cm^2 であると述べている。今回の実験に用いたラットの体重は雄雌ともこの範囲内に収まっており、雄1匹と雌1匹の合計ケージの床面積は445.11 cm^2 となる。今回の CSケージの床面積は452 cm^2 、RSケージは432 cm^2 であり、便宜上算出した値とほぼ一致している。これら CS, RSケージの床面積を基準とし、その2倍(CM, RM)、8倍(CL, RL)の面積を有するケージを作製した。

さらに、上記のケージサイズ並びにケージ形状の違いは冒頭に述べたラットの性行動パターンの特徴を考慮したものである。例えば、雌が hopping, darting するためのスペース、その雌を雄が追尾するためのスペースが必要である。また、雌の hopping, darting および雄の追尾行動の量的、質的要素がケージ形状によっても異なる可能性があることも考えられる。つまり、ケージ形状により、直方体型ケージには4つのコーナーがあるが、円筒型ケージにはそれがない。

要約すれば、著者の実験が明らかにしたのは次の如くである。(1) ケージサイズが同じであれば、ケージ形状の違いによる性行動パターンおよび産子数には影響が見られなかった。(2) ケージ形状に関係なく、ケージサイズが大きい程、乗駕回数、射精潜時、射精後挿入潜時および射精間隔の値の減少、挿入回数、ヒット レイトの値および射精回数の増加が見られた。しかし、産子数には影響しなかった。

これらの結果より、実験動物学的観点から考えた場合、産子数がケージサイズおよびケージ形状の違いにより影響されなかったことは、今回検討した最も

小さい CS, RS ケージ、すなわち NIH Guideline より便宜上算出した飼育ケージの大きさでも性行動用ケージとして適当であると思われる。しかしながら、雄ラットはこのケージでは不十分な挿入、射精しか行うことができず、数多くの乗駕を試みなければ射精に必要な挿入の回数を得ることができない。このことは動物福祉の立場から、性行動用ケージとして NIH Guideline の飼育ケージの最小スペースでは不適當であることを示唆しているのかも知れない。さらに、詳細な検討が必要であろう。

謝辞

稿を終わるにあたり、ご校閲を賜った新潟大学医学部佐藤徳光助教授に感謝する。本実験の一部は文部省科学研究費(総合A 06304055、班長: 佐藤徳光)の補助により行われた。

本稿の概要は第49回関西実験動物研究会(大阪大学コンベンションセンター、平成8年3月8日)特別講演にて報告された。発表の機会を与えて戴いた京都大学医学部芹川忠夫教授並びに大阪大学医学部黒沢 努助教授に深謝する。

参考文献

1. Beach, F.A. (1966). Sexual behavior in the male rat. *Science*, 153, 769-770.
2. Dewsbury, D.A. (1975). Diversity and adaptation in rodent copulatory behavior. *Science*, 190, 947-954.
3. Guide for the care and use of laboratory animals. (1985). NIH Publication No. 85-23: 14-16.
4. Heimer, L., and Larsson, K. (1967). Mating behavior of male rats after olfactory bulb lesions. *Physiol. Behav.*, 2, 207-209.
5. Hokao, R., Saito, T.R., and Takahashi, K.W. (1993). Comparison of sexual behavior in small laboratory animals. *Exp. Anim.*, 42, 451-

455.

6. Saito, T.R., and Moltz, H. (1986). Copulatory behavior of sexually experienced male rats following removal of the vomeronasal organ. *Physiol. Behav.*, 37, 507-510.
7. Saito, T.R. (1987). Copulatory behavior of male rats paired with natural proestrous and hormone-treated ovariectomized females. *Exp. Anim.*, 37, 93-95.
8. Saito, T.R. (1988). Effects of LHRH on copulatory behavior and locomotor activity in sexually inexperienced male rats. *Exp. Anim.*, 37, 489-492.

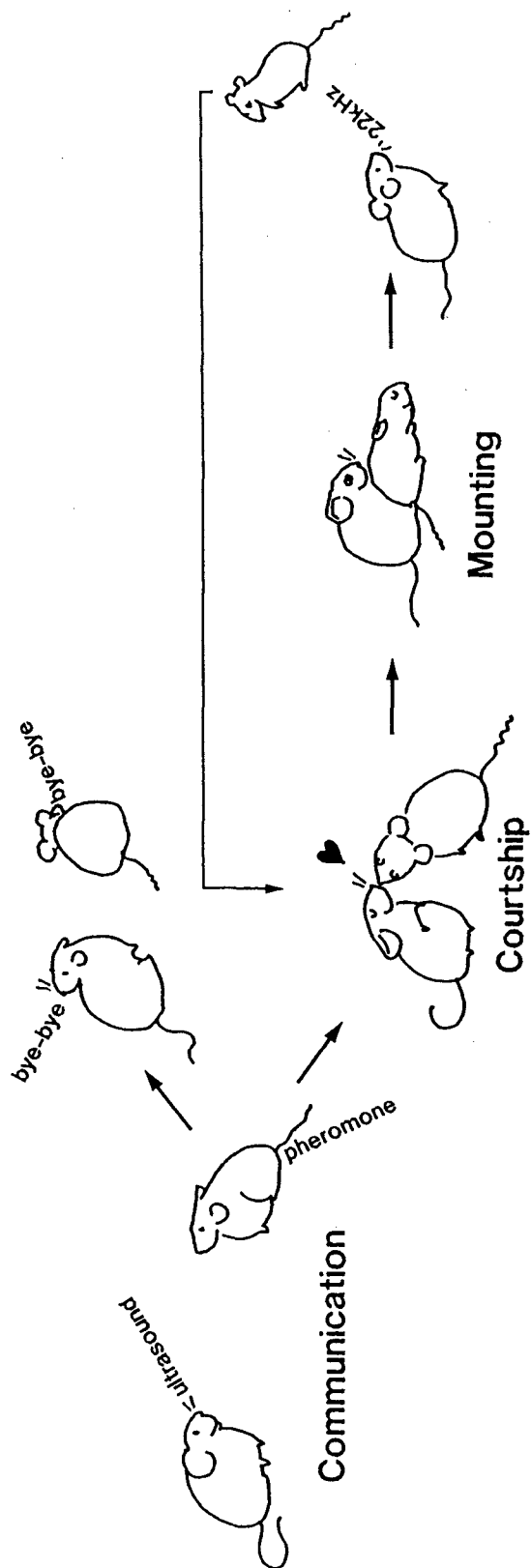
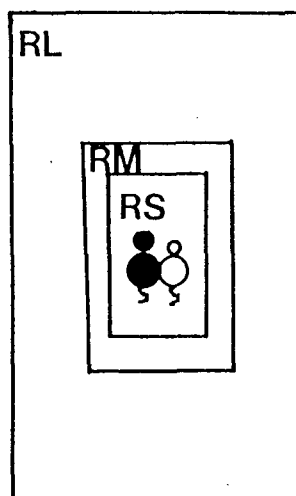
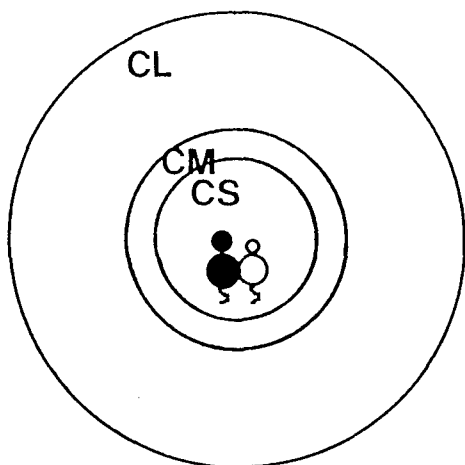


Fig. 1 The pattern of copulatory behavior in male rats



CS: $3.14 \times 12^2 = 452 \text{ (cm}^2\text{)}$

CM: $3.14 \times 17^2 = 907 \text{ (cm}^2\text{)}$

CL: $3.14 \times 34^2 = 3630 \text{ (cm}^2\text{)}$

RS: $16 \times 27 = 432 \text{ (cm}^2\text{)}$

RM: $23 \times 38 = 874 \text{ (cm}^2\text{)}$

RL: $46 \times 76 = 3496 \text{ (cm}^2\text{)}$

Fig. 2 Schematic diagram of cage arrangement and two rats, above view.

Left and right indicate the cylindrial (CS, CM and CL from inside) and rectangular prism (RS, RM and RL from inside) cages, respectively. The above cage spaces are in the 1 : 2 : 8.

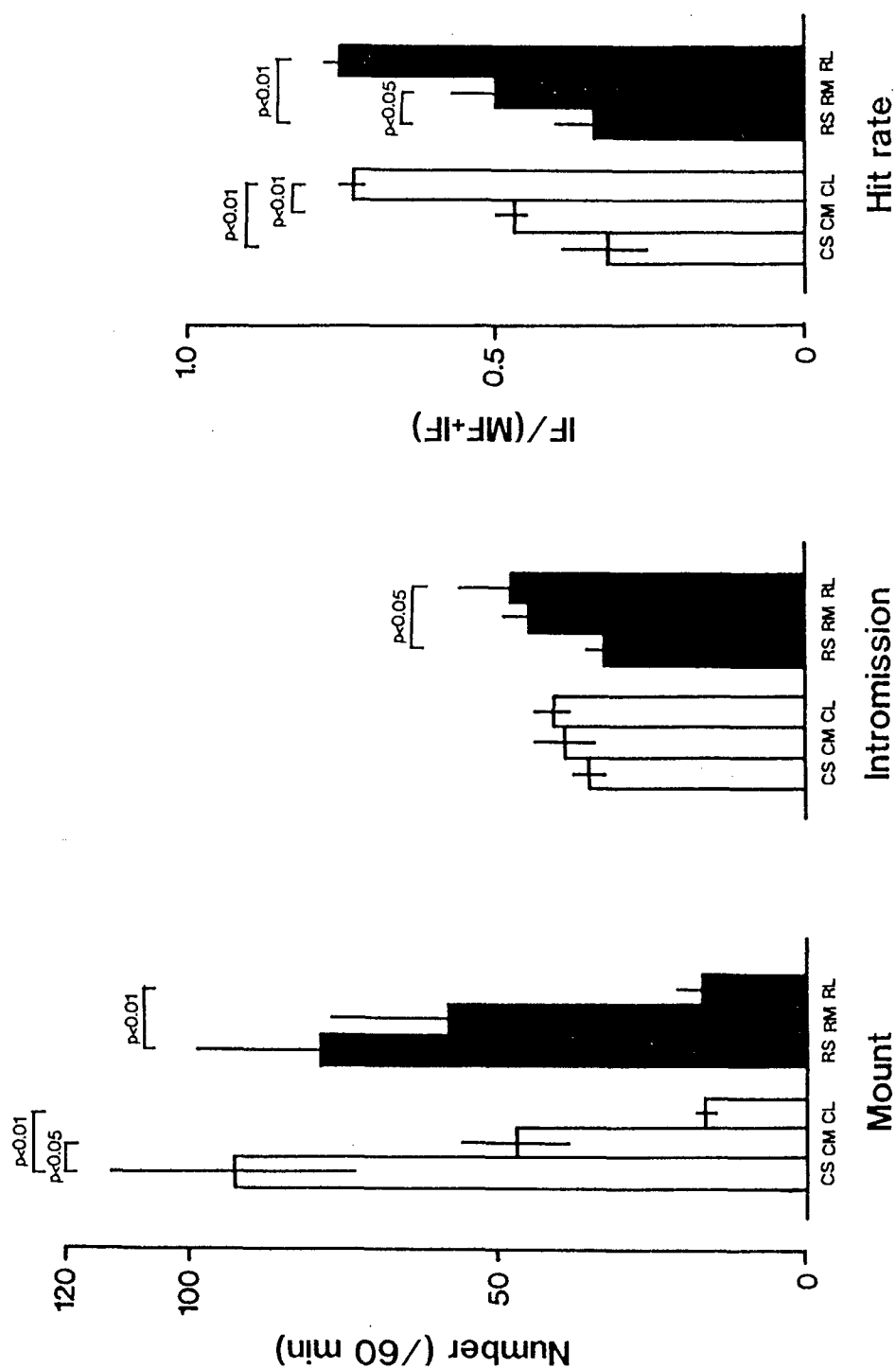


Fig. 3 Comparison of behavioral frequencies (mean $\pm$ SEM, $n=6$) for male rats in small (CS, RS), middle (CM, RM) and large (CL, RL) size cages

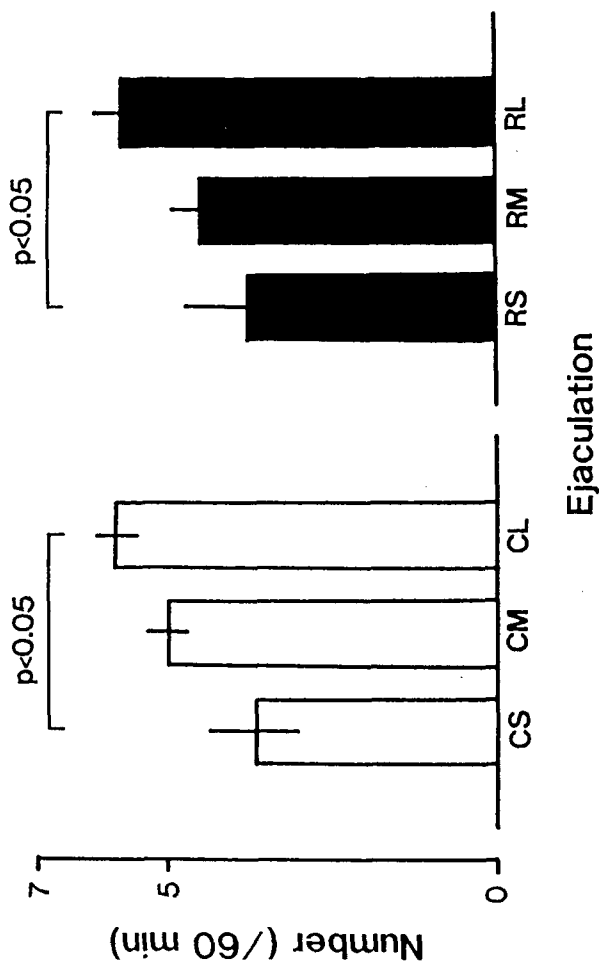


Fig. 4 Comparison of ejaculation frequencies (mean $\pm$ SEM, $n=6$) for male rats in small (CS, RS), middle (CM, RM) and large (CL, RL) size cages

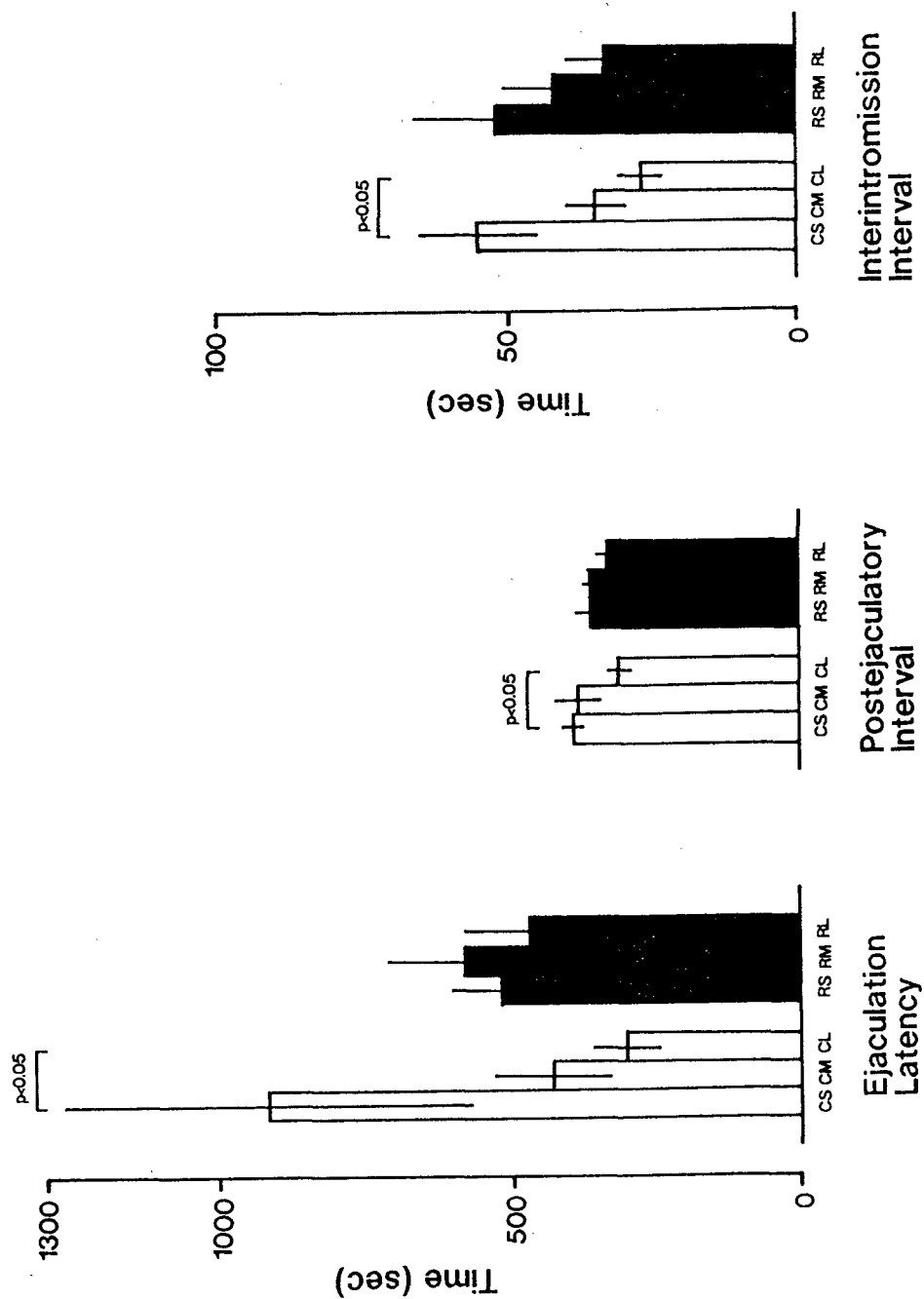


Fig. 5 Comparison of behavioral latencies (mean $\pm$ SEM, $n=6$) female rats in small (CS, RS), middle (CM, RM) and large (CL, RL) size cages

Table 1 Comparison of litter sizes (mean $\pm$ SEM, n=6) for female rats mated with males in small (CS, RS), middle (CM, RM) and large (CL, RL) size cages

Mating cage	Litter size
CS	10.7 $\pm$ 2.6
CM	11.5 $\pm$ 1.7
CL	13.7 $\pm$ 0.4
RS	10.6 $\pm$ 2.2 (n=5)
RM	13.0 $\pm$ 0.6
RL	12.2 $\pm$ 0.7

「動物実験の管理とサル感染症」

国立予防衛生研究所 筑波医学実験用霊長類センター

吉川 泰弘

本日、私に与えられたテーマは「動物実験の管理とサル類の感染症」ですので、以下の3つの内容について話題を提供しようと思います。

- 1) 動物実験の安全性確保
- 2) 事故対策
- 3) サル類の感染症、です。

1) 動物実験に伴うバイオハザードを防止するための要素は、3つに大別されます。第1は施設（facility）による物理的封じ込めです。動物実験の危険度に応じてP1～P3（ABSL1～4）のレベルがあります。実際には、クリーンゾーン、ダーティーゾーンの区別、サポートエリアの確保、パスボックス、また動物実験室は、前後室を設置する。HEPAフィルターを使用する等があります。第2は、設備・機器類（equipment）で、アイソレーター、セーフティーキャビネット、ディスポーザブル器具、滅菌器等があります。第3はソフトウェアに関するもので、教育・訓練・運営等の分野（practice）です。この独立した3つの要素がかみ合って biosafety が確保されます。

米国では、CDC・NIHが「Biosafety in microbiological and biomedical laboratories」というガイドラインを出しています。この中のセクション4、5に動物実験に関する項目が記載されています。日本にはまだ行政的なガイドラインはありません。国立予防衛生研究所をはじめ、各研究機関や大学・企業等が独自にガイドラインを作っているのが現状です。国立予防衛生研究所には、病原体を取扱う実験のガイドラインと、動物実験を行う際のガイドラインの両方が出来ています。

2) こうしたマニュアルに基づき、動物実験が遂行されるわけですが、それでも人間がやる限り事故が発生するケースがあるわけで、事故の対策をマニュアル化しておくことが必要であります。筑波霊長類センターでは、事故に対し、大別して予防措置と、事故時対応の2つに別けてノウハウが整理されています。サル類は特に他の実験動物にはない危険性を持っています。第1はヒトに近いので、後に述べるように数多くのヒトとの共通感染症があります。第2は手や尾を非常にうまく使うという点です。第3は知能が高く、その分飼育、取扱いが難しい点があります。

サル類のケージは、挟体板付のケージで個別飼育型の方が、動物の捕獲には安全です。また薬物投与や、病原体接種あるいは採血の際には、動物に苦痛を与えないためにも、実験の安全性の確保のためにも麻酔が必要です。さらに雄ザルは大きな犬歯を持っているので性成熟に達する前に抜歯あるいはカットする方が安全です。防御衣、金属ネット付き手袋、ゴーグル、腕カバー、前かけ（防水性）等の着用も感染事故を防ぐ点では必要な用具です。また正常時の動物実験関係者の血清の保存等も事故対策上必要です。

サル類を用いた実験中の咬傷、引っ掻傷、針さし事故の対応については、出来るだけ早

い患部の洗浄、ヨード剤・アルコール等による消毒と応急処置（ピンセット、ハサミ、ガーゼ、バンドエイド、包帯、綿棒等、応急処置用キットとして、マニュアル書きとともにセットにして、各実験室に置いておきます）をします。事故報告をすると共に、専用の医院（日常的に連絡の取れている専門医）に直行します。事故者の血清の保存と1、3ヶ月及び必要に応じて6ヶ月、1年後の血清チェック、及び危害を与えた動物の抗体検査が必要です。この他に動物実験に伴う事故の対応としては、各実験の特殊性（ケミカルハザードを含めて）に応じた事故対策が必要とされます。立て前だけでなく、実際に起こり得る場面をシミュレートした現実的対応のマニュアルを作成しておく必要があります。

3) サル類の感染症には、大きく分けてサルからヒトに由来する感染症、ヒトからサルに行く感染症及びサル間で流行する感染症の3種類があります。サル類からヒトに由来する感染症の中で重要なものにはBウイルスがあります。これはヒトへの感染率は高いものではありませんが、神経系を巻き込むと致命的になります。最近では抗ヘルペスウイルス剤の有効性が認められています。この他にモンキーボックスやマールブルグウイルス、エボラウイルス等のフィロウイルスがあります。サルのフィロウイルス（レストン株）は、ヒトに対する病原性はありません。ウイルス以外では、原虫症であるアメーバ赤痢があります。重症例では肝膿瘍を作り死亡することもあります。

ヒトからサル類に行き、またヒトに感染する感染症としては、A型肝炎、結核、細菌性赤痢が重要なものです。直接ヒトには感染しませんが、サルのコロニーで流行すると致死的な流行を起こすものに、水痘様ヘルペスウイルス、D型レトロウイルス、サル出血熱ウイルス等があります。

動物実験を管理するにはこれまでに述べた種々の情報を理解した上で、動物実験を安全に行うためのマニュアルを作成し徹底することが必要だと思えます。

第 5 0 回 研 究 会

ハンタウイルス感染症と動物実験：

腎症候性出血熱をめぐる最近の話題

新しいハンタウイルス感染症の病理

倉田 毅（国立予防衛生研究所感染病理部）

腎症候性出血熱（HFRS）は、10世紀の古くから知られるアジアー帯から欧州にかけて分布するハンタウイルスによる腎疾患である。1993年春突如米国西南部にウイルス病が出現した。ウイルスはブニヤウイルス科ハンタウイルス属のメンバーで肺を侵し、前者とは比較にならない速度で死への転機をとる。媒介動物は小さな *Peromyscus maniculatus*（シカシロアシネズミ）である。1980年代前半HFRSの研究が強力に進められる中で、このネズミでもHFRSウイルスと関連する（交差する）抗体が検出されていたが、ウイルスは分離されなかった。最初の分離は Four Corners 地域（アリゾナ、ニューメキシコ、ユタ、コロラド）のヒト及びネズミからで、ウイルス名にもこの名が使われたが、その後米国全域に分布することがわかり、Muerto Canyon（死の谷）、次いで Sin Nombre（名なし）と変わった。1996年1月迄に米24州で127名の患者が発生し、65%が急性呼吸不全で死亡している。感染経路はHFRSと同じく①手足の傷とネズミの尿、唾液の接触、②ネズミに咬まれる、③ウイルス汚染のある埃を吸い込む等により、HPSは③が最も多い。

この疾患は現在米国のみにもみられている。年齢層は13～64歳、女性が60%を占める。発熱と筋肉痛が100%にみられ、咳、呼吸困難、頭痛、消化器症状が70%以上にみられる。頻呼吸、頻心拍、血圧低下等がみられる。熱に続く呼吸困難、酸素不飽和状態が特徴的である。入院48時間以内の死もよくみられる。極めて迅速に進行する肺浮腫（水腫）が原因である。

HFRSの特徴的病理像は、脳下垂体前葉、腎間質、副腎、右心耳内膜等の出血壊死で、更に脳、肝臓にも及ぶ。組織小血管、毛細血管の拡張、うっ血、多発性小出血が著しい。腎は腫大、間質は浮腫状で髄質部のうっ血は必発である。HPSでは、浮腫、時に巣状のヒアリン膜を伴う間質性肺炎像を示す。ウイルス抗原は肺小血管、毛細血管の内皮細胞にみられている。更に樹状突起細胞、マクロファージ等に検出された。HE所見では、HFRSにみられる激しい出血等はみられない。HFRSウイルス感染マウス、ラットでは、全身諸臓器の毛細血管内皮細胞に広汎にウイルス抗原が検出される。シカシロアシネズミでは毛細血管の断裂、出血、肺胞隔の浮腫もみられないが、ウイルス抗原は、肺、肝、脾、腎の毛細血管内皮細胞にみられる。

動物ではウイルス抗原の分布に大きな差がないのに、ヒトでは主標的が何故腎（HFRS）と肺（HPS）で異なるのかは今後の重要な課題である。

1992 年 11 月の検疫時に、搬入を希望されていた近交系ラットからハンタウイルス抗体が検出された。その後の調査から、当医学部の複数のラットコロニーに抗体保持ラットが含まれていることが明らかになった。ラットを用いる研究従事者等の調査では、ハンタウイルス抗体保持者が見いだされたが、発症者はなかった。抗体陽性コロニーには、高い抗体価をもつラットが高率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。前者にあつては、直ちにコロニーを閉鎖して、すべての飼育ラットを安楽死後に焼却して、飼育室の消毒、廃棄または更新を行った。後者については、隔離した後に再検査を繰り返した。その結果、高い抗体価をもつラットが検出された場合には、前者と同様に処置した。残りの実験コロニーについては、実験終了時に室内の消毒などを行った。また、系統維持コロニーのラットについては、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収容した。その後、抗体陰性ラットをもとにして子宮切断術による無菌動物化を順次行い、最終的に SPF 動物にした。1996 年 6 月において、必要な 11 系統すべての SPF 化を終えた。ハンタウイルスの侵入経路については、個々のコロニーについて検討したが、明瞭な答えは得られなかった（詳細は、下記資料を参照）。

動物実験施設のラット飼育実験室を再利用するにあたって、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。搬入動物については、SPF ラットで、かつハンタウイルスの抗体検査が定期的実施されているものに限定した。また、ハンタウイルスに対する自家検査体制を整え、3 カ月毎の定期抗体検査を実施してきた。再開した動物実験施設において、これまでハンタウイルス抗体陽性ラットは検出されていない。

<資料>

1. 芹川忠夫、山田淳三：京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
2. 芹川忠夫：腎症候性出血熱（HFRS）、最近の話題「ウイルス抗体陽性事例」、アニテクス、5（6）：294－298, 1993
3. 芹川忠夫：HFRS 抗体陽性ラットの摘発事例、関西実験動物研究会報 15：1-3, 1995

実験的低抗体価ラットとその感染性

堂前 嘉代子（大阪大学微生物病研究所）

腎症候性出血熱(HFRS)は、主として野性ゲッシ動物から人への感染発症に至るハンタウイルスによる人獣共通感染症である。過去におけるわが国の動物実験関係者に見られた HFRS 患者発生は、汚染ラットに因るものであることが明らかになっている。また、1990 年代になって再び実験室内ラットに低値ながらハンタウイルスに対する抗体が検出されたが、これらのラットの感染性、抗体価の意義を明らかにすることは重要である。

しかし、通常感染母獣から新生仔への垂直感染は起こらない。そこで、水平感染について検討した。

その結果、以下の事柄が明らかになった。

- A. 様々な実験条件下で正常野生型ラット間では
同一ケージ内飼育による水平感染は成立しなかった。
- B. 免疫不全条件下では容易に水平感染が成立した。
 - 1. 免疫不全ラットは感染に対する感受性が高い。
 - 2. 感染した免疫不全ヌードラットは多量のウイルスを排出する。

更に、実験的に作出した様々な抗体価を保有するラットのヌードラットに対する感染性については

- C. 抗体価が消失するか、少なくとも終始低抗体価（128 倍以下）に留まっていたラットの感染性は認められなかった。
- D. 低抗体価乃至中等度の抗体価を示したグループはたとえ一時的には低抗体価であっても全て感染性を示した。
- E. さらに、高い抗体価を維持したグループは感染性が強く、早い時期にヌードラットに感染が成立した。

PCR法によるハンタウイルスRNAの検出

大阪大学微生物病研究所ウイルス免疫 伊勢川裕二

腎症候性出血熱（HFRS）は高熱、出血傾向及び腎障害を主徴とし、ラット等のゲッ歯類を媒介として感染するウイルス疾患である。現在世界中に蔓延し、多くの公衆衛生上の問題を提起する一方で、わが国におけるHFRSの発生のように、動物実験施設の職員及び研究者の安全性に関与した問題となっている。

これまで高抗体価ラットにおける個体内でのウイルスの存在は数多く報告されてきたが、低抗体価ラットの個体内のウイルスの存在やその感染経路に関してはほとんど知られていない。そこで、低抗体価ラットの個体内でのウイルスの有無を明らかにすることを目的とした。本報告においては、まず、RT-PCR法を用いた高感度の遺伝子診断法の確立を行い、次に、モデルハンタウイルス感染ラットを作成し、その個体内でのウイルスRNAの推移について検討した。さらに、動物実験施設内の低抗体価ラットでのウイルスRNAの検出へも応用した。

これまで報告されているハンタウイルス8種類のgenotypesの内、日本もしくは日本近郊で流行しているSeoul型とHantaan型の2種類に対して高感度で検出する系を確立した。ハンタウイルスのゲノムはnegative strandの1本鎖RNAの3 segments (L, M, S segments) から構成されている。この内、最も研究されており、ウイルスの膜蛋白で、ウイルスの感染に関与している糖蛋白 (G1, G2) をコードしているM segmentを用いてprimerの設計を行った。Primerの部位は最も保存性の高いG2蛋白のC末近くに4つ設計し、nested PCRが行えるようにした。1本のチューブでRT反応と1st PCRを行い、その1 μ lを用いて2nd PCRを行う反応条件を決定した。この方法を用いたとき、1st PCRで 10^2 pfu、2nd PCRで 10^{-1} pfu相当のウイルスRNAまで検出できた。RNAの抽出法としてはGTC超遠心法を採用したが、この方法では臓器の抽出物によるRT-PCRに対する影響は認められなかった。そこで次に、ハンタウイルスのラットへの感染実験を行い、個体内でのウイルスRNAの推移について検討した。 10^3 pfuのウイルスを6週令ラットに感染させた内、2匹は感染が成立し、感染後1週から1ヵ月は血液中からウイルスRNAが検出できた。一方、感染の成立しなかったラットにおいては感染後1週目には血液中からウイルスRNAは検出できたが、それ以降は検出されず、抗体価の上昇も認められなかった。新生ラットの場合とは異なり、8週令ラットの場合、感染後1ヵ月以内ならば、血液中からウイルスRNAは検出できるが、感染後4ヵ月を過ぎると高抗体価のものも低抗体価のものもいずれも血液中からは検出できなくなった。8週令ラットに感染後、1.5ヵ月のラット個体内のウイルス分布は肺と腎臓に認められ、血液、脳、心臓、脾臓には認められなかった。しかし、感染後4ヵ月を過ぎるといずれの組織からも検出できなくなった。この方法では約 10^5 細胞相当のRNAからウイルスRNAを検出していることとなり、上記の結果はウイルスRNA量が検出感度以下になったためと考えられる。この方法を用いて実験動物施設内の低抗体価ラットの臓器中にはウイルスRNAは検出できなかった。

ハンタウイルス感染の血清診断法の現状

有川二郎 （北海道大学医学部附属動物実験施設）

ハンタウイルス感染症には腎症候性出血熱(HFRS)とハンタウイルス肺症候群(HPS)が含まれ、いずれもげっ歯類によって媒介される人獣共通感染症（ズーノーシス）である。患者発生や感染げっ歯類の分布はほぼ全世界的に報告されている。わが国ではソウル型のハンタウイルスに感染した実験用ラットを原因とする実験室型の流行が中心である。近年、患者の発生は報告されていないが、わが国の主な港湾地域に生息するドブネズミの多くに感染例が存在し、また、北海道のヤチネズミを中心に北欧諸国での腎症候性出血熱の原因ウイルス（プーマラ型）に近縁のウイルスが存在していることが明らかになった。すなわち、野生げっ歯類に関してみればわが国もハンタウイルスの流行国といえる。この意味で、実験動物施設への本ウイルスの侵入に常に注意を払う必要がある。

本症の伝播は、持続感染したげっ歯類の糞尿や唾液中に排泄されるウイルスによる飛沫感染が中心である。人から人への感染伝播は成立しないため、感染動物の「摘発・淘汰」が本症のコントロールに最も有効で、そのための血清診断、特に抗体検出が重要である。

本症の血清診断にはこれまでハンタウイルス感染培養細胞（Vero細胞）のスメアをスライドグラス上に固定したものを抗原とする間接蛍光抗体法(IFA)が広く用いられてきた。しかし、IFAでは蛍光像を肉眼判定するために判定に熟練を要し、また、強い非特異蛍光や判定しづらいパターンを示す例を避けることが出来なかった。さらに、本ウイルスでは、陽性ラット等が確認された場合には多数の関連ラットが殺処分され、また実験・飼育業務従事者の安全確保等にも大きく影響する。このため、特に、陽性限界ぎりぎりの低抗体価保有例や強い非特異蛍光像を示す判定不能例を対象とした確定診断法の確立が望まれていた。

本日は、IFAによる血清診断の問題点を事例を交えて紹介し、次いで、確定診断法として我々が開発したWestern blotting 法の有用性を示したい。そして、最後に、各施設でのルーチンの血清モニタリングへの応用を目的としたELISAの開発状況を紹介したい。

まとめ

山西 弘一（大阪大学医学部、大阪大学微生物病研究所）

1930年代に主として極東やスカンジナビア半島で見出された流行性出血熱（後に腎症候性出血熱＝HFRSと総称された）は我が国では1960年代に大阪の市民の間で患者が見出されたが、1970年代よりは主として動物実験施設での感染例が見受けられた。それもラットよりの感染であり感染源となりうるラットは殺処分等の対策が採られてきた。これらの感染はハンタウイルスの感染によるもので、ラットを含む齧歯類はこのウイルスに感染をしても症状を出さず持続感染をする。そこで持続感染をしているラットを取り扱って実験を行うと感染することになる。そこで実験動物がこのウイルスに感染をしているか否かを抗体検査や遺伝子の検出でしらべることが出来れば感染の機会を無くすることが出来る。

以前より抗体価の高い動物よりウイルスが分離されることより高抗体を保有するラットは感染源となることが知られていたが、いわゆる低抗体保有ラットは感染源となるかは重要な問題である。特に担癌ラットや疾患モデルラットが低抗体を保有しているとその問題が更に重要となってきた。

現在まで一般的に検査法として蛍光抗体法が用いられてきたが、更に持続感染を反映する抗体法の検討、ラット体内でのウイルスそのものを高感度に検出する手だてとしてのPCR法による遺伝子の検出、又重度免疫不全ラットを用いての実験室内感染実験が試みられた。北大の有川先生らのELISA, Western blot法による抗体検出の検討は蛍光抗体法に比し経験の少ない人でも行える利点はあるが、一点だけの検査では未だ完全に持続感染ラットを検出は出来ない。伊勢川先生らのPCR法による遺伝子の検出は感度は高いが臓器に少量のウイルスが感染している場合には感度以下になる欠点がある。その点ヌードラットを用いた検出法は実際にラットに感染を行わせていることと極少量のウイルスでも感染しうる系であるので感度は高い。現在の所、堂前、西宗先生の研究成果より、例え低抗体価保有ラットでも完全には感染源とならない保証はないが、経時的に抗体の変動を観察することでその危険性は回避できるものと思われる。

故 山 田 淳 三 先 生

を

偲 ん で



山田淳三 博士 (1929 ~ 1996)
京都大学名誉教授
関西実験動物研究会名誉会員
関西実験動物研究会初代会長

山田淳三先生が始められたラット研究の展開

芹川忠夫（京都大学医学部附属動物実験施設）

京都大学名誉教授であり、また関西実験動物研究会の初代会長であった山田淳三先生は、大腸癌手術後の多臓器不全により平成8年8月17日午前6時5分ご逝去された。享年67歳。先生は、東京大学大学院生物系畜産学専攻博士課程を修了後、科学技術庁放射線医学総合研究所を経て、昭和48年2月に京都大学助教授に転任、医学部附属動物実験施設の専任教官として、実験動物に関する教育・研究並びに動物実験施設の運営にあたられた。その後、昭和61年4月に教授に昇任、昭和62年4月からは附属動物実験施設長を併任、平成5年3月に停年退官され、京都大学名誉教授の称号を受けられた。この間、（社）日本実験動物学会においては、理事、評議員、専門委員会委員、及び第37回日本実験動物学会総会（京都）の会長、日本疾患モデル学会においては、幹事、評議員、及び第8回日本疾患モデル動物研究会総会（京都）の当番幹事、（社）日本実験動物協会においては、実験動物技術者のための通信教育及び認定事業の中心的役割を担われ、また亡くなられる前には同協会の副会長として実験動物分野の発展に大きく貢献された。

先生は、京都大学に着任されるや実験動物に関する公開セミナーを開始され、そのセミナーを核にして実験動物集談会を作られた。その後、実験動物に関心のある多くの人達が固定して集まるようになり、昭和59年3月に関西実験動物研究会を創設され、その後は自ら牽引者となって献身的に本会の発展に寄与された。

23年間もの長い間、先生とほとんど一緒に暮らしてきたような私であるが故か、山田先生の思い出を文章に綴ることはなかなかできない。そこで、これについては、他の方におゆずりして、山田先生が本研究会の第37回研究会において、「ラットにおける生化学的遺伝子座の開発から染色体地図まで」と題してご自分の研究の道のりを紹介され、関西実験動物研究会会報第14号（平成6年7月）にその内容を記述されているので、私はその後の研究の展開をここに紹介して、山田先生のご冥福をお祈りしたい。

ラット遺伝子連鎖地図の構築研究と比較遺伝子地図を利用した ラットミュータントのポジショナルクローニング法

1. はじめに

ヒトやマウスに較べて詳細なゲノム情報のない動物種において、興味のある表現型に関わる遺伝子をポジショナルクローニング、あるいはポジショナル候補遺伝子アプローチで同定することは、極めて困難な仕事である。我々は山田先生を中心にして、実験用ラット (*Rattus norvegicus*) を対象にしてこの難関に挑んできた。

古くから実験用のマウスやラットにおいて、ヒトの病態に類似したミュータントやモデル動物が育種・開発されてきた。これらの疾患モデル動物は新薬のスクリーニングや病態発生機構の解析研究に利用され、ヒトの病気の治療法や予防法の開発に貢献してきた。最近、分子遺伝学的手法の進歩により、いくつかのミュータントマウスの原因遺伝子がポジショナルクローニングによって明らかにされ、ミュータントの価値が再評価されるようになった。興味のあるミュータント遺伝子をこの方法でクローニングするためには、そのミュータント遺伝子を遺伝子連鎖地図上に高い精度でマッピングすることが必須である。マウスにおいては、有用な遺伝多型マーカーであるマイクロサテライトマーカーが6,000 個以上も準備されており、これに基づいた詳細な遺伝子連鎖地図が完成している。また、大きなゲノム断片を含むマウスの YAC ライブラリーや BAC ライブラリー等が複数のグループで開発され、これらを利用できる状況にある。それゆえ、単一遺伝子変異に起因するマウスのミュータントについてのポジショナルクローニングを成功させる研究環境は、ほぼ整備され、この分野の研究が活発に展開されている。

一方、ラットにおけるポジショナルクローニングは、マウスにおけるその状況には至っていない。ラットは、行動観察が容易なこと、学習能力が高いこと、病態の変化が急激でないことなどの特性が挙げられ、高血圧、糖尿病、発癌、神経疾患、老化といった多因子疾患の病態発生における遺伝的要因および環境要因を明らかにするには大変に有利であり、マウスでは困難な研究が行える素地がある。実際に、高血圧、糖尿病、てんかん等の自然発症モデルがラットに

において開発されており、これらの遺伝学的コントロールがなされた疾患モデルラットを使用して、厳格に設定した環境下で遺伝学的解析研究を行うことができる。それゆえ、ヒトにおける特に大きな研究課題である上記の多因子疾患の病態発生機構をこの実験系で解明することが可能であると期待される。このようなことから、我々の研究グループは世界に先駆けてラットの遺伝子連鎖地図とラット・マウス・ヒト間の比較遺伝子地図を作成する研究を行ってきた。また、遺伝性の海綿状脳症ラット (zitter rat) とてんかん小発作を自然発症するラット (tremor rat) から自然発症てんかんラット (Spontaneously Epileptic Rat, SER) を作出して、その病因遺伝子をポジショナルクローニングの手法を用いて同定する研究を併行して行ってきた。

2. ラット遺伝子連鎖地図の構築と遺伝多型マーカーの開発に関する研究

1980年代末期のラット遺伝子連鎖地図は、毛色遺伝子、免疫学的遺伝子、生化学遺伝子の遺伝的多型および突然変異形質をもとにしたもので、ほとんどが染色体番号が知られておらず、単に連鎖群 (連鎖群) として報告されていたのみであった (Hedrich, 1990)。1992年にフランスとドイツの研究グループとの国際共同研究で我々は世界で最初の染色体番号を示した遺伝子連鎖地図を発表した (Serikawa et al., 1992)。この報告と共に我々の研究グループは、多因子疾患の一つのモデルである脳卒中易発症ラット (SHRSP) における複数の高血圧発症原因遺伝子のマッピング成績を発表した (Hilbert et al., 1991)。これらを契機にして、ラットにおける遺伝解析研究が大きく展開することになった。これらの研究成果は、ラットにおいて初めてマイクロサテライトマーカーを系統的に開発することにより達成し得た。この新たなマーカーの開発が成功した最大の要因として、我々の研究室で複数の近交系ラット間の戻し交配セットとラット染色体を同定するためのラット x マウス体細胞交雑クローンパネル (Yasue et al., 1991) が既に作成されていたことが挙げられる。

ラット遺伝子連鎖地図を構築・拡充する研究領域における次の研究課題は、1) ラット遺伝多型マーカーの絶対数を増やすこと、2) 遺伝子連鎖地図の染色体上での方向性を決定すること、あるいはその遺伝子連鎖地図が染色体のどの領域を占めているかを明らかにすることであった。

マイクロサテライトマーカの開発については、その方法論が確立している。すなわち、AC モチーフの繰り返し配列を含むラットゲノムクローンをスクリーニングして、その塩基配列を決定することにより PCR 用のプライマーセットが作成される。あるいは、GenBank あるいは EMBL の遺伝子データベースに登録されている遺伝子等の中で、塩基配列の中に 2～4 塩基対のコア配列が 10 回以上連なっているマイクロサテライト領域をもつものを選び出し、その情報に基づいて PCR 用のプライマーセットが作成される。これらの方法で準備したプライマーを用いて、近交系ラットのゲノム DNA をテンプレートにして PCR が行われ、PCR 産物にゲル電気泳動上で識別できるサイズ多型があるかどうか調べられる。さらに、ラット x マウス体細胞交雑クローンパネルや近交系ラット間の戻し交雑セットを用いて、これらの DNA fragment の染色体同定あるいは連鎖地図へのマッピングがなされる。以上のようにして、ラットにおいてもマウスと同程度の 6,000 セットのプライマーを開発することは全く不可能ではなく、米国においては、約 10,000 個のマーカを開発する研究プロジェクトが進められている (Jacob et al., 1995)。

一方、RAPD (Random Amplified Polymorphic DNA) マーカは、元々は 10 mer のオリゴヌクレオチドを 1 種用いて、低いアニーリング条件下で Anonymous DNA マーカを開発する方法であり、多くの生物種において利用され、ラットにおいても応用された (Serikawa et al., 1992)。また、マイクロサテライト用に準備した PCR プライマーセットの片方を用いて、同様の arbitrarily primed PCR を行い Anonymous DNA マーカを開発することも可能であった (Kuramoto et al., 1995)。RAPD マーカについては、その特異性に問題点があるので、再現性の高いもののみを厳格に選ぶことが必要である。このマーカは、その開発経費が少なくすむことやゲノムのシークエンス情報が不要であること等の利点はあるが、PCR 産物の有無による多型であり、ポリアレルのマイクロサテライトマーカに比較してその遺伝多型マーカとしての価値はマイクロサテライトマーカに較べて低い。

マッピングされている遺伝多型マーカが少ない場合には、興味のある遺伝子が存在していると推定された特定の染色体領域について独自に遺伝多型マーカを開発する必要性が出てくる。その場合の有効な方法として、分離世代に

において興味があるゲノム領域に関して異なる2つの群分けを行い、両者のゲノム間の差をもとにして、その領域から効率的にマーカーを開発するRDA (Representational Difference Analysis) 法が挙げられる。ラットにおいても、RDA 法を応用して多くの多型マーカーの開発され、このマーカーについて多数のサンプルを容易にタイピングできる方法が報告された (Toyota et al., 1996)。

ラットとマウスのように遺伝的に近縁な動物種の関係においては一方のためにデザインされたプライマーのいくつかは他方に応用可能と推測される。我々は、マウスのマイクロサテライトプライマーセットの約 12% (20/166 セット) がラットゲノムをテンプレートにしても特異的なラットDNA fragment を増幅することを実験的に示し、これらのプライマーはそのままラットの遺伝マーカーのツールとして利用できることを報告した (Kondo et al., 1993)。最近、新たに 815 セットのマイクロサテライトプライマーについて、追加検討を行ったところ 122 セット (15%) が特異的な ラット DNA fragment を増幅した。そして、39 セット (4.8%) は、調べた 8 系統の近交系においてサイズ多型が認められ、そのうちの 20 セットによって得られた新たな遺伝多型マーカーを連鎖地図上にマッピングすることができた。さらに、興味あることは、そのマウスマーカーの連鎖地図上の位置とラットマーカーの連鎖地図上の位置は、以前にシンテニーが認められていたことである。すなわち、このマイクロサテライトはラットとマウスの共通の祖先から保存されており、ラットとマウスの相同ゲノム領域を繋ぐマーカーとしても利用できることである。

染色体上の物理的位置と連鎖地図上の位置が共に明らかにされた遺伝マーカーの開発は、遺伝子連鎖地図と染色体上の物理的位置を繋ぐアンカーとして価値が高い。このアンカー遺伝子は、コスミドのラットゲノムライブラリーを材料にして系統的に開発した。すなわち、コスミドで構築したラットゲノムライブラリーの個々のクローンを *EcoRI* で消化した後に電気泳動して、(AC)₁₅ プロブを用いた Southern hybridization を行い、500 bp 以下の短い DNA 断片に AC モチーフ の繰り返し配列をもつクローンを選択した。このコスミドクローンをプロブに用いて蛍光 in situ hybridization (FISH) を行い、染色体上の物理的位置を同定した。次に、染色体上にマッピングされたコスミドクローンから全染色体に分散しているクローンを選び出し、AC モチーフ のマイクロサテラ

イトマーカーを開発して連鎖地図上にもマッピングした (Kuramoto et al., 1993)。これらの方法によって、すべての染色体の遺伝子連鎖地図の方向性を決定することができるようになった。

マウスにおいては遺伝的に離れた野生マウス系統が開発され、これらが精度の高い連鎖地図を構築する上で大きな威力を発揮している。ラットにおいては、大野らによってわが国の野生ラットから近交系ラットが開発されている。この系統とある近交系ラットの間には、遺伝マーカーにおいて極めて高い多型率があったが、どの実験用ラット系統に対しても遺伝的に極端に離れている理想的な系統ではなかった (Kondo et al., 1996)。この点については、世界中で維持されている代表的な、あるいは由来が特に異なる多くの近交系ラットに関する詳細なゲノムプロファイルを作成するプロジェクトが始まっているので、近い将来にはこの情報をもとにして効果的な交配組み合わせを選ぶことができるようになると思われる。また、詳細な遺伝子連鎖地図を構築するためには、ヒト (Gyapay et al., 1996) やマウス (Schmitt et al., 1996) において報告されているような Radiation Hybrid パネルをラットにおいても開発することが検討されよう。

3. ラット・マウス・ヒト比較遺伝子地図の構築研究

ラットに較べて、ヒトやマウスのゲノムプロジェクトが非常に進んでいるので、ラットとマウスおよびラットとヒト間の詳細な比較遺伝子地図を構築することは大変価値が高い。相同遺伝子や相同 DNA 断片の高密度比較地図があれば、興味のあるラットのゲノム領域からヒトあるいはマウスの相同ゲノム領域にシフトして解析することが容易となる。そうすれば、ヒトやマウスで集積されている多量の情報をラットでの研究に取り込み、さらにこれを進展させることができる。マウスとヒト間の比較遺伝子地図については、詳細なデータベースが作られている (Debry & Seldin, 1996)。我々は、1994 年にマウスの連鎖地図上にラット相同遺伝子の所属染色体を記したラットとマウスの比較遺伝子地図、及びヒトの染色体上にラット相同遺伝子の所属染色体を記したラットとヒトの比較遺伝子地図をまとめて発表した (Yamada et al., 1994)。次いで、我々はマウスの遺伝子連鎖地図を中心にして、マウス・ラット・ヒトの 3 つの動物

種について同時に検索できる比較遺伝子地図を新たに作成している。この比較遺伝子地図により、ラットにおいて未拡充のゲノム領域の存在が明らかになった。今後、これらを充足していくためには、対応するマウスのゲノム領域にある遺伝子をもとにして、その相同遺伝子のマッピングを追加していくことが必要である。

4. ラットミュータントにおける原因遺伝子のポジショナルクローニング法
ラットにおいてのポジショナルクローニングの第1段階は、数 cM~10 cMの距離に興味のある表現型を規定している遺伝子をマッピングすることである。これは、通常、既存の遺伝多型マーカーで可能であろう。第2段階では、解析する交雑仔とマーカーを増加させて1 cM未満のマッピングをする。この段階では、興味あるゲノム領域において独自に遺伝多型マーカーを開発する必要がある。第3段階において、未知の遺伝子を探ることになれば、ラットからマウスにゲノムレベルでシフトすることがよからう。それは、ラットにおいては YAC や BAC ゲノムライブラリーが未だ開発されていないことや EST (Expressed Sequence Tags) の情報量が少ないからである。まず相同ゲノム領域について、マウスの YAC や BAC でコンティグを作ることにより詳細な物理地図を作成する。続いて、特定されたマウスゲノム領域に存在する転写領域をダイレクトスクリーニング法や、ハイブリッドセレクション法、エクソントラップ法等を用いて決定する。マウス EST の塩基配列が数多く集積されつつあることから、ゲノムシーケンスにより転写領域を決定することも可能であろう。以上のようにして、マウスにおいて候補遺伝子が単離されれば、再びラットを対象とした解析に戻ることになる。すなわち、この候補遺伝子が真の原因遺伝子であることを証明するために、ラットにおける相同 cDNA の解析およびこれを用いたゲノム解析を行うわけである。

しかし、ヒトやマウスにおいて、急速に遺伝子マッピングや EST マッピングが進んでいることから、上に述べた過程の純然たるポジショナルクローニングに達する前に、ポジショナル候補遺伝子アプローチの段階で求める遺伝子を見いだすことができるようになって期待される。従って、ポジショナルクローニングを実施する場合には、いずれの段階においても、そのマッピング領域に既

に報告されている候補遺伝子が存在しないかどうかを注視することが重要である。それがラットにおいて見いだされていない場合には、ヒトやマウスの相同ゲノム領域に候補遺伝子あるいは遺伝子不特定のcDNA クローンが報告されていないかどうかを調べることが必要である。

5. 自然発症モデルラットの病態発症関連遺伝子のクローニング

次に、ラットゲノムに関する基盤研究の推進と併行して、山田先生と共に独自に開発した海綿状脳症を伴うてんかんモデルラット SER (Spontaneously Epileptic Rats) における2つのミュータント遺伝子のポジショナルクローニング研究の進行状況を紹介する。

自然発症てんかんラット SER は、1986年に振戦と海綿状脳症をもつ2種のミュータントラット (zitter rat と tremor rat) を交配することによって開発したもので、2つの突然変異遺伝子をホモにもつダブルミュータントである。この SER は、欠神様発作と強直性けいれんを自発的に高頻度に発症する。慢性記録電極を用いた大脳皮質と海馬の自発脳波の検査では、その欠神様発作時には5～7 Hz の棘徐波結合の群発放電が、またその強直性けいれん時には、低振幅速波が、それぞれの行動異常に一致して両部位から現れることが明かにされている。また、既存の抗てんかん薬の単回投与による発作抑制実験の結果から、SER の強直性けいれんはヒトの大発作に相当し、SER の欠神様発作はヒトの小発作に相当すると考えられ、SER は新規に開発されたヒトの抗てんかん薬の評価試験に極めて有用なモデル動物であるとされている。

すでに、2つの突然変異遺伝子のうち、zitter rat に由来する zi 遺伝子はラット第3染色体に、tremor rat に由来する tm 遺伝子はラット第10染色体に位置していることを明らかにしているので、これらのクローニングを目標にして詳細なマッピング研究をさらに行うことが当面の課題であった。zitter rat については、戻し交配仔数の増加とコンジェニック系統の作成を通して、詳細なマッピングが行われた。また、tm 遺伝子については、そのホモ個体が両性共に不妊であるので、ヘテロ動物を用いた戻し交配から生まれたミュータントホモの個体のみを連鎖解析に用いた。その結果、zi 遺伝子は prion protein (Prnp) 遺伝子と、tm 遺伝子は synaptobrevin-2 (Syb2) 遺伝子とそれぞれ近接して位置して

いることが明らかになり、これらの DNA プローブを用いて、ラット第 3 染色体 3q35 と第 10 染色体 10q24 にそれぞれが位置していることが明らかになった (Kuramoto et al., 1994)。zi 遺伝子と tm 遺伝子の候補として Prnp 遺伝子と Syb2 遺伝子が、それぞれとりあげられた。しかし、Prnp 遺伝子については戻し交雑仔数を増加して解析した結果、zi 遺伝子とは極めて近くに位置しているが異なる遺伝子であると推察された。また、Syb2 遺伝子については、その発現量と塩基配列が共に tremor mutant と正常個体に差異がみられなかった。

次のステップとして、tm 遺伝子と zi 遺伝子の位置に相当するマウスゲノム領域を比較遺伝子地図から推定したところ、それぞれマウス第 2 染色体のセントロメアから 74 cM の位置とマウス第 11 染色体の 37 cM の位置に相当することが判明した。そこで、この領域を含むマウスの YAC と BAC クローンによるコンティグを作成している。その結果、tremor ミュータントラットに変異がある tm 遺伝子の候補遺伝子を見つけることができた。現在、その遺伝子変異の実態と原因遺伝子であることを確かめる実験を行っている。

6. おわりに

山田先生が日本のウイスターラットの遺伝的プロファイルを明らかにすることから始められた研究は、その後ラットの遺伝学的基盤を整備する研究へと展開してラットが持つ実験動物としてのポテンシャルを大いに高めるものとなった。2,000 年を過ぎるとヒトゲノムの全塩基配列が読みとられるという。その遺伝子の機能を明らかにするためには、動物のモデルが求められるであろう。その際、マウスとひと味違ったラットはマウスでは解析困難な研究分野において遺伝子ベースの貴重な実験系を提供するものとして、大いに活用されるものと期待される。

心残りのことはたくさん浮かんでくるが、京都大学のウイスターコロニーにおいて発見された tremor ラットの遺伝子変異を山田先生のご存命中に明らかにしてお見せすることができなかったことは、至極残念に思っている。

本研究を始め、多岐に亘ってご指導頂いた山田淳三先生に心からの感謝を申し上げ稿を終える。

文献

1. H. J. Hedrich: Linkage map. pp 405-409, *In Genetic monitoring of inbred strains of rats*. Gustav Fischer Verlag, 1990
2. T. Serikawa, T. Kuramoto, P. Hilbert, M. Mori, J. Yamada, C. J. Dubay, K. Lindpainter, D. Ganten, J. L. Guénet, G. M. Lathrop, and J. S. Beckmann: Rat gene mapping using PCR-analyzed microsatellites. *Genetics* 131, 701-721, 1992
3. P. Hilbert, K. Lindpainter, J. S. Beckmann, T. Serikawa, F. Soubrier, C. Dubay, P. Cartwright, B. De Gouyon, C. Julier, S. Takahashi, M. Vincent, D. Georges, and G. M. Lathrop: Chromosomal mapping of two genetic loci associated with blood-pressure regulation in hereditary hypertensive rats. *Nature* 353, 521-529, 1991
4. M. Yasue, T. Serikawa, and J. Yamada: Chromosomal assignments of 23 biochemical loci of the rat by using rat x mouse somatic cell hybrids. *Cytogenetics and Cell Genetics* 57, 142-148, 1991
5. H. J. Jacob, D. M. Brown, R. K. Bunker, M. J. Daly, V. J. Dzau, A. Goddman, G. Koike, V. Kren, T. Kurtz, Å. Lernmark, G. Levan, Y. Mao, A. Pettersson, M. Pravenec, J. S. Simon, C. Szpirer, J. Szpirer, M. R. Trollet, E. S. Winer, and E. S. Lander: A genetic linkage map of the laboratory rat, *Rattus norvegicus*. *Nature Genetics* 9, 63-69, 1995
6. T. Serikawa, X. Montagutelli, D. S. Chazottes, and J. L. Guénet: Polymorphisms revealed by PCR with single, short-sized, arbitrary primers are reliable markers for mouse and rat gene mapping. *Mammalian Genome* 3, 65-72, 1992
7. T. Kuramoto, T. Mashimo, and T. Serikawa: Fourteen anonymous DNA markers of laboratory rats identified with arbitrarily primed polymerase chain reaction (AP-PCR). *Experimental Animals* 44, 119-125, 1995
8. M. Toyota, F. Canzian, T. Ushijima, Y. Hosoya, T. Kuramoto, T. Serikawa, K. Imai, T. Sugimura, M. Nagao: A rat genetic map constructed by representational difference analysis markers with suitability for large-scale typing. *Proceedings of National Academic Science, USA* 93, 3914-3919, 1996
9. Y. Kondo, M. Mori, T. Kuramoto, J. Yamada, J. S. Beckmann, D.

- Simon-Chazottes, X. Montagutelli, J.-L. Guénet, and T. Serikawa: DNA segments mapped by reciprocal use of microsatellite primers between mouse and rat. *Mammalian Genome* 4, 571-576, 1993
10. T. Kuramoto, M. Mori, N. Hirayama, S. Saburi, J. Yamada, and T. Serikawa: A strategy for rapid construction of genetic and physical maps in the rat. *Acta Histochemica et Cytochemica* 26, 325-332, 1993
 11. Y. Kondo, K. Ohno, S. Oda, and T. Serikawa: Genetic profile of three inbred strains derived from wild rats (*Rattus norvegicus*) trapped in Japan. *Experimental Animals* (in press), 1996.
 12. G. Gyapay, K. Schmitt, C. Fizames, H. Jones, N. Vega-Czarny, D. Spillet, D. Muselet, J-F. Prud'Homme, C. Dip, C. Auffray, J. Moressette, J. Weissenbach, and P. N. Goodfellow: A radiation hybrid map of the human genome. *Human Molecular Genetics* 5, 339-346, 1996
 13. K. Schmitt, J. W. Foster, R. W. Feakes, C. Knights, M. E. Davis, D. J. Spillet, and P. N. Goodfellow: Construction of a mouse whole-genome radiation hybrid panel and application to MMU11. *Genomics* 34, 193-197, 1996
 14. R. W. DeBry and M. H. Seldin: Human/Mouse homology relationships. *Genomics* 33, 337-351, 1996
 15. J. Yamada, K. Kuramoto, and T. Serikawa: A rat genetic linkage map and comparative maps for mouse or human homologous rat genes. *Mammalian Genome* 5, 63-83, 1994
 16. T. Kuramoto, M. Mori, J. Yamada, and T. Serikawa: Tremor and zitter, causative mutant genes for epilepsy with spongiform encephalopathy in spontaneously epileptic rat (SER), are tightly linked to synaptobrevin-2 and prion protein genes, respectively. *Biochem and Biophysical Research Communications* 200, 1161-1168, 1994

山田淳三 名誉会員のご逝去を悼む

1996 年 11 月 15 日（金）

株式会社 新日本科学

宮 蔭宏彰

関西実験動物研究会名誉会員、京都大学名誉教授、東京大学農学博士、山田淳三先生は 1996 年 8 月 17 日、ちょうど五山の送り火の日の翌朝、多臓器疾患で逝去されました。享年 67 歳の若さでした。

先生は 1929 年 8 月 27 日、東京都のお生まれで、佐賀高等学校から東京大学農学部畜産学科にご入学になり、ご卒業後は直ちに大学院にご進学され、1960 年大学院修了と同時に東京大学農学博士の学位を取得されました。

先生が京都大学におみえになったには、1973 年のことで、医学部附属動物実験施設の助教授としてでした。

私が先生に初めてお会いしたのは、先生がまだ科学技術庁の放射線医学総合研究所の主任研究員であった頃で、先生の教室へお邪魔して、マウスやラットの毛色とその遺伝について、いろいろとご教授いただいたことをいまでも鮮明に記憶しております。その後、私は大阪の製薬会社に転職しましたが、その 1 年後に山田先生が京都大学に来られたのでした。

先生は故田嶋嘉雄東京大学名誉教授と故近藤恭司名古屋大学名誉教授を終生、心の師と仰いでおいででした。わが国の実験動物の世界で、両先生の時代ほど活力があり、求心力のあった時代はなかったといわれ、現在の実験動物界に危機感を持っておられました。そのような意識が先生をして世界的にも輝かしい業績として評価されている“ラットの標識遺伝子の開発と遺伝子マッピング”のお仕事に駆り立てたのだと思います。

また、先生は人材の育成にも、事のほか力を注いでおいででした。京都大学に来られて間もなく、定期的に“実験動物セミナー”を主催され、大学の先生のみならず、製薬会社の第一線で活躍している若い研究者を講師として招き、活気あふれるセミナーを開催しておいででした。やがて一回も途切れることなく続いた“実験動物セミナー”を発展的に解消し、1984 年、現在にまで続く“関西実験動物研究会”を組織されました。初めは 63 名の発起人で始まりました。先生は当初から年 4 回開催を主張して譲りませんでした。私共は年 4 回ではすぐに種切れになってしまう、と思ったのですが、常日頃から実験動物学ほど幅広く、奥深い学問はないとおっしゃっていた先生の達観は見事に当たりました。現在では、会員 300 名、研究会もすでに 52 回を数え、その間、一回も休んだことがありません。

1986年に先生は京都大学の教授に昇任されましたが、先生の実験動物学に対する情熱は一向に衰えるところがなく、ますます燃え盛っていきました。

実験動物界ではすでに定着した感のある資格認定制度にも、その初期から関係され、制度の設立から、今日の発展に至るまで、文字通り身を削る努力をされました。

先生は極めて強い意思を持っておられ、常に厳しい態度で事にあたられました。その反面、専門以外の分野にも広い見識をお持ちで、大きな包容力をもって、私共を包んでくれました。各界に多くの交友がおり、先生を人生のさまざまな立場から師と仰ぐ方々には枚挙にいとまがありません。

先生はまた有名な酒豪でもありました。しばしば痛飲して人生を語ることを好まれ、幅広い分野に興味をお持ちで、そのそれぞれを徹底的に追及されました。私は先生がお亡くなりになる1か月程前に先生からお便りをいただきました。今年の12月には先生ご夫妻と先生とは大学時代からの無二の親友である中山様ご夫妻の4人で鹿児島島の温泉にゆっくりとつかりに行く計画をしているという内容でした。伺いますと、いずれは先生は千葉で奥様とご一緒に、静かな読書三昧の生活をするご計画があって、そうなると鹿児島にはなかなか行きにくいというご配慮があったということでした。

先生の闘病生活は短く静かな日々でありました。しかし、心のなかではどれほど無念であったことでしょう。

また、東京大学時代から登山を好まれた先生は、その経験が人格形成に大きな影響を与え、厳しさと同時に忍耐強さを身に付けられたものと思います。先生の厳しい人生態度は最後の闘病生活にも良く示され、眠るようにお亡くなりになり、私共に多大の感銘を与えました。

実験動物の世界に身お置いてから25年以上に及ぶ長きにわたって、ご指導を戴いていた先生を、無情にも神は突然奪い去っていきました。まさに私共は放心状態にされたまま置き去りにされた思いであります。

しかし、先生の厳しさ、とくに、実験動物学における先生の情熱とその教えは、多くの若い実験動物学者の心のなかに、いつまでも伝わり続けるであります。

五山の送り火の日は私共にとってまた一つ、忘れ得ぬ日になりました。

先生のご冥福を心からお祈りいたします。

山田淳三先生を追悼する

関西実験動物研究会評議員

内海健二郎

バリア施設、SPFマウス・ラットがまだ珍しい1963（昭和37）年に私はこれらの研修のため、会社（大日本製薬株式会社）から実験動物中央研究所（実中研）および東京大学伝染病研究所（現医科学研究所，医科研）の実験動物繁殖施設に派遣されました。この研修期間中に医科研の奥木先生が千葉県船橋市にある放射線医学総合研究所の動物飼育施設見学を組み入れて下さいました。そこで山田先生と初めて出会いました。晩夏の暑い時期でした。半袖カッターシャツを着ておられました。バリアのバも知らない私に施設を見せ、いろいろ説明をして下さいました。

その後、何等の接触もなく10数年の年月が経過しました。その間、1973（昭和48）年2月に山田先生が京都大学医学部附属動物実験施設に専任助教授として転任されてこられました。そして、山田先生赴任5年後の1978（昭和53）年に実験動物技術者認定試験（現在の2級技術師認定試験）を京都大学でも実施されました。この時の試験官の1人に私を含めて下され、打ち合わせの場所（パークサイドホテル）で再会した次第です。（私はよく覚えていたのですが、山田先生は全く覚えておられませんでした。）ここから先生とのお付き合いが始まりました。

いまさら私が申し上げるまでもなく先生は、関西実験動物研究会の産みの親、育ての親です。

研究会の発足は1984（昭和59）年3月でありましたが、先生がそれより7年前に、京阪神には実験動物の仕事に従事している人の多いこと、その連絡網を持たないこと、をお知りになりその人達に呼びかけられ、実験動物の勉強会（実験動物セミナー）を作って下さいました。この会での先生はリーダー役は当然なされましたが、同時に参加メンバーの融和を作るため、会終了後にお酒の飲む場を作られました。この席では実験動物に関する情報交換の場となりメンバーにとっては掛け替えのない会になりました。会を重ねるごとにメンバーの隔たりがなくなり、次回を楽しみにする集いとなってきました。そこには先生のお人柄、偉ぶることなく、参加メンバーを同等扱いなされたからです。

この会は1980（昭和55）年3月に実験動物集談会へと脱皮し、メンバーも増加しましたが、実験動物セミナー時の環境は引き継がれてゆきました。そして、関西実験動物

研究会として発展してきた幸いです。山田先生は研究会開始前に来られ、入り口付近で出席者を迎えられ、講演が始まれば最前列の席にお着席され、熱心に聞き入れられ、適切な発言をされ、われわれを励まして下さいました。そのようなお姿を見た会員は少なくないでしょう。

山田先生との最後の会話は7月16日（火）の夕刻で「内海さん、##といっぱい飲みに行ってくるわ」でした。普段と変わらないお元気そのものでした。その3日後に入院、即手術をうけた由を耳にして、私は動転しました。その後、術後経過は思わしくなく、ご逝去された8月16日（金）まで意識の回復がなく、お話することができませんでした。

もう、先生とお話することはできなくなりました。しかし、先生の御遺志は、私共研究会会員一人一人の胸に深く刻み込まれていると信じます。

山田先生どうか安らかに眠り下さい。哀しみは例えようもなく、万感胸につきませんが、以て追悼の言葉にかえさせていただきます。

山田 淳三 先生 と の 思 い 出
－43RD AALAS ANNUAL MEETING と米国実験動物視察団に参加して－

武田薬品工業(株) 阿 部 敏 男

平成8年の8月17日は、私にとっても忘れられない日になった。この日の夕刻、山田先生がお亡くなりになったことを電話で知った。2カ月前の6月28日、阪大・銀杏会館で開催された第50回関西実験動物研究会でお会いしたのが最後でしたが、当時のお元気な姿から突然の訃報は信じ難かった。

時の流れは早いもので、関西実験動物研究会が主催した第1回米国実験動物視察ツアーが実施されてからすでに4年が経過した。私にとっては思い出多く、印象深い旅でした。ここに、旅行を共にして下さった山田先生との思い出として、手元にある記録と薄れた記憶をもとに、また、一緒に参加された方々の記憶をもお借りして視察過程を振り返ってみました。

I. 第43回アメリカ実験動物学会(AALAS)への参加と米国実験動物視察団の概略

本ツアーは以下の内容で実施された。

期 間：平成4年10月27日(火)～11月6日(金) <11日間>

企画主催：関西実験動物研究会

企画後援：(株)ケー・エー・シー、協力：加商(株)、旅行主催：(株)エー・ビー・シートラベル

目 的：第43回 AALASへの参加および実験動物関連施設の視察

参加人員：団長：山田淳三・京都大学医学部教授、他添乗員含め計12名

訪問施設：1. National Institutes of Health (NIH)

2. Microbiological Associate, Inc.

3. HRP, INC.

4. International Research and Development Corp.

5. California Primate Research Center, UC Davis

6. 43rd. AALAS Annual Meeting, Anaheim

II. 米国における動物実験施設の視察

平成4年10月27日、大阪空港に8時30分集合。結団式で山田先生、(株)ケー・エー・シー社長(当時)の北村さんご両人から訓示を受けた後、9時45分発の JL152便で東京国際

空港へ。同空港を定刻12時30分に出発。フライトはまもなく夜を迎え、北極圏に輝くオーロラを眺めながら、旅先へ思いを馳せた。ワシントン・ダラス国際空港には定刻の同日10時45分に到着した。空港周辺は木々の葉が真黄色に紅葉し、秋たけなわであった。気温13℃と比較的に温暖で、アーリントン墓地やホワイトハウス前の公園で人おじせずに遊んでいる野生リスが印象的であった。夕刻「キャピタルヒルトン」へチェックイン。夕食の席で自己紹介とスケジュールの説明があり、改めてメンバーを確認。若干のジェットラグと不慣れな土地柄故に疲労感を覚え、皆さん早々に就寝。旅慣れておられる山田先生にとっては若干物足りないご様子でした。

1. National Institutes of Health (NIH) <Bethesda, Maryland>

10月28日、Veterinary Resources Branch の Small Animal Section を訪問し、当施設の責任者で、遺伝学者でもある Dr. Hansen からマウス、ラットの系統維持の現状について約1時間の説明を受けた。本部門は飼育係、テクニシャン、獣医師等約50名の人員で構成され、近交系のマウスおよびラット約150系統をSPF環境下で維持していた。Dr. Hansen は維持系統の中から SHR、関節炎モデルラット、糖尿病ラットおよび新生仔黄疸モデルマウス等を話題にとりあげ、それらの特性ならびに疾患モデル動物としての有用性について説明された。新しい疾患モデル動物の発見経緯についてふれられた折に、飼育担当者の資質と日常の緻密な観察が重要であることを感慨深く述べられたのは印象的であった。山田先生とは遺伝学に関する共通話題がたくさんあるご様子で、会話は大変弾んでいた。11時半に NIHを辞し、途中の昼食の席で改めて自己紹介の後、次ぎの訪問先へ。

2. Microbiological Associates, Inc. (MA) <Rockville, Maryland>

2時に到着。MAはBiotechnology compoundのスクリーニングと品質試験を行う部門ならびに変異原性試験、小核試験、代替試験を行う部門を持つ受託機関で、1974年に設立された。日本は得意先で、実施中の55試験の中で25試験は日本の企業からの受託であった。当社では Big BlueTM Transgenic mice を用いたin vivo変異原性試験、EytexTMおよび SkintexTM等を用いた眼および皮膚の in vitro局所刺激性試験を行っていた。皮膚や角膜の組織培養が単層から立体培養へと改良が進んでいると説明され、これらの代替法試験は動物福祉の面からさらに発展するものと思われた。17時頃まで時間がとられ、あわててワシントン国際空港へ。

19時発の便でシカゴ・オフフェア国際空港へ向けて離陸し、オフフェア国際空港（時差1時間遅れ）には19時58分着で「ホテル ニッコー シカゴ」に宿泊。山田先生の部屋に全員が集合し、これまでの見学内容等について午前0時過ぎまでアルコール片手に語り明かした。全員旅にも慣れて来たようだ。翌朝(10月29日)5時45分のまだ薄暗い中、ホテルから支給された朝食(パン、リンゴ、ジュース)持参で出発。オフフェア国際空港を7時10分発で、カラマズ空港には約40分後に到着。晩秋の日差しの中、バスで10時にHRP, INC. に到着。

3. HRP, INC. (旧 Hezleton Research Products, Inc.) <Kalamazoo, Michigan>

HRP, INC. は非ゲッ歯類動物の供給では大手の会社である。当社ではウサギおよびイヌの繁殖施設を見学し、獣医と技術スタッフによる日常的な健康モニタリングプログラム、動物の繁殖・健康状態の管理システムについて説明を受けた。

イヌに関しては純系のアメリカンビーグル、Purpose-bredの「ミニ交雑犬」、大型猟犬(ハウンド)等をNIH指定の大型ケージで繁殖しており、子犬の飼育室では冷感を抱かないように樹脂製のマットが使用されていた。イヌの交配組合せは子孫に遺伝的偏りが生じないように、交配経歴や雌雄の年齢が20カ月以上離れない等の基準でコンピューターを用いて処理し、また、一般状態、病歴および定期的健康モニタリングの成績が個別にコンピューターにファイルされ、綿密な管理体制のもとに繁殖が行われていた。ウサギに関してはニュージーランドホワイト種を SPF環境下で繁殖しており、AALAS 認定の実験動物技術師の資格を持つ若い女性が責任者になっていた。彼女のアイデアで繁殖率向上のためのロックミュージックが動物室内に流れていたのが印象的であった。また、繁殖率向上および作業ミス防止を基準とする表彰制度を取り入れ、従業員の士気高揚を図っていた。11時半に辞し、沼のほとりのロッジ風の瀟洒なレストランで昼食を取った後、IRDCへ向かった。

4. International Research and Development Corp. (IRDC) <Mattawan, Michigan>

14時に到着。IRDCは全米 1~2位の規模を誇る毒性試験受託機関で、1960年に設立された。施設は森に囲まれ自然環境豊かな中にあり、従業員 約360名で、マウス、ラット、モルモット、ウサギ、イヌおよびサル、計18,000匹を用いて試験を行っていた。平屋建ての動物施設内には800mの直線廊下があり、規模の大きさに驚かされた。イヌやサルのケージはすべてNIH 指定の広いサイズのものを使用し、飼育室や廊下の内部はとてもきれいで、整った環境下で試験が行われていた。しかし、SPFバリアは日本の感覚からはあまり厳密でないようで、見学コースの通常廊下から動

物室へ直接入室が可能であった。このような環境下で長期の癌原性試験を実施しているとの説明には驚いた。ラボ視察の中では病理所見音声入力システムに興味がもたれた。これは当施設で開発されたもので、Speech Recognition Transcription Interface System (SRTIS)と呼ばれ、英語あるいは日本語でも発声音と所見の対応を予めコンピューターに覚え込ませておくだけで、認識記録装置が音声に対応して自動的に所見を記憶するようになっており、今後注目される装置と考えられた。関心を引く内容が多かったせいか質疑が多く、予定時間を超過した。18時20分の便でカラマズ空港を出発し、オフエア国際空港に帰着。バスにて「ホテル ニッコー シカゴ」には 19 時半に戻った。

10月30日(金)：今朝も手弁当をさげて6時半にホテルを出発。オフエア国際空港を9時15分に離陸し、4時間30分でサンフランシスコ国際空港に到着。バスで UC Davisの Primate Research Center へ向かうが、これまでのハードスケジュールのせいか、出発とともにすぐ眠りについた。UC Davis校の敷地内を走るフリーウェーから直接構内に入り、大学の正門を入ってからバスで15分位走ったように思う。14時に到着。施設見学に当たっては、日本を出発する前に結核および麻疹に罹っていないという医師のサイン入り証明書を予め送付するように指示されていた。当時、アメリカでは「はしか」の流行の兆しがあり、サル類をウイルスから守るためであることを後で知った。

5. California Primate Research Center(CPRC), UC Davis <Davis, California>

CPRCはNIHの指導により設立された全米7ヶ所にある Regional Primate Research Centerの一つで、カリフォルニア大学に附属する。当センターではビデオで業務内容の概略説明を受けた後、野外および一部の室内飼育施設を視察した。当センターはヒトを除く霊長類を用いたヒト関連疾病の研究と霊長類の生物・病態の研究を主目的に設立され、研究部門は ①Perinatal biology and reproduction, ② Respiratory disease, ③Infectious diseases and immunology, ④Behavioral biology より構成され、約100名の研究者がそれらに従事していた。アカゲザルを中心に、カニクイザル、リスザル、日本ザル、バブーン等10種類、計3,500匹を維持・繁殖しており、年間 約500匹の仔が生まれるとのこと。繁殖サルは野外の金網で仕切られた広大な飼育場(約25m×50m) 7カ所でコロニーとして飼育され、一方、実験用サルは室内では NIH指定の大型ケージで単飼育、室外では直径5 m程の円型ケージを連結したタイプで群飼育され、社会生態学等の研究に供されていた。各ケージにブ

ランコや樹脂性円筒などの遊び道具が配備されていたのが印象的であった。

10月31日(土)は終日フリーで、サンフランシスコの宿泊先「パーク 55」を後に市内観光。街の一部には1989年の大地震で破壊された2階建てのフリーウェーが当時のすさまじい姿をさらけ出して残っていた。夕刻、“ハロウィーン”のパレードで街はにぎわっており、印象深い一夜になった。

11月1日(日)の朝はこの旅初めての小雨が降った。8時にホテルを出発し、9時30分の便でサンフランシスコ国際空港から離陸。ロサンゼルス国際空港に到着し、バスで市内通過後、港の一角で昼食。市街地から約50分の「アナハイム ヒルトン & グラズ」に15時40分着。AALAS の会場はホテルに隣接しており、また、有名なディズニーランドは徒歩15分程のところにあった。夜は山田先生の部屋に集合し、プログラム内容について説明を受けた。明日のために全員乾杯。

Ⅲ. 43RD. AALAS Annual Meeting への参加

<会場：Anaheim Convention Center, Anaheim, California>

<期間：1992年11月1~5日（参加；2~4日）>

第43回アメリカ実験動物学会(The American Association for Laboratory Animal Science: AALAS)の参加登録者は2,839名(会員：6,826 名)と発表されていた。本学会は機関紙“Laboratory Animal Science”の発行、また、米国実験動物学技術者資格認定委員会として「Assistant Laboratory Animal Technician」および「Laboratory Animal Technician」等の認定を行っており、技術者の養成に大きく関わっている。日本の実験動物学会および実験動物技術者協会が合体したような規模であった。国内のみならず、カナダ、欧州、アジアを含めた世界各国からの参加があり、日本からの参加も少なくなかった。口頭発表が52題および図説発表が96題と意外と少なかったが、内容的には疾患モデル、微生物、病理病態、飼育・管理、実験手技に関するものが多かった。動物愛護および低学年児童向けの動物に関する教育カリキュラム等の発表は国柄を反映し、印象的であった。また、教育講演やセミナー、ワークショップには多くの時間が割かれており、技術者に対する教育・研修にも重点の置かれていることが窺われた。会期中に世界各国 121社による飼育関連機器が展示され、とくにイヌやサル的大型ケージは迫力があった。動物愛護関連の印刷物を配布し、動物実験の啓蒙活動しているブースもあり、意外であった。

IV. Allergan Pharmaceuticals <Irvine, California>

予定外であったが、ツアー最終前日(11月4日)に山田先生のご配慮でアナハイム近郊にある中規模の製薬会社“Allergan Pharmaceuticals”を訪問し、完成間近な研究所の動物施設を見学することができた。カリフォルニア州は動物愛護運動のとくに盛んな地域ということで、施設面では動物積み下ろしのために輸送車専用の大型ガレージを設置し、動物室の入退監視には“Watch Dog System™”(エストロム社製)を採用していた。動物室や洗浄室等に“Animal”の具体的な用語を表示せずに、また、動物管理部門の長には“Vivarium Manager”という専門用語(Vivarium=陸生動物飼養場)を用いる等の細かい配慮が窺われた。

V. 5 km マラソンの話題

AALASの会期4日目(11月4日)早朝に学会関連スポンサー主催の5 km マラソンが開催された。山田先生の発案で、我が視察団からも3名(竹本、秋本、阿部)がエントリーした。運動靴の持ち合わせがない私は前夜、ホテル内でテニスシューズを買い求め参加した。早朝6時30分のまだ薄暗い中ホテル前に集合。バスで約20分の川岸に沿ってコースがあり、すでに100人程が集合していた。恒例のようで、参加者はジョギング姿で決めていた。日本人は我々3名のみ。不思議と大和魂(?)が沸いてきた。山田先生はじめ、内海さん、濱田さん、添乗員の柴田さん達が応援に駆けつけてくれた。走り込み経験のない私はどうにか完走を目標にレースに臨んだ。若い秋本君は上位に入った。苦しかったが、走り切った後の感動は格別で、山田先生の勧めがなかったら、マラソンの魅力を現在も知らずに過ごしていると思う。

11月5日(木):「アナハイム ヒルトン & タワーズ」を9時に発ち、ロサンゼルス国際空港をエンジントラブルのため約1時間遅れで13時に離陸。11月6日(金)東京国際空港乗り継ぎで大阪空港には20時到着。長いようで短かった旅も終わり、全員無事帰還。

VI. 雑感

最初に訪れたワシントンD.C.では、昨日までの寒気がうそのごとく快晴に恵まれ、いたる所で赤、黄色の素晴らしいメープルが我々を迎えてくれた。ツアー前半の晩秋の色濃いワシントンD.C.、シカゴ、カラマズから、後半は温暖な西海岸のサンフランシスコ、アナハイムと、移動による時差に順応する間もなく時間が経過した。丁度この時期は大統領選挙運動がたけなわで、行く先々でクリントン候補の選挙用ビラに遭遇した。また、帰国前夜にはクリントン候補の初当選が決定し、ホテル内

での関係者による祝賀会にも遭遇した

今回の視察団に参加し、アメリカにおける実験動物および動物実験の一端を把握できたことは大きな収穫であった。個性豊かな参加メンバーに恵まれたことも幸いしたが、それ以上に山田先生の細かいお心遣いと適切なアドバイスは今回のツアーをより有意義なものにしてくれた。いつの日かメンバーが再会し、グラス片手に微笑む先生を囲みながら旅の思い出を語る機会が来ることを確信していたが、それは叶わなくなった。また、ツアー報告には山田先生ご自身の思い出も加筆していただく予定にしていたが、その機会もなくなり大変心残りに思う。

最後に、山田先生の数々のご好意に対して改めて感謝するとともに、先生のご冥福を心からお祈り申し上げます。

○参加者（順不同・敬称略・当時の所属名称）

山田淳三（京都大学：団長），高橋順一（~~株~~ミドリ十字），竹本忠由・秋本耕三郎（大塚製薬~~株~~），内海健二郎（大日本製薬~~株~~），濱田佑二（~~株~~成和実験動物研究所），石井邦生（日揮~~株~~），鶴田敏夫（~~株~~美濃~~株~~），大西久美雄・河邊行廣（~~株~~ケ・エ・シー），阿部敏男（武田薬品工業~~株~~），柴田英男（~~株~~エ・ビ・シー・トラベル：添乗員）

山 田 淳 三 さ ん を 偲 ぶ

中 山 亮

淳三さんとは大学の農学部時代からのおつき合いでありました。

当時の教室には 山田淳三さん の他にもう一人 山田二郎さん という二人の山田姓がおり、
区別するため、“淳三さん”、“二郎ちゃん”と呼んでおりました。

淳三さんは頭がよく論理派でしたが、趣味も広く、人づき合いが広い人でした。

淳三さんは コール チクリアン と称した教室員のコーラスの指揮者でした。教室員の
結婚式の時は皆で歌ったものでした。勿論、淳三さんと奥さんのセツエ(旧姓 木口)さん
の結婚式でも歌わせていただきました。皆んな酒が好きでしたが、二郎ちゃんは既に
若くして他界してしまいました。

淳三さんは左ききでした。ソフト ボールでは キャッチャー をやり、普通のミットを
右手にさして、上手に球をさばいておりました。テニスも左手にラケットを持ち サービ
ス をうってくるのでなかなか打ち返すのが難しかったものでした。字は右手で書いて
おりましたが、左手でも書け、とくに英語の スペル を裏返しに、鏡像体を書くことを得
技としておりました。

淳三さんと私とは良く気が合い、二人で北海道旅行もしました。^{オシャマンベ}長万部の駅のホームで
淳三さんが 毛ガニ を買ってきました。一匹 50円 でした。当時ウマイといわれた
『北海道のアイスクリーム』が 30円 でした。汽車が出たところで毛ガニを始めて食べた
ところ、ウマイの何の、これだったらもう一匹ずつ買っておくんだったと悔やみました。
^{ウスダケ}有珠岳に登り、同窓生である中瀬信三君のいた^{ニイカッブ}新冠牧場で馬に跨がり、^{オンネトウ ヒナ}温根湯の鄙びた
温泉郷に行き、^{コダマ}温根湯沼で餅を呼び、モウセンゴケ や オオアカゲラ を見ました。現
在の温根湯は傍らを立派な道が走り、青少年センターなどができて全く様変わりしていま
すが、当時は人がやっと歩ける程度の一本道があって、木造の古びた小屋が旅館でありま
した。トイレも下を温泉の湯が流れる天然の水洗便所であった。温泉も大きな木の板で
つくられた風呂でありました。二人で湯につかっていると、ドヤドヤと女性が 4,5人 入っ
てきました。トタンに淳三さんが飛び出して上がってしまいました。私もしかたなく温
泉をでましたが、今の淳三さんからは想像もできないような出来事でありました。それ

ミアカンダケ
から雌阿寒岳に登り、阿寒湖、摩周湖なども廻りました。

それから奥秩父の^{ミズガキヤマ}瑞牆山、^{キンブサン}金峰山では木の幹にナタで切れ目をつけ目印とした“ナタ目”の道を這いずり廻り、^{キコリ}樵小屋に泊めてもらいました。樵小屋は入り口に扉はなく、下は直接地面でした。樵の小父さんが一人いました。直径 40cm くらいの太い丸太とそれに平行して置かれていた直径 20cm ほどの丸太との間に赤い火が燃えておりました。扉がないので寒いのではないかとわれわれが火を燃えたたせようとして丸太に触ろうとすると樵の小父さんが“丸太には決して触ってはならない”と言いました。なるほどしばらく見ていると平行した丸太の間の火はチョロチョロといつまでも燃えていて、地面に寝ているわれわれも決して寒くはありませんでした。結局一晩中丸太には手をふれなくてもいささか暑いくらいの火が燃えていました。もっとも小父さんと酌み交わしたトリス ウキスキーが効いていたのかもしれませんが。

北アルプスでは、徳沢にベース キャンプを張り、『名チェリストたち』の記者である淳三さんの妹の玲子さんらと登った槍ヶ岳、また、常念岳、蝶ガ岳から見た前穂、奥穂、大キレットと連なるすばらしい壮大なる眺め、また、黒部の川の上数百メートルの断崖の道を這うようにして行った十字峡、岩の洞窟の阿曾原温泉、すばらしい山岳が水面に映る仙人池、鎖に掴まり岩壁から身を乗り出して登った剣岳、また、立山から針の木岳では、山から下ってきて二人で交番の前でお茶を入れて貰い昼飯を食べていた時、黒部ダムを作っているトラックに仲間が乗っているのを見つけ、それを大声で呼びかけ止めようとしたが止まらず、だいたい先にいってから止まったのを見て、交番の奥さんに大きな声で礼をいって、荷物をしょってトラックまで走り、やっと乗せてもらって、“なんで止まってくれなかったんだ”と問いかけたところ、“お前らのいたところが悪い、交番の前でトラックをとめられるか”と言われギャフンとなった話。

また、北海道大学で実験動物学会があり、その後、皆んなで小樽に行き^{ウツキ}裏小路の卯月という飲み屋で“北の旅人”を歌い大いに盛り上がったこと、^{レブントウ}船で礼文島に渡りムラサキ色のレブンハナシノブ、クロユリなどを見ながら登った礼文岳への旅。また、淳三さんの車で淡路島から、四国へ渡り、徳島大学の松本耕三教授と再会の喜びを交わし、剣山の今にも真逆さまに落ちそうな急傾斜のリフトに^{オオボケ}乗り、^{コボケ}大歩危、小歩危のフジツルの吊り橋を渡ったこと、池田市で宿を探したが国体の水泳選手権があり皆つまっていて、観光案内所でラブ ホテルに泊まるように教えられたこと。私が長野県の伊那市にあるイナ

リサーチ に単身赴任していた時、淳三さんは奥様と車で訪ねてくれました。駒ヶ根から専用のバスに乗り換え、サル、カモシカなどを見ながらケーブルで登った千畳敷カール、残雪で広い溪谷が埋めつくされ、遠くには南アルプスの北岳、仙丈ヶ岳が見えておりました、などなど 今も皆 鮮明な記憶として残っております。

今年は年末に 宮島 宏彰 氏のおられる鹿児島に行こうといていたところでした。

大阪大学医学部銀杏会館で開かれた関西実験動物研究会の後、北千里の“愚羅馬亭”というバーで飲んだのが最後になってしまいました。帰りがけに淳三さんが“中山 うちにこないか”と誘ってくれたのに今日はもう遅いからといって帰ってしまったのですが、あの時の淳三さんのちょっと悲しげな顔がいまでも目に焼きついております。あの時淳三さんの家に行っていたらもう少し淳三さんと長く飲めたのにと惜しまれてなりません。

淳三さんはウキスキーの ストレート か オンザ ロック が好きで、とくに Ballantine がお気に入りでした。ある時サンフランシスコの空港で買った Ballantine の 30年 をもっていったところ大いに感激してもらい、淳三さんの奥さんに作っていただいた美味しいお料理と一緒に楽しませていただきました。

京都に私が行ったときは、いつも先斗町のチャップリンというバーで、壁にゴヤ画くところの“裸のマハ”の大きな絵がかかっているのを前にしてグラスを傾けるのが常でした。ある時ここで『実験動物学会用語』のことで口論になり、ついに私がバーを飛び出して帰ってしまいました。淳三さんは人間적におだやかな人で、酒の時にする口論は勿論 酒の肴としてやっていたのですが、この時ばかりは二人とも真剣となり、ついに本当の喧嘩となっていました。淳三さんと喧嘩をしたのは 44年間で 後にも先にもこれが最初で最後のたったの一回きりでありました。

私は若い頃ささいなことで悩んでおりました。そんな時 淳三さんが『人間生きてるか ぎり罪なんだ。自分が生きるのには 生きている動物・植物を食べなければならないんだ 生きること自体が罪なんだぞ。そんな小さなことで思い悩むな』と諭してくれました。今、淳三さんは全ての罪から脱却して天上におられます。私もそのうち淳三さんの後を追っかけて天までまいります。その時は二人でまた天上で盛大に Ballantine の 30年 を空けましょう。

奥様のセツエさんはじめ、^{アツシ}淳君、^{ヤスシ}康君のご子息方も、天上からの淳三さんのお導きを願っておられることと存じます。^{ミツマ}御霊の安からんことをお祈りして偲ぶことばとさせていただきます。

焼 酎 賛 歌

民 衆 の 酒 焼 酎 は

安 く て 廻 り が 速 い

焼 き 鳥 固 く 冷 え ぬ 間 に

血 潮 は 頬 を 染 め ぬ

高 く 持 て 杯 を

そ の 蔭 に 涙 あ り

去 ら ば 去 れ 特 級 酒

我 ら は 焼 酎 守 る

この詞は大学時代に 山 田 淳 三 さん から教わったもので、当時はやっていたストライキなどで共産党が歌っていた『赤旗の歌』の替え唄で、旧制 佐賀高校の学生が作ったもののようです。原詞の赤旗の歌よりも この『焼酎賛歌』の詞のほうが上手くできていると思います。赤旗の歌の曲はドイツ民謡となっていますが、『O! Tannenbaum』を少し変えたメロディーです。O! Tannenbaum のようにリズムカルに歌うより、やはり赤旗の歌のように歌う方が この『焼酎賛歌』には合っているように思います。当時は世の中全体が貧しく、学生のわれわれは金もなく、飲むといえば焼酎しか飲めませんでした。焼酎を飲みながら この『焼酎賛歌』を歌ったものでした。

(中 山 亮)

関西実験動物研究会だより

研究会開催

本号では第50回までの研究会における学術講演および研究発表の記録を掲載したが、その後以下の研究会が開催されている。

1) 第51回研究会(平成8年9月20日 大阪大学医学部 講義棟) 講演会

1. 医薬品毒性試験における代替法導入の現状
橋本正晴 (藤沢薬品工業 (株) 安全性研究所)
2. 化粧品原料における眼粘膜刺激性試験代替法のバリデーション
1) バリデーションの開始にあたって
金子豊蔵 (国立衛試・安全性生物試験研究センター)
3. 2) その全体計画と結果
柿島 博 (鐘紡 (株) 化粧品研究所)

維持会員ニュース

1. (株) イナリサーチ: 「サルの骨密度測定 — サル骨粗鬆症モデルにおける測定 —」
 2. オリエンタル酵母 (株): 「ラット・マウス用蛋白18%飼料 CR—LPF の開発経緯」
- #### 2) 第52回研究会 (平成8年12月6日 京大会館)

会員による研究発表 (15題)

特別講演

1. 疾患モデル動物を用いた高血圧・循環器病遺伝子の研究
檜垣實男 (大阪大・医・第四内科)
2. 新しい循環調節ペプチド: アドレノメデュリンと PAMP
寒川賢治 (国立循環器病センター研究所・生化学部)

評議員会、総会の議事概要

1) 第14回評議員会の概要

(平成8年3月8日 於 大阪大学コンベンションセンター)

1. 出席：阿部、石川、内海、海野、及川、岡庭、岡本、北田、黒澤、佐藤、塩見、芹川、竹之下、谷村、鳥居、新谷、前田、増岡、松村、三日月、森本（代 宮本）、宮脇、森岡、森本、山中、山田（26名）

2. 議事

- (1) 平成7年度事業報告 海野幹事（集会）より平成7年度事業報告が行われ、承認された。
- (2) 機関誌発行報告 宮脇幹事（編集）より第15号（平成7年2月）、第16号（平成7年12月）会報の発行について報告があった。
- (3) 平成7年度決算報告 阿部幹事（庶務）より平成7年度収支決算報告が行われ、また、監事より監査の結果適正であったことが報告され、承認された。
- (4) 役員の改選（平成8年～10年度）

1. 評議員

再任：出席評議員（26名）の再任（平成8年～平成10年）が承認された。

欠席評議員には、後日事務局より継続の依頼をすることが提案され了承された。

新任：浅野裕三（田辺製薬）、池田卓也（バイエル薬品）、河井祥一郎（丸石製薬）、喜多正和（京都府立医大）、久保薫（奈良県立医大）、千葉薫（たばこ産業弘済会）、螺良愛郎（関西医大）、原田正史（大阪市大）、森本宏一氏（日本チバガイギー）、吉田元信（大日本製薬）以上10名が推薦され、選出された。

退任：宮本政樹氏（日本チバガイギー）より退任の届け出があり受理された。

2. 会長 芹川忠夫氏が推薦され、選出された。

3. 監事 清水英夫、高木貞明、両氏が再任された。

(5) 会則の改正と幹事選出

1. 会則の改正 会則の改正案が、以下の通り提案され承認された。

現会則：評議員は評議員会を組織し、本会に関する重要な事項を審議・決定する。また、会長を補佐し、庶務、会計、集会、会誌発行などの会務を実行する。

提案：評議員は評議員会を組織し、本会に関する重要な事項を審議・決定する。また、評議員の互選により選ばれた幹事は、幹事会を組織し、会長の補佐及び庶務、会計、集会、会誌発行などの会務を実行する。

2. 幹事 会則（15）の改正に伴い、幹事（17名）が紹介され、選出された。

(6) 名誉会員の推薦 前会長、宮脇宏彰氏が名誉会員に推薦され、承認された。

(7) 平成8年度事業計画案 海野幹事（集会）より平成8年度の事業計画案が説明され、承認された。また、宮脇幹事（編集）より会報の発行を2回予定していることが報告

された。

- (8) 平成 8 年度予算案 北田幹事（庶務）より平成 8 年度の予算案の説明が行われ、承認された。
- (9) その他 本研究会から日本実験動物学会理事選挙の候補者を出すとの提案が出され、幹事会において具体的に検討することが了承された。

2) 第 13 回総会概要 （平成 8 年 3 月 8 日 於 大阪大学コンベンションセンター）

- (1) 平成 7 年度事業報告が行われ、承認された。
- (2) 機関誌の発行（第15号、第16号）が報告された。
- (3) 平成 7 年度収支決算報告が行われ、また、監事より監査の結果適正であったことが報告され、承認された。
- (4) 役員の改選（平成 8 年～10 年度）
 - 1. 評議員 旧評議員、旧監事（平成 5 年～平成 7 年）が継続して新評議員、新監事（平成 8 年～平成 10 年）となることが報告され承認された。
新評議員として浅野裕三氏、池田卓也氏、河井祥一郎氏、喜多正和氏、久保薫氏、千葉薫氏、螺良愛郎氏、原田正史氏、森本宏一氏、吉田元信氏、以上 10 名が選出されたことが報告され、承認された。
宮本正樹氏の退任が報告され、承認された。
 - 2. 会長 芹川忠夫氏が評議員会にて選出されたことが報告された。
- (5) 会則の改正と幹事
 - 1. 会則の改正 （理由）幹事、幹事会実態に則して会則に明記する。
会則（15）の改正案が提案通り可決された。
 - 2. 幹事 会則（15）の改正に伴い評議員会から幹事（17 名）が選出されたことが報告され承認された。
- (6) 前会長宮脇宏彰氏が名誉会員に推薦され、承認されたことが報告された。
- (7) 平成 8 年度の事業計画案が説明され、承認された。また、会報の発行を 2 回予定していることが報告された。
- (8) 平成 8 年度の予算案の説明が行われ、承認された。
- (9) その他 評議員会において本研究会から日本実験動物学会理事選挙の候補者を出すとの提案が出され、幹事会において具体的に検討することが報告された。

幹事会の概要

(平成 8 年 10 月 31 日 於 京都大学医学部附属動物実験施設)

1. 出席：浅野、阿部、海野、喜多、北田、黒澤、芹川、新谷、宮脇、森岡、森本

(11名)

2. 議事

- (1) 第 52 回関西実験動物研究会 会員発表会

プログラムの編集が行われ、本年度は一般演題 14 題が採択された。

発表時間を厳守するため、タイムキーパー用のブザーを購入する件が提案され、了承された。

- (2) 第 53 回以降の関西実験動物研究会について

第 53 回研究会は、平成 9 年 3 月 7 日に京大会館にて開催することが決められた。

企画については芹川氏が担当、京都大学医学研究科臨床病態医科学講座と相談して決定することが了承された。

第 54 回研究会の企画について、浅野、阿部、黒澤の 3 氏が担当することが了承された。

第 55 回研究会の企画は、北田、宮脇の両氏が担当することが了承された。

第 56 回研究会の企画は、海野、喜多、森本の 3 氏が担当することが了承された。

集会幹事より、広く会員から、研究会の企画案を募集している旨が報告された。

- (3) その他

平成 9 年度総会にて、故山田淳三氏および宮脇宏彰名誉会員に、名誉会員証を贈呈することが提案され、了承された。

関西実験動物研究会 評議員名簿 (平成8年度)

名前	所属
阿部 敏男	武田薬品工業(株)実験動物研究管理室
浅野 裕三	田辺製薬(株)安全性研究所
飯田 晶敏	(株)資生堂医薬品研究所・薬理G
池田 卓也	バイエル薬品(株)中央研究所
内海 健二郎	(株)ケーエーシー
海野 隆	鐘紡(株)薬品安全性研究所
江角 吉造	日本シェーリング(株)
江崎 孝三郎	大阪府立大学農学部
及川 弘	
岡庭 梓	(株)ボゾリサーチ
岡本 宗裕	大阪大学医学部附属動物実験施設
河井 祥一郎	丸石製薬(株)中央研究所
川俣 順一	
喜多 正和	京都府立医科大学実験動物室
北田 一博	京都大学医学部附属動物実験施設
久保 薫	奈良医科大学動物実験施設
黒澤 努	大阪大学医学部附属動物実験施設
小嶋 明廣	(株)マルゴリサーチサービス
笹川 祐成	
佐藤 良夫	大阪大学歯学部中央研究室
塩見 雅志	神戸大学医学部附属動物実験施設
志村 圭志郎	三重大学医学部附属動物実験施設
芹川 忠夫	京都大学医学部附属動物実験施設
相馬 正志	(株)新薬開発研究所 関西支所
高折 修二	島根医科大学
高島 俊行	(株)実生研・筑波研究所
竹之下 洋司	ケアリー
谷村 孝	近畿大学医学部第一解剖学教室
千葉 薫	(財)たばこ産業弘済会理化学関連事業部
螺良 愛郎	関西医科大学第二病理学教室
螺良 義彦	
鳥居 隆三	滋賀医科大学医学部附属動物実験施設
新谷 聰	国立循環器病センター研究所
西宗 義武	大阪大学微生物病研究所
原田 正史	大阪市立大学医学部動物実験施設
藤村 一	(財)生産開発科学研究所
古河 恵一	近畿大学医学部共同研実験動物室
前田 敏宏	大日本製薬(株)研究管理部動物飼育室
牧野 進	塩野義製薬(株)油日ラボラトリーズ
増岡通夫	(株)ケーエーシー生物科学センター
松村 理一郎	日本ベーリンガーインゲルハイム(株)
三日月 勝見	塩野義製薬(株)油日ラボラトリーズ

関西実験動物研究会 評議員名簿 (平成 8 年度)

名前	所属
宮 瀧 宏彰	(株) 新日本科学
宮 嶋 正康	和歌山県立医科大学動物室
宮 脇 茂樹	日本新薬(株)分子生物研究室
森 岡 宏至	大阪府立大学農学部獣医学科実験動物
森 本 純司	大阪医科大学実験動物センター
森 本 宏一	日本チバガイギー (株) 薬剤安全性研究室
安 田 正秀	大阪薬科大学実験動物センター
山 中 久	(株)イナリサーチ大阪支所
山 本 博	富山医科薬科大学動物実験センター
山 本 好男	滋賀医科大学法医学教室
家 森 幸男	京都大学人間環境学部
吉 田 元信	大日本製薬 (株) アニマルサイエンス部

関西実験動物研究会 幹事名簿

(平成8年度)

	名前	所属
会長：	芹川 忠夫	京都大学医学部附属動物実験施設
庶務：	喜多 正和	京都府立医科大学 実験動物室
会計：	北田 一博	京都大学医学部附属動物実験施設
集会：	海野 隆	鐘紡(株)薬品安全性研究所
	阿部 敏男	武田薬品工業(株)実験動物研究管理室
	森岡 宏至	大阪府立大学農学部獣医学科
	黒澤 努	大阪大学医学部附属動物実験施設
	森本 純司	大阪医科大学・実験動物センター
	浅野 裕三	田辺製薬(株)安全性研究所
編集：	宮脇 茂樹	日本新薬(株)創薬研・分子生物学研究部
(京都 G)	山本 好男	滋賀医科大学・法医学教室
	三日月 勝見	塩野義製薬(株)実験動物研究センター
	鳥居 隆三	滋賀医科大学附属動物実験施設
編集：	新谷 聰	国立循環器病センター 研究所
(大阪 G)	岡本 宗裕	大阪大学医学部附属動物実験施設
	飯田 晶敏	(株)資生堂 医薬品研究所
	山中 久	(株)イナリサーチ 大阪支所

《会員の異動》

(平成7年12月～平成8年12月)

入会者	谷内 孝次	大阪大学医学部附属動物実験施設
	吉田 元信	大日本製薬(株) アニマルサイエンス部研究所
	原田 正史	大阪市立大学医学部
	浅田 孝	藤沢薬品工業(株) 開発第一研究所
	村本 泰一	日本商事(株) 医薬研究所・安全研
	福岡 俊文	住友化学工業(株) 生物環境科学研究所
	植野 一郎	バイエル薬品(株) 中央研究所
	山添 裕之	住友化学工業(株) 生物環境科学研究所
	日野 雅生	塩野義製薬(株) 中央研究所
	橋本 正晴	藤沢薬品工業(株) 安全性研究所
	安倍 宏明	日本チャールズリバー(株)
	中川 博司	(株) 新日本ラボラトリー
	田邊 好男	千寿製薬(株) クリエイト センター
	西村 弘道	(株) アニマルケア 西日本営業所
	秋山 純一	(株) 加美乃素本舗 開発研究部
	荻野 信二	住友製薬(株) 茨木工場
	高橋 明男	住友製薬(株) 総合研究所
	石井 昭男	協和発酵工業(株) 安全性研究所
	増井 則夫	日本エスエルシー(株) 品質管理部
	渡辺 清	塩野義製薬(株) 実験動物研究センター
	菅 千里	(株) 化合物安全性研究所 病理検査室
	長谷川 治子	大阪大学医学部附属動物実験施設
	鍵山 莊一郎	大阪大学医学部附属動物実験施設
退会者	圓入 克介	藤沢薬品工業(株)
	遠藤 敏	加商(株) ライフサイエンスグループ
	小柳津 竜樹	関西医科大学第2病理学教室
	木佐 茂雄	加商(株) ライフサイエンスグループ
	多田 憲市	日本新薬(株) 中央研究所
	二階堂浩子	金沢大学医学部附属動物実験施設
	山之内 孝尚	
	森井 外吉	
	伴野 高彦	新日本ラボラトリー
	澤浦 雅人	日本チャールズリバー(株)
	坂本 雄二	千寿製薬(株)
	梶山 松生	
	周藤 勝一	協和発酵工業(株) 安全性研究所
	古川 学	
	二宮 寿三	武田薬品工業(株) 薬剤安全性研究所光支所
	高田 頼一	塩野義製薬(株)
	藤島 寛	

《関西実験動物研究会 維持会員》

(五十音順) (平成8年12月現在)

No.	社名	〒	住所
1	(株) イナリサーチ大阪支所	541	大阪市中央区道修町 2-2-6 道修町後藤ビル3F
2	(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
3	オリエンタル酵母 (株) 大阪営業所	564	吹田市南吹田 4-4-1
4	加商 (株)	103	東京都中央区日本橋 2-14-9
5	鐘紡 (株) 薬品安全性研究所	534	大阪市都島区友淵町 1-5-90
6	(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
7	(株) ケアリー	531	大阪市北区豊崎 4-12-1
8	(株) ケー・エー・シー	604	京都市中京区西の京西月光町40
9	参天製薬 (株) 中央研究所	553	大阪市東淀川区下新庄 3-9-19
10	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
11	(株) 実医研	103	東京都中央区日本橋本石町3-3-8
12	白井松器械 (株)	540	大阪市中央区森ノ宮中央 1-19-16
13	白銀工業 (株)	547	大阪市平野区加美北 4-6-19
14	(株) 新日本科学	891-13	鹿児島県鹿児島郡吉田宮之浦 2438
15	(株) 新薬開発研究所 関西支所	573	枚方市河原町 6-10-205
16	(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
17	(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
18	大日本製薬 (株) 開発研究所・安全研	564	吹田市江の木町 33-94
19	武田薬品工業 (株) 創薬研究本部	532	大阪市淀川区十三本町 2-17-85
20	田辺製薬 (株) 研究開発企画センター総務部事業課	532	大阪市淀川区加島 3-16-89
21	(株) 夏目製作所	113	東京都文京区湯島 2-18-6
22	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
23	日本クレア (株)	550	大阪市西区京町堀 1-13-2
24	日本商事 (株) 医薬研究所	567	茨木市庄 2-24-3
25	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
26	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
27	日本チャールスリバー (株)	550	大阪市西区西本町 1-11-7
28	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
29	(株) ハイゲン	349-01	埼玉県蓮田市末広 1-2-7
30	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
31	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
32	(株) 船橋農場 京都営業所	607	京都市山科区御陵鴨戸町 46-6
33	丸石製薬 (株) 中央研究所	538	大阪市鶴見区今津中 2-2-18
34	(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
35	(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
36	(株) 美濃ラボ	503-03	岐阜県海津郡平田町今尾 1195-1
37	(株) ラビトン研究所	677	兵庫県西脇市中畑町 718

編集後記

関西実験動物研究会の初代会長を努められた山田淳三先生（京都大学名誉教授）が、平成8年8月17日に享年67歳の若さでご逝去された。その一月半ほど前に開催された第50回研究会では、多くの会員の方々が先生のお元気なお姿をお見かけしたことになると思う。あまりに突然のことで、今なお先生の死が信じられない思いがするのは私だけではないであろう。心より先生のご冥福をお祈りしたい。本号では、先生とご親交の深かった多くの方々の中から特に5名の方に追悼文のご寄稿をお願いし掲載させていただいた。特別に紙面をお借りしたことをご了願したい。

1996年12月 S.M.記

編集後記

本号はかなりボリューム・アップしました。また、第43、および45回研究会の講演会の記事は、様々な分野における会員の皆様にとって、それぞれに十分な内容のあるものではないかと考えます。

ところで、本号はこの師走に会員の皆様の手元に届けられるものと思いますが、この年の日本には衝撃的な出来事が続発しました。私の曖昧な記憶の儘に並べてみても横浜の医師母子殺人事件、神戸地震、オウム真理教事件などがあります。また、バブル崩壊後の日本経済の低迷と雇用不安は深刻な影響を日本社会に与えています。一方、国としての方向性を示せない政治家、奢り、腐敗した官僚（機構）、講座制に象徴される大学の閉鎖性と後進性などは相も変わらずであり、一

体これからの日本はどこへ行くのか、この国は自浄作用を喪失して、ひたすら終末への道を駆け落ちつつあるのではないかと不安にかられます。さらに、このような状況は日本だけに限らないのではないか、人類自体が一つの種としての役割を終えて滅亡への道を辿りつつあるのではと、SF小説・映画かぶれの私は話を飛躍させて考えたりします。何れにしても、かつて地球上に栄えて絶滅した生物のように、人類もまた繁栄から滅亡に向かう可能性があります。そして、人類の存在の痕跡はどのような形でこの地球上に残るのでしょうか・・・

少しばかり杞憂と妄想の過ぎる編集後記になりました、どうぞ御容赦願います。

1995年晩秋 M. I 記

平成 8 年12月20日 印刷
平成 8 年12月25日 発行

編集兼発行者 芹 川 忠 夫
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