

関西実験動物研究会会報

Kansai Journal of Laboratory Animals

平成9年12月 18号

関西実験動物研究会

Kansai Laboratory Animal Research Association

目 次

< 第 51 回研究会 (平成 8 年 9 月 20 日)>

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) ----- 1
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) ----- 6
2) その全体計画と結果
柿島 博 (鐘紡 (株) 化粧品研究所) ----- 23

< 第 52 回研究会 (平成 8 年 12 月 6 日)>

- 会員による研究発表 ----- 29
- 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 (大阪大学・医・第四内科) ----- 45
 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) ----- 51

< 第 53 回研究会 (平成 9 年 3 月 7 日)>

- テーマ：「臨床から動物実験そして臨床へ」
1. 肥満遺伝子産物 (レプチン) と受容体の分子機構-Genetics から
臨床応用へ-
小川 佳宏 (京都大学・医・臨床病態医科学) ----- 62
 2. 血圧制御研究からの発展-遺伝子から表現型へ：表現型から遺伝子へ
深水 昭吉 (筑波大学・応用生物化学系) ----- 66

< 第 54 回研究会 (平成 9 年 6 月 6 日)>

- テーマ：「がん原性試験を指向する-その理論と実際-」
1. ICH における発がん性試験ガイドラインの動向および今後の展望：
トランスジェニックマウスを用いた短期発がん性試験法
三森 国敏 (国立衛試・安全性生物試験研究センター) ----- 67
 2. 前癌病変を指標とした中期発癌性試験
立松 正衛 (愛知県がんセンター研究所) ----- 79

< 関西実験動物研究会だより>	92
< 幹事会、評議員会、総会の議事概要 >	93
< 会長、幹事、監事名簿 >	95
< 評議員名簿 >	96
< 維持会員名簿 >	98
< 会員の異動 >	99
< 個人会員名簿 >	100

医薬品毒性試験における代替法導入の現状
－製薬協アンケート調査をもとに－

藤沢薬品工業（株）安全性研究所
橋本 正晴

1. はじめに

医薬品の毒性試験は変異原性試験を除いて厚生省の毒性試験法ガイドラインにしたがって、Wholebodyの哺乳動物を用いて行うことになっている。Wholebodyの動物を用いた毒性試験は、ヒトでの副作用を予測するという大きな目的があるが、ヒトと動物の間には種差が存在するために、その試験の限界も認められている。近年、多くの毒性現象について科学的な解析を行うために、in vitroでの試験がなされるようになってきており、このような手法の確立は、製薬企業にとっても医薬品の開発の効率化や経済性の点からも有用なものになりつつある。一方、実験動物を使用するために、動物福祉の観点からいわゆる3Rを配慮していくことも必要になってきている。

このような背景を踏まえ、製薬協基礎研究部会では、毒性試験のなかで代替法がどの程度実施されているか、どのような目的で実施されているか、またどのような試験系を用いているかを調査し、今後どの程度進展していくかを把握するためにアンケート調査を実施した。実施時期は1994年の2月から4月にかけて、製薬協加盟99社を対象としてアンケートを送付し、そのうち83社と海外2社より回答を頂き解析した。（回収率84%）

2. 調査の内容

調査項目として、13の毒性分野〔肝毒性、腎毒性、心毒性、神経毒性、免疫毒性、催奇形性、感作性、抗原性、局所刺激性（眼、皮膚）、癌原性、依存性、急性毒性〕について、その実施状況を「確立し、日常的に実施している」「確立したが、日常的に実施している段階ではない」「現在、検討中」「実施経験はあるが、現在は中止している」「必要性はあると考えるが、実施していない」「必要性はなく、実施していない」の6つに分けて回答してもらった。さらに実施経験のある会社について、各毒性分野ごとにその目的をスクリーニング試験、毒性機序解析、申請関連、動物愛護、経費節減について、また用いている実験系を灌流臓器、スライス臓器、遊離細胞、初代培養細胞、株化細胞、細胞下分画、培養器官、哺乳動物以外の生物、非生物系材料の中から選択して頂いた。

3. 代替試験の実施状況

全体的な実施状況を図-1に示した。現在までに何らかの代替試験の実施経験がある会社は50社（59%）、残りの35社（41%）は経験がなく、経験のある会社のうち10社は現在中止している。一方、実施経験のない35社のうち、必要性がないと回答さ

れたのは12社（14%）で、残りの23社（27%）はいずれかの分野で必要性があると回答している。次に、各毒性分野ごとの実施状況を図-2に示した。全体では約60%の会社が実施経験ありとなっていたが、各毒性分野ごとでは経験ありが少なくなっている。これは各社いずれかの毒性分野では経験はあるものの、その分野が限定されていることを示している。各毒性分野のうち、肝毒性32社と最も多く、ついで催奇形性23社とほぼ1/3程度の実施率であった。また、眼、皮膚の局所刺激性については、現在は中止しているとの回答が半数近くあった。一方、実施していないものの必要性があるとされている分野は眼、皮膚の局所刺激性であった。

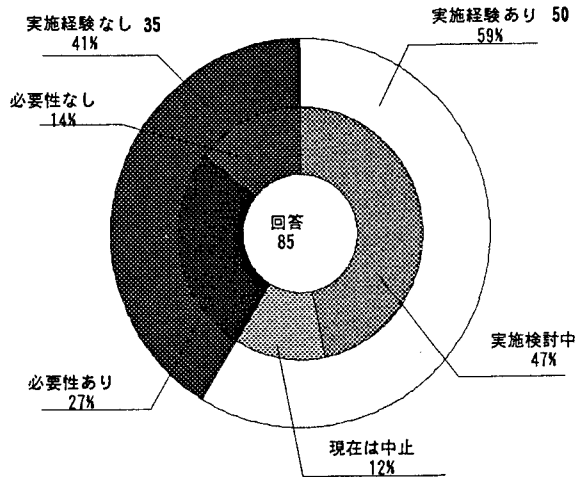


図-1 毒性試験動物代替試験の実施状況

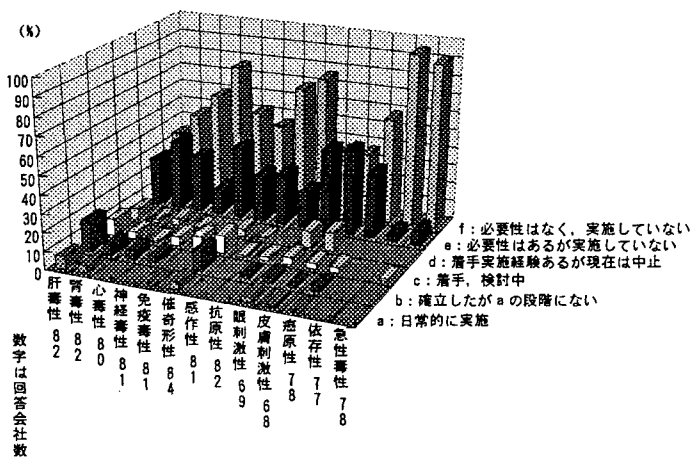


図-2 各毒性毎の代替試験実施状況

4. 各毒性分野ごとの実施状況

肝毒性については、日常的に実施しているのは6社、確立したが日常的ではない14社、検討中7社、現在は中止している5社、実施していないが必要性あり28社と約70%が何らかの形でin vitroの系を使用する意義を感じている。試験の目的としてはスクリーニング試験が44%、毒性発現機序の解析が35%とほぼ80%を占め、動物愛護、経費節減は10%ずつであった。また、実験系は初代培養細胞を用いる系が70%を

その他には免疫毒性、腎毒性が必要性があるとされている。

各毒性分野ごとの代替試験の目的を図-3に示した。スクリーニング試験と毒性発現機序の解析が主であった。

次に、用いている実験系について図-4に示した。いずれの毒性分野でも初代培養細胞を用いている場合が多い。ただし、催奇形性についてはほとんど全胚培養を使用している。

占め、灌流臓器、スライス臓器、遊離細胞、株化細胞はそれぞれ5-10%であった。初代培養細胞での細胞障害性の評価には肝細胞の逸脱酵素活性の測定を指標としている場合が21社と多く、2ないし4社では形態観察、ミトコンドリアの障害性、脂質の定量、ライソゾームの障害性も指標としている。これらの試験はほとんどがラットで実施されており、ウサギ、イヌ、ヒトは1社のみであった。

腎毒性については、実施経験のある会社は13社と少ないものの、31社が必要性はあるとしている。しかし、確立したが日常的でない、あるいは現在中止している会社が7社と半数を越えている。その理由として毒性試験では重要な標的臓器はあるが、毒性試験結果との相関性がまだ不十分であるとの回答が数社からあった。実施の目的はスクリーニング試験、毒性発現機序の解析がそれぞれ40%と80%を占め、動物愛護、経費節減、申請関連が1-2社ずつであった。また、実験系は株化細胞を用いる系が70%を占め、スライス臓器、遊離細胞、初代培養細胞はそれぞれ1-2社であった。株化細胞はラット由来のNRK52E細胞、ブタ由来のLLCPK1細胞が用いられ、障害性の指標としては、細胞の形態、細胞の逸脱酵素活性の測定を実施している。

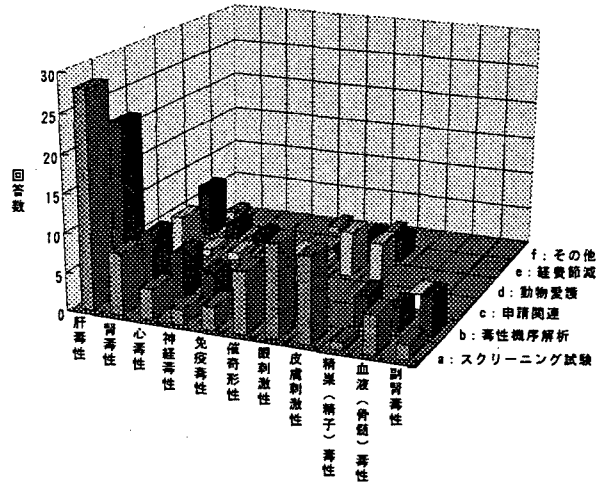


図-3 主な代替試験の目的

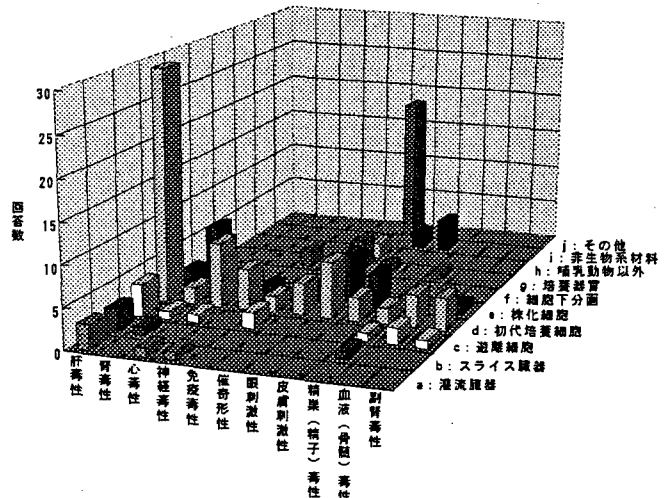


図-4 主な代替試験の実験系

心毒性については、実施していないところが90%と多く、実施しているところでも日常的ではなく、確立はしている、あるいは中止しているところが多い。この理由としては目的のところでも明らかなように毒性が発現したときのみその機序について検討する場合が多いためであろう。用いられている実験系は初代培養細胞が多

く、その障害性の指標にはGOT, CPK, LDHなどの酵素活性、拍動変化、形態変化が採用されている。灌流臓器を用いている場合には心内圧、心電図などが指標とされている。

催奇形性については、生殖・発生毒性試験との関連でよく実施されているはずと考えられたが、結果的には約30%の実施経験しかなかった。さらにそのなかでも約半数は日常的でなく、あるいは中止している。一方、必要性があるが実施していない会社の理由は情報収集中、適切な系がない。設備・技術・人手・コストなどがおもな理由であった。実験目的はほとんどがスクリーニング試験と毒性発現機序の解析であった。用いている実験系は全胚培養が60%を占めていた。次に多いのは気管培養であり、MICROMASS CULTURE法が用いられているが、in vivoとの相関がよくない。また、哺乳動物以外としてニワトリの胚を使用している場合も2社みられた。

免疫毒性はほとんど実施されていないが、現在検討中のところが6社あり、今後増えていくことが予想される。目的はスクリーニング試験と毒性発現機序の解析が主で、実験系としては初代培養細胞、遊離細胞を用いており、細胞としては脾細胞、末梢血リンパ球を用いている。実験項目としては抗体産生能としてPFCassay, リンパ球幼若化反応が主に実施されている。

神経毒性もほとんど実施されていないが、現在検討中のところが4社あり、今後増えていく可能性が考えられる。目的はスクリーニング試験と毒性発現機序の解析が主で、実験系としては主として初代培養細胞と培養器官が使用され、その指標としてはGABA受容体結合や細胞死亡率、器官培養では神経突起の伸張をみている。

眼の局所刺激性は13社で実施されている。目的はスクリーニング試験が約半数を占めているが、他の毒性分野と違い、動物愛護の点も6社と多いのが特徴である。実験系としては初代培養細胞、株化細胞を用いる系が80%を占め、非生物系材料のキットも2社利用されていた。

皮膚の局所刺激性は11社で実施されているが、その目的は眼の場合と同様にスクリーニング試験と動物愛護、経費節減であった。実験系としては初代培養細胞、株化細胞、非生物系材料のキットも4社利用されていた。眼・皮膚の局所刺激性は必要性があるにとらえているところが多いのも特徴である。

その他の器官・組織については、骨髄・副腎が比較的实施されている。また、精巣に関して必要性があるとするところが多いのは、雄性生殖能についての議論がなされていた時期と重なっているためではないかと思われる。

代替試験においてはその実験系の精度を保証するためにバリデーションを行うこ

とが必要であり、各社でどのように実施されているか、どの程度まで対応すべきかについて調べた。陽性対照物質との比較19社、in vivo実験との相関性13社と多く、その他にはバックグラウンドデータとの比較9社、施設間での評価（バリデーションスタディ）8社、文献データとの比較8社、再現性をみる3社であった。

さらに、いくつかの方法を組み合わせる、代替試験の目的によりバリデーションは異なるという意見が7-8社と多く、この場合には完全代替の場合には広範囲なバリデーションスタディが必要であるが、毒性機序解析には特に必要ない、スクリーニング試験では陽性対照物質との比較でよい、などの意見もあった。

これ以外にバリデーションとして特に意識していないが3社、バリデーションは困難であったが3社あり、その理由として薬理作用を考慮すると薬剤ごとに微修正が必要、対象器官に対するreference drugがないことがあげられている。

代替試験の将来の導入予定については、導入予定ありと条件つきで導入予定ありが36社と過半数を占めた。条件つきで導入予定ありとした条件は申請資料で用いられるようになる、代替試験法が確立した時、必要性を認めた時であり、予定はないが、条件により考えるの場合も同様の条件であった。導入予定ありの目的は申請がらみとスクリーニング試験、毒性発現機序の解析であった。

各社の代替試験についての意見をまとめてみると、代替法の推進派は20社余であり、スクリーニング試験、毒性発現機序の解析に有用である、また動物愛護の面からもより発展させるべきとの声であったが、20社弱の慎重派は行政側の対応がなされておらず、現行の毒性試験の代替として確立していない、in vivoとin vitroの相関性が不十分である。動物愛護ならばむしろ使用動物数を減らす努力が必要であるなどであった。

今後の代替法の在り方として、動物実験のための代替というよりもヒトにいかに関与するかの観点から代替法を発展させていくことが重要であり、in vivoとin vitroの相関性のよい実験系を作り、その系について広く情報を公開し、多数の参加によるバリデーションテストを実施して、バックグラウンドを充実した後、科学的な裏付けをもとに試験系として当局に認知してもらう努力が必要であると考えている。

最後に、このアンケート調査にご協力頂いた製薬協加盟各社と多大の労力を費やして頂いた住友化学工業の甲田 彰さんを長とする製薬協一般毒性ワーキンググループC班の皆様に感謝いたします。

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

国立衛生試験所

安全性生物試験研究センター 毒性部

金子 豊 蔵

ドレイズ眼粘膜刺激性試験⁽¹⁾は、医薬品や化粧品等のヒトにおける眼粘膜刺激性を評価するために使われてきた。近年、動物福祉・愛護の観点から、この試験が批判の対象となっており、さまざまな代替試験法が提案され、バリデーションが世界中で行われている。われわれもドレイズ代替法のバリデーションを、平成2年から7年まで6年間にわたり厚生科学研究費の助成を受けて行なってきた⁽²⁾。バリデーションの協力機関は、国立衛生試験所、横浜市大、昭和大、理研ジーンバンク、キットメーカー4社、主力は日本化粧品工業連合会加盟18社で、産・官・学の協力のもとに行われた。10（細かく分けると14）の代替試験法に延べで241施設の参加があった。平成2～3年は実際にバリデーションに入るための準備期間で、ドレイズ試験法とその代替法に関する文献調査に費やされた。バリデーションに入ってから平行してドレイズ試験法についての実験的な検討が継続して行われた。筆者はこの準備期間に検討されたこと及びドレイズ試験の検討結果について紹介する。

1) 代替法に係わる最近の動向

世界中で動物実験代替法のバリデーションが行われている背景の一つに、ヨーロッパ共同体理事会による「化粧品に関する加盟国法規の近似化指令（93/35/EEC）1993年6月14日付の第6改正」がある。それは「成分もしくは成分混合物の動物試験は、1998年1月1日より禁止されるべきである；ただし、当落日までにそれに代わる試験方法が科学的に実証されない場合には、当落日は延期されることになる；委員会はかかる方法に関して進捗報告を提出する必要がある。」というものであった。しかし、原料については、動物実験の禁止を延期する改正指令が1997年1月にでる見込みとなっている。

また、大きな動きとして、1996年1月22-24日にスウェーデンのソルナ市で「毒性試験の代替法に関する技術的適合性と受け入れ体制の各国間協調のための経済協力開発機構（OECD）ワークショップ」が開かれ、「①バリデーションとアクセプタンスの基本要件 ②バリデーションの手順書 ③眼粘膜・皮膚刺激性試験についてのアセスメントスキーム」

の3つのワーキンググループに分かれて討議が行われ、③で眼刺激性、皮膚刺激性、光毒性についてのアセスメントスキームが示された⁽³⁾。

ここでは眼刺激性についてのスキーム (Fig. 1) について簡単に紹介する。

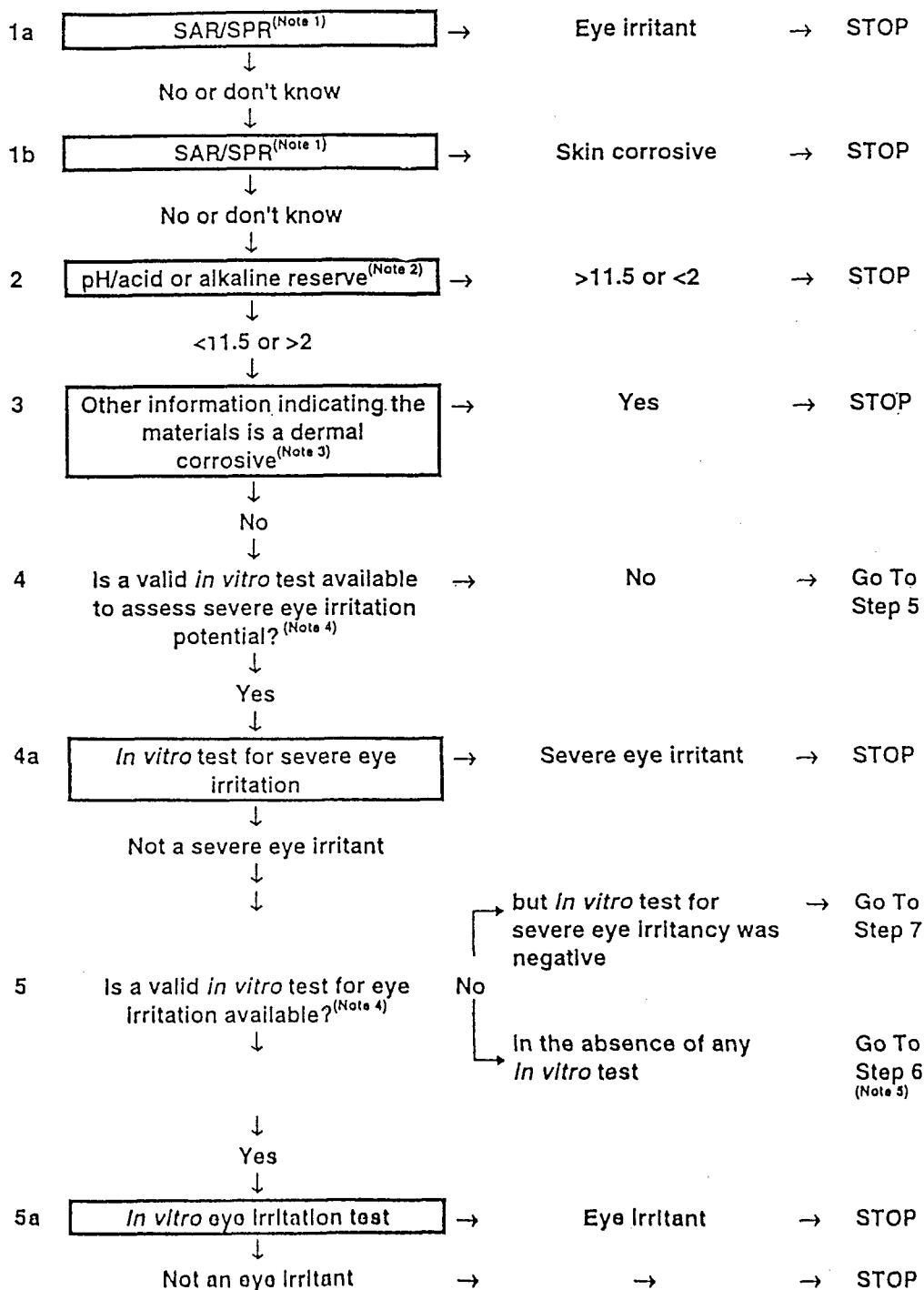
化学的な構造活性／物性相関から眼刺激性の物質や皮膚腐食性の物質、pHが11.5以上または2以下の物質、他の物質情報で皮膚腐食性の物質については、それぞれのステップで試験を中止する。そうでなければステップ4に進み、強眼刺激性を評価するインビトロ試験系がないときはステップ5に進み、試験系がある時にはステップ4a強刺激性のためのインビトロ試験を行う。その結果、強刺激性であれば試験を中止し、強刺激性でないときは、ステップ5へ進み、有効な眼刺激を評価するインビトロ試験があればステップ5aで刺激性を評価して終える。適当なインビトロ試験がない場合、強眼刺激性インビトロ試験が行われていてマイナスならばステップ7へ行く、いかなるインビトロ試験もない場合はステップ6で実験的に皮膚腐食性を評価する。このとき可能ならばインビトロの試験で評価を行う。腐食性であれば試験を中止し、腐食性でなければステップ7で、一匹のウサギによる試験を行う。このインビボの試験で強刺激性であれば試験を中止し、強刺激性でないときはさらにステップ8でウサギを1、2匹追加して試験を行い評価する。

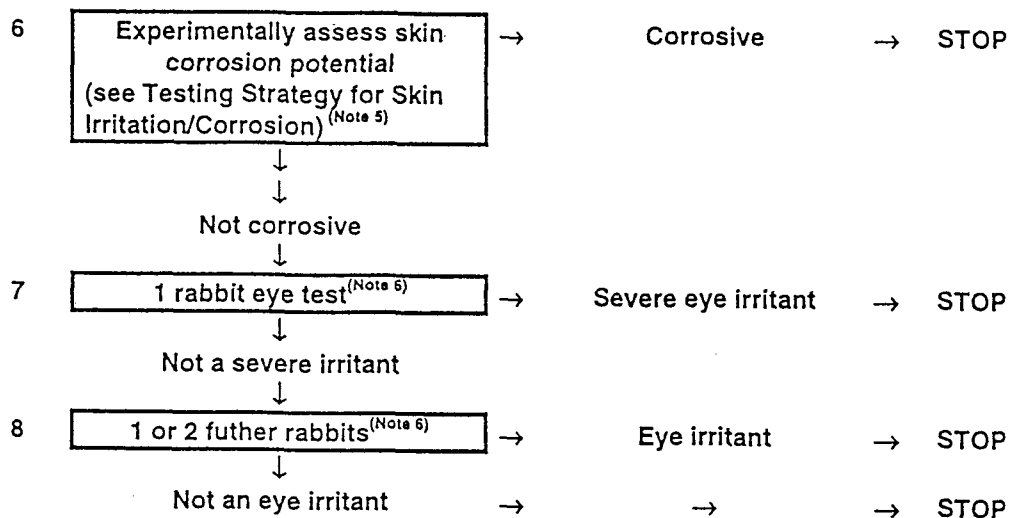
バリデートされ、受け入れられるべき代替法が存在するときに、このSTRATEGYは可能になるが、ステップ5aのインビトロ試験で中程度の刺激性評価を終了することが可能であるかどうか、今後の課題だと思われる。

動物試験を代替法に置き換えていくというOECDの方針は、ECVAM (European Center for the Validation of Alternative methods) やECETOC (European Center for the Ecotoxicology and Toxicology of Chemicals)、COLIPA (European Cosmetic Toiletry and Perfumery Association)、米国の13省庁の統合協議団体ICCVAM (Interagency Coordinating Committee on the Validation of Alternative Methods)、学術団体としてはJohns Hopkins Univ.のCAAT (Center for Alternatives to Animal Testing) などによって牽引されていると言える。

この背景には、第一に2000種に及ぶ新規化学物質の毎年の国際市場への参入があり、これにより安全性評価のための動物実験の増加がある。第二には「科学的な基礎を持った毒性学の再構築」が求められ始めていることである。行政毒性学(regulatory toxicology)から、いわば毒性機構学(mechanistic toxicology)へ脱皮させ、近代化を進めようとする動きがある。第三には動物愛護や自然保護の問題である。そして第四に代替法の方向性を複

Fig. 1 PROPOSED TESTING STRATEGY FOR EYE IRRITATION/CORROSION





Notes to the Proposed Testing Strategy for Eye Irritation/Corrosion

- Note 1: SAR/SPR for eye irritation and skin corrosion are shown separately but in reality would probably be done in parallel. This stage should be completed using validated and accepted SAR/SPR approaches.
- Note 2: Although measurement of pH alone may be adequate, assessment of acid or alkali reserve is likely to be more useful.
- Note 3: This information should be restricted to that which pre-exists. No laboratory or animal work need be conducted at this stage.
- Note 4: These must be alternative methods which have been validated and accepted as per the criteria established by the Workshop.
- Note 5: In the absence of any other information on skin corrosion, it is essential to obtain this via a rabbit skin corrosion/irritation test before proceeding to a rabbit eye irritation test. This must be conducted in a staged manner. If possible, this should be achieved using a validated, accepted *in vitro* skin corrosivity assay. If this is not available then the assessment should be completed using animal tests (see the skin irritation/corrosion strategy).
- Note 6: Staged assessment of eye irritation *in vivo*. Further analysis of existing data is required to determine whether 2 or 3 rabbits in total are required.

難にしている要因として、ヨーロッパの統合があり、また医薬品と同じように化粧品規制におけるハーモナイゼーションが絡んでいると思われる。

2) バリデーションの目的と特徴

この厚生科学研究の目的は、ドレイズ試験により得られる情報及びドレイズ試験代替法について調査・研究し、化粧品の眼粘膜刺激性の評価法におけるインビトロ試験法の利用の可否を判断するための基礎的なデータを得ることにある。その結果、可能ならばインビトロ試験法を組み込んだガイドラインを作成することを目的にしている。

特徴としては、①産・官・学の密接な協力によるバリデーション、②微調整しながら三次にわたるバリデーションを実行、③幅広く文献調査を行い、試験法と被験物質を選択、④一つの方法を複数の機関で検討、⑤一つの機関が複数の方法を検討、⑥試験実施経験者を中心にSOPを作成し、試験を実施、⑦試験法を統一し、技術講習会を開催、⑧被験物質を盲検として配布、⑩被験物質を化粧品原料に絞った、⑪同一の被験物質についてドレイズ試験を実施したことなどが挙げられる。

バリデーションを行う代替法の選択基準として、①使用動物数の削減につながり、②倫理性の面で問題がなく、残酷な印象を与えない試験であること、③操作が容易であり、標準化の可能性があり、結果判定に客観性があること、④研究室内および研究室間での再現性があり、試験系の特性が明らかで、対応するインビボ試験の毒性指標が明確であること⑤試験系の感度がよく特異性が明らかであること、⑥インビボ試験結果やヒトの結果との対応性がよいこと、⑦適用可能物質が明確であることを考慮した。

被験物質は、①インビボでの刺激性データがあること、②刺激性のない物から強刺激性のものまで均等に振り分け、インビトロとインビボの結果の対応図を書きやすく出来ること、③眼粘膜刺激性標準物質として相応しい特性、すなわち化学的な安定性、品質の均一性、供給の安定性があること等を基準として選択した。

3) ドレイズ試験

ドレイズ試験は、ウサギ眼瞼嚢内へ被験物質点眼後、一定の判定基準(Table 1)に従い、角膜の混濁の程度と面積により最大80、虹彩の変化により最大10、結膜の発赤、浮腫、流出物により最大20、最大総評価点110の評点付けを行う。ヒトにおける目の機能における障害の重要性からドレイズ評点は角膜の障害に重きが置かれている。

Table 2にドレイズ試験から得られる情報を整理した。表に示すような多彩な情報をドレ

Table 1 Draize 試験の刺激性評価基準

		評 点
① 角膜		A×B×5
A 混濁の程度		最大 80
混濁なし～白濁し、虹彩が認められない	0～4	
B 混濁の面積		
0～ 4/4	1～4	
② 虹彩		A×5
正常～対光反射なし、出血、組織破壊	0～2	最大 10
③ 結膜		(A+B+C) × 2
A 発赤		最大 20
正常～潤湿性の牛肉様赤色	0～3	
B 浮腫		
腫脹なし～腫脹、眼瞼が半分以上閉じる	0～4	
C 分泌物		
分泌物なし～分泌物がかなりの部分を濡らす	0～3	
		最大合計 110

Table 2 ドレイズ眼粘膜刺激性試験から得られる情報と対応する代替法

ドレイズ試験からの情報	CAM	赤血球	皮膚疹 ¹⁾	SIRC	ヒト 培養細胞	動物 培養細胞	EYTEX
① 角膜混濁							
a 膜実質 (コラーゲン) の変性	▲	×	○	×	×	×	○
b コラーゲンの溶解 (上皮・内皮の障害度に依存)	▲	×	○	×	×	×	○
c 上皮細胞の変性・剥離 (細胞毒性による)	▲	▲	○	○	○	○	×
② 虹彩							
a 経角膜吸収と虹彩損傷性	×	×	×	×	×	×	×
b 対光反射	×	×	×	×	×	×	×
③ 結膜							
a 発赤 (炎症性血管拡張)	○	×	▲	▲	▲	▲	×
b 浮腫 (炎症性の浮腫)	▲	×	▲	▲	▲	▲	×
c 分泌物 (涙液の過剰分泌・炎症性浸潤反応)	×	×	×	×	×	×	×
④ 経過観察からの情報							
a 修復性	▲	×	▲	▲	▲	▲	×
b 遅発性の有無	▲	▲	▲	▲	▲	▲	×
⑤ ドレイズの観察項目にない情報							
a 角膜潰瘍 (角膜上皮の損傷・欠落)	×	×	×	×	×	×	×
b 角膜の凹凸 (乾燥性・凹地形成)	×	×	×	×	×	×	×
c 洗浄による障害の軽減性	○	×	○	▲	▲	▲	×
d 痛みの評価 (行動観察・瞬目回数・閉眼)	×	×	×	×	×	×	×
e 物理的刺激による障害の検出 (不溶性物質)	×	×	×	×	×	×	×

注 (バリデーション開始前の文献に基づく評価で、○ : 対応、▲ : 検討の必要、× : 対応不能)

Table 3 ヒトとウサギの眼粘膜刺激性に影響する相違点

	ウサギ	ヒト
1. 解剖学的・生理学的差異		
角膜、Bouman膜	薄い	厚い
瞬膜	発達	退化
瞬き反射	未発達	発達
眼房水の pH	8.2	7.1～7.3
眼瞼	緩い	張りがある
角膜の血管増殖	起こりやすい	起こりにくい
角膜上皮の再生	遅い	早い
涙液腺	未発達	発達
2. 暴露量による差異	多い (0.1ml)	少ない (洗眼処置)
3. 眼障害の回復の早さの相違	遅い	早い

イズ試験から得ているが、代替法から得られる情報量としては僅かであると考えられる。

▲は試験法のメカニズムから情報として得られる可能性があると考えられるもので、実際のバリデーションにおいて充分検討されなければならない。

ウサギとヒトの眼粘膜刺激感受性に関連すると考えられる相違点をTable 3 に示した。これらの解剖・生理学的差異、暴露量の差、回復性の相違が、ヒトよりウサギの感受性が高い原因であると思われる。

4) 一次・二次バリデーションにおけるドレイズ試験結果

一次では界面活性剤を中心とした10の被験物質、二次では15の化粧品原料について、10%濃度を中心にその0.1mlを各3匹のStd: NZWウサギの右眼結膜囊内に点眼し、ドレイズの判定基準に従って、7日間観察し、さらに刺激が継続するときは14日間観察した。二次バリデーションでは、最大平均評価点(MAS) 20を目安にして、0.1、1、100%濃度の試験を追加した。それらの結果を table 4 に、個々の動物の総評価点と平均総評価点の時間推移および Kay and Calandraの変法による刺激性の評価区分(0.0~0.5: non-irritant, 0.5~15: slight irritant, 15~25: mild irritant, 25~50: moderate irritant, 50~110: severe irritant) を Fig. 2 に示した。mild irrit.で個体間のバラツキが多く見られる。

これら得られた成績すべてのバラツキを、横軸に最大平均評価点(MAS)、縦軸に標準偏差(SD、一群3例)をとりプロットして Fig.3 に示した。最大平均評価点50~70に空白があり、第三次バリデーションでは、mild および severe irritant に相当する物質を多く取り上げなければならないことが示唆された。SD は当然のことながら刺激の弱いところと強いところで小さく、最大平均評価点25~85で大きい。

最大平均評価点25~50、すなわち moderate irritant に評価される物質の評点の SD は、およそ評点の1/2であった。

第一次のバリデーションにおいてS1-7ラウリル硫酸ナトリウム(SLS)は、最大平均評価点15.0を示し、文献値(22.3~40.0)より著しく低い値を示した。文献値からSLSの平均的な最大評価点は30前後なので、前述のことからSDの範囲内であると考えられる。

しかし、SLSの純度により刺激性も変化することが考えられたので、粧原基SLSに加え、試薬1級SLS(和光純薬)の2種のSLSで再度試験を実施した。その結果、表に示していないが、粧原基と試薬SLSの間では平均評価点で差がなく、被験物質の規格の違いによる刺激

Table 4 ドレイズ眼粘膜刺激性試験結果

第一次バリデーション

No.	被験物質	10%		
		MAS	24hr	AUC(%)
(S1-1)	生理食塩水	0.0	0.0	0.0 *
(S1-2)	ポリオキシエチレン硬化ヒマシ油(60E.O.)	0.0	0.0	0.0
(S1-3)	モノラウリン酸ポリオキシエチレンソルビタン(20E.O.)	0.7	0.0	0.1
(S1-4)	モノラウリン酸ポリエチレングリコール(10E.O.)	3.3	0.0	0.2
(S1-5)	ラウロイルサルコシナトリウム(30%水溶液)	10.3	8.3	3.4
(S1-6)	N-硬化牛脂脂肪酸-L-グルタミン酸ナトリウム	26.7	26.7	14.9
(S1-7)	ラウリル硫酸ナトリウム	15.0	14.7	7.1
(S1-8)	ポリオキシエチレンラウリルエーテル硫酸ナトリウム (2E.O.) (27%水溶液)	10.0	2.7	2.0
(S1-9)	ポリオキシエチレンオクチルフェニルエーテル(10E.O.)	41.3	24.7	26.9
(S1-10)	塩化ベンザルコニウム	78.0	78.0	57.3

*:100%

第二次バリデーション

No.	被験物質	100%			10%			1%		
		MAS	24hr	AUC(%)	MAS	24hr	AUC(%)	MAS	24hr	AUC(%)
(S2-1)	ショ糖脂肪酸エステル	28.3	23.0	18.1	11.0	5.7	1.6			
(S2-2)	グリセリン	4.7	0.0	0.2	0.0	0.0	0.0			
(S2-3)	赤色104号	71.0	36.3	47.6	25.0	20.3	15.6	0.7	0.0	0.1
(S2-4)	モノリン酸ポリオキシエチレン(20E.O.)	4.7	0.7	0.4	0.0	0.0	0.0			
(S2-5)	チオグリコール酸カルシウム	79.7	52.3	61.8	4.0	2.7	0.9			
(S2-6)	塩化ジステアリアルジメチルアンモニウム	96.3	73.3	78.3						
(S2-7)	パタリル安息香酸4-チルキル	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0			
(S2-8)	塩化セチルピリジニウム (0.1%: 2.7	2.7	0.6)		94.7	93.0	79.5	34.7	19.3	23.2
(S2-9)	パラオキシ安息香酸メチル	8.7	3.3	1.5						
(S2-10)	ミリスチン酸イソプロピル	0.0	0.0	0.0	0.7	0.0	0.0			
(S2-11)	ポリエチレングリコール400	4.0	0.0	0.2	0.0	0.0	0.0			
(S2-12)	無水ケイ酸	2.7	0.0	0.1						
(S2-13)	ベンジルアルコール	31.0	12.0	20.3	23.0	23.0	14.3	0.0	0.0	0.0
(S2-14)	サリチル酸ナトリウム	83.7	37.7	60.5	0.0	0.0	0.0			
(S2-15)	メタフェニレンジアミン (除外)	80.7	53.3	62.5	4.3	0.7	0.4			

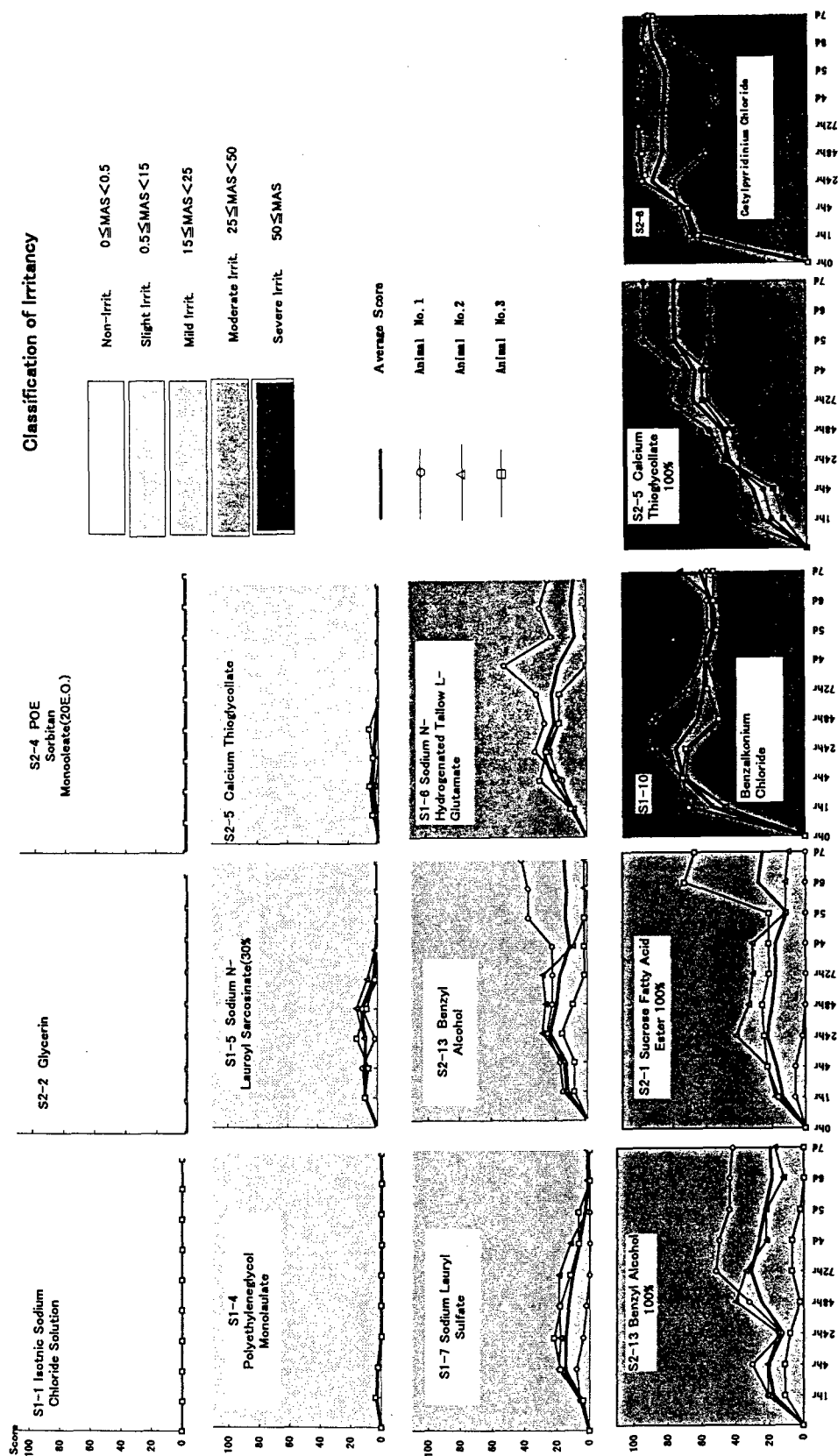


Fig. 2 Changes of Individual and Average Draize Score after Treated Some Test Chemicals (10% and 100%) for Rabbits

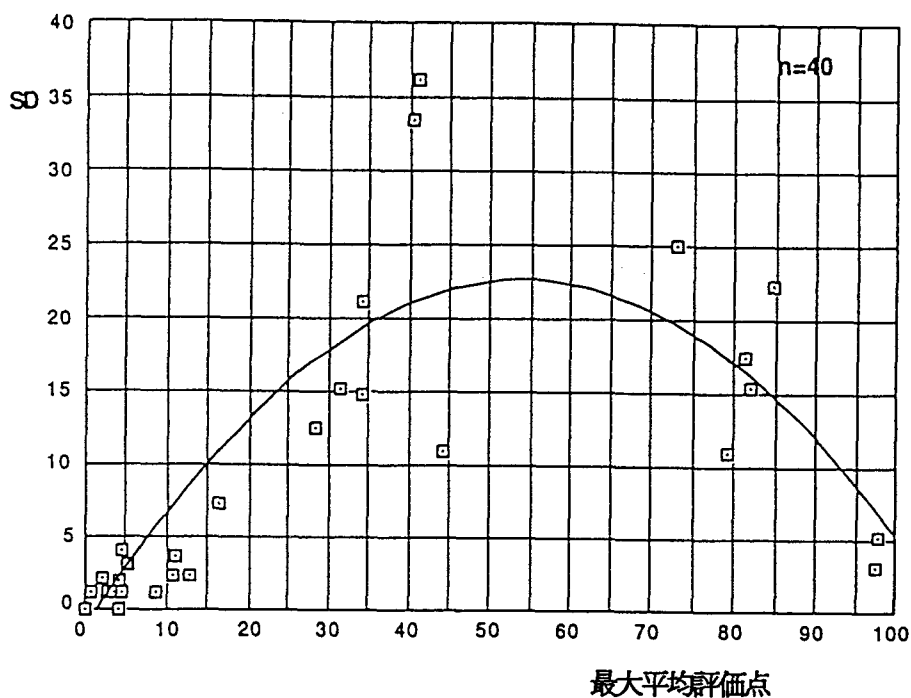


Fig. 3 ドレイズ試験における最大評価点のバラツキ

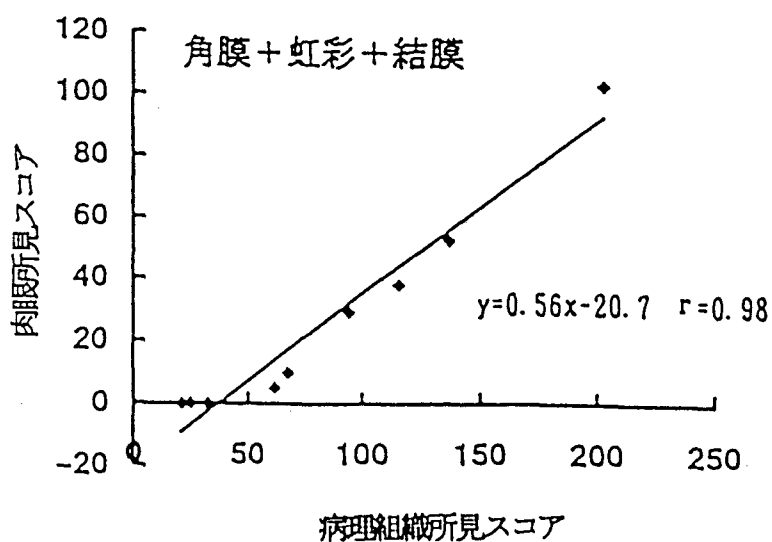


Fig. 4 肉眼所見と病理組織所見のスコア

性の相違はなかったが、ともに大きなバラツキが見られた。

5) ドレイズ評点と病理組織学的変化

ドレイズ代替法の一次バリデーションで使用した9種の界面活性剤と生理食塩水をそれぞれ4例のウサギに点眼し、24時間後と7日後のドレイズ評点と病理組織学的変化の相関性について検討した。被験物質はすべて盲検とし、組織検査の際にも標本はブラインドとして検査を行った。

ドレイズ評点、病理組織評点とも角膜、虹彩、結膜のそれぞれの最大評点を100とすると、Fig. 4 に示すように $r=0.98$ と高い相関を示した。このことからドレイズの評点は重みづけをはずすと病理組織変化とよく一致し、ドレイズ評点法の妥当性を示すものと考えられた。

次にいくつかのドレイズ評点と病理組織変化の具体例を示す。Photo 1, 2はともに結膜ドレイズ評点 0 の結膜円蓋部で、Photo 1は生理食塩水点眼7日目で、リンパ球の集塊と副涙腺が反応増生を示している（組織結膜評点11）。副涙腺に相当する漿液腺はある程度の刺激で増生し、刺激が強まるとむしろ退縮する。Photo 2は S-3 (Polyoxyethylene Sorbitan Monolaurate(20 E.O., Tween20) で、結膜組織スコア18.8と評点したものである。杯細胞の配列は残っているが、リンパ装置は消失し、副涙腺も認められない。

Photo 3は無処置角膜で、角膜上皮の表面は2, 3層の扁平な細胞からなり、その下を立方上の細胞が裏打ちされ、その下にボウマンの膜がある。さらにその下に膠原繊維と繊維芽細胞からなる間質（固有層）がある。間質の繊維はこのように並行して走行している。

Photo 4はTween20で、ドレイズ角膜スコア 0 のものである。角膜上皮細胞の配列の乱れや間質繊維の並行性の乱れ、軽度の不透明感があり、角膜組織スコア20としたものである。

Photo 5, 6はともにS1-10 (Benzalkonium Chloride)で、Photo 5はドレイズ結膜評点10を示した結膜円蓋部で、上皮の著しい変性と剥離、杯細胞の消失、扁平上皮化が見られ、間質は強い浮腫と高度の細胞浸潤がある（結膜組織スコア77.5）。Photo 6はドレイズ角膜評点45を示した例で、上皮の変性、消失、間質繊維の平行性の乱れと密度の増加が見られる（角膜組織スコア70）。

Photo 7はS1-9 (Polyoxyethylene Octylphenylether, 10E.O., Triton X-100)の角膜で、24時間後のドレイズ評点15としたものである。上皮は脱落変性し、間質結合繊維の変性は中程まで及んでおり角膜組織評点75としたもので上皮の変化の方が著しい例である。Photo 8は同じ S1-9 の7日目でドレイズ評点45、組織スコア50としたものである。上皮には再生像がみられるが、間質の変性は著しく肉芽も見られ、間質の変化の方が強い例である。この例

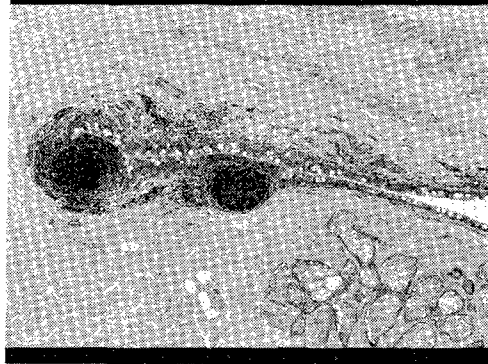


Photo 1

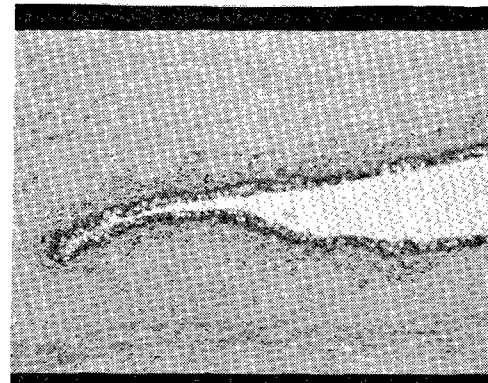


Photo 2

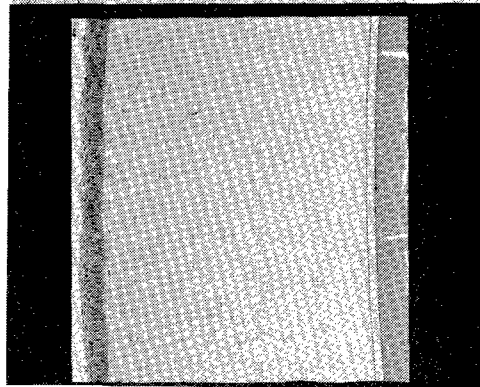


Photo 3

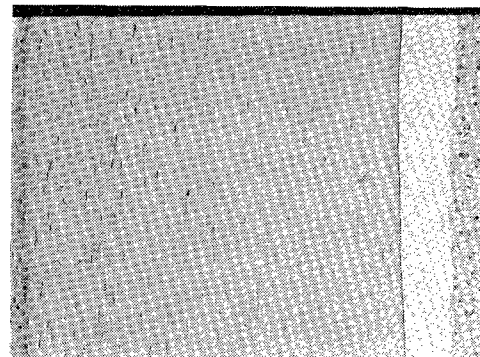


Photo 4

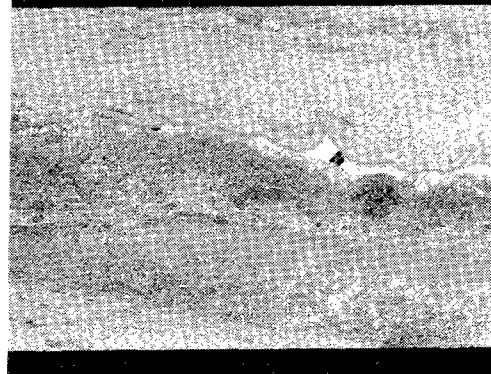


Photo 5

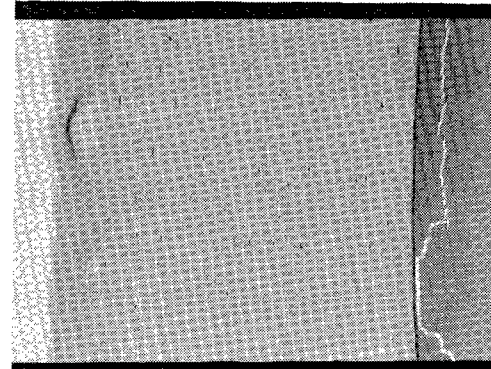


Photo 6

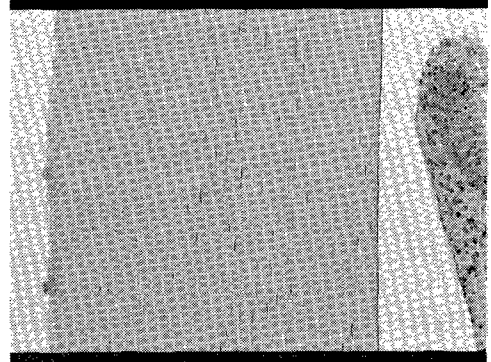


Photo 7

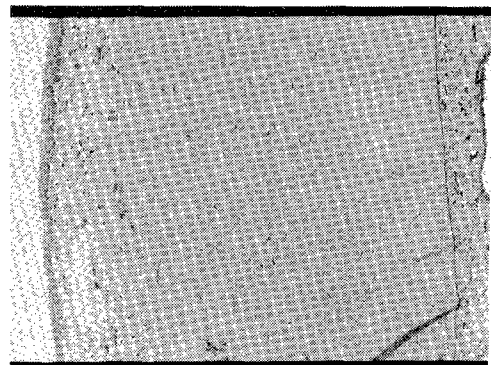


Photo 8

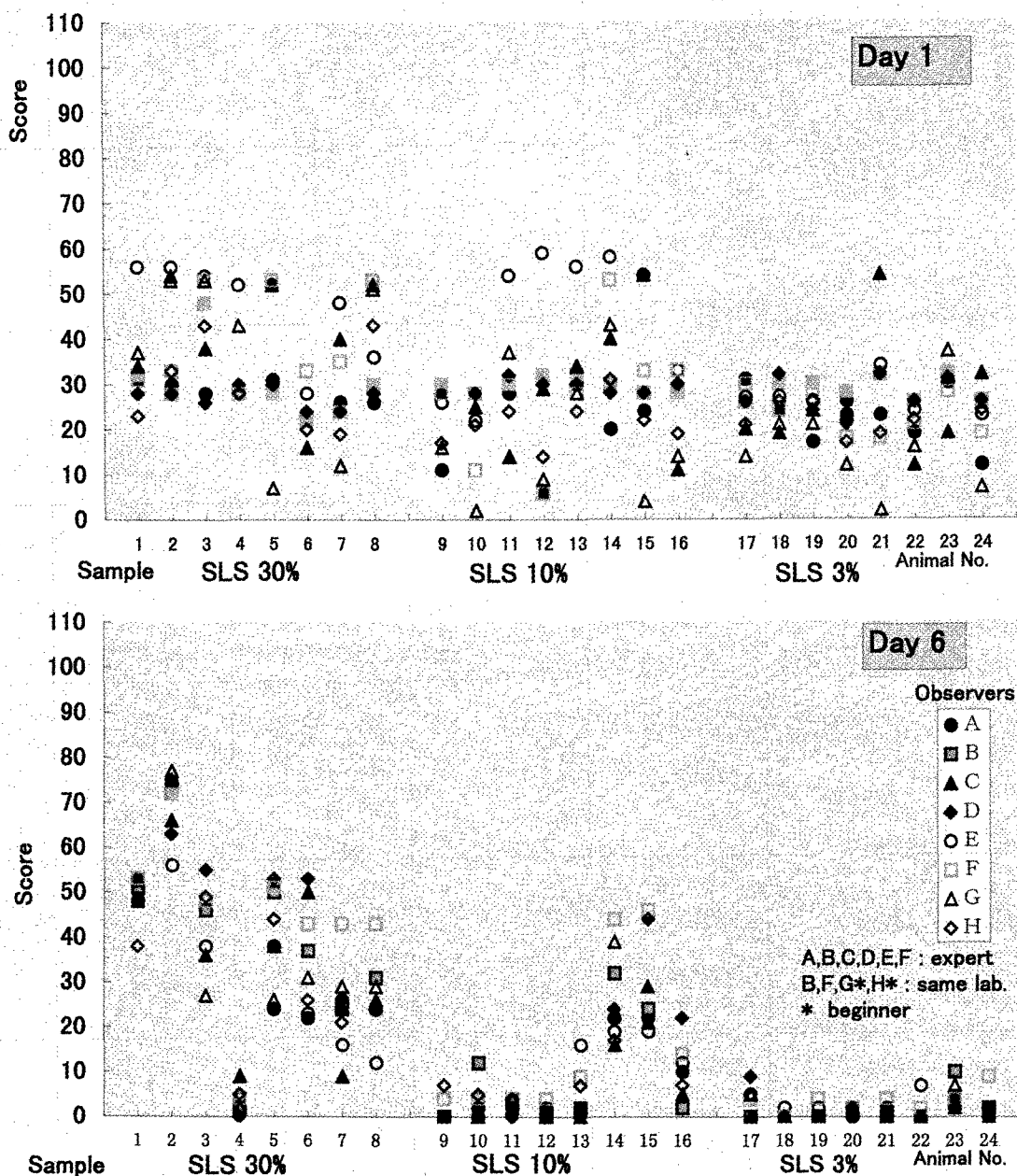


Fig. 5 Valiance of Draize Score by Observers

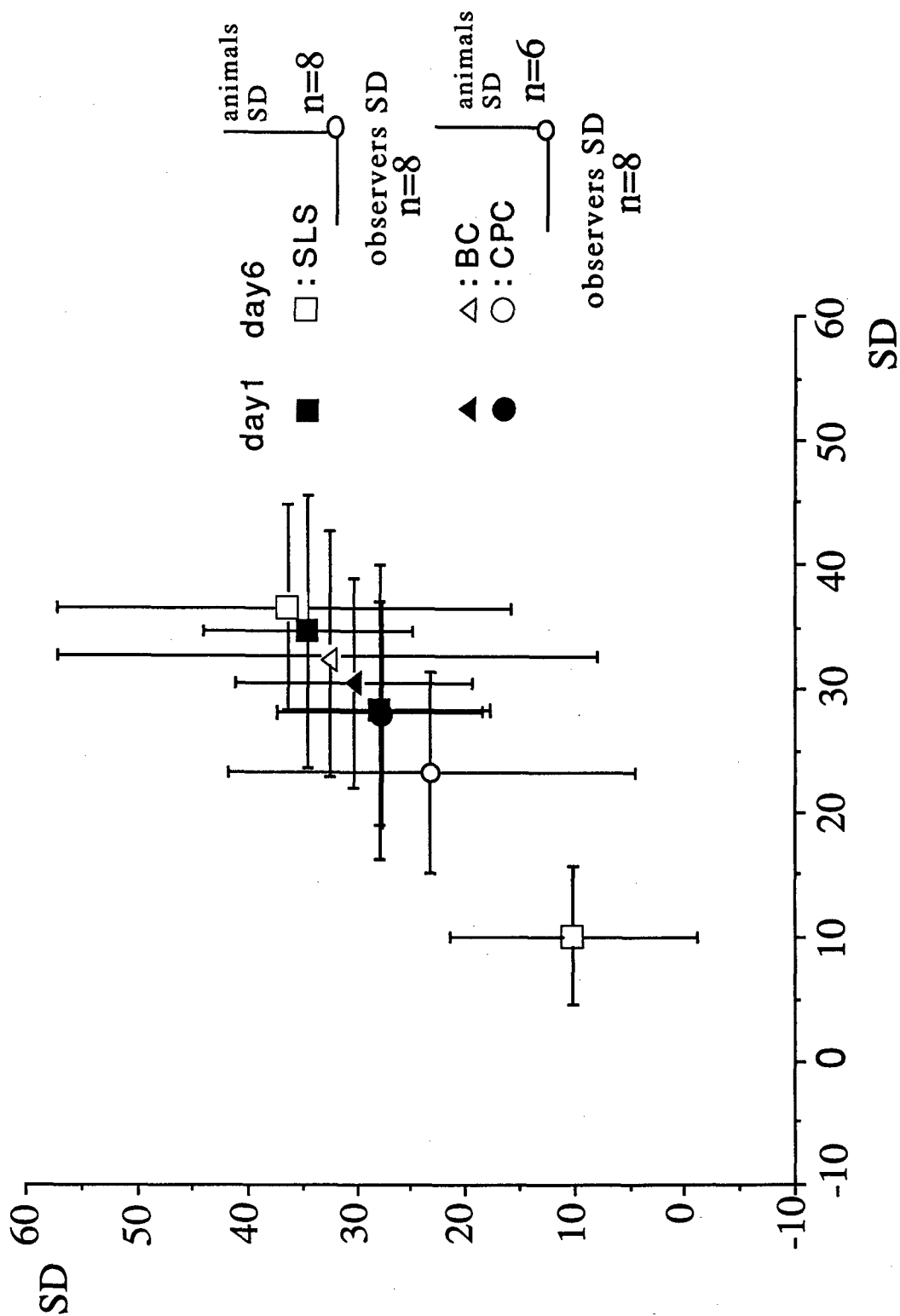


Fig. 6 Comparison of SD between Observers and Animals

ではフルオレッセンの検査でマイナスであったにもかかわらず、強度の白濁がみられた。
この6日目の Triton X-100 の例ではドレイズ評点と組織評点で食い違いが見られた。

6) ドレイズスコアの変動要因についての検討

ウサギの個体差および観察者に起因する評点のバラツキを検討する目的で、Std:JW/CSK
(白色在来種, 日本エスエルシー) 1群8例にSLS(試薬1級) 3%, 10%, 30%溶液(注射用蒸留水)
を点眼し, 24時間後と6日後にすべてブラインドにして, ドレイズ試験の経験者6名と初心
者2名(G, H)により観察を行った。B, F, G, Hは同一施設研究者である。結果を Fig.5 に示
した。

1日後の30%群と10%群および6日後30%群、すなわち評点25~60で、観察者によるバラツ
キが見られ、同一施設4名は揃ってやや低めに評点づけする傾向が見られた。

同一動物の評点の観察者間でのバラツキと、同一観察者による群内動物個体間のバラツ
キを比較する目的で、それぞれ縦軸に動物個体間のSD、横軸に観察者間のSDとして Fig.6
に示した。ここでは同時におこなったbenzalkonium chloride(BC)とcetylpylidinumedhl
oride(CPC)の成績を加えて示してある。

3物質とも6日目の観察で、個体間のバラツキが観察者間のバラツキより大きいことを示
している。

7) まとめと考察

個体間でのバラツキが大きくなる原因は、回復期に修復性変化として起こる角膜間質固
有層の肉芽の増生が強く発現する個体があり(写真8)、ドレイズの評点が角膜に重みづけ
をしていることと相まって、個体差を顕著にしていると考えられた。

このようなドレイズ評点の変動についての報告は、1980年代にかなり見受けられ、Ruse
lla⁽⁴⁾ 4施設における施設間変動の報告、Weilらの5実験室でのバリデーションによる個
体差、研究室内変動、研究室間変動を検討した報告⁽⁵⁾、日本産業皮膚衛生協会技術委員会
第2分科会が多価アルコール、炭化水素を用いて6施設で施設間変動を検討した報告⁽⁶⁾等
がある。いずれも施設間の差やウサギの個体間変動が報告されている。このような多くの
試験は、ドレイズ試験の改善を目指したものであり、変動を少なくすることを目的とし、
点眼法を始め実験手技、判定法、評価法等さまざまな提案改良がなされ、眼粘膜刺激性試
験法が現在に至っている。

代替試験法のバリデーションを行うにあたって、いろいろな批判もある⁽⁷⁾が、従来法と新試験法との間の2種のデータセットの相関性を調べるのがまず行われる。比較の基になるドレイズ試験のスコアが安定していないという事実は、既存のドレイズ試験データを当てはめて行うバリデーションでは、大きな誤りを犯すことになると思う。

また、バリデーションにおいて平均最大総評価点や総評価点24時間値、AUC%（時間曲線下面積比）がよく使われる。今回の試験で見る様に、評点25以上の刺激物質で、平均最大総評価点が48時間以後にみられ、回復期に入り総評価点が増加する例が見られた。BC1%の点眼6日に病理検査をした例がこれに相当するが、角膜の変化が著しく、上皮は剝離脱落后著しく肥厚し、間質結合組織の変性や細胞浸潤、肉芽の形成も強度に見られ、薬物による急性炎症後の修復反応を強くあらわした例と考える。こうしたことから代替試験法との相関性を見るときには、急性反応期であり、比較的バラツキの少ない24時間値を用いるのが妥当であると思う。

観察者の評点のバラツキは moderate irritant に評価される評点で、表には示さなかったが、変動係数は24時間値でも6日値でもおよそ0.3前後であるが、動物の個体差によるバラツキは6日で、0.7~1.0の変動係数を示し、このことも24時間値を比較に採用することを支持するものと思われた。

Williamsらも2人の観察者間の変動より、ウサギの個体間の変動が大きいことを既に示しているが、より多人数で行った今回の試験でも動物自体に問題があることが明らかになったと考える。

眼粘膜刺激試験でウサギの系統としては、日本白色在来種（JW/CSK）とニュージーランドホワイト（NZW）が圧倒的に使用され、経験的に日本白色在来種の眼刺激感受性が高いことが知られており、データを示せなかったが、今回それが確認された。また、両眼に同じ物質を点眼し、手技上の差について検討したが、大きな差は見られなかった。

ドレイズ評点の変動要因として、動物の個体差が最も影響する事を示した。特にmoderately irritatingに評価される物質を点眼したときに回復期での動物個体差が大きいことから、平均最大総評価点を用いずに、平均総評価点24時間値を用いてバリデーションを試みる必要があると考えられた。また、現在第三次バリデーションの結果を含め総合的な評価が行われているが、ドレイズ試験のこれらの特性を踏まえた上で代替試験法の評価を行わなければならないと思う。

これらの結果の一部は、日本実験動物代替法学会第9回（平成6年度）研究助成金を受けて行われたものであり、厚生科学研究「新規原料配合化粧品安全性評価のための試験法の研究」班（班長大野泰雄）インビボ試験委託管理班の研究成果であることを付記し、感謝の意を表します。

8. 引用文献

- 1) Draize, J.H.: Dermal toxicity. In Appraisal of the safety of chemicals in Food, Drugs and Cosmetics. p46, The Association of Food and Drug Officials of the United States, Austin, TX. and Federal Register (1978) 43 (163), 37359, (1959)
- 2) Ohno, Y., Kaneko, T., Kobayashi, T. et al.: In Vitro Toxicol. 7, 89-94, (1994)
- 3) Test Guidelines Programme, Final Report of The OECD Workshop on Harmonization of Validation and Acceptance Criteria for Alternative Toxicological Test Methods : OECD, ENV/MC/CHEM/TG(96)9
- 4) Russell, K.L. and Hoch, S.G.: Toilet Goods Assoc., (37) 27, (1962)
- 5) Weil, C.S. and Scala, R.A.: Toxicol. Appl. Pharmacol., 19 : 276, (1971)
- 6) 中村和博, 岡本輝公彦, 濱田俊昭ら: 皮膚, 26 (5) 1065-1074 1984
- 7) 小野 宏: 食品薬品安全センター秦野研究所年報 Vol. 16, 9 (1993)

動物実験代替法について

鐘紡（株） 化粧品研究所

柿島 博

要旨

化粧品原料の安全性評価の一つとして、ドレイズ試験（眼刺激性試験）がある。本試験がインビトロ法で、動物実験が代替可能かどうかを検討する目的で産・官・学共同で平成2年から検討をしている。

ドレイズ試験（眼刺激性試験）より得られる情報、及びドレイズ試験代替法について調査、研究し、化粧品原料の眼刺激性の評価におけるインビトロ試験法の可能性を判断するための基礎的なデータを得ることである。

今回は、本研究課題の骨子を簡略して述べる。なお、結果について既に一部を動物実験代替法学会で報告しているので参考にされたい。

実験動物

表 1

○代替法の基本的な考え方

1. 使用動物数の削減につながる
2. 論理性、残虐な印象を与えない
3. 操作の容易性、標準化の可能性、結果の判定の客観性
4. 再現性（研究室内、研究室内間）
5. 試験系の特性、対応するインビボ試験の毒性指標の明確性
6. 試験系の感度、特異性
7. インビボ試験結果やヒト結果との対応性
8. 適用可能物質の明確性

以上の事を踏まえ、厚生科学研究費の課題（化粧品安全性評価のための試験法開発に関する研究）を実施した。結果及び評価については、平成10年に報告予定である。

今回のバリデーションの特徴

表2

1. 産・官・学の密接な協力によるバリデーション
2. 微調整しながら三次にわたるバリデーションを実行
3. 幅広く文献調査を行い、試験法と被験物質を選択
4. 一つの方法を複数の機関で検討
5. 一つの機関が複数の方法を検討
6. 試験実施経験者を中心にSOPを作成し、試験を実施
7. 試験法を統一し、技術講習会を開催
8. GLPの精神を尊重して試験を実施
9. 被験物質を盲検として配布
10. 被験物質を主に化粧品原料に絞った
11. 同一の被験物質についてドレイズ試験を実施

表3

バリデーションの結果から得られた結果から見た各試験の特徴

試験名	特	徴
CAM 肉眼観察法	In vivo と同条件で試験可能 (適用可能物質の範囲が大きい) 血管反応観察可能	動物個体を用いる 判断に熟練が必要 スコアの範囲が狭い 着色物質では要注意
trypan blue 染色法	In vivo と同条件で試験可能 (適用可能物質の範囲が大きい) 評価が客観的 CAM-肉眼観察法と組み合わせ可能	着色物質では要注意 胎児が露出される ビボとの対応において原体 と溶液とは区別が必要
溶血性試験	簡便で安価 細胞膜直接作用を評価可能	不溶物には適用不可 着色物質では要注意 溶媒により結果に差がでる
Hb変性試験	簡便で安価 蛋白変性作用を評価可能	不溶物には適用不可 着色物質では要注意
Skin ² ZK 110	膜の三次元構造を保持したモデル 培養細胞法と類似した結果	不溶物では結果が不安定 高価 着色物質では要注意
MATREX	膜の三次元構造を保持したモデル In vivo と同条件で試験可能 (適用可能物質の範囲が大きい)	不溶物では結果が不安定 高価
Corne Pack	無血清、正常細胞 細胞の管理が不要で、比較的容易 感度が高い 色素や脂溶性のものでも可能	不溶物では結果が不安定 他の培養細胞系と結果が異なる In vivo 結果との対応は他の 培養細胞法と比べ悪い
培養細胞法	ばらつきが小さく、汎用性が高い 色素や脂溶性のものでも可能 比較的In vivo 結果との対応が良い 細胞種やエンドポイントによる差は 少ない	細胞管理が煩雑 不溶物では結果が不安定 エンドポイントにより評価不能 物質が異なる
EYTEX	In vivo と同条件で試験可能 (適用可能物質の範囲が大きい) 再現性が良い	In vivo 試験との乖離が大きい 高価

表 4

：バリデーションの結果から見た各試験の特徴

試験法名	特 徴	
CAM 肉眼観察法	In vivo と同条件で試験可能 適用可能物質の範囲が大きい 血管反応観察可能 液体試料ではvivoとの順位相関は比較的良好 識別性がやや良い	動物個体を用いる 判断に熟練が必要 スコアの範囲が狭い 着色物質では要注意
trypan blue 染色法	In vivo と同条件で試験可能 適用可能物質の範囲が大きい 評価が客観的 CAM-肉眼観察法と組み合わせ可能 液体試料ではvivoとの相関が順位相関も含め比較的良好 識別性は比較的良好	動物個体を用いる 着色物質では要注意 ピボとの対応において原体と 溶液とは区別が必要
溶血性試験	簡便で安価 細胞膜直接作用を評価可能 再現性が比較的良好 細胞膜に作用して強い刺激性を発現する物質の選択可能	不溶性物質には適用不可 着色物質では要注意 溶媒により結果に差がでる
Hb変性試験	簡便で安価 蛋白変性作用を評価可能 蛋白変性陽性物質では再現性が良い 蛋白変性を介して強い刺激性を発現する物質の選択可能	着色物質では要注意
人工皮膚モデル Skin2 ZK1100	膜の三次元構造を保持したモデル 培養細胞法と類似した結果 再現性が比較的良好 酸、アルカリ、アルコール以外ではvivoとの相関性が比較的良好。 順位相関？	不溶物では結果が不安定 高価 着色物質では要注意
MATREX	膜の三次元構造を保持したモデル In vivo と同条件で試験可能 適用可能物質の範囲が大きい 再現性が比較的良好 vivoとの順位相関は比較的良好	不溶物では結果が不安定 高価
CornePack	無血清、正常細胞 細胞の管理不要で、比較的容易 他の細胞系と比較し感度が高い 色素や脂溶性のものでも可能 再現性が比較的良好 酸、アルカリ、アルコール以外では識別性が比較的良好	不溶性物質では結果が不安定 他の培養細胞系と結果が異なる 他の培養細胞法と比べin vivoとの対応が悪い
培養細胞法	汎用性が高い 色素や脂溶性のものでも可能 細胞種やエンドポイントによる差は少ない 再現性が比較的良好 酸、アルカリ、アルコール以外ではvivoとの相関性が順位相関も含め良い 酸、アルカリ、アルコール以外では識別性が良い	細胞管理が煩雑 不溶性物質では結果が不安定 エンドポイントにより評価不能物質が異なる
EYTEX	In vivo と同条件で試験可能 適用可能物質の範囲が大きい 再現性が良い	In vivo 試験との乖離が大きい 高価

再現性が良い：CV<0.3、再現性が比較的良好：CV<0.5

vivoとの相関性良い： $r > 0.9$ 、相関性比較的良好： $r > 0.8$

識別性が良い：4段階評価での2段階誤評価が5%以内。

識別性が比較的良好：4段階評価での2段階誤評価が10%以内。

識別性がやや良い：4段階評価での2段階誤評価が15%以内。

表5

ドレイズ試験及び対応する情報が代替法から得られる可能性

ドレイズ試験からの情報	代替法からの情報								
	摘出 眼球法	摘出 角膜法	受精鶏卵 膀胱膜法	溶血法	人工皮膚 モデル	眼由来 細胞株法	ヒト由来 細胞法	動物由来 細胞法	蛋白質 変性法
角膜混濁									
膜実質（コラーゲン）の変性	○	○	▲	×	○	×	×	×	○
コラーゲンの膨潤（上皮・内皮障害依存）	○	○	▲	×	○	×	×	×	○
上皮細胞の変性・剥離（細胞毒性による）	○	○	▲	▲	○	○	○	○	×
虹彩									
経角膜吸収と虹彩損傷性	○	×	×	×	×	×	×	×	×
対光反射	○	×	×	×	×	×	×	×	×
結膜									
発赤（炎症性血管拡張・出血）	×	×	○	×	▲	▲	▲	▲	×
浮腫（炎症性浮腫）	×	×	▲	×	▲	▲	▲	▲	×
分泌物（涙液の過剰分泌・炎症性浸潤反応）	×	×	×	×	×	×	×	×	×
経過観察からの情報									
修復性	×	×	▲	×	▲	▲	▲	▲	×
遅発性の有無	×	×	▲	▲	▲	▲	▲	▲	×
その他（ドレイズ試験観察項目には無い）									
角膜損傷（角膜上皮の損傷・欠落）	○	○	×	×	×	×	×	×	×
角膜の凹凸（乾燥性・凹地形成）	○	○	×	×	○	▲	▲	▲	×
洗浄による障害の軽減性	○	○	○	×	×	×	×	×	×
痛みの評価（行動観察・瞬き回数・閉眼）	×	×	×	×	×	×	×	×	×
物理的刺激による障害の検出	×	×	×	×	×	×	×	×	×

○：原理的に評価できる可能性あり、▲：原理的に評価不能だが、間接的に対応はあるかも知れない、×：評価不能あるいは可能性低い

表 6

ドレイズ眼粘膜刺激性試験代替法の評価

行政的に受け入れられる際の考慮点	評価基準	Draize試験	IET-CAM	CAM-TB	RBC	HB毒性	Skin2*	MATREX	CornePack	SIRC-CV	SIRC-NR	HeLa-MTT	CHL-CV	EYTEX
実験材料の入手は容易か	1	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○
特殊な実験施設、機器を要するか	2	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	△
実験操作は比較的容易か	1	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○
実験操作は標準化されているか	1	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○
判定基準は客観的か	1	△	△	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○
判定までに時間的を要するか	3	△	△	○	○	○	△	△	△	△	△	△	△	○
経済性	4	×	○	○	○	○	×	×	△	○	○	○	○	×
製品形態のもので試験が可能か	5	○	○	○	△	△	△	○	△	△	△	△	△	○
ピボでの用量依存性の検出が可能か	5	○	○	○	×	×	×	○	×	×	×	×	×	○
適用可能物質の標準の検出は可能か	6	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○
適用可能物質の範囲は広い	7	○	○	○	×	×	△	○	△	△	△	△	△	○
再現性は良いか	8	約0.7**	○*	△*	○*	◎*	○	○	○	-	○	◎	○	◎
対応するin vivo の障害機構が明確か	6	-	△	△	○	○	△	△	△	△	△	△	△	○
動物試験結果との対応は良いか	9	-	△	△	○	○	◎	○	△	◎	◎	◎	○	×
減毒な印象を与えないか	1	△	△	△	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○
関連学会に受け入れられているか	10	◎	△	×	×	×	△	×	×	×	×	×	×	△
行政機関に受け入れられているか	11	◎	×	×	×	×	×	×	×	×	×	×	×	×

評価基準 1 : ○ : 特に問題は無い、△ : 若干問題がある、× : かなり問題がある。

評価基準 2 : ○ : 通常の安全性試験機関が所有する機器で可能、△ : 経費はそれほど無いが特殊な機器を要する、× : 高価な特殊機器を要する

評価基準 3 : ○ : 1 日以内に完了、△ : 1 週間以内、× : 1 週間以上 (準備期間は含まない)

評価基準 4 : 1 検体 ○ : 1 万円以下、△ : 1 - 3 万円、× : 3 万円以上

評価基準 5 : ○ : 可能、△ : 一部可能、× : 困難

評価基準 6 : ○ : 明確、△ : かなり明確、× : 不明確

評価基準 7 : ○ : 広い、△ : 若干制約されている、× : 狭い

評価基準 8 : 施設内あるいは施設間のばらつき (CV) で比較 ◎ : $CV \leq 0.3$ 、○ : $0.3 < CV \leq 0.5$ 、△ : $0.5 < CV \leq 0.7$ 、× : $0.7 < CV$

評価基準 9 : 3 次式で帰した時の相関係数の絶対値 (r) で比較、◎ : $r \geq 0.9$ 、○ : $0.8 \leq r < 0.9$ 、△ : $0.7 \leq r < 0.8$ 、× : $r < 0.7$

評価基準 10 : ◎ : 広く受け入れられている、○ : 施設間バリデーションの結果良いとされている、△ : 広く利用されている、× : 報告例は少ない

評価基準 11 : ◎ : 多くの行政機関で受け入れられている、○ : 一部の行政機関で受け入れられている、× : 受け入れられていない

*: ZK1100モデル、**: slight及びmoderate irritantの施設内のばらつき

#: 一部の結果を除いて計算した結果。

第 52 回関西実験動物研究会研究発表

1. マイクロサテライト多型による近交系マウスの遺伝的モニタリングとその有用性
2. 大阪産モロシヌスマウス由来毛色突然変異を支配する遺伝子の染色体マッピング
3. ラット・マウス・ヒト間の比較遺伝子地図の作成
4. ラットゲノムマッピングへのマウスマイクロサテライトマーカの応用
5. Dark Agouti ラットの妊娠期間・産子数・分娩時刻について
6. スナネズミ系統繁殖の試み - 一側総頸動脈結紮法による脳梗塞発症率の検討 -
7. ラット胎児骨格標本の個体識別法 - 腰部針金巻付け法 -
8. 抗癌剤 Adriamycin による精巣障害の回復性の検討
9. ネコ卵胞卵子による体外受精・体外培養・胚移植
10. ビーグル犬の飼育条件に伴う赤血球の変化
11. カニクイザルにおけるパズル餌箱による摂餌時間の延長効果
12. ネフローゼ症候群自然発症 ICGN マウスにおける骨髄移植治療の試み
13. ウィルス性心筋炎の病態形成におけるサイトカインの役割
14. PCR 法を用いた高感度検出法による P. pneumotropica の検出 - ICR マウスの汚染室内飼育による汚染経過の検討 -
15. 強酸性電解水の消毒効果

マイクロサテライト多型による

近交系マウスの遺伝的モニタリングとその有用性

増井 則夫・渋谷 政治・矢鍋 誠（日本エスエルシー・品質管理）

【背景】現在、近交系マウス・ラットの遺伝的モニタリングには生化学的及び免疫遺伝学的マーカーが広く利用されている。しかし、新しいモデル動物の導入、トランスジェニック動物の開発などにより、維持系統数が急激に増加したため、当施設ではタンパク質や酵素等を対象とした従来の方法だけでは十分な遺伝的背景の確認ができない状況にある。そこで、DNAを対象とするマイクロサテライトマーカーを遺伝的モニタリングに導入することとなった。本マーカーは、タンパク質に比べ多型性・試料の安定性などに優れ、京大の芹川らによって遺伝解析に関する報告も数多く出されている。

【目的】前試験としてPCR-SSLP法を用い、8近交系のマイクロサテライト多型を調べ、生化学的マーカーとの比較を行った。さらに得られたデータを基に遺伝的モニタリングへの実用化に向け、系統数・検体数等を増やし、非RIでのマイクロサテライト多型を調べ、その有用性を検討した。

【材料および方法】我々の施設で維持している近交系マウスの中から、比較的維持個体数が多く由来の異なる7系統とコンジェニック系統1系統についてDNAを抽出し³²P放射線標識によるPCR反応を行った。マイクロサテライトマーカーは各染色体に分散するよう心掛け、17ペアのプライマーをリサーチ・ジェネティックス社より購入した。PCR産物は変性ポリアクリルアミドゲル中で電気泳動後、オートラジオグラフィを行ってサイズを決定し、遺伝的プロファイルを作成した。特に、由来の異なる近交系7系統については生化学的マーカーによる多型との比較も行った。さらに、当施設維持の33系統に加え、NIH、ジャクソン研究所、阪大・医からDNA、動物等を購入・分与していただき、近交系マウス総計55系統について、非RIでのPCR反応を行い、4%アガロースゲル電気泳動、エチジウムブロマイド染色によりマイクロサテライト多型を調べ、PCR産物の相対的移動度の差による遺伝的プロファイルを作成した。

【結果および考察】PCR-SSLP法によるマイクロサテライト多型解析の結果、由来の異なる近交系7系統内の任意の2系統間における平均多型率は68.4%であったが、生化学的マーカーによる同一の調査では35.5%という低い値であった。また、本法では生化学的マーカーによる遺伝的パターンからは系統識別が不可能なB10.AとC57BL/6Cr間において17マイクロサテライト遺伝子座中3遺伝子座に多型が確認された。この3遺伝子座のうち、2遺伝子座におけるサイズ差は各々36bpと13bpで非RIでも十分確認できるものであった。さらに、非RIでの55系統にわたるマイクロサテライト多型解析の結果、従来実施してきたマーカーでは識別不可能な亜系統間やコンジェニック系統間にも多型が確認される例があった。勿論、本法は同一系統内での継代に伴うDNA比較も可能であり、遺伝的モニタリングには非常に有用であると評価できる。

大阪産モロシヌスマウス由来毛色突然変異を支配する遺伝子の
染色体マッピング

○和田あづみ¹、奥本正昭²、國東由布子¹、都築政起^{1,3}

(¹大阪府大, 農、²同, 先端研、^{1,3} 広大, 生物生産)

大阪府堺市で捕獲したモロシヌスマウス (*Mus musculus molossinus*) に由来する毛色突然変異の一つが、常染色体性の単一劣性遺伝子によって支配されている事を昨年度本研究会にて報告した。今回は、この遺伝子の染色体マッピングの結果等を報告する。

マッピングには、本突然変異形質を持つ Mol-skir line マウスと C57BL/6N の F₂ 世代を用いた。本突然変異遺伝子の存在する染色体を推定するため、F₂ 世代の突然変異個体 22 例を用いて生化学的遺伝形質を支配する 14 loci に対し連鎖解析を行った結果、8 番染色体の *Estelase 2* との連鎖が認められた。次に、8 番染色体上のマイクロサテライトマーカー、D8Mit11 (染色体中位に位置する)、D8Mit12 (やや末端側)、および D8Mit13 (末端側) について上述の 22 例を用いておおまかな連鎖を調べたところ、末端側の D8Mit13 により強い連鎖が認めれた。そこで D8Mit13 を中心に、F₂ 世代 218 例を用いより詳細なマッピングをおこなったところ、centromere - D8Mit12 - 4.17 ± 0.96 cM - D8Mit87 - 13.42 ± 1.64 cM - D8Mit13 - 0.69 ± 0.40 cM - D8Mit14 - 0.46 ± 0.33 cM - D8Mit121 - 0.93 ± 0.46 cM - mutant gene - 2.38 ± 0.74 cM - D8Mit122 - 0.48 ± 0.34 cM - D8Mit92 - 1.16 ± 0.51 cM - D8Mit56 - 1.85 ± 0.65 cM - D8Mit93 - teromere という結果が得られた。この領域には、本突然変異と類似した毛色突然変異形質を支配する *extension* (現在名 *melanocortin 1 receptor*) locus がマップされている。そこで我々は、この locus の allele の 1 つである *recessive yellow* (常染色体性劣性) を持つ C57BL/6J-*Mc1^e* マウスを用いた対立性検定を行った。その結果、我々の発見した突然変異遺伝子は *melanocortin 1 receptor (Mc1r)* locus の allele であり、*recessive yellow* に対し優性であることが判明した。

この新たな毛色突然変異に対し突然変異形質名を、"tawny"、遺伝子記号を *Mc1r^{taw}* とすることを提唱する。

ラット・マウス・ヒト間の比較遺伝子地図の作成

崔 宗虎、庫本高志、横井伯英、近藤 靖*、北田一博、芹川忠夫

(京都大学・医・動物実験施設、*田辺製薬・安全研)

〔目的〕実験用ラット (*Rattus norvegicus*) はバイオメディカルリサーチの分野で広く利用されており、高血圧、糖尿病、てんかん、海綿状脳症などの興味のある疾患モデルラットについて、病因遺伝子の同定が試みられている。近年、ラットにおいても、遺伝子連鎖地図の基盤がほぼ完成したが、ヒトやマウスに比べると、まだ不十分である。ヒトやマウスにおいては、多くのマイクロサテライトマーカーや YAC ライブラリー、cDNA ライブラリー等が整備されており、それらの情報がデータベース化されている。これらは、今後さらに拡充されるものと考えられる。そこで、ラット・マウス・ヒト間の詳細な比較遺伝子地図を構築すれば、マウスやヒトの豊富なゲノム情報と遺伝的ツールをラットゲノム研究においても容易に利用することができるようになると期待される。我々は、1994 年にマウス・ラット間、及びヒト・ラット間の比較遺伝子地図をまとめて発表した (Yamada, et al 1994)。今回、最新のデータベースを利用してデータを追加し、ラット・マウス・ヒト間の比較遺伝子地図として改訂した。

〔方法と結果〕GDB、MGD、Seldin/DeBry Human/Mouse Homology Map、RATMAP のデータベースから、ヒトあるいはラットにおいて染色体にマッピングされているマウス相同遺伝子座を総計 1370 個選択した。この遺伝子座によるマウスのゲノムマップを中心に置き、両側に対応するヒトとラットの遺伝子座を配置した。ヒトとラットゲノムにおいて、近傍の遺伝子座 (Rat map では 10 cM 以内、Human Map では 5 cM 以内のもの) が同一の染色体上にマッピングされている場合には、一つの染色体領域としてまとめた。以前の地図と比べて、マウスの第 8、11、13、14、16 染色体とラットの第 16、14、1、16、10 染色体に、それぞれ相同ないわゆるシンテニック領域が新しく見出された。マウス・ラット間の相同ゲノム領域は総計 414 cM から 758 cM に延長した。マウス染色体全長を 1600cM とすると これは 47% に当たる。そして、相同遺伝子座は 184 から 352 個になり、マウス・ラット・ヒト間の相同遺伝子座は、169 から 202 個に増加した。

〔結語〕今回作成した比較遺伝子地図により、マウス・ラット・ヒトの遺伝子検索を同時に行うことができるので、ラットにおいて興味のあるゲノム領域からヒトとマウスの相当ゲノム領域にシフトして解析することが容易となる。従って、マウスやヒトの豊富なゲノム情報と遺伝的ツールを用いて、興味のある形質を担う候補遺伝子をヒトあるいはマウスゲノムから見出すことができる。さらに ヒト遺伝病に関するモデルの確立、ほかの動物において知られた遺伝子のヒトの相当遺伝子の同定、新しく発見された遺伝子の機能に関する研究、量的形質に主要な影響を持つ遺伝子のマッピングと同定、および、ヒトゲノムの進化などのヒトゲノム研究への貢献も可能であろう。今回の研究により、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ので、そのマウス領域に対応するラットゲノム領域の比較マッピングをさらに進めていく必要があると考えられる。

ラットゲノムマッピングへのマウスマイクロサテライト マーカーの応用

○佐藤清美^{1,2}、近藤靖^{1,3}、北田一博¹、芹川忠夫¹

(¹京大・医・動物実験施設、²ケーエーシー、³田辺製薬・安全研)

[緒言] ラットの遺伝子マッピングやゲノムスキニングは、マイクロサテライトマーカーの利用により容易になりつつある。しかし、1cMレベルの詳細なゲノムマッピングについては、ラットの遺伝学的ツールの整備が充分でないため、未だ困難な状況にある。われわれは、系統発生学的に比較的近縁であるマウスのマイクロサテライトマーカーの一部が、ラットゲノムマッピングにも応用可能であることを既に報告している (Mammalian Genome, 4, 571-576, 1993)。今回、この方法で、容易に新たな20のマーカーを開発することができたので報告する。

[方法と結果] 各染色体に分散する MIT プライマーから総計 815 のプライマーペアを選択し、PCR でラットゲノムとの反応性を調べたところ、122 (15.0%) のペアで産物の増幅が見られた。そのうち、39 (4.8%) の PCR 産物において、8 近交系間 (BN, IS, F344, ACI, WTC, SHR, ZI, TM) でサイズによるボリアレリックな多型性が観察された。さらに戻し交雑仔のパネルを用いて連鎖解析を行ったところ、現在までに、20 の多型マーカーについて特定のラットゲノム上にあてはめることができた。なお、19 の多型マーカーについては、既にマウスゲノムとシンテニーが存在すると報告されているラットのゲノム領域にマップされることが明らかとなった。

[考察] 今回、大量に市販されている anonymous なマウスマイクロサテライトマーカーを利用することによって、クローニングやシークエンスのステップを経ずに、比較的容易にかつ効率的にラット遺伝マーカーを開発することができた。同様の方法で6,600のマウスマーカーをスクリーニングすることにより、330 程度の新規ラットマーカーが開発され得るものと推測される。また、このストラタジーにより、今後、詳細なマウス・ラット間の比較ゲノム地図も作製され得るものと期待される。最後に、ミュータントラットの原因遺伝子同定に際して、豊富なマウスやヒトの遺伝学的ツールを用いるポジショナルクローニング法を提唱したい。すなわち、マウスマイクロサテライトマーカーによりミュータントラットの原因遺伝子を 1cM レベル以内でマッピングできれば、その領域を包含するマウス YAC もしくは BAC クローンでコンティグを構築し、エクソントラップ法やマウス、ヒト EST の物理マッピングを行うことにより、候補遺伝子を推定する。最終的には、ミュータントラットにて、真の原因遺伝子であるか否かを検討する。以上の「ゲノムシフトアプローチ」を用いれば、現況においても、ラットにおけるポジショナルクローニングが可能であると思われる。

Dark Agouti ラットの妊娠期間・産子数・分娩時刻について

○森岡宏至・江崎孝三郎（大阪府大・農・実験動物）

ラットの妊娠と分娩に関する詳細を知することは繁殖生理学の研究やより実的な計画生産の情報を得るためにも極めて大切である。使用頻度の高い Sprague-Dawley系ラットやWistar系ラットに関する妊娠と分娩パターンについては報告されているが、いずれもアルビノラットで有色ラットについての詳細は報告されていない。本観察は有色ラットである Dark Agouti (DA) 系ラットの妊娠と分娩の特性に関する基礎的知見を得ることを目的とする。

〔方法〕 使用動物はDAラット（3～5カ月齢）で、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。雌は規則正しく4日の性周期を連続2回以上繰り返した後、発情前期の夕方に雄と交配させ、翌日の精子確認日を妊娠第1日とした。妊娠ラットは妊娠17日に個別ケージ（32.0×21.5×12.5cm）に移し分娩させた。

〔結果〕 1) 観察総数91例中70.3%が妊娠22日の明時に分娩し、7.7%が暗時（翌朝の点灯時に確認）、22.0%が妊娠23日の明時に分娩した。 2) 妊娠期間22日と23日の平均産子数は、それぞれ8.2匹と5.4匹で23日の産子数の方が有意に少なく、妊娠期間と産子数との間に負の相関（ $r=-0.494$ ）が認められた。性比については、妊娠期間23日の雄1.0に対し、雌1.5と雌の産子数が幾分多かった。 3) 分娩開始時刻は妊娠期間22日のものにおいて、午前8時から午後6時まで分布したが、正午から午後2時の間で開始したものが63%（33/52）を占めた。妊娠23日に分娩した例では、全てが正午までに分娩を開始した。 4) 妊娠期間22日における産子数は4匹から10匹まで分布したが、各産子の最長平均娩出間隔は第1子から第2子の分娩に要した 14.9 ± 3.3 (M $\pm$ SD) 分であった。 5) 妊娠期間22日における分娩所要時間については、産子数4匹の平均所要時間の35分から産子数10匹の84.4分まで産子数の増加に伴って所要時間も延長し、分娩所要時間（Y）と産子数（X）との間に有意な相関（ $r=0.764$, $P<0.001$ ）が認めら、その回帰直線は $Y = 7.41 + 9.56X$ であった。産子数4匹の26分が最短期、最長は産子数10匹の98分であった。

〔結論〕 DA系ラットの妊娠期間はWistar系ラットと類似した22日を示し、SD系ラットの妊娠期間23日より1日短く、また従来の報告と同じくほとんどの例（92%）で点灯時間内に分娩した。DA系ラットはアルビノラットより幾分粗暴であるが、SD系ラットやWistar系ラットより小型で、経済的であり、アドレナリン分泌も正常である面も含めて安全性試験などにアルビノラットに替わって使用されることを期待する。

スナネズミ系統繁殖の試み

一側総頸動脈結紮法による脳梗塞発症率の検討

新谷 聰、成富 博章（循環器センター・研）

スナネズミ (Mongolian Gerbil) は、1966年に一側総頸動脈の結紮により、容易に脳および網膜に虚血性変化の生じることが報告されて以来、広く脳梗塞の実験モデルとして使用されるようになった。一側総頸動脈の結紮で、スナネズミが脳梗塞を生じる頻度は、30～60%で、多数例の成績では大体40%代と言われている。この頻度を限りなく100%に近づければ、使用数の減少につながるのではないかと考え、当センター内で、自家繁殖をしている研究者から分与を受け、自家繁殖をすると共に実験を開始した。

〔目的〕 当初、脳梗塞発症率の高い系統の作成を目指したが、繁殖が極めて困難であったため、逆に脳梗塞発症率の低い系統の作成を目指すことにした。

〔材料と方法〕 まず、スナネズミは無作為交配で繁殖し、実験に使用できる個体の増数を図った。一側総頸動脈の結紮で脳梗塞を発症せず、生き残った動物同士を交配し、その子孫を実験に供し、その中で生き残った動物を繁殖に用いるといった方法を繰り返した。

〔虚血巣の作成〕 麻酔下でスナネズミを仰臥保定し、頸部正中に縦切開をくわえ、ピンセットで右側総頸動脈を迷走神経・交感神経枝から遊離し、絹糸で2重結紮後、切断した。動物の状態は、術後6、12、24、36、48、72時間目に観察・記録した。

〔結果〕 手術は、8年たらずの間に総計1,727例に達し、任意に6つの実験群にわけた。各実験群から72時間生存率を評価するのに不適合な200例を除き、1,527例を検討した。実験1から6にかけて生存率が徐々に増化する傾向が見られた。雌・雄の性別で、生存率を比較すると、一つの実験群のみで、雄の術後72時間生存率が高く、他の五つの実験群では雌の生存率が高かった。また、生存率100%を示すグループも数グループ出現した。

〔結語〕 脳血管の構築が、脳梗塞の発生率を機軸にして、偏向していくことが判明したので、今後は発症率100%に限りなく近い系統の作成に挑みたい。

ラット胎児骨格標本の個体識別法－腰部針金巻付け法－

菅 千里・古川 正敏・中島 準子・井本 精一

((株) 化合物安全性研究所)

近年、生殖発生毒性試験では、胎児の確実な個体識別法が求められている。我々は今回、番号札をステンレス製針金で胎児に装着する方法を考案し、装着がしやすいこと、番号札の脱落がないこと、標本への損傷がないこと、および標本観察の支障にならないことを指標にして、装着部位としてラット胎児の頭・下顎・頸・腰部の4部位とステンレス製針金として3種類の太さの針金を用いて比較検討したので報告する。

合計 93 匹の生存胎児を8例の Crj:CD(SD)系雌ラットから獲得した。そのうちの1例は不妊であった。各装着部位へは子宮角をひとまとまりとして胎児を割り当てた。胎児数は頭部装着 29 例、下顎部装着 24 例、頸部装着 9 例及び腰部装着 31 例であった。プラスチック製テープを約 2 cm の長さに切って番号札とし、それに穴をあけ、ステンレス製針金を通した。針金は#24 (直径 0.50mm)、#26 (直径 0.45mm) 及び#30 (直径 0.28mm) の3種類を選んだ。テープには右子宮角を赤色 (R)、左子宮角を青色 (L) とし、胎児番号を子宮頸部に近い方から 1、2、3・・・と表示した。番号札の装着は1胎児に対して1部位とし、頭部及び下顎部装着例には針金を刺入し、頸部及び腰部装着例には針金を巻付けた。骨格標本はアリザリンレッドSの単染色で作製した。

番号札の脱落は下顎部及び腰部装着例でそれぞれ 2/24、2/31 の頻度で認められた。刺入方法では装着部位が切断されて脱落し、巻付け方法ではねじ巻きが不十分で脱落したが、後者では十分にねじ巻くことで脱落防止が可能であるため、脱落防止には刺入方法よりも巻付け方法がより適切であると判断された。実体顕微鏡下での観察のしやすさを比較すると、針金を巻付ける部位としては腰部が頸部より優れていると判断された。また、針金は細い方が容易にねじ巻くことができ、取り外しも簡単であることから、3種類の針金を比較した結果、#26 及び#30 の太さの針金が適していると判断された。

以上の結果、胎児骨格標本の個体識別法としては、番号札をつけたステンレス製針金を腰部に巻付ける方法が有用であると考えられ、使用する針金の太さについては#26～#30 (直径 0.28～0.45mm) の太さが適当と思われた。

抗癌剤 Adriamycin による精巣障害の回復性の検討

○足立民子、新比恵啓志、長崎徹、山村高章、乾俊秀、
浅野裕三、川合是彰（田辺製薬・安全研）

抗癌剤である Adriamycin(以下 ADR)は高用量投与でラットの心臓および腎臓を障害し、また精巣では精祖細胞を傷害し不可逆性の萎縮を引き起こすことが明らかにされている。今回我々は精巣以外の臓器に影響を与えない程度の低用量¹⁾の ADR をラットに投与し、精巣障害および障害の回復性に関する検討を行ったので報告する。

[材料と方法]

7週齢のSlc:SD系雄ラットにADRの1mg/kgを週1回の割合で4週間尾静脈内投与した。実験1として最終投与後1、5および10週間の、実験2として11、16および21週間の休薬期間において動物を殺処分し、血液学検査、血液生化学検査、精子機能検査(数および運動性の測定)、副生殖器および精巣の重量測定ならびに組織学的検査を行った。副生殖器は10%ホルマリン中性緩衝液で固定後、パラフィン切片としH-E染色を施した。精巣は同様にFA液(ホルマリン-酢酸混合液、ホルマリン原液：蒸留水：酢酸=2.5：17.5：0.8)で固定しH-E染色ならびにPAS染色を施してステージ分類を行うとともに、セルトリ細胞に対する精上皮細胞の割合を算出した。また、実験2では剖検前の1週間、同系統の雌と同居させ、交配検査を実施した。

[結果]

実験1：休薬1週間の精巣重量および精子検査では対照群と差はなかったが、組織学的には精祖細胞が減少していた。休薬5週間の精巣重量は対照群のほぼ半分に減少し、組織学的に精母細胞および精子細胞数は著明に減少していたが、精祖細胞数は対照群と同程度に回復していた。また、精子の運動性および数はともに対照群の約70%に低下していた。休薬10週間の精巣重量および組織像は対照群と同等であったが、精子検査では精子はほぼ消失し、運動性も極めて乏しかった。

実験2：休薬11週間では実験1の休薬10週間と同様な結果が得られた。交配試験においては、交尾率は対照群と差がなかったが、雌の妊娠率は著明に低下していた。休薬16週以降では、精巣重量、組織像、精子の運動性および数はほぼ対照群と同様であり、交尾率、雌の妊娠率とも異常は認められなかった。また、実験1、2ともいずれの時期においても血液学検査および血液生化学検査では特記すべき変化はなかった。

[まとめ]

精巣重量、組織学的検査では休薬1週から重量の低下および精上皮細胞の減少傾向が認められ、5週で変化は最大となり、その後回復した。精子検査では、数および運動性はともに休薬5週から減少し始め10週前後で最低となり、その後回復した。雌の妊娠率は11週で著明に低下していたが、16週以降回復した。すなわち、ADRのような精祖細胞のみを選択的に傷害する薬物の場合、その障害性および回復性は、精子検査または交配検査よりも先に臓器重量または組織学的検査の結果に反映されることが示された。また、ADRの1mg/kg/week、4回投与では精祖細胞は完全には消失せず、休薬によって精巣毒性がほぼ完全に回復することが確認された。

参考文献 1) Imahie, H. et al. (1995) J. Toxicol. Sci. 20:183-193

ネコ卵胞卵子による体外受精・体外培養・胚移植

○神田政典、宮崎貴子、神田恵、中尾博之（塩野義・実動研）

閉鎖集団のネコ繁殖コロニーを微生物学的にコンベンショナルな環境下で維持していく際、感染症等によって系統が途絶えたり、近交係数の上昇により繁殖効率の低下する危険性がある。こうした事態に対処するための一手段として現有系統を凍結保存する必要があると考え、胚の培養・凍結・移植方法等について検討を進めてきた。ところで、これまでの研究からネコ初期胚を既存の合成培地で培養した場合、発生の途中で胚の発育が遅延または停止することが明かとなった。解析の結果、この発生阻害は4細胞期以前の胚、特に体外受精卵子を培養した場合に強く発現し、阻害の起こるステージは何れも桑実期胚であることが判明した。従って、凍結ならびに移植可能なステージである後期桑実胚～胚盤胞期胚を *in vitro* で作出するには、この発生阻害を解消し得る新しい培養液の開発が不可欠となった。そこで我々は、M-199の基礎塩類液であるEarle平衡塩類液に修飾を行い、ネコ初期胚培養用のCAT mediumを開発した。本実験では、「体外受精/体外培養」におけるCAT培地の有効性を判定し、さらに得られた胚盤胞を移植して胎仔への発生能を調べたので報告する。

【材料および方法】 供試動物には、卵子回収用(以下OD)として成熟雌ネコ15頭を、精子回収用として成熟雄ネコ7頭を用いた。卵胞の発育を誘起するため、ODに対してPMSGを初日(Day1)100IU、Day2に50IU投与し、さらにDay6にhCG100IUを投与した。ODからの卵胞内卵子回収手術は、hCG投与後23±1時間目に行い、形態的に成熟卵子と判定したものについて体外受精を行った。培養液には、CATにMEM用の20種アミノ酸を添加したCAT-1培地とM-199培地を用い、添加する蛋白成分には、非働化ヒト血清(以下HS)、非働化ウシ胎仔血清(以下FCS)ならびにウシ血清アルブミン(以下BSA)を用い、(A)CAT-1+10%HS、(B)CAT-1+0.4%BSA、(C)CAT-1+10%FCS、(D)M-199+10%FCS、以上4実験区を設定した。

【結果および考察】 体外受精後の卵割率は(A)区が91.6%で最も高く、(B)区(61.5%)、(C)区(45.0%)、(D)区(41.0%)との間には有意差が認められた。体外受精により得られた卵割胚は、何れの実験区においても桑実胚までは良好な発育を示した。一方、胚盤胞発生率では(C)区(5.6%)ならびに(D)区(12.5%)が、(A)区(69.7%)ならびに(B)区(50.0%)よりも有意に低い成績であった。次に、*in vitro* で得られた胚盤胞をODの子宮角に移植し胎仔への発生能を調べた。その結果、体外受精後120時間目の胚盤胞を移植した8頭のうち5頭が受胎し、このうちの4頭が1～5頭の仔ネコを正常分娩した。

以上の成績から、新たに開発したCAT-1培地は、HSを添加することによりネコ体外受精卵子を高率に胚盤胞へ発生させ得ることが明かとなった。さらに、これら胚盤胞を移植することによって受胎が成立することを確認し、わが国では初めて体外受精仔を誕生させることに成功した。

ビーグル犬の飼育条件に伴う赤血球の変化

○渡辺 清、阪口田鶴子、三日月幸治、藤井金也（塩野義・実動研）

我々は、ビーグル犬の飼育を集団平飼方式で行っている。しかし、同一環境下で出生時よりケージ（4ヶ月齢より個別）飼育した動物は、集団平飼犬と体重等の成長に差がないのに、血液性状のRBC、HGB、HCT（以下赤血球）が高い傾向を示した。また、集団平飼犬をケージで個別飼育すると、赤血球が上昇する個体をみとめた。このように飼育方法の違い、あるいは変更で赤血球が変化することは、何らかの要因が関与していると考えられる。今回は、赤血球が変化する飼育条件について検討をおこなった。

<材料および方法>

動物は集団平飼の雄ビーグル犬を用い、4～10頭を1群としてケージ飼育する月齢や運動性の違いで赤血球が変化するか否かを調べた。

I：成長過程の3、5、7、9ヶ月齢および18ヶ月齢の成犬をケージAで飼育した。また、3および18ヶ月齢よりケージ飼育した動物は36ヶ月齢まで観察した。

II：7ヶ月齢の動物を床面積や高さの異なるA、Bの2種類のケージおよび、集団平飼と同一条件で個別平飼し、赤血球の推移等を集団平飼群と比較した。

ケージA：600W×650D×540H mm B：660W×700D×1000H mm

平飼犬房：1000W×1500D×2000H mm（運動場：1000W×3500D×2000H mm）

<結果および考察>

3～9ヶ月齢犬をケージ飼育し、12ヶ月齢まで血液・血漿生化学値を観察した。集団平飼群との間に差が見られたのはRBC、HGB、HCTの3項目であった。また、赤血球が安定するのは8～10ヶ月齢で、集団平飼群より1～2ヶ月遅い時期であった。一方、赤血球はケージ飼育すると1～3ヶ月後に増加し、成犬になっても集団平飼群より10%前後高い値で推移した。しかし18ヶ月齢犬をケージ飼育しても赤血球はほとんど変化しなかった。赤血球がほぼ安定する時期の7ヶ月齢犬を運動性の異なる環境で飼育したが、ケージサイズに関係なく、また集団平飼と同一条件で個別平飼した場合も赤血球は10%以上高い値を示した。ケージ飼育等の実験群でRBCの最高値が $700 \times 10^4 / \text{ml}$ 以上を示す個体は60%以上、集団平飼群のそれは40%以下であった。

以上の成績から、赤血球の増加は正常範囲内の変動であるが、成長過程のビーグル犬をケージ飼育するか、平飼においても個別飼育すると起こることが明らかになってきた。

カニクイザルにおけるパズル餌箱による摂餌時間の延長効果

○中井健史、土屋栄一、高木英敏、武藤通彦、稲垣晴久、山下武夫

(塩野義製薬・実動研)

近年、動物福祉の考え方が社会的に支持されることとなり、動物を扱う実験施設には飼育環境をより豊かにすることが求められるようになった。動物の福祉に配慮した豊かな飼育環境は動物の心理的ストレスを軽減し、ひいては生理的に安定したよりよい状態を生み出すことにつながるといえる。飼育下のサルは野生下のものに比べ摂餌 (foraging) 行動の時間が著しく短く、これを野生下での消費時間に近づけることは飼育環境を豊かにするための一つの手段と思われる。今回、そのために飼育下のカニクイザルに対してパズル餌箱で給餌し、通常使用している餌箱と摂餌行動の時間を比較して、その効果を検討した。また、血漿コルチゾール値を指標として、パズル餌箱による給餌がサルに与える心理的な影響についても調べた。

《材料および方法》

動物は成熟カニクイザル・オス6頭で、入荷後8年間個別飼育されている。パズル餌箱は前面に今回使用した固型飼料がそのままの形では通らない程度の格子状の金網を張り、餌を取り出しにくくしたものである (網目の有効サイズ: 16mm×16mm)。実験では1週目に習熟のためパズル餌箱を、2週目に通常の餌箱、3週目にパズル餌箱を用いて給餌 (オリエンタル酵母社製PS・50個) した。1週目を除く週3回 (月、水、金)、給餌から4.5時間 (12:00～16:30) ビデオ撮影し、1時間までの摂餌行動について分析した。摂餌行動は、サルが餌箱から餌を取り出す行動に限定した。血液試料は1週目を除く週1回 (木) 採取し、コルチゾール濃度は酵素抗体法で測定した。

《結果および考察》

給餌後1時間までの摂餌行動の合計時間は、通常の餌箱が平均2.2分、パズル餌箱が平均31.8分でパズル餌箱の方が平均14.5倍長く、パズル餌箱による有意な延長効果が認められた ($P<0.01$)。しかし、餌が取り出しにくくなったことで餌への関心を示さなくなるようなことはなく、むしろ摂餌にあまり集中しなかった個体を含めて、摂餌行動を持続させた。このように、パズル餌箱は本来カニクイザルに見られる摂餌行動の時間配分に少しなりとも近づけることができ、また摂餌意欲を増進させる効果もあることが認められた。パズル餌箱は使用時における血漿コルチゾール値が通常の餌箱の時と変わらないか、もしくはわずかに上昇する程度であったことから、サルに大きなストレスを与えるものではないと考えられた。以上のことから、今回使用したパズル餌箱は飼育下のサルの環境をより豊かにする手段の一つとして有用であると思われる。

ネフローゼ症候群自然発症ICGNマウスにおける 骨髄移植治療の試み

○ 岳秉飛¹, 水野信哉¹, 岡本宗裕¹, 堀之内謙一², 高橋昌里², 崎山武志³, 黒澤努¹

(大阪大学医学部動物実験施設¹, 静岡県立こども病院², 聖マリアンナ医大病理³)

近年骨髄移植による腎炎治療の有用性が自己免疫疾患(ループス腎炎/糖尿病性腎症)モデルで示されている。難治性ネフローゼ症候群では高度の蛋白尿に持続する2次性尿細管間質腎炎を発症して腎不全に移行する。ICGNマウスは糸球体形成異常によって若齢期にネフローゼ症候群を発症することから、ネフローゼの病因は自己免疫性ではなく"遺伝性"と考えられる。本マウスは2次性尿細管間質腎炎の発現に一致して概ね14週齢以後腎不全を発症する。2次性尿細管間質腎炎の発症と進行には免疫系が関与することが指摘されている(Kidney Intl., 54:S75, 1996)。今回ICGNマウスに骨髄移植を試み、腎不全の指標である2次性尿細管間質腎炎の発現遅延の可能性を検討した。

1. 材料と方法

6週齢のICGNマウス、ホモ20匹およびヘテロ(ドナー)20匹を用いた。ホモは骨髄移植群(12匹)と対照群(8匹)に分けた。骨髄移植群にはレシピエントをX線照射後、ヘテロのドナー骨髄細胞を尾静脈に移植した。両群について尿および血清中のアルブミン濃度およびBUN値を測定した。移植後8週目および20週目に剖検し、腎の病理組織学的検査を行なった。

2. 結果

臨床生化学検査：対照群で認められたアルブミン尿は骨髄移植によって改善されなかった。血清アルブミン濃度は両群の間で有意差は認められなかった。8週および20週目のBUN値は骨髄移植群で対照群に比べ、低い値を示した。

病理所見：対照群では単核細胞浸潤、円柱の蓄積、尿細管上皮細胞の脱落および扁平化によって特徴づけられる萎縮性変化が観察された。骨髄移植群では以上の変化はほとんど観察されなかった。対照群ではメサングウムにおける細胞外基質の過剰沈着が観察され、一方骨髄移植群ではこの変化は軽度であった。

3. 考察

ネフローゼモデルにおける骨髄移植はアルブミン尿および低アルブミン血症の改善をもたらさなかった。しかしながら、骨髄移植を受けた動物において腎機能の指標であるBUN値の上昇抑制と尿細管間質性病変の軽減を観察することができた。

以上のことから、ネフローゼモデルにおける骨髄移植はネフローゼそのものには緩解をもたらさないものの、ネフローゼに続発する腎不全の進行を遅延させているかもしれない。

ウイルス性心筋炎の病態形成における サイトカインの役割

○喜多正和、劉 亞黎、今西二郎
(京都府立医大・実験動物室、微生物学教室)

【目的】小児科領域において、ウイルス性心筋炎は重要な疾患の一つであるが、心筋炎におけるサイトカインの役割については不明な点が多い。本研究では、encephalomyocarditis virus (EMCV) による急性心筋炎モデルを用いてサイトカインの役割を検討した。

【材料と方法】4週令のC57BL/6マウスに EMCウイルスM株 (100pfu/0.1ml) を i.p 接種後、経時的に心臓を採取し、ウイルス量およびサイトカインを測定した。IL-1 β 、IL-2、IL-3、IL-4、IL-5、IL-6、IL-10、IL-12、TNF- α 、IFN- α 、IFN- β 、IFN- γ mRNA の発現はRT-PCR法で、一部のサイトカインはELISA法で測定した。また、抗IL-6、抗TNF- α 、抗IFN- γ 抗体投与によるEMCVウイルス感染に与える影響を、マウスの生存率および心筋組織の病理組織学的変化を指標に検討した。

【結果】

1) EMCV感染後、心臓内ウイルス量を経時的に定量した結果、心臓内ウイルス量は感染2日後をピークに増加し、以後徐々に減少した。また、病理組織学的な検討の結果、感染2日後から心筋組織の炎症および壊死など典型的な心筋炎の病態を示した。

2) EMCV感染後、心臓において発現の増強が認められたサイトカインmRNAは、IL-1 β 、IL-6、IL-10、TNF- α 、IFN- α 、IFN- β 、IFN- γ であり、IL-6、TNF- α 、IFN- γ については蛋白レベルでも発現の増強が確認された。

3) 抗IL-6抗体およびIFN- γ 抗体投与実験の結果、統計学的に有意な生存率の低下、および心筋組織の炎症、壊死の増悪を認めた。一方、抗TNF- α 抗体投与により、生存率の改善および心筋炎の改善が認められた。

【考察】EMCVによるウイルス性心筋炎モデルにおいては、IL-6およびIFN- γ は感染防御因子として、TNF- α は感染増悪因子として作用していることが明らかとなった。

PCR法を用いた高感度検出法による *P. pneumotropica* の検出
-ICRマウスの汚染室内飼育による汚染経過の検討-

○長谷川 治子、鍵山 壮一郎、外野 善弘、田島 優、黒澤 努
(大阪大学医学部附属動物実験施設)

目的：*Pasteurella pneumotropica* 汚染は、本菌が日和見感染菌であるために検知しにくい。さらに、従来の検査法では感度や特異性の点で問題があり、所要時間も長かった。また、試料採取時に被験動物を処分しなければならない検査法は、トランスジェニック、ノックアウト動物、遺伝子治療など各個体が重要な実験系には不適である。加えて、各個体を再検査することも不可能である。このことから、われわれは、Wangらの咽頭のぬぐい液を検体としたPCR法（咽頭PCR法）を改良して被検動物を生かしたまま試料採取できるような *P. pneumotropica* 検出法を考案した。汚染マウスを検体として、本法と咽頭PCR法での検出感度を比較し、また、本法を用いて清浄ICRマウスの汚染室内飼育による汚染経過を検討した。

方法：汚染マウス16匹について、滅菌ろ紙により目頭に溜まった涙を採取し、BHIB増菌培地で増菌培養後、菌体を洗浄、DNA抽出を行った。DNA抽出液を試料としてWangらの方法に準じて16S rDNAプライマーを用いてPCR反応を行った（涙PCR法）。また、涙採取後、被験動物を気管切開し、滅菌綿棒により咽頭部ぬぐい液を採取し、同様に、咽頭PCR法を行った。

清浄なICRマウス8匹を *P. pneumotropica* 汚染が確認されている当施設のマウスコロニー飼育室内で飼育した。陽性コントロールとしてこの汚染室内で飼育されていたICRマウスを用いた。個体を処分することなく、涙PCR法により汚染経過を観察した。また、汚染室搬入後31日目では、涙PCR法と同時に咽頭PCR法も行い、比較した。

結果：汚染マウス16匹を用いたテストで、本涙PCR法での陽性率は62.5%、咽頭PCR法での陽性率は18.8%となり、本法は咽頭PCR法と同程度以上の高検出感度を有することが分かった。

汚染室内に搬入した清浄マウス8匹のうち、汚染室搬入後17日目では3匹、31日目で1匹が涙PCR法陽性になった。また、31日目での咽頭PCR法では3匹が陽性であった。なお、陽性コントロールとした動物は、実験期間を通して涙PCR法陽性であり、31日目の咽頭PCR法でも陽性であった。しかし、陽性コントロールとした動物の涙PCR法産物量には経時的な減少が認められた。汚染室内飼育動物の涙PCR法による継続的な観察結果と陽性動物での涙PCR法産物量の減少は、同一部位からの継続的な試料採取の影響ではないか想像され、左右の眼から交互に試料採取するなどの工夫が必要ではないかと考えられた。

結論：本法は高感度、高特異性であることから、その利用により *P. pneumotropica* 検査に供する動物数を減少することが可能であり、また、試料採取に伴う被検動物の処分が不要なことから、トランスジェニック、ノックアウト動物、遺伝子治療など各個体が重要な実験系において、本法は特に有効な検査法になるものと期待された。

強酸性電解水の消毒効果

大野周三，加藤仁五，谷本純一，加堂洋一〔藤沢テクニクス(株)〕

藤田敬朗〔(株)ケーエーシー〕，福山権七〔アイケン工業(株)〕

微生物学的統御には滅菌・消毒等による微生物の蛋白変成あるいは染色体切断による方法が用いられている。しかし、これらの方法は大がかりな設備や熱エネルギーの消費を伴い、更に、ハロゲン系消毒薬による環境汚染やアレルギーの問題によりこれらに変わる方法が求められている。近年、水に電解物質を添加し、電気分解することで得られる強酸性電解水（以下、強酸性水）が殺ウイルス作用とMRSAを含めた強い殺菌作用を有し、環境汚染やアレルギーの問題も少ないため、病院や歯科医院で使用されつつある。そこで、我々は強酸性水の実験動物飼育分野に於ける有用性を調べる目的で、強酸性水の手指消毒および動物飼育施設の清拭消毒効果を検討した。

方法：〔Ⅰ〕強酸性水：強酸性水（PH 2.4，次亜塩素酸濃度 25ppm，酸化還元電位 +1100mV）は強電解水生成装置〔アイテック（アイケン工業(株)）〕を用いて生成し、12時間以内に使用した。

〔Ⅱ〕手指消毒効果試験：水，強酸性水および0.15% 両性界面活性剤に浸漬し、浸漬前後の手のひらを7ドスタンプ法（標準寒天培地）により比較した。

〔Ⅲ〕飼育施設清拭消毒効果試験：①〔モップ法〕飼育室の床面をそれぞれ強酸性水，0.06%塩素系消毒薬および0.15% 両性界面活性剤を浸したモップで清拭消毒し、消毒前後の床面を7ドスタンプ法（標準寒天培地，デキソコレート寒天培地，TGSE寒天培地）により比較した。②〔ペーパータオル法〕これら消毒薬の効果をより厳密に比較するため、飼育室の床面に0.5m²の領域を3ヶ所設定し、消毒前後の床面を7ドスタンプ法により比較した。

結果：〔Ⅰ〕手指消毒効果試験：強酸性水および0.15% 両性界面活性剤は共に浸漬後明らかな付着菌数の減少を示し、その程度は0.15% 両性界面活性剤の方が強酸性水よりも強かった。

〔Ⅱ〕飼育施設清拭消毒効果試験：①〔モップ法〕強酸性水，0.06%塩素系消毒薬および0.15% 両性界面活性剤は飼育室の床面清拭消毒後、3種類の7ドスタンプで明らかな付着菌数の減少を示した。②〔ペーパータオル法〕3種類の消毒薬は清拭消毒後明らかな付着菌数の減少を示し、その程度は0.06%塩素系消毒薬および0.15% 両性界面活性剤の方が強酸性水よりも強かった。

考察：今回実施した試験系に於いて、強酸性水は明らかな消毒効果を示したが、既存の消毒薬に勝るものではなかった。しかし、強酸性水に明らかな消毒効果が認められたことから、強酸性水の使用に関しては、強酸性水のメリット・デメリットを考えた判断が必要であると思われる。

疾患モデル動物を用いた高血圧・循環器病遺伝子の研究

檜垣実男(大阪大学医学部第四内科)

1. はじめに

本態性高血圧症は、環境要因と遺伝子からなる多因子疾患である。近年の分子生物学的研究の進歩により、これら循環調節因子の高血圧の成因へのかかわりが遺伝子レベルで解明されるようになった。高血圧遺伝子の解明により、その予防、治療に新しい展開が期待できる。本稿ではレニン-アンジオテンシン系因子の遺伝子を中心に高血圧ならびに循環器系合併症とのかかわりについて述べる。

2. 遺伝性高血圧モデル動物の遺伝子

SHR(高血圧自然発症ラット)やDahl-S(ダール食塩感受性)ラットを用いて解析がすすめられている。1991年、Jacobら¹⁾、Hilbertら²⁾はSHR-SP(stroke-prone)を用いて、全ラットの多型性DNAマーカー(塩基配列に個体差を認める部位)のスクリーニングで第10染色体のアンジオテンシン変換酵素(ACE)遺伝子近傍に昇圧に関係する遺伝子(BP-SP1)の存在を報告し注目された。その後、多くの研究者から第1、第2、第4、第10染色体などに候補遺伝子が報告された。我々も第4染色体上のニューロペプチドY(NPY)遺伝子近傍や第9染色体上のガンマクリスタリン遺伝子近傍に新しい昇圧遺伝子を見出し、第8染色体にはフォスフォリパーゼCデルタ1遺伝子近傍に降圧遺伝子の存在を報告した^{3, 4)}。このように遺伝子レベルでも昇圧系と降圧系が存在し、両者の相互作用で高血圧が発症するものと考えられた。また最近の我々の解析ではSHRとDahl-Sラットの高血圧遺伝子では共通するものと異なるものがあり、ヒトにおける本態性高血圧の多様性を示唆する結果であった⁵⁾。

3. 遺伝子操作による高血圧の成因解明

ある遺伝子を欠落させたり、過剰に導入する手法はジーンタゲッティングと呼ばれており、これにより遺伝子の機能が直接的に明らかにされるようになった。Smithiesら⁶⁾のグループはアンジオテンシノジェン(AGN)遺伝子を0, 1, 2, 3倍に組み込んだマウスを作成し、遺伝子量と平行して血中のAGN濃度と血圧の上昇を認めている。同様にACE遺伝子やアンジオテンシンIIタイプ1(AT1)受

容体遺伝子の欠損マウスでは低血圧となり、R-A系が遺伝子レベルで血圧維持機構に必須であり、高血圧の成因にも深くかかわっていることが明らかとなった。Gantenらはマウスレニン導入ラットを作成、これは重症高血圧となるが、血中レニン濃度は上昇せず、副腎や脳内レニンの関与が示唆されている。最近、村上らのグループはヒトレニンとヒトAGN遺伝子の両者を導入したつくば高血圧マウス・ラットを作成、心肥大の著明なモデル動物として注目されている⁷⁾。さらに我々はHVJ-リポソーム法と呼ばれる、効率の良い遺伝子導入法を用い、Wistar-Kyotoの肝臓にヒトレニン遺伝子を導入することで、高血圧を呈するラットの作製に成功している。本高血圧ラットは成熟動物に対する遺伝子直接導入法によって、初めて作製された高血圧モデルラットである。HVJ-リポソーム法によるモデルラット作製は、簡便でかつ種特異性を問わないため、ヒトには感染しないウイルスDNAを導入したり、ヒトレニン特異的降圧薬の開発に有用であると考えられている⁸⁾。

一方、アンジオテンシノジェン(AGN)遺伝子と高血圧の関係は実験的にも示されており、このことは前述のマウスにおけるAGN遺伝子コピーの数とAGN濃度、血圧との並行性からも示唆されている。さらに我々はSHRにおいてAGN遺伝子のアンチセンスオリゴヌクレオチドやAGN遺伝子転写活性調節因子に対するデコイ型核酸をHVJリポソーム法で肝臓内に局所的に遺伝子の導入を行うと血中AGN濃度の低下とともに降圧がみられることを確認した⁹⁾。さらに最近これらを脳室内投与することにより中枢性にAGN産生を抑制するとSHRで降圧がみられたことから、AGNは従来の血中(肝由来)レニン-アンジオテンシン系の他、脳のような局所レニン-アンジオテンシン系においても重要な役割をはたしていることが示唆されている。

4. 本態性高血圧とレニン・アンジオテンシン系遺伝子

ヒト本態性高血圧はポリジーン疾患の代表的なもので、主要遺伝子座位数は十数個と推定されている。本症の遺伝子解析は多数例を用いた罹患同胞対解析 sib-pair analysisや群間比較法であるassociation studyで行われており、現在までのところ表1に示すような候補遺伝子が挙げられている。これらのうち、最も重要な働きをすると考えられ、世界的に研究が進められているのは、AGN遺伝子である。その他レニン・アンジオテンシン系(RA)系遺伝子はACE遺伝子が心筋

梗塞など、心血管系合併症遺伝子として注目されている。

表1. ヒト本態性高血圧の候補遺伝子

<u>染色体座位</u>	<u>血圧との相関が報告された遺伝子</u>
1q36	心房性ナトリウム利尿ペプチド
1q42-43	アンジオテンシノーゲン
3q22	アンジオテンシンIIタイプI受容体
4p16.3	α -アデュシン
5q31-32	グルココルチコイド受容体
5q31-32	β 2-アドレナリン受容体
8p12-11.1	β 3-アドレナリン受容体
10q25	α 2-アドレナリン受容体
16p13.11	SA
16q22.2	ハプトグロビン
17q25	グルカゴン受容体
19p13.3	インスリン受容体
19q13.3	グリコーゲン合成酵素

ヒトAGN遺伝子は1番染色体長腕にあり、5つのエクソンからなる。Jeunemaitreら¹⁰⁾はAGN遺伝子の第2エクソンのアミノ酸番号235番のメチオニンがスレオニンとなる変異(M253T)が高血圧と関連し、さらにこの変異を持つヒトでは血中AGN濃度も上昇していると報告した。その後本邦人も含めてM235Tが高血圧群に多いことが確認された¹¹⁾。さらにこの多型は老年者の収縮期高血圧とも関係していることが報告されている。しかし、CaulfieldらはM235Tと高血圧は連鎖せず、3'側のGTリピートマイクロサテライト多型と連鎖すると報告した。最近、深水らは5'側のコアプロモーターには転写活性領域の応答に重要なメディエーターであるAGCF1が結合し、この結合領域内に存在する遺伝子多型(-20, -18)によりAGCF1のDNA結合活性が2.5倍も変化し、AGN遺伝子の転写活性が影響を受けている可能性を示唆した(日本高血圧学会、1996)。我々の検

討では、この多型(-18)と高血圧が関連していることを確認している。さらに本プロモーター領域の多型は、従来注目されてきたM235T多型と強く連鎖していることも明らかとなり、ANG遺伝子における本多型と高血圧との関係は深いものと考えられるが、その詳細な機序については今後の課題である¹²⁾。その他AGN遺伝子のM235T変異は心筋梗塞の危険因子としても知られている¹³⁾。

ACE遺伝子は第16イントロンのAlu配列の有無によりII型、ID型、DD型多型が存在することが知られているが、Cambienら¹⁴⁾によりDD型では心筋梗塞が多いとの報告があり有名になった。ACE/DD多型は心筋梗塞の他、緊急PTCA後の再狭窄¹⁵⁾、心肥大、糖尿病性腎症の腎機能増悪因子、IgA腎症、IgA腎症における抗蛋白尿効果、頸動脈壁肥厚、高血圧患者の大動脈 stiffness との関係が指摘され心血管系合併症へのACE遺伝子のかかわりが注目されている。ACE遺伝子と心筋梗塞との関係はその後賛否両論があり、結論はでていないが、最近これらをまとめたメタアナリシスの結果が報告されており、心筋梗塞に対するDD型のオッズ比は非DD型の1.26倍と有意に高いことが示された¹⁶⁾。ACE/DD型は血中のみならず組織(心臓)中のACE濃度を高める方向に働き、組織RA系を介して、これら心血管系合併症や心血管リモデリングの増悪因子になっている可能性が高い。

アンジオテンシンII受容体遺伝子(AT1-R)のA1166C多型については高血圧症、大動脈壁の硬化度と関連するとの報告や、ACE/DDと相乗的に心筋梗塞の危険因子として働くとの報告がある。一方、我々の最近の検討によるとAT1、AT2遺伝子多型は 高血圧とは直接関係しないものの重症度とCC型が関連することが判明した。

その他、R-A系以外にも交感神経系関連遺伝子($\alpha 2$ 、 $\beta 3$ 受容体)、糖代謝やインスリン感受性に関連する遺伝子(インスリン受容体、プロテインフォスファターゼ-1)なども高血圧と関連するとの報告がみられる。

5. おわりに

レニン-アンジオテンシン系関連遺伝子と高血圧とのかかわりについてラットとヒトにおける遺伝子解析の最近の情報、および遺伝子操作動物のトピックスを含め述べた。アンジオテンシノジェン遺伝子は血圧の維持、高血圧の成因と深くかかわることが示唆され、ACE遺伝子は組織R-A系を介して心血管系合併

症と関係している可能性が高い。アンジオテンシンII受容体遺伝子(AT1)も高血圧や合併症と関係している可能性がある。高血圧遺伝子の解明な本症の早期診断に有用であり、予防、治療など、臨床面においても飛躍的な進展が期待されている。

文 献

- 1) Jacob HJ. et al.: Genetic mapping of a gene causing hypertension in the stroke-prone spontaneously hypertensive rat. *Cell* 67:213-224, 1991.
- 2) Hilbert P. et al.: Chromosomal mapping of two genetic loci associated with blood-pressure regulation in hereditary hyertensive rats. *Nature* 353:521-529, 1991.
- 3) Katsuya T et al.: Hypertensive effect associated with a phospholipase C δ 1 gene mutation in the spontaneously hypertensive rat. *Biochem Biophys Res Comm* 187:1359-1366, 1992.
- 4) Katsuya T et al.: A neuropeptide Y locus on chromosome 4 cosegregate with blood pressure inthe spontaneously hypertensive rat. *Biochem Biophys Res Comm* 192:261-267, 1993.
- 5) Takami S. et al.: Analysis and comparison of new candidate loci for hypertension between genetic hypertensive rat strains. *Hypertens Res.* 19:51-56, 1996.
- 6) Smithies O et al.: Gene targetting approaches to complex genetic disease atherosclerosis and essential hypertension. *Proc Natl Acad Sci USA* 92:5266-5272, 1995.
- 7) Fukamizu A et al.: Chimeric renin-angiotensin system demonstrates sustained increase in blood pressure of transgenic nice carrying both human renin and human angiotensinogen genes. *J Biol Chem* 268:1167-1121, 1993.
- 8) Tomita N. et al.: Hypertensive rat produced by in vivo gene introduction of human renin. *Circ Res* 73: 898-905, 1993.
- 9) Tomita N et al.: Transient decrease in high blood pressure by in vivo transfer of antisense oligonucleotides against rat angiotensinogen. *Hypertension* 26:131-136, 1995.

- 10) Jeunemaitre X et al.: Molecular basis of human hypertension : role of angiotensinogen. *Cell* 71:169-180, 1992.
- 11) Kamitani A et al.: Association analysis of a polymorphism of the angiotensinogen gene with essential hypertension in Japanese. *J Hum Hypertens* 8:521-524, 1994.
- 12) Sato N. et al.: Association of variants in critical core promotor element of angiotensinogen gene with increased risk of essential hypertension in Japanese. *Hypertension* (in press), 1997.
- 13) Kamitani A et al.: Enhanced predictability of myocardial infarction in Japanese by combined gene type analysis. *Hypertens* 25:950-953, 1995.
- 14) Cambien F et al.: Deletion polymorphism in the gene for angiotensin-converting enzyme is a potent risk factor for myocardial infarction. *Nature* 359:641-644, 1992.
- 15) Ohishi M et al.: A potent risk factor for restenosis. *Nature Genet* 5:324-325, 1993.
- 16) Samani NJ et al.: A meta-analysis of the association of the deletion allele of the angiotensin-converting enzyme gene with myocardial infarction. *Circulation* 94:708-712, 1996.

新しい循環調節ペプチド：アドレノメデュリンとPAMP

国立循環器病センター研究所 生化学部

寒川 賢治

はじめに

循環器系は、種々の神経性及び体液性因子により複雑な調節を受けている。ナトリウム利尿ペプチドファミリーやエンドセリンなどの発見により新しい循環調節機構が明らかになってきたように、新しい循環調節因子の発見は循環調節研究に新たな展開をもたらすものと考えられる。

筆者らは、ラット血小板中のcAMPの増加活性を指標にしたアッセイ法を用いて、ヒト褐色細胞腫組織より新しい降圧活性ペプチド；アドレノメデュリン(adrenomedullin: AM)を発見した。また、アドレノメデュリン前駆体のcDNA解析により、同じ前駆体よりアドレノメデュリンとは別に、降圧活性を示す新たな生理活性ペプチド；“PAMP (proadrenomedullin N-terminal 20 peptide)”が産生されることが明らかにした。アドレノメデュリンとPAMPの存在は、ナトリウム利尿ペプチドやエンドセリンとは異なる新たな循環調節系が存在することを示唆するものである。

本稿ではアドレノメデュリンとPAMPの構造と作用、産生調節などの基礎的な面を概説し、また、一部循環器疾患やエンドトキシンショックなどの病態との関連についてもふれたい。

1. アdreノメデュリンの構造と活性

ヒトAMは52残基のアミノ酸よりなり、分子内ジスルフィド(S-S)結合による環状構造を有し、C末端がアミド化(-CONH₂)されたペプチドである(図1)(1)。AMはカルシトニン遺伝子関連ペプチド(calcitonin gene related peptide: CGRP)及びアミリン(amylin)と全体でのアミノ酸の相同性は約20%と低いが一部類似性を示し、6残基のアミノ酸よりなる環状構造とC末端のアミド構造に関して共通の特徴を有する。また、AMとCGRPは生理作用や作用機序などの点でも類似することから、AMは広い意味でCGRPファミリーに属すると考えられる。

AMはCGRPにはないN末端側に14残基延長した特徴的な構造を有するが、この延長構造は活性に必須ではなく、環状構造よりN末端側を切除したAM [16-52]はAMと同等な活性を示す。一方、環状構造は活性に必須であり、環状構造を含まないAM [22-52]は全く活性を示さず、逆にアンタゴニスト活性を示すことが明らかになっている。またC末端のアミド構造(-CONH₂)も重要であり、C末端

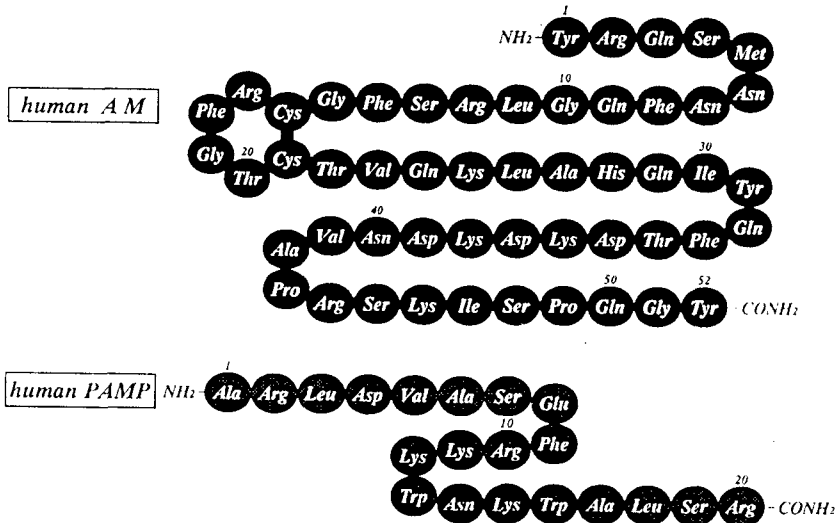


図1 ヒト・アドレノメデュリンと PAMP のアミノ酸配列。

がカルボン酸の AM [1-52] COOH では非常に活性が低下する (2)。

2. アドレノメデュリン前駆体の構造と前駆体由来の新たな降圧活性ペプチド ; “PAMP”

ヒト AM 前駆体の構造は cDNA 解析により明らかにされた (3)。図 2 に示したように、ヒト AM 前駆体は 21 残基のシグナルペプチドを含む 185 残基のアミノ酸よりなり、一つの AM 配列を含む。AM 配列の両側は、典型的なプロセッシングシグナル (Lys-Arg もしくは Arg-Arg) で囲まれていて、C 末端の Tyr に続く Gly はアミド構造の供与体になると考えられる。また、アドレノメデュリンの N 末端側に続く Arg-X-Arg-X-Lys-Arg という配列は、非内分泌系の細胞における生理活性ペプチドの constitutive な分泌に際してのプロセッシングに適した配列とされている。このことは後に述べるように、アドレノメデュリンが副腎髄質などの内分泌組織以外にも多くの組織で発現されていることを考えると興味深い事実である。

AM 前駆体にはさらに、新しい生理活性ペプチドと考えられる興味あるアミノ酸配列が存在した。シグナルペプチドに続くプロアドレノメデュリン (proAM) の N 末端 20 残基の配列には、20 番目の Arg に続き、Gly-Lys-Arg という典型的な C 末端がアミド化シグナル配列が存在する。この事実は、proAM の N 末端の 20 残基は、その C 末端が Arg-CONH₂ 構造を有した生理活性ペプチドとして生合成される可能性が非常に高いことを示すものであることから、筆者らはこのペプチドを proadrenomedullin N-terminal 20 peptide (PAMP) と命名した (3)。

PAMPのアミノ酸配列を図1に示したが、既知の生理活性ペプチドとは全く相同性のない新しいペプチドである。

PAMPはその後副腎髄質よりペプチドとして単離、構造決定され、遺伝子側からその存在が推定されたPAMPが実際に生体内で存在することが証明された(4)。PAMPはAMと同様に降圧活性を有するが、その降圧パターンはAMとは異なる。PAMPは褐色細胞腫や副腎髄質以外にも心房や脾臓にも存在し、血中及び尿中でも存在することが明らかになっている。このように、AM前駆体からは、AMと同時にさらにPAMPが新しい循環調節ペプチドとして生合成されることが明らかになった。

3. アドレノメデュリンとPAMPの生理作用

AMの作用として特徴的なものは、長時間持続する(30~60分)強力な降圧作用である(図3)(1)。この降圧作用は抵抗血管の拡張によるもので、最も強力な血管拡張性の降圧ペプチドとして知られているCGRPに匹敵することから、AMが生体内でも降圧ペプチドとして重要な役割を果たしているものと考えられる。AMはラット培養血管平滑筋細胞に対して、CGRPと同様にcAMPを増加させ、さらに培養血管平滑筋細胞にはAMに特異的な受容体が存在することから、AMによ

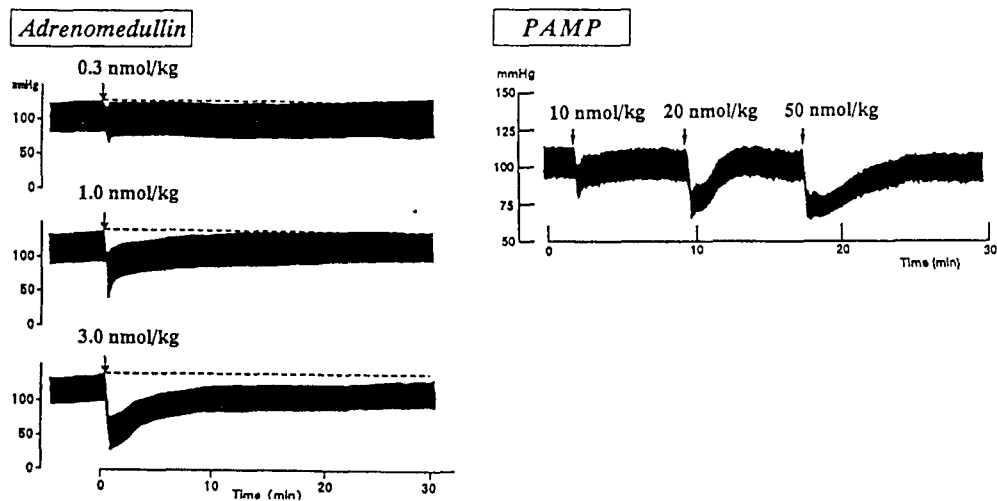


図3 アドレノメデュリンとPAMPの降圧活性。

(a) 麻酔下のラットにアドレノメデュリン (AM) を単回投与したときの血圧の変化。
投与量依存性に降圧が認められ、持続時間が30~60分と長い特徴的な降圧パターンを示す。

(b) 麻酔下のラットにPAMPを単回投与したときの血圧の変化。

PAMP 20nmol/kgでの最大降圧効果はアドレノメデュリン3nmol/kg投与に匹敵する。しかし、降圧の持続時間はアドレノメデュリンと比較して短時間である。

る血管拡張作用は、このレセプターを介した血管平滑筋細胞内のcAMP増加によるものと考えられる(5, 6)。一方、血管内皮細胞にもAMに特異的な受容体が存在し、AMの血管拡張作用の一部は内皮依存性であり、NO産生を介した作用機序も存在すると考えられている(7, 8)。

AMは上記の血管拡張作用のほかにも多様な生理作用を示し、利尿、気管支拡張、細胞増殖及び遊走抑制、アルドステロン産生抑制、エンドセリン産生抑制、自律神経活動の変化などの作用が報告されている。また中枢作用として神経活動、血圧、心拍数を変化させる作用やACTH分泌抑制、飲水行動の抑制などの作用も報告されている。

一方PAMPは、一過性のAMとは異なるパターンの降圧作用を示し、PAMPの静脈内投与による降圧活性はAMの約10分の1程度である(図3)。PAMPがAMにはない副腎髄質からのカテコールアミンの分泌抑制作用を有し、また血管壁の交感神経末端からのノルエピネフリン分泌を抑制することから、PAMPによる降圧作用はこれらの機序を介したものと考えられている(9, 10)。

4. アドレノメデュリンの組織分布と発現調節

ヒトの各組織におけるAMのmRNAの発現及び免疫活性は、副腎髄質のみならず心房、心室、肺、腎臓、脾臓など多くの組織に分布していることが明らかになっている(3)。特に、副腎髄質では褐色細胞腫に相当するmRNA発現が見られ、また極めて高濃度のAMが存在することから、当初は、血中のAMは副腎髄質からの分泌に由来するものと考えられていた。しかし、その後の検討で副腎髄質が血中AMの主な分泌源ではないという結果が得られている。

肺、心臓、腎臓などにおけるAMmRNA発現は副腎髄質に匹敵するのに対して、これらの組織でのAM免疫活性は副腎髄質に比べてかなり低濃度であり、mRNA量とペプチド量で違いが見られる。これは、副腎髄質からのAMの分泌が心房からのANPなどと同様に、生合成されたペプチドがいったん分泌顆粒に貯蔵されのち分泌刺激に応じて分泌される調節性の機序(regulatory pathway)であるのに対して、副腎髄質以外の肺、腎臓などの組織からのAMの分泌は、生合成後組織には貯蔵されずにただちに分泌される構成性の機序(constitutive pathway)であることによるものと考えられる。

さらに、ラットの各組織及び培養細胞での検討により、AMはラットの培養血管内皮細胞及び平滑筋細胞において非常に多量に発現、分泌され、特に培養血管内皮細胞でのAMmRNAの発現は、副腎の約20倍以上にも達し、ペプチド分泌量はエンドセリン-1に匹敵することが示されている(11, 12)。また、血管組織でも腎臓や心室に相当するmRNA発現が見られることから、現在血中AMの主要な産生源は血管壁細胞と考えられている。血管内皮細胞及び平滑筋細胞からの分泌は構成

性であることから、血管壁細胞での産生、分泌は遺伝子発現レベルでの調節により制御されているものと考えられる。実際、培養細胞での検討により、リポポリサッカライド (LPS)、IL-1、TNFなどのエンドトキシンショック誘動因子、ステロイドホルモン、甲状腺ホルモンや種々の血管作動性物質、8Br-cAMP、フォルスコリンなど多種類の因子で複雑に制御されていることが明らかにされている (13, 14, 15)。

AMは上記の循環器系組織以外にも、脳 (室傍核、視索上核) 及び消化管 (胃、小腸、大腸の上皮細胞) にも存在することが抗体を用いた免疫組織化学的に示され、さらにマクロファージなどの免疫系の細胞での存在も明らかにされているが、これらの部位での機能については現在まだ明らかになっていない。

5. 循環器疾患における血中アドレノメデュリン濃度

AMは、強力な降圧作用をもち、主として循環器系の臓器、組織において産生されることより、心血管系において重要な役割を担うペプチドであることが予想される。

そこで、各種循環器疾患におけるAMの血中動態について、AMに特異的な高感度ラジオイムノアッセイ法を用いて検討した。本態性高血圧症、慢性腎不全および心不全患者における血漿AM濃度を健常者と比較して図4に示した (16, 17)。高血圧患者において血中AMは健常人に比べ上昇しており、その程度は臓器障害のないWHO I期の患者よりも臓器障害を伴うWHO II期の患者の方が大きかった。腎不全や心不全患者においては、血中AMレベルの増加がより著明であった。腎不全患者では血漿クレアチニン濃度が高い程、心不全患者ではNYHAの分類でランクが高い程、血漿AM濃度は高値を示した。心不全患者では、治療により病

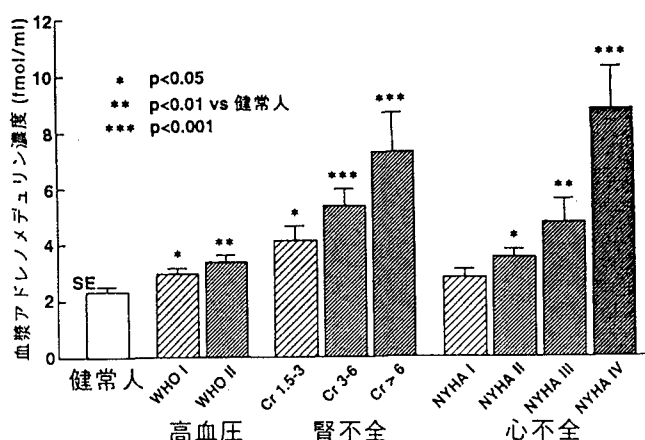


図4 各種の循環器疾患患者における血漿アドレノメデュリン濃度。
Cr: 血漿クレアチニン濃度 (mg/dl), NYHA: ニューヨーク心臓学会による心機能分類。

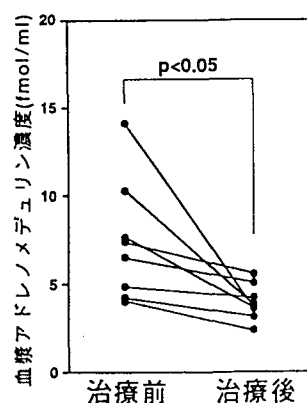


図5 心不全患者における治療前後の血漿アドレノメデュリン濃度の変化。

態が改善すると血漿AM濃度も低下した（図5）。すなわち、各種の循環器疾患において、血中AMは、疾患の重症度に伴って増減すると考えられる。（16, 17）。

腎不全患者は言うまでもなく、WHO II期の高血圧患者や心不全患者においても腎機能が低下していると考えられ、その程度は疾患の重症度に並行することが予想される。従って、これらの循環器疾患患者における血中AMの増加は、インスリンやPTHなどのペプチド・ホルモンの場合と同様に、単に腎臓における代謝・排泄の遅延を反映しているのかもしれない。実際、血中AMと血漿クレアチニンの間には正の相関が認められる。しかし、腎動静脈カテーテル検査時の採血では、腎動静脈間に有意な血中AM濃度の差はなく、ラットにおいて静脈内に投与されたAMは半減期1分以内と極めて速やかに循環血液中より消失することより、腎臓が循環血液中のAMの主要な代謝部位であるとは考え難い。おそらく、血中AMの消失は主として受容体との結合を介するものであり、その主要臓器の一つが肺であると推測されている。

表1 各種の循環器疾患患者における血漿中アドレノメデュリンと他の循環器系液性因子との相関（n = 124）

	相関係数 (r)	p 値
血漿エピネフリン濃度	0.138	n.s.
血漿ノルエピネフリン濃度	0.668	<0.0001
血漿レニン活性	0.358	<0.001
血漿アルドステロン濃度	0.422	<0.001
血漿 ANP 濃度	0.691	<0.0001
血漿 BNP 濃度	0.500	<0.0005
血漿 cyclic AMP 濃度	0.585	<0.0001
血漿クレアチニン濃度	0.586	<0.0001

表1に、各種の循環器疾患患者における血漿AMと他の循環器系の液性因子との相関を示した（16）。血中AMは、レニン、アルドステロンよりもエピネフリン（NE）や心房性Na利尿ペプチド（ANP）と良い相関を示した。また、血漿AMと血漿cAMPとの間にも有意な相関が認められた。従って、循環器疾患における血中AMの上昇には、交感神経活性の亢進や体液量の増加が関与し、また、AMのcAMP産生刺激作用は血中cAMPレベルにも影響し得るものであることが推測される。

6. エンドトキシンショックとアドレノメデュリン

血管壁細胞におけるAM遺伝子発現が、LPS, IL-1, TNFなどのエンドトキシンショック誘動因子により顕著に増加することから、エンドトキシンショックにお

けるAMについての検討を行った。エンドトキシンショックのモデルとして、ラットにLPS (5mg/kg) を投与した時の血中AM濃度の変化を図6に示した。血漿中のAMは経時的に増加し、1時間後に約3倍、3時間後に約15倍に上昇した。ノーザンブロッティングによる検討の結果、AM遺伝子の発現はほぼ全組織で亢進していたが、特に血管、肺、腸管などでの増加が著しく、さらに正常時には認められない肝臓などにも発現が見られた。このことから、これらの組織の血管壁におけるAM産生が血中濃度の上昇に寄与しているものと考えられる (18)。

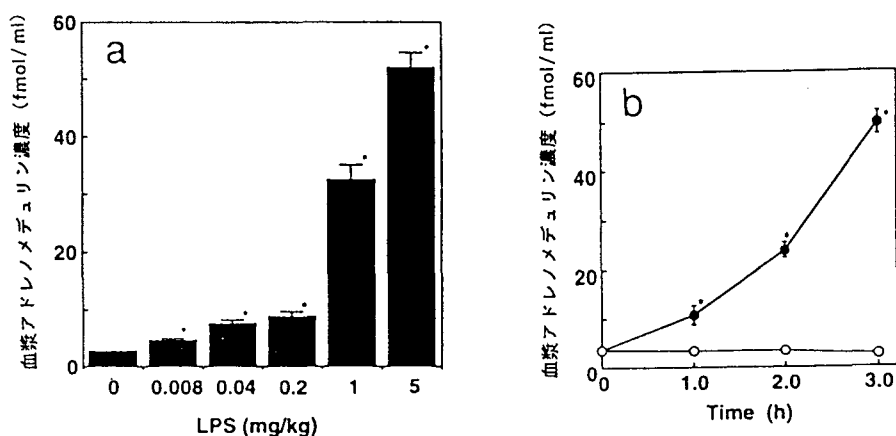


図6 リポポリサッカライド (LPS) 投与 (静脈内) 時のラット血漿アドレノメデュリン (AM) 濃度
(a) LPS投与3時間後, (b) LPS ; 5mg/kg (—●—), コントロール (—○—)

最近、敗血症性ショック患者における血中AM濃度について検討した結果、全ての患者でAM濃度は上昇し、正常者の100倍に達する例も見られた。また、血中AM濃度と末梢血管抵抗との間に高い負の相関性が認められることから、AMがエンドトキシンショック時の降圧性物質として機能している可能性が示唆される (19)。

AMは血管拡張に基づく著明な降圧作用をもち、その血中レベルが各種の循環器疾患において上昇することから、生体内の特に心血管系の保全に役割を担う循環調節ホルモンであると考えられるが、敗血症時のように過度の産生刺激により全身的に過剰産生されると極度の血管拡張を来すものと考えられる。

おわりに

AMが副腎髄質や心臓、肺、腎臓のみならず血管壁の細胞で産生され、またそのレセプターが血管内皮や平滑筋細胞に存在することを考えると、AMは循環ホルモンと同時に、血管壁においてはエンドセリンやC型ナトリウム利尿ペプチド

(CNP)と同様に局所因子としてオートクリンやパラクリン的にも機能しているものと思われる。共通の前駆体より生合成されるAMとPAMPは、AMが血管内皮及び平滑筋に直接作用して血管拡張に働くのに対して、PAMPは血管壁の交感神経末端に作用して血管拡張に働くという具合に、両ペプチドは協調してトーンズの調節などに関与しているものと推測される。

今後、各種疾患における知見がさらに集積されることにより、病態生理的意義が明らかになり、病態の理解、治療に有用な情報となるものと思われる。

文 献

- (1) Kitamura, K., Kangawa, K., Kawamoto, M., Ichiki, Y., Nakamura, S., Matsuo, H. and Eto, T. : Adrenomedullin: A novel hypotensive peptide isolated from human pheochromocytoma. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 192 : 553-560, 1993.
- (2) Eguchi, S., Hirata, Y., Iwasaki, H., Sato, K., Watanabe, T. X., Inui, T., Nakajima, K., Sakakibara, S. and Marumo, F. : Structure - activity relationship of adrenomedullin, a novel vasodilatory peptide, in cultured rat vascular smooth muscle cells. *Endocrinology* 135 : 2454-2458, 1994.
- (3) Kitamura, K., Sakata, J., Kangawa, K., Kojima, M., Matsuo, H. and Eto, T. : Cloning and characterization of cDNA encoding a precursor for human adrenomedullin. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 194 : 720-725, 1993.
- (4) Kitamura, K., Kangawa, K., Ishiyama, Y., Washimine, H., Ichiki, Y., Kawamoto, M., Minamino, N., Matsuo, H. and Eto, T. : Identification and hypotensive activity of proadrenomedullin N-terminal 20 peptide(PAMP). *FEBS Lett.* 351 : 35-37, 1994.
- (5) Ishizaka, Y., Ishizaka, Y., Tanaka, M., Kitamura, K., Kangawa, K., Minamino, N., Matsuo, H. and Eto, T. : Adrenomedullin stimulates cyclic AMP formation in rat vascular smooth muscle cells. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 200 : 642-646, 1994.
- (6) Eguchi, S., Hirata, Y., Kano, H., Sato, K., Watanabe, Y., Watanabe, T. X., Nakajima, K., Sakakibara, S. and Marumo, F. : Specific receptors for adrenomedullin in cultured rat vascular smooth muscle cells. *FEBS Lett.* 340 : 226-230, 1994.
- (7) Kato, J., Kitamura, K., Kangawa, K. and Eto, T. : Receptors for adrenomedullin in human vascular endothelial cells. *Eur. J. Pharmacol.* 289 : 383-385, 1995.
- (8) Shimekake, Y., Nagata, K., Ohta, S., Kambayashi, Y., Teraoka, H., Kitamura, K., Eto, T., Kangawa, K. and Matsuo, H. : Adrenomedullin stimulates two signal transduction pathways, cAMP accumulation and Ca^{2+} mobilization, in bovine aortic endothelial cells. *J. Biol. Chem.* 270: 4412-4417, 1995.

- (9) Katoh, F., Kitamura, K., Niina, H., Yamamoto, R., Washimine, H., Kangawa, K., Yamamoto, Y., Kobayashi, H., Eto, T. and Wada, A.: Proadrenomedullin N-terminal 20 peptide(PAMP), an endogenous anticholinergic peptide: its exocytotic secretion and inhibition of catecholamine secretion in adrenal medulla. *J. Neurochem.* 64: 459-461, 1995.
- (10) Simosawa, T., Ito, Y., Ando, K., Kitamura, K., Kangawa, K. and Fujita, T.: Proadrenomedullin N-terminal 20 peptide, a new product of the adrenomedullin gene, inhibits peripheral sympathetic nerve activities. *J. Clin. Invest.* 96: 1672-1676, 1995.
- (11) Sugo, S., Minamino, N., Kangawa, K., Miyamoto, K., Kitamura, K., Sakata, J., Eto, T. and Matsuo, H.: Endothelial cells actively synthesize and secrete adrenomedullin. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 201: 1160-1166, 1994.
- (12) Sugo, S., Minamino, N., Shoji, H., Kangawa, K., Kitamura, K., Eto, T. and Matsuo, H.: Production and secretion of adrenomedullin from vascular smooth muscle cells: Augmented production by tumor necrosis factor- α . *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 203: 719-726, 1994.
- (13) Sugo, S., Minamino, N., Shoji, H., Kangawa, K., Kitamura, K., Eto, T. and Matsuo, H.: Interleukin-1, tumor necrosis factor and lipopolysaccharide additively stimulate production of adrenomedullin in vascular smooth muscle cells. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 207: 25-32, 1994.
- (14) Minamino, N., Shoji, H., Kangawa, K. and Matsuo, H.: Adrenocortical steroids, thyroid hormones and retinoic acid augment the production of adrenomedullin in vascular smooth muscle cells. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 211: 686-693, 1995.
- (15) Sugo, S., Minamino, N., Shoji, H., Kangawa, K. and Matsuo, H.: Effects of vasoactive substances and cAMP related compounds on adrenomedullin production in cultured vascular smooth muscle cells. *FEBS Lett.* 369: 311-314, 1995.
- (16) Ishimitsu, T., Nishikimi, T., Saito, Y., Kitamura, K., Eto, T., Kangawa, K., Matsuo, H., Omae, T. and Matsuoka, H.: Plasma levels of adrenomedullin, a newly identified hypotensive peptide, in patients with hypertension and renal failure. *J. Clin. Invest.* 94: 2158-2161, 1994.
- (17) Nishikimi, T., Saito, Y., Kitamura, K., Ishimitsu, T., Eto, T., Kangawa, K., Matsuo, H., Omae, T. and Matsuoka, H.: Increased plasma levels of adrenomedullin in patients with heart failure. *J. Am. Coll. Cardiol.* 26: 1524-1531, 1995.
- (18) Shoji, H., Minamino, N., Kangawa, K. and Matsuo, H.:
Endotoxin markedly elevates plasma concentration and gene transcription of

adrenomedullin in rat. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 215: 531–537, 1995.

- (19) Nishio, K., Akai, Y., Murano, Y., Doi, N., Ueda, S., Tabuse, H., Miyamoto, S., Dohi, K., Minamino, N., Shoji, H., Kitamura, K., Kangawa, K. and Matsuo, H.: Elevated plasma levels of adrenomedullin correlate with relaxation of vascular tone in patients with septic shock. *Crit. Care Med.* 25 : 953–957, 1997.

肥満遺伝子産物（レプチン）と受容体の分子機構

—Geneticsから臨床応用へ—

京都大学医学研究科臨床病態医科学・第二内科 小川佳宏

肥満遺伝子産物（レプチン）は、脂肪組織より分泌されて、中枢神経系に作用する新しい飽食因子であり、強力な摂食抑制作用と交感神経活動亢進作用により体重増加の抑制や肥満の制御に関与すると考えられている。遺伝性肥満 *ob/ob* マウスでは、レプチンの105番目のアミノ酸であるアルギニンが終止コドンに変換されるナンセンス変異(Arg105Stop)のため肥満とインスリン抵抗性糖尿病を発症する。レプチン前駆体は、21アミノ酸より成るシグナルペプチドを有する167アミノ酸から成り、マウス、ラット、ヒトのレプチン前駆体の構造はマウスとラットの間で96%、マウスとヒトの間で83%であり種属を越えて保存されている。ヒトのレプチン遺伝子は第7染色体長腕(7q31.3)に約20kbにわたって存在し、3つのエクソンと2つのイントロンから構成され、レプチン前駆体は第2,3エクソンによりコードされている。ヒト肥満では、最近、パキスタンのパンジャブ地方の従兄婚の家系に含まれる2人の高度肥満児の解析の結果、レプチンの132番目のアミノ酸であるグリシンの後の1塩基欠失のためフレームシフトを生じる点突然変異が見い出されている。

レプチン受容体(Ob-R)は膜一回貫通型受容体であり、サイトカイン受容体のシグナル伝達分子であるgp130と高い相同性が認められ、選択的スプライシングにより生じる複数のアイソフォーム(Ob-Ra, Ob-Rb, Ob-Rc, Ob-Rd, Ob-Re)が存在する。このうち最も長いOb-Rbの細胞内領域にはJAKsとSTATsの結合に関与するボックス1, 2, 3配列が認められる。一方、Ob-Ra, Ob-Rc, Ob-Rdの細胞内領域には、ボックス1配列のみが存在する。Ob-Reには膜貫通領域が認められず、分泌型のアイソフォームである。各Ob-Rアイソフォームは、中枢神経系のみならず広く末梢組織にも分布しており、レプチンの末梢作用の可能性が注目されている。

遺伝性肥満 *db/db* マウスはレプチン不応性であるが、これはOb-R遺伝子のイントロン中の点突然変異により生じる異常選択的スプライシングのために

Ob-Rbを欠失することによって考えられている。又、遺伝性肥満Zucker(*fa/fa*)ラットでは、全てのOb-Rアイソフォームに共通な細胞外領域の269番目のアミノ酸であるグルタミンがプロリンに変換するミスセンス変異(Gln269Pro)が、肥満高血圧自然発症Koletsky(*fa^k/fa^k*)ラットのOb-Rの細胞外領域には763番目のアミノ酸であるチロシンが終止コドンに変換するナンセンス変異(Tyr763Stop)が見い出されており、Ob-R遺伝子変異が肥満の原因遺伝子となることが明らかになっている。ヒトOb-R遺伝子においても複数の遺伝子多型が報告されているが、肥満の原因となる遺伝子変異は同定されていない。

マウス、ラット、ヒトのいずれにおいてもレプチン遺伝子発現は脂肪組織でのみ検出され、その程度は、脂肪組織の部位により異なっている。脂肪組織における遺伝子発現は、種々の遺伝性肥満モデル動物あるいは後天性肥満モデル動物において著しく亢進している。更に、血中レプチン濃度は、肥満モデル動物あるいは肥満者において著しく上昇しており、肥満の程度、特に体脂肪率と良く相関する。一方、神経性食欲不振症患者においては血中レプチン濃度は著しく減少しており、血中レプチン濃度は体脂肪量の有力な生化学的指標になると考えられる。内分泌性肥満であるクッシング症候群においても血中レプチン濃度の上昇が認められるが、少なくとも一部は、過剰に分泌されたグルココルチコイドの脂肪組織への直接作用によるものであると考えられている。

レプチンは、発見当初より脂肪組織においてのみ産生されるものと考えられていたが、最近、脂肪組織以外の臓器としてヒト胎盤において産生されることが明らかになった。特に、胎盤の中でも、栄養膜細胞と合体栄養細胞においてレプチンの生合成と分泌が確認されており、hCGと同様に母体血中及び臍帯静脈中へ分泌されている。このため、妊娠女性では非妊娠女性と比較して著しく血中レプチン濃度の上昇が認められ、肥満者の血中濃度に匹敵するものである。更に、絨毛性疾患（胎状奇胎、絨毛癌）の腫瘍組織におけるレプチンの産生が証明されており、血中濃度も著しく上昇するが、単純子宮全摘術あるいは化学療法により血中レプチン濃度は速やかに減少する。以上より、これらの絨毛性疾患は“レプチン産生腫瘍”と考えられる。胎盤に由来するレプチンの生理的・病態生理的意義については今後の検討が必要である。

ラットやマウスにリコンビナントレプチンを腹腔内あるいは静脈内投与する

ことにより、レプチンの強力な摂食量と体重増加の抑制作用が確認されている。レプチンの末梢投与による摂食量と体重増加抑制効果は、数100分の1の用量を脳室内投与することにより再現されるため、レプチンの作用の大部分は中枢神経系を介するものと考えられている。ラットの視床下部神経核にレプチンを直接マイクロインジェクションすることにより、特に、弓状核(Arc)へのレプチン投与群において、著しい摂食量と体重増加抑制効果が認められる。又、視床下部腹内核(VMH)破壊ラットにおいて、レプチンの摂食量と体重増加抑制効果が消失しており、レプチンの摂食抑制作用にVMHも関与することが明らかになっている。一方、レプチンを静脈内投与あるいは脳室内投与することにより、血中カテコラミン濃度の上昇を伴う交感神経活動亢進が認められるが、これは、VMHにレプチンが直接作用することによると考えられている。以上のように、脂肪組織より分泌されるレプチンは視床下部に直接作用することにより新しいエネルギー代謝調節系を構成すると考えられる。

[参考文献]

1. H. Masuzaki, Y. Ogawa, M. Shigemoto et al. Adipose tissue-specific expression of the *obese (ob)* gene in rats and its marked augmentation in genetically obese-hyperglycemic Wistar fatty rats. *Proc. Jpn. Acad. Ser. B.* 71: 148-152, 1995.
2. H. Masuzaki, Y. Ogawa, N. Isse et al. Human *obese* gene expression — Adipocyte-specific expression and regional differences in the adipose tissue —. *Diabetes* 44: 855-858, 1995.
3. Y. Ogawa, H. Masuzaki, N. Isse et al. Molecular cloning of rat *obese* cDNA and augmented gene expression in genetically obese Zucker fatty (*fa/fa*) rats. *J. Clin. Invest.* 96: 1647-1652, 1995.
4. N. Isse, Y. Ogawa, N. Tamura et al. Structural organization and chromosomal assignment of the human *obese* gene. *J. Biol. Chem.* 270: 27728-27733, 1995.
5. H. Masuzaki, Y. Ogawa, K. Hosoda et al. Augmented expression of the *obese* gene in the adipose tissue from rats fed high-fat diet. *Biochem.*

- Biophys. Res. Commun. 216: 355-358, 1995.
6. H. Masuzaki, K. Hosoda, Y. Ogawa et al. Augmented expression of *obese* (*ob*) gene during the process of obesity in genetically obese-hyperglycemic Wistar fatty (*fa/fa*) rats. FEBS Lett. 378: 267-271, 1996.
 7. K. Hosoda, H. Masuzaki, Y. Ogawa et al. Development of radioimmunoassay for human leptin. Biochem. Biophys. Res. Commun. 221: 234-239, 1996.
 8. K. Takaya, Y. Ogawa, N. Isse et al. Molecular cloning of rat leptin receptor isoform complementary DNAs — Identification of a missense mutation in Zucker fatty (*fa/fa*) rats —. Biochem. Biophys. Res. Commun. 225: 75-83, 1996.
 9. M. Hayase, Y. Ogawa, G. Katsuura et al. Regulation of *obese* gene expression in KK mice and congenic lethal yellow obese KKA^y mice. Am. J. Physiol. 271: E333-E339, 1996.
 10. K. Takaya, Y. Ogawa, J. Hiraoka et al. Nonsense mutation of leptin receptor in the obese spontaneously hypertensive Koletsky rat. Nature Genet. 14: 130-131, 1996.
 11. N. Satoh, Y. Ogawa, G. Katsuura et al. Pathophysiologic significance of the *obese* gene product, leptin, in ventromedial hypothalamus (VMH)-lesioned rats —Evidence for loss of its satiety effect in VMH-lesioned rats —. Endocrinology 138: 947-954, 1997.
 12. N. Satoh, Y. Ogawa, G. Katsuura et al. The arcuate nucleus as a primary site of satiety effect of leptin in rats. Neurosci. Lett. 224: 149-152, 1997.
 13. H. Masuzaki, Y. Ogawa, K. Hosoda et al. Glucocorticoid regulation of leptin synthesis and secretion in humans —Elevated plasma leptin levels in Cushing's syndrome—. J. Clin. Endocrinol. Metab. in press, 1997.
 14. N. Matsuoka, Y. Ogawa, K. Hosoda et al. Human leptin receptor gene in Japanese obese subjects: Evidence against either obesity-causing mutations or association of sequence variants with obesity. Diabetologia in press, 1997.
 15. H. Masuzaki, Y. Ogawa, N. Sagawa et al. Non-adipose tissue production of leptin: Leptin as a novel placenta-derived hormone in humans. Nature Med. in press, 1997.

トランスジェニックマウスを利用した時限的遺伝子機能発現システム —妊娠高血圧マウスからのヒント—

筑波大学応用生物化学系 深水昭吉

演者らは、血圧が正常なヒトレニン遺伝子導入マウス (**hRN-TgM**) とヒトアンジオテンシノーゲン遺伝子導入マウス (**hAG-TgM**) を交配して生まれる F1 の高血圧マウスを作製する過程で、♀ **hAG-TgM** × ♂ **hRN-TgM** の交配で妊娠した ♀ **hAG-TgM** だけが妊娠末期に大動脈弓部の血管破裂や心不全によって死亡するという、大変興味深い例を見出した。

F1 高血圧マウスで高血圧が発症するメカニズムは、**RN** と **AG** の間の種特異的な反応性をトリックとしている。この妊娠マウスで観察された一見不可解な現象も、ヒトーマウス間での酵素・基質の種特異的な反応性のトリックから成り立っていることが判明した。

ポイントは、胎児にあった。つまり、胎児は母方から **hAG** 遺伝子と父方から **hRN** 遺伝子を受け継ぐため、胎児—胎盤側で **hRN** が産生される。すると、この **hRN** が母体血中へ移行し、母体で循環している **hAG** と反応して過剰のアンジオテンシン II を産生する。この **hRN** の母体透過性こそが、このマウスでの妊娠高血圧の発生原因となる引き金だったのである。

ヒトの妊娠中の高血圧は、“多臓器に循環障害を起こす基礎疾患の 1 徴候”として特に注意されるべきだと考えられている。この点では、妊娠高血圧マウスの表現型がヒトの病態とどれだけ近いのかという議論は大切である。しかし、この妊娠高血圧マウスの持つ発生工学的な大きな特徴は、導入遺伝子の機能発現が極めて時限的であることである。すなわち、《妊娠》という特異的な時期に、「胎盤」という一過性に出現する特殊な器官を利用した遺伝子機能発現システムと捉えることができるだろう。

ICHにおけるがん原性試験ガイドラインの動向：トランスジェニックマウスを用いた短期発がん性試験法

三森国敏

国立医薬品食品衛生研究所 病理部

ICHにおけるがん原性試験ガイドラインの動向

ICH(医薬品の国際ハーモナイゼーション会議)の S1B(がん原性)専門家委員会(EWG)の会議では、これまでに医薬品のがん原性試験における2種のげっ歯類の使用の是非が議論されてきている。この議論においては、マウスのがん原性試験で肝腫瘍の発生増加のみで規制の対象となった例はこれまでにないこと、片方の動物種でがん原性が陽性であった物質のうちラットのみの場合はマウスのみの場合の約2倍であったこと、そしてマウスは肝腫瘍が高頻度に自然発生することなど、マウスを用いる試験に対するいくつかの問題点やマウスでの肝に対する催腫瘍性の試験成績は必ずしもヒトに外挿できない等についての疑問点等が指摘されてきた。これらの指摘に基づき、1996年5月のEWGでは、がん原性試験においては2種のげっ歯類を用いた試験を実施する替わりに、一種のげっ歯類のがん原性試験の実施に加えてトランスジェニック(TG)動物を用いた短期発がん試験モデル、イニシエーション・プロモーションモデルや新生仔動物モデルの中から一つを選び、その試験を実施し、それらの結果から、医薬品についての発がん性評価を行おうと言う新しいガイドラインの勧告案が提案された。この提案は1997年7月のICH4において6極の承認が得られ、新しいICHガイドラインとなった。

Tgマウスを用いた短期発がん性試験法

Tg動物を用いた短期発がん性試験法としては、c-Ha-ras(RAS^{H2})やv-Ha-ras等の癌遺伝子を導入したTgマウスやp53のような癌抑制遺伝子をノックアウトしたマウスを用いた試験モデルが提案されている。

v-Ha-ras 遺伝子導入 Tgマウスはその連結されるプロモーターやエンハンサーの種類により、用途が異なっている。TG.ACマウスは、ホモのv-Ha-ras

に胎児γ-グロブリンをプロモーターとして連結した Tg マウスであり、米国 Taconic Farms でその親となる wild-type の FVB/N 系マウスと共に系統維持されている。このマウスは、皮膚発癌の Tg マウスモデルとして開発されたものであり、米国国立環境衛生科学研究所(NIEHS)の Tennant らはこのマウスの皮膚に種々の発癌物質 (benzene、benzethonium chloride、2-chloroethanol、ethyl acrylate、mirex、phenol 等)を短期間投与することにより、このモデルが非遺伝子障害性発癌物質の検出に有用であることを見いだしている³。

p53 ノックアウトマウスは p53 癌抑制遺伝子を遺伝学的にノックアウトしたものであり、ホモ個体とヘテロ個体が米国 Taconic Farms で系統維持されている。ホモ個体においては、無処置で飼育しても生後 6 ヶ月までに悪性リンパ腫の発生により死の転帰をとるものが多いため、発癌性評価にはそのヘテロ個体 (p53+/-)が使用されている。米国 NIEHS の Tennant らは、National Toxicology Program (NTP)で実施した 2 年間の発癌性試験で陽性を示した化学物質 (4-vinyl-1-cyclohexene diepoxide、p-cresidine、p-anisidine、N-methylolacrylamide、reserpine)について、この p53+/-マウスを用いて 6 ヶ月未満の投与実験を行ったところ、遺伝子障害性発癌物質の検出にこのマウスモデルが著しく感受性が高かったことを報告している³。現在までの種々の実験成績から、TG.AC マウスや p53 ノックアウトマウスは、非遺伝毒性ないし遺伝毒性発癌物質の癌原性の検索に有用な実験動物であることが示唆されているが、検証作業は未だ不完全であり、日米欧の各国においてその有用性についての検証作業が国際生命科学研究所(ILSI)が中心となって実施されている。一方、わが国では、既に 30 種の化合物についてヒトプロト型 c-Ha-ras 遺伝子導入 Tg(CB6F1-Tg RASH2)マウス (RASH2 マウスと略) を用いた短期発がん試験が実施されており、この短期発がん試験法としての有用性を評価する検討がなされている。

ヒトプロト型 c-Ha-ras 遺伝子導入 Tg マウスを用いた短期発がん試験法

ヒトでの発癌における最も重要なプロセスは、プロト型癌遺伝子の活性化と癌抑制遺伝子の不活化にあると考えられていることから、癌遺伝子を導入した

Tg マウスの応用は近年急速に拡大してきており、その発癌メカニズムの解明に有用な動物としてこれらが注目をあびている。また、ヒトの腫瘍の 30%では、プロト型 ras 遺伝子の点突然変異による活性化がみられていることから、これらのプロト型遺伝子を導入した Tg マウスでは、ヒトと同様、導入遺伝子の変異により発がん性が誘発される可能性が高く、この種の Tg マウスはヒトでの発がん性検出に有用と考えられている。

RASH2 マウスは、ヒトプロト型 c-Ha-ras 癌遺伝子を導入した腫瘍モデルマウスであり、系統名は(BALB/cByJxB6rasH2/Tg)CB6F 1 である。本マウスはホモ個体が得られないため、導入遺伝子をヘテロにもつ C57BL/6JJcTg 系雄マウスと既知の非導入近交系 BALB/cByJ 系雌マウスとを戻し交配することにより実験動物中央研究所において系統維持されている²。RASH2 マウスを用いた発癌性試験の短期化の試みは、平成 4 年から我国では実施されてきている^{2,5}。

表 1 と 2 に示すように、今までに 29 種類の化学物質(17Ames 試験陽性発癌物質、6Ames 試験陰性発癌物質、3Ames 試験陽性非発癌物質、3Ames 試験陰性非発癌物質)について 7 から 9 週齢の rasH2 マウスを用い 26 週間にわたる短期発癌試験が実施され、生じた腫瘍を病理組織学的に検索し、腫瘍の種類、発生部位、発生頻度などについて対照の non-Tg マウスと比較検討がなされている^{1,4-6}。

図 1 に示すように、17Ames 試験陽性発癌物質のすべてにおいて腫瘍が誘発された。すなわち、RASH2 マウスでは 2 年間がん原性試験に比べて腫瘍誘発が 26 週以内に発現し、腫瘍がこのマウスにおいては早期から発現することが確認された。さらに、14 の発がん物質で non-Tg マウスに比較して腫瘍発生の増強が認められ、この Tg マウスが non-Tg マウスよりも著しく発がんに感受性が高いことが示唆された⁴⁻⁶。

6 種の Ames 試験陰性発癌物質については、4 物質において肺ないし前胃腫瘍が RASH2 マウスで non-Tg マウスに比し有意に増加したが、ethylene thiourea については甲状腺腫瘍は誘発されたが、RASH2 と non-Tg マウスとの間に差異はなかった(図 2)。他の非発癌物質においては、有意な腫瘍の発生増加はみられなかった(図 3)^{4,6}。このように、Ames 試験陰性発がん物質につい

ては、RASH2 マウスにおいて腫瘍の誘発が増強されたものもあったが、非発がん物質を含め、未だ検索物質数が少ないため、今後種々の物質についての検討をかさねた上で、この動物モデルの有用性について評価すべきである。

腫瘍発現した臓器に関しては、RASH2 マウスでは、表3と4に示すように、肺、前胃、脾、皮膚等に腫瘍が誘発される場合が多く、従来のマウスを用いた長期発がん試験での標的臓器と RASH2 マウスでのそれは必ずしも一致しなかった。これは、長期発がん試験に用いられている B6C3F1 や ICR 系と RASH2 の母体である CB6F1 との間で遺伝毒性発がん物質に対する各臓器の感受性が異なるものと考えられた。しかし、臓器の感受性が系統間で異なるとはいえ、RASH2 マウスは今回用いた遺伝毒性発がん物質のほとんどでこれらの臓器での腫瘍の誘発を増強すると共に、その発現が早期化していることから、これらの臓器にみられた腫瘍は投与に起因する変化とみなすべきであろう。したがって、RASH2 マウスを用いたこの短期試験系において、がん原性が不明な化学物質を投与した場合、これらのいずれかの臓器に腫瘍が誘発された時には、その物質に催腫瘍性があると判断すべきであると考えられる。

以上のように、RASH2 マウスはいわゆる遺伝毒性発癌物質の検出に非常に有用であることが示され、ICH4 において既に決定されたように、従来のマウスを用いた長期発癌性試験に代わってこのような Tg マウスを用いた短期発癌試験が今後がん原性の検出法として用いられていくものと思われる。しかし、RASH2 マウスのこれらの特別な臓器に何故腫瘍が誘発されやすいのかについては今後の検討が不可欠であり、現在そのメカニズム解明のための研究が進められている。

参考文献

1. Mitsumori K, Wakana S, Yamamoto S, Kodama Y, Yasuhara K, Nomura T, Hayashi Y, Maronpot RR. Susceptibility of transgenic mice carrying human prototype c-Ha-ras gene in a short-term carcinogenicity study of vinyl carbamate and ras gene analyses on the induced tumors. Molec Carcinogen in press. (1997).

2. Saitoh A, Kimura M, Takahashi R, Yokoyama M, Nomura T, Izawa M, Sekiya T, Nishimura S, Katsuki M. Most tumors in transgenic mice with human c-Ha-ras gene contained somatically activated transgenes. *Oncogene* 5: 1195-1200 (1990).
3. Tennant RW, French JE, Spalding JW. Identifying chemical carcinogens and assessing potential risk in short-term bioassays using transgenic mouse models. *Environ Health Perspect* 103: 942-950 (1995).
4. Urano K, Koizumi H, Nagase S, Watanabe Y, Jiang H, Nomura T, Yamamoto S. Rapid carcinogenic response of transgenic mice harboring the human prototype c-Ha-ras gene to various carcinogens. In: *Progress in Clinical and Biological Research*. New York: Wiley-Liss. in press. (1997).
5. Yamamoto S, Hayashi Y, Mitsumori K, Nomura T. Rapid carcinogenicity testing system with transgenic mice harboring human prototype c-HRAS gene. *Lab Anim Sci* 47: 121-126 (1997).
6. Yamamoto S, Mitsumori K, Kodama Y, Matsunuma N, Manabe S, Okamiya H, Suzuki H, Fukuda T, Sakamaki Y, Sunaga M, Nomura G, Hioki K, Wakana S, Nomura T, Hayashi Y. Rapid induction of more malignant tumors by various genotoxic carcinogens in transgenic mice harboring human prototype c-Ha-ras gene than in control nontransgenic mice. *Carcinogenesis* 17: 2455-2461 (1996).

Table.1 List of chemicals for short-term carcinogenicity tests using CB6F1-TgRASH2 mice

<i>Salmonella mutagenesis assay-positive carcinogens (Trans-species) : 17 chemicals</i>	
<i>p</i> -Cresidine ^b	Cyclophosphamide ^b
<i>N,N</i> -Diethylnitrosamine (DEN) ^f	1,2-Dimethylhydrazine ^g
4-Hydroxyaminoquinoline-1-oxide (4HAQO) ^a	Melphalan ^d
Methylazoxymethanol (MAN) ^a	<i>N</i> -Methyl- <i>N'</i> -nitro- <i>N</i> -nitrosoguanidine (MNNG) ^c
3-(<i>N</i> -Methyl- <i>N</i> -nitrosoamino)-1-(3-pyridyl)-1-butanone (NNK) ^a	
<i>N</i> -Methyl- <i>N</i> -nitrosourea (MNU) ^e	4-Nitroquinoline-1-oxide (4NQO) ^b
Phenacetin ^a	Procarbazine ^a
4,4'-Thiodianiline ^a	Thiotepa ^a
Vinyl carbamate ^b	4-Vinyl-cyclohexene diepoxide ^a

Carcinogenicity tests were done at ^aCIEA, ^bNIHS, ^cYamaguchi Pharmaceutical Co. Ltd., ^dKyowa Hakko Kogyo Co., ^eChugai Pharmaceutical Co. Ltd., ^fSankyo Co. Ltd. and ^gTokyo University (Dr. K. Itoh).

Table.2 List of chemicals for rapid carcinogenicity tests using CB6F1-TgRASH2 mice

<i>Salmonella mutagenesis assay-negative carcinogens (trans-species) : 6 chemicals</i>	
Benzene ^a	Cyclosporin ^a
1,4-Dioxane ^a	Ethyl acrylane ^a
Ethylene thiourea ^b	Furfural ^a
<i>Salmonella mutagenesis assay-positive noncarcinogens : 3 chemicals</i>	
P-Anisidine ^b	8-Hydroxyquinoline ^a
4-Nitro-0-phenylenediamine ^a	
<i>Salmonella mutagenesis assay-negative carcinogens : 3 chemicals</i>	
Resorcinol ^c	Rotenone (mouse) ^a
Xylenes (mixed) ^a	

Carcinogenicity tests were done at ^aCIEA, ^bNIHS, and ^cYamanouchi Pharmaceutical Co. Ltd.

Table.3 Tumor target organs in CB6F1-TgRASH2 mice treated with mutagenic (Salmonera) carcinogens

Mutagenic carcinogens	Organs where tumors were induced in Hras2 mice	Target organs in NTP 2-year bioassay and other references
p-Cresidine	Urinary Bladder	Urinary Bladder, liver
Cyclophosphamide	Lung	Urinary bladder, lung, mammary, hematopoietic organ
DEN	Lung, forestomach	Liver, lung, forestomach
DMH	Colorectal, colon/rectum	Colon/rectum
4-HAQO	Forestomach, skin	Pancreas
MAN	Skin, lung	Colon/rectum, lung, perianal grand
Melphalan	Forestomach, lung	Lung, hematopoietic organ
MNNG	Forestomach	Forestomach and esophagus
MNU	Skin, forestomach, spleen, hematopoietic organ	Skin, forestomach, hematopoietic organ
NNK	Lung	Lung
4NQO	Skin, lung	Skin, oral cavity, lung
Phenacetin	Lung, forestomach, spleen	Kidney, urinary bladder,liver,lung

Table.4 Tumor target organs in CB6F1-TgRASH2 mice treated with non-mutagenic (Salmonella) carcinogens

Non-mutagenic carcinogens	Organs where tumors were induced in Hras2 mice	Target organs in NTP 2-year bioassay and other references
Benzene	Forestomach, lung	Hematopoietic organ, zymbal glznd, forestomach, ovary, lung, mammary gland
Cyclosporin	Forestomach, skin	(Lymphomas, leukemias in humans)
1,4-Dioxane	Lung	Liver, lung
Ethyl acrylate	Forestomach	Forestomach
Ethylene thiourea	Thyroid	Thyloid, liver, pituitary
Furfural	Lung	Liver, kidney, forestomach

組織学的検査終了：17 物質

結果：

腫瘍の早期発現

投与マウス > 対照マウス (17物質)

腫瘍発生頻度・発生個数

Hras2 マウス > Non-Tg マウス (14物質)

Hras2 マウス = Non-Tg マウス (*p*-cresidine, cyclophosphamide)

Hras2 マウス < Non-Tg マウス (NNK)



遺伝毒性発がん物質の発がん検出に有用

図1 Ames試験陽性発がん物質 (17 物質)

組織学的検査終了 : 5 物質
剖検終了 : 1 物質 (furfural)

結果 :

benzene, cyclosporine, 1,4-dioxane, ethylacrylate

肺 / 前胃腫瘍の誘発

Hras2 マウス > Non-Tg マウス

ethylenethiourea

甲状腺腫瘍誘発

Hras2 マウス ≒ Non-Tg マウス

furfural

肺腫瘍

Hras2 マウス > Non-Tg マウス

↑ Ames 試験陰性発がん物質の発がん検出にも有用と推察
他の物質の検証作業継続中であり、より多くの物質
についての追加実験さらに必要

図2 Ames 試験陰性発がん物質 (6 物質)

Ames 試験陽性非発がん物質 (3 物質)

物質 : *p*-anisidine, 8-hydroxyquinoline, 4-nitro-*o*-phenylenediamine
組織学的検査終了 : 2 物質 (8-hydroxyquinoline, 4-nitro-*o*-phenylenediamine)
結果 : Hras2 マウスに腫瘍誘発増強なし (8-hydroxyquinoline)
肺腫瘍 投与マウス > 対照マウス (phenylenediamine)
腫瘍の誘発の増強なし (*p*-anisidine)

Ames 試験陰性非発がん物質 (3 物質)

物質 : resorcinol, rotenone, xylene
組織検査終了 : 3 物質
結果 : Hras2 マウスに腫瘍誘発増強なし

➡ 発がん偽陽性反応がないことを確認するため、さらなる検証作業必要

図3 Ames 試験陽性・陰性非発がん物質

前癌病変を指標とした中期発がん性試験

愛知県がんセンター研究所 病理学第一部

立松正衛

はじめに

ラットやマウス等の小動物を用いた長期発がん性試験が、化学物質の発がん性の評価に最も重要な情報を提供している。しかし、準備期間を入れると約3年間の検索期間が必要とされ、これを実施できる施設・費用ならびに人材の面より検索可能な物質数は限られている。こうした問題に対応する目的で、発がん性予知のための短期スクリーニング法が開発されてきた。短期間で経済的に多数の物質のスクリーニングが可能であることより、ひろく検索が実施され、変異原性非発がん物質と非変異原性発がん物質の存在が明らかとなった。その結果、変異原性試験と長期発がん性試験のデータは、化学物質の発がん性の判定において、当初予想されたほどには一致しないことが明らかと成ってきた。

このため、長期と短期発がん性試験の欠点を補う目的で、動物を用い、検索期間の短縮と false positive や false negative を減少させるため、発がんの多段階（2段階）説を基礎とし、初期病変（前がん病変）をマーカーとした中期発がん性試験が開発されてきた。今回は、肝の前がん病変の特性とこれをマーカーとした中期発がん性試験について報告する。

A. 肝前癌病変の特性

1) 最大変異・最小変異

肝前癌病変（小増殖巣、酵素変異巣）を効率的に作成するには発がん二段階説に基づく図1の実験系¹⁾が主に用いられている。Diethylnitrosamine (DEN)でイニシエーションの後、2週間おいて、肝発がん物質やプロモターを6週間投与し、さらに検索物質投与開始1週後に、細胞増殖を促進させ、肝前癌病変（肝小増殖巣）の形成を促進させるため肝の3分の2部分切除を行う。この実験系で多数の肝小増殖巣が形成される。この小増殖巣は種々の酵素変異

を示す。陽性マーカーとして glutathione S-transferase (GST-P), glucose-6-phosphate dehydrogenase (G6PD), γ -glutamyl transpeptidase (γ -GT), 陰性マーカーとして adenosine triphosphatase (ATPase), glucose-6-phosphatase (G6P) 等がある²⁾。個々の小増殖巣でそのマーカーの陽性率が異なり、最も多数のマーカーが変異していた小増殖巣を最大変異巣、また一個しか変異のないものを最小変異巣と呼んでいる。最大変異巣の細胞増殖率は最小変異巣より高く、前癌状態がさらに進展していることが示唆され、この一部が、腺腫（腫瘍性結節）、肝がんへと進行していくと考えられている。また単独の指標として最も陽性率が高いのは、GST-P で肝前がん病変の検出には最もすぐれたマーカーと考えられる³⁾。

2) 選択的抑制

前がん病変の形成を促進させる機構として1. 選択的抑制 (differential inhibition) と2. 選択的刺激 (differential stimulation) が考えられている。図1の肝発がんモデルにおいて、検索物質に acetylaminofluorene (AAF) を投与すると、極めて強い GST-P 陽性巣の形成が認められる。AAF は強力な肝発がん物質で同時に強力な肝細胞増殖阻止作用を有している。正常肝細胞は肝部分切除後、壊死した肝細胞の再生のため、高い肝細胞増殖が誘導されるが、AAF 投与中は正常肝細胞の増殖は殆どゼロに抑えられる。この間、AAF の細胞増殖抑制に抵抗性のある GST-P 陽性巣のみが増殖抑制されず発育を続ける。こうした正常肝細胞増殖の選択的抑制が、GST-P 陽性巣の形成を促進するような機構を選択的抑制と呼んでいる⁴⁾。

3) 可逆性／不可逆性

小増殖巣に特異的に陽性または陰性になる種々のマーカーが、それぞれ陰性化や陽性化を示し、周囲肝細胞と区別がつかなくなっていく現象より、肝前癌病変には可逆性のものが含まれていると考えられている。しかし、現象だけでは、周囲肝細胞による置換（見かけの可逆性）か、小増殖巣を構成する細胞自

身が正常肝細胞化（真の可逆性）するかは不明であった。先に述べたAAFで誘導される選択的抑制の現象を利用し、 γ -GT陽性巣を構成する肝細胞をほぼ100% ^3H -thymidineで標識し、逆に周囲肝細胞はゼロの状態の実験設定が可能となった。数ヵ月の後、 γ -GT陰性正常肝細胞が明瞭に ^3H -thymidineで標識されており、小増殖巣を構成する細胞自身が正常肝細胞化（真の可逆性）する事が明らかとなった⁵⁾。正常肝細胞化も、指標が異なるとその速度も異なり、同一の小増殖巣において γ -GTが陰性化しても、GST-Pは免疫組織化学的に長く陽性所見をしめす。しかし、こうした可逆化を示す病変において、GST-Pのm-RNAの *in situ* hybridizationをおこなえば、明確にその発現は低下しており⁶⁾、指標により程度の差こそあれ可逆性を示す小増殖巣では、一斉にそれぞれの指標が正常化していくと考えられる。こうして小増殖巣は可逆性を示し消失するかそのまま残存し、その一部が腫瘍性結節（腺腫）さらには肝細胞癌へと進展していく。

B. 中期発がん性試験

変異原性試験は、ブラックボックスではあるがシステムとしての動物個体における未知の促進・抑制要因が関与していないため長期発がん性試験結果と一致しない場合がある。そこで、長期と短期発がん性試験の欠点を補う目的で、動物を用い、検索期間の短縮と false positive や false negative を減少させるために、初期病変（前がん病変）をマーカーとした中期発がん性試験が開発されてきた。IARCより報告されているヒト発がんに関連する物質の50%以上が肝臓に標的性を示しており、肝を中心に検索が進められている。

1) プロモーション作用に基づいた肝における中期発がん性試験（伊東法）

肝における8週間の中期発がん性試験(伊東モデル)^{1,7)}では、前がん病変であるGST-P陽性巣を指標とし、260以上の化学物質が検索されている。方法は図1に示してあるごとく、DENでイニシエーションの後、2週間おいて、検索物質を6週間投与し、さらに検索物質投与開始1週後に、細胞増殖を促進さ

せ、GST-P 陽性巣の形成を促進させるため、肝の3分の2部分切除を行う。8週後に肝に形成されたGST-P 陽性巣の単位面積あたりの数と面積を定量し、対照群と比較して有為差検定を行う。図2には269の化合物の検索結果（名市大データ）が示してある。肝発がん物質については変異原性陽性物質は97%、変異原性陰性物質でも84%の高率で陽性所見が得られている。ただ肝発がん物質で変異原性陰性物質で本試験陰性の物質の殆どはperoxisome proliferatorであり、GST-P 陰性の肝腫瘍を形成する物質群で、これらの特殊な物質を除けば、非変異原性肝発がん物質でも陽性率は95%以上になる。一方、非肝発がん物質では変異原性陽性ならびに陰性物質とも20~30%の検出率にとどまっている。これはプロモーション作用には明確な臓器特異性が存在するため、肝を標的としない検索物質の陽性率が低下したものと考えられる。一方、非発がん物質は変異原性、非変異原性含め、45物質のうち2例のみ陽性所見が認められ、false positiveが5%に抑えられていることは、特筆すべきと考えられる。おそらく図2に表示してある伊東法で検索された100以上の発がん性未知物質の内、本検索法で陽性をしめした物質のなかから、多くの新たな肝発がん物質が見い出されると思われる。

2) . イニシエーション作用に基づいた肝における中期発がん性試験

GST-P 陽性巣を指標としたin vivo イニシエーション活性中期検索法では、図3で示す如く、肝部分切除後（12時間）の肝細胞増殖期にイニシエーターとして最初に検索物質が一回投与される⁸⁾。2週後、強力な前癌病変形成促進として、acetylaminofluorene(AAF)の投与を2週間行いその間、細胞増殖を刺激する目的で四塩化炭素（CCl₄）を投与する。イニシエーションが成立しておれば、AAFによる選択的抑制がフルに作動し、5週間という実験期間で驚くべき多数のGST-P 陽性巣が形成される。図4は、本検索法により検索した物質の一覧であり、しろぬきの物質が陽性所見を示した。すなわち、変異原性陽性物質のうち、肝に標的性を持つ持たないにかかわらず発がん性の認められた物質のみが、陽性所見を示した。また発がん性のある物質でも、突然変異原性の無い物質では、たとえ肝発がん物質でも陰性を示した。

このことは、イニシエーション作用に基づいた肝における中期発がん性試験の場合は、発癌物質の持つ臓器標的性の壁が破られ⁹⁾、肝を標的としない物質の検索が可能である事を示し 変異原性物質であれば、発がん性変異物質と非発がん性変異物質との識別が可能である。しかし、肝における検索にも関わらず非変異原性肝発がん物質はこの検索期間では検出できない。

3) DNA付加体形成とイニシエーション

通常の単独投与法において肝に標的性を示さない化学物質がin vivo イニシエーション活性中期検索法において、陽性所見を示す発生機序の一つとして、肝部分切除直後、6, 12, 18, 24時間後に4-nitroquinoline 1-oxide(4-NQO) と benzo [a] pyrene(B [a] P)を投与し、DNA付加体形成の程度とGST-P 陽性巢の形成を検討した。その結果、肝部分切除後、両物質の付加体は肝より肺に多く形成され、付加体形成の多寡のみでイニシエーションが成立するわけではなく、付加体形成とそれに伴う細胞分裂の重要性が明らかとなった⁸⁾。

C. 化学発がん物質の変異原性試験と発がん二段階法（イニシエーション活性とプロモーション活性検索）のハーモナイゼーション

化学発がん物質は、肝発がん物質、腎発がん物質等、in vivoにおいて臓器標的性が存在する。in vivo イニシエーション活性中期検索法においては、変異原性を有する化学発がん物質はそれ自身の持つ臓器特異性の枠を脱し、陽性所見を示す。一方、伊東モデルのデータを基にすると、プロモーション活性検索系では検索物質の変異原性の有無にかかわらず肝発がん物質が陽性所見を示す。こうした事実を総合的に解釈すると図5の如くの相関が考えられる。化学物質を変異原性陽性と陰性、肝のGST-P 陽性巢をend point とした中期発がん性試験のイニシエーション活性の有無、プロモーション活性の有無の組み合わせで、変異原性肝発がん物質(genotoxic hepatocarcinogen)、変異原性非肝発がん物質(genotoxic non-hepatocarcinogen)、変異原性非発がん物質(genotoxic non-carcinogen)、非変異原性肝発がん物質(non-genotoxic

hepatpcarcinogen), 肝発がんプロモーター(hepatopromoter), 非変異原性非肝発がん物質(non-genotoxic, non-hepatpcarcinogen), 非肝発がんプロモーター(non-hepatppromoter)およびその他(others)に分類される。Othersには理論的に肝以外を標的とするプロモーターすべてが含まれ今回の方法では検索不能である。ここに含まれる物質の検索には、中期多臓器発がん試験法¹⁰⁾が有効と考えられる。こうして、ある物質の特性が各々の検索法により、変異原性、発がんまたはプロモーター作用の臓器標的性が明らかとなれば、データの信頼性はますます向上する。しかし、変異原性試験ならびに中期発がん性試験はあくまで発がん性検索における、短期間で経済的に可能な限り正確なデータを得ることを目的としており、多種類の検索法全てを行うことは、本来の趣旨から外れることになる。各検索法の長所を取り入れ、膨大に蓄積されつつある未検索の化学物質のより効率化された検索系の確立が急務と思われる。

参考文献

- 1) Ito, N., H. Tsuda, M. Tatematsu, T. Inoue, Y. Tagawa, T. Aoki, S. Uwagawa, M. Kagawa, T. Ogiso, T. Masui, K. Imaida, S. Fukushima and M. Asamoto(1988) Enhancing effect of various hepatocarcinogens on induction fo preneoplastic glutathione S-transferase placental form positive foci in rat:An approach for a new medium-term bioassay system. Carcinogenesis, 9, 387-394.
- 2) Tatematsu, M., Kaku, T., Medline, A., Eriksson, L. and Farber, E. (1983) Markeres of liver neoplasia - Real or fictional? In: Application of biological markers to carcinogen testing eds H. A. Milman and S. Sell Plenum Pub. Co. New York.
- 3) Tatematsu, M., Mera, Y., Ito, N., Satoh, K., Sato, K(1985) Relative merits of immunohistochemical demonstrations of placental, A,B and C forms of glutathione S-transferase and histochemical demonstration of γ -glutamyl transferase as markers of altered foci during liver carcinogenesis in rats.

Carcinogenesis, 6, 1621-1626.

4) Tatematsu, M., T. Aoki, M. Kagawa, Y. Mera and N. Ito(1988) Reciprocal relationship between development of glutathione S-transferase positive liver foci and proliferation of surrounding hepatocytes in rats. *Carcinogenesis*, 9, 221-225.

5) Tatematsu, M., Nagamine, Y., Farber, E(1983) Redifferentiation as a bases for remodeling of carcinogen-induced hepatocyte nodules to normal appearing liver. *Cancer Res.*, 43, 5049-5058.

6) Imai, T., Masui, T., Ichinose, M., Nakanishi, H., Yanai, T., Masegi, T., Muramatsu, M., Tatematsu, M(1997) Reduction of glutathione S-transferase P-form mRNA expression in remodeling nodules in rat liver revealed by *in situ* hybridization. *Carcinogenesis*, 18, 545-551.

7)Ito, N., R. Hasegawa, K. Imaida, M. Hirose and T. Shirai(1997) Medium-term liver bioassay in rats for rapid detection of carcinogenic agents *J. Biol. Chem.* in press.

8)Tezuka, N., M. Tada, M. Kojima. H. Nakanishi, A. Mori and M. Tatematsu(1995) Effects of partial hepatectomy on initiation of liver cell foci by 4-nitroquinoline 1-oxide, a non-hepatocarcinogen, and generation of DNA adducts in rats. *Cancer Lett.*, 85, 89-94.

9)Tatematsu, M., R. Hasegawa, K.Imaida, H. Tsuda and N. Ito(1983) Survey of various chemicals for initiating and promoting activities in a short-term in vivo system based on generation of hyperplastic liver nodules in rats. *Carcinogenesis*, 4, 381-386.

10) Hirose, M., H. Tanaka, S. Takahashi, M. Futakuchi, S. Fukushima and N. Ito(1993) Effects of sodium nitrite and catechol, 3-methoxycatechol, or butylated hydroxyanisole in a rat multiorgan carcinogenesis model, *Cancer Res.*, 53, 32-37.

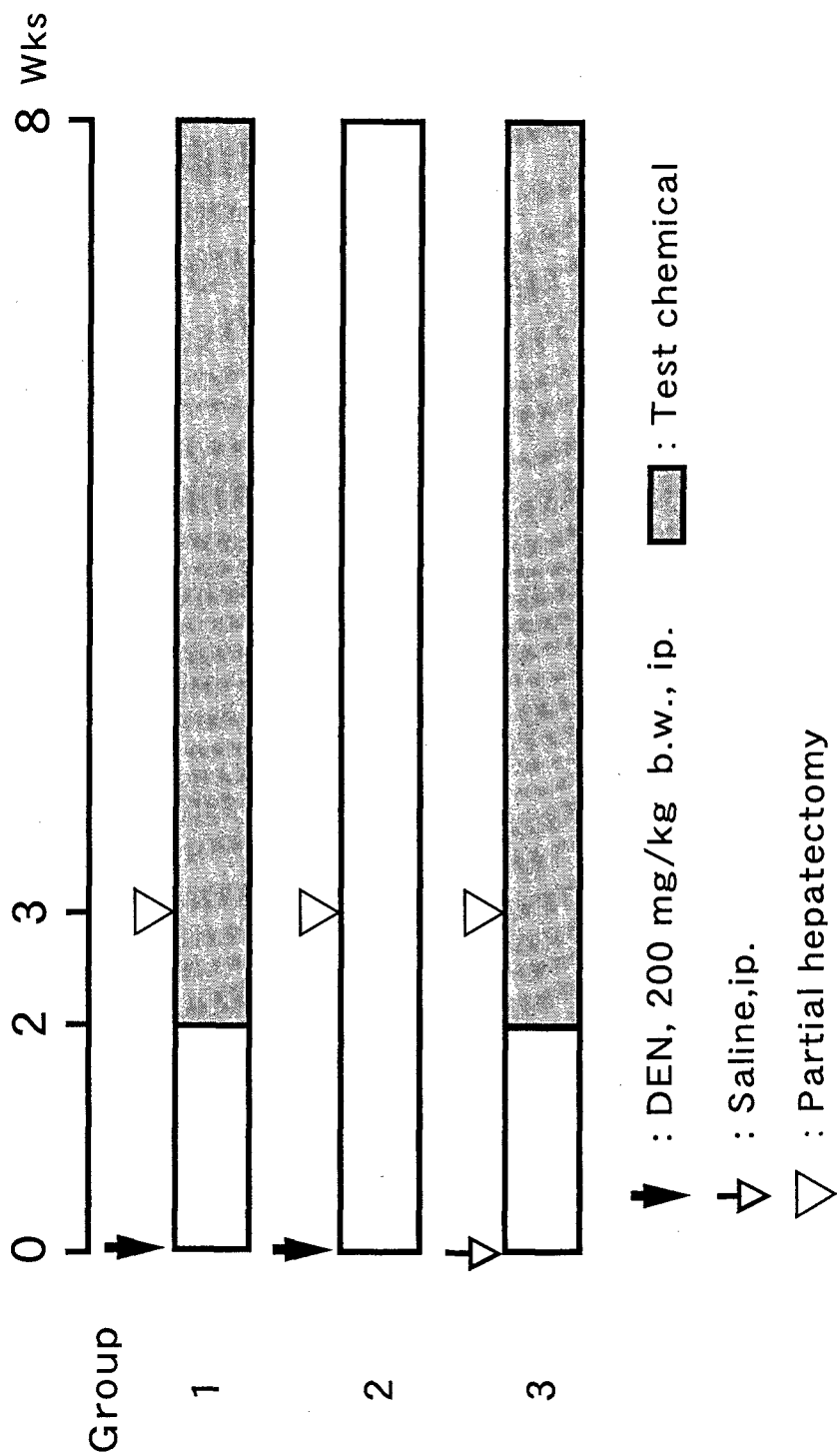


図1. プロモーション作用に基づいた肝における
中期発がん性試験（伊東法）

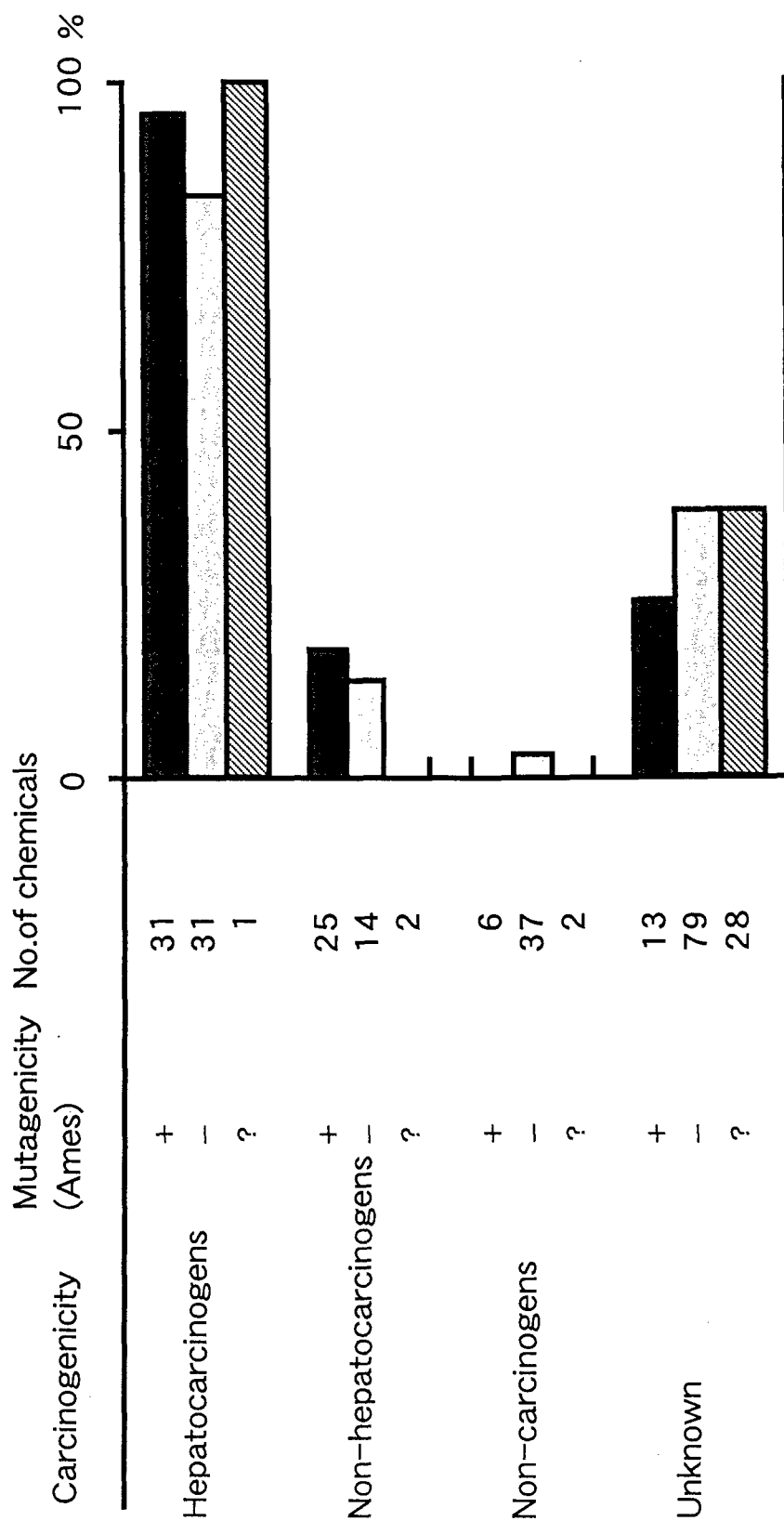


図2. 伊東法における269化合物の検索結果

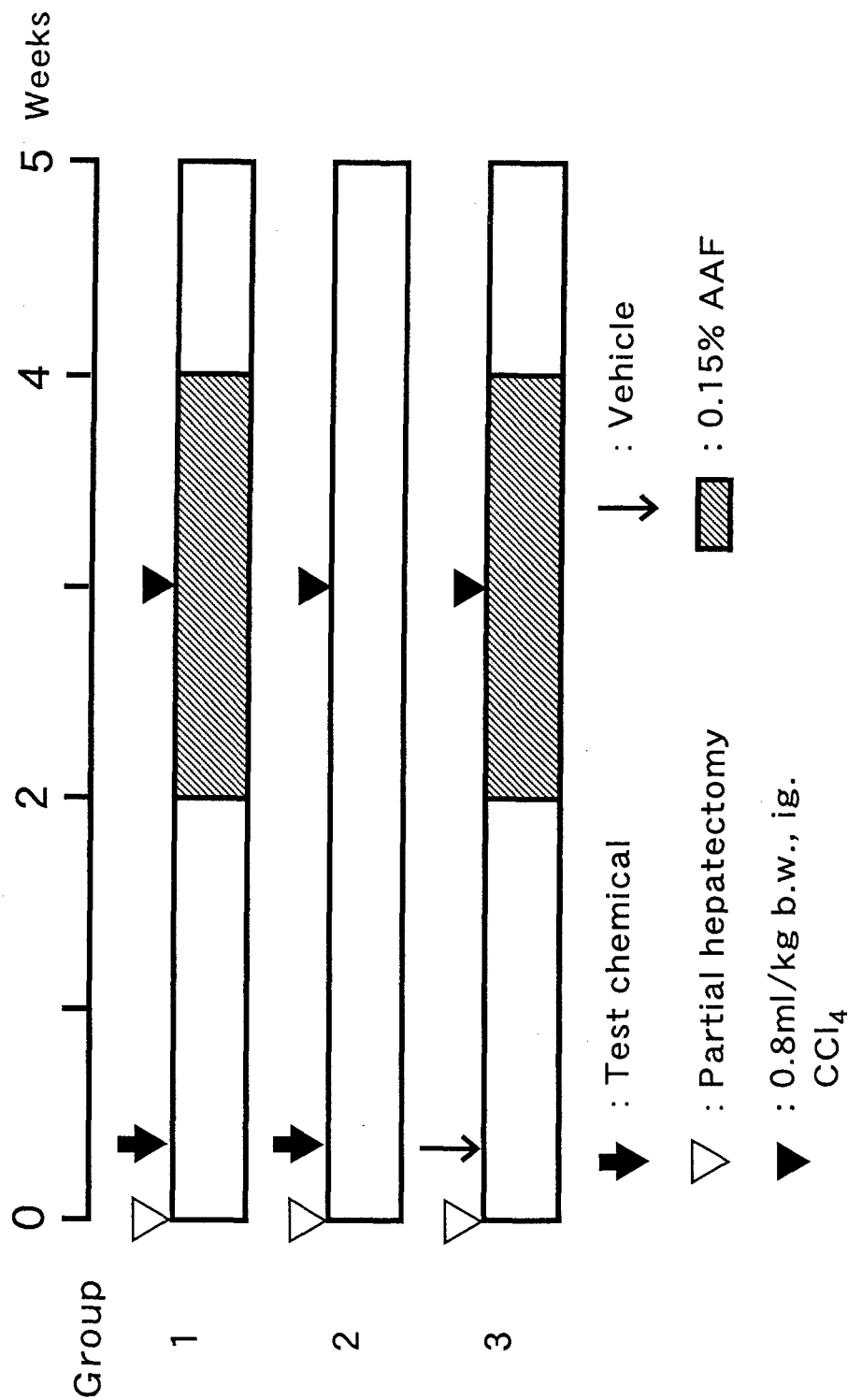


図3. イニシエーション作用に基づいた肝における中期発がん性試験

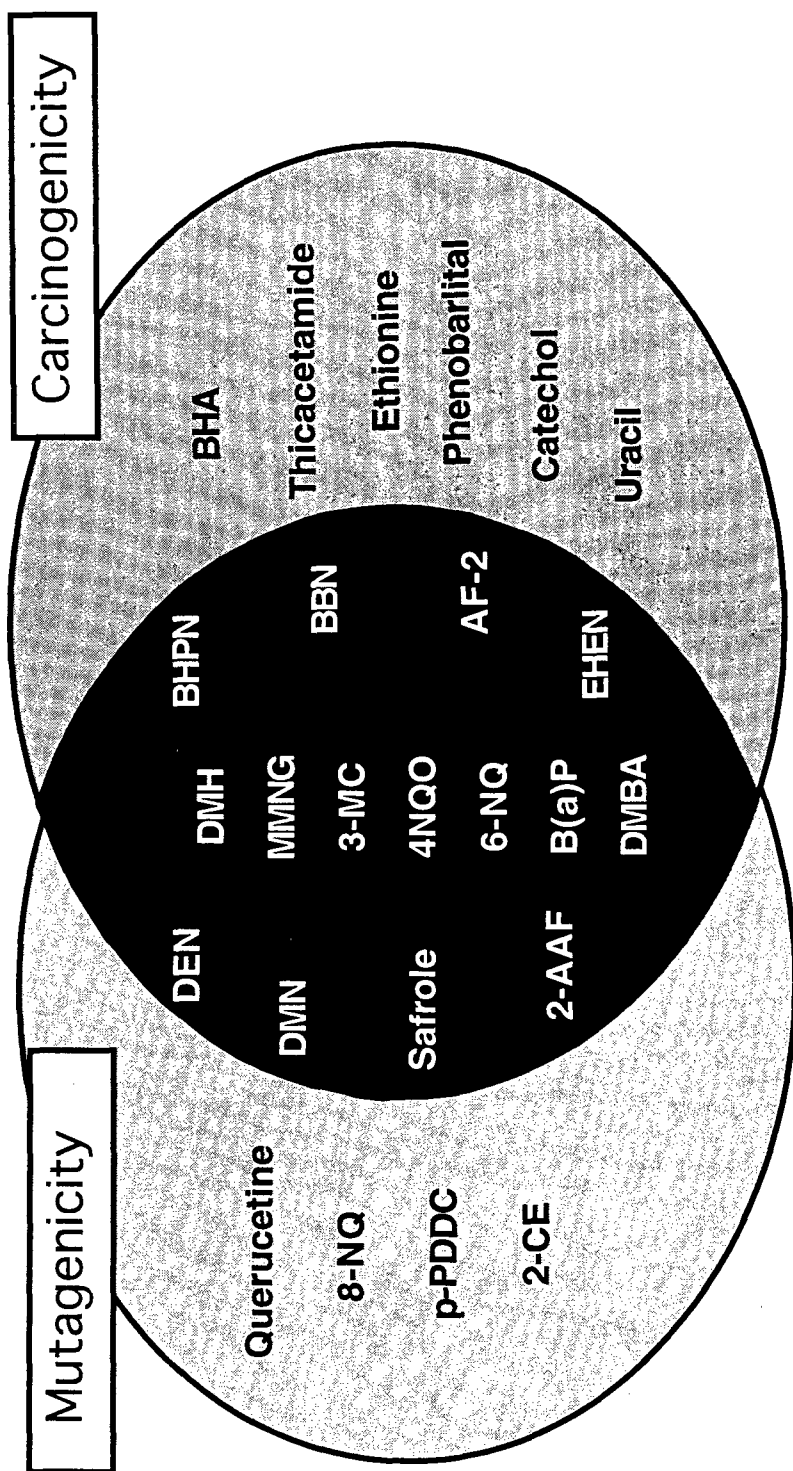


図4. イニシエーション活性中期発がん性試験結果

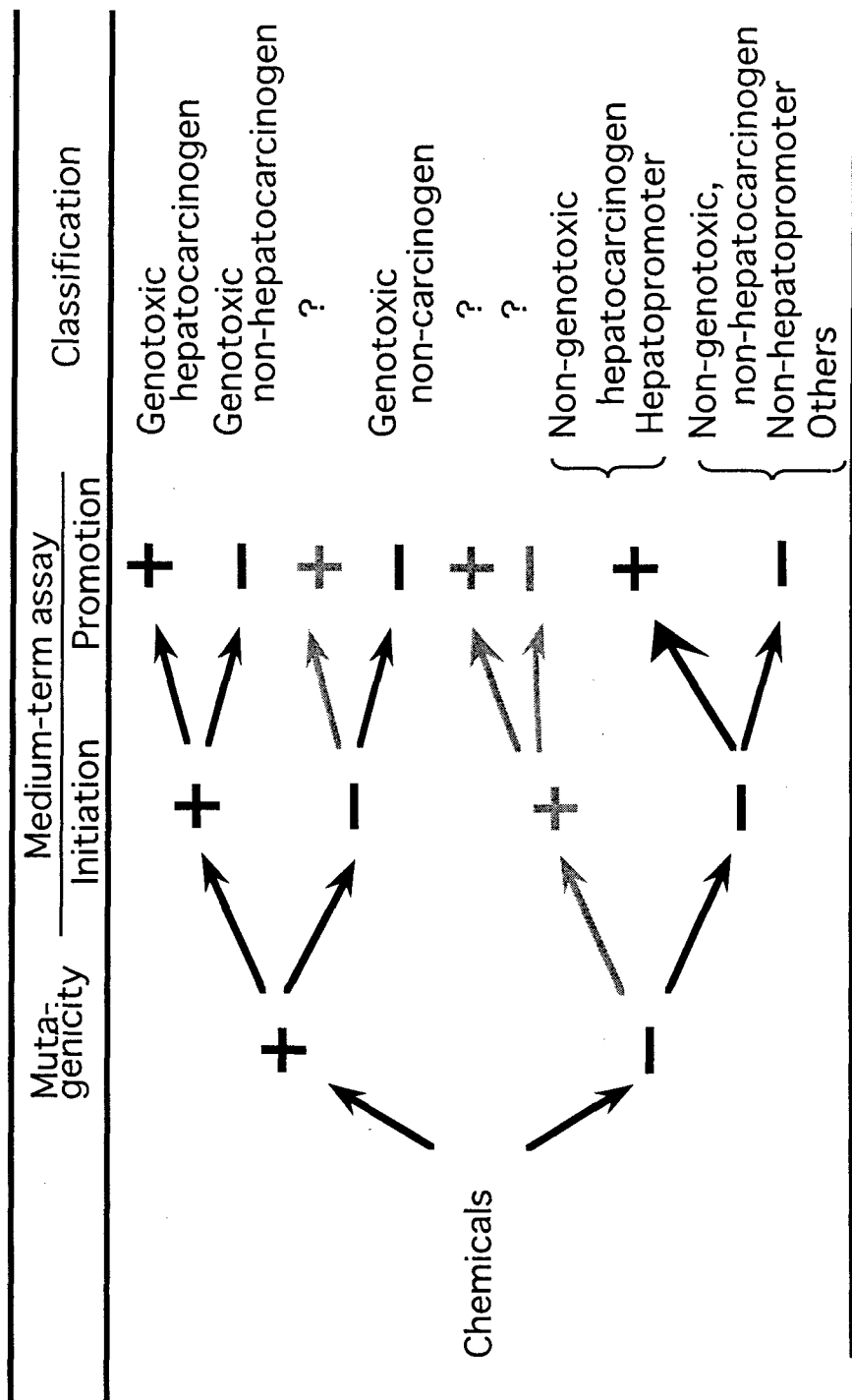


図5. 化学物質の突然変異原性、イニシエーション活性ならびにプロモーション活性との相関

＜その他＞

関西実験動物研究会だより

関西実験動物研究会会報 第 17 号に掲載した第 52 回研究会以後、以下の研究会が開催された。

1) 第 53 回研究会 (平成 9 年 3 月 7 日 於 京大会館)

＜講演会＞

1. 肥満遺伝子産物 (レプチン) と受容体の分子機構—Genetics から臨床応用へ—
小川 佳宏 (京都大学医学研究科臨床病態医科学)
2. 血圧制御研究からの発展—遺伝子から表現型へ：表現型から遺伝子へ—
深水 昭吉 (筑波大学応用生物化学系)

＜維持会員ニュース＞

(株) 新日本科学 「新日本科学におけるサルを用いた骨粗鬆症モデル」

2) 第 54 回研究会 (平成 9 年 6 月 6 日 於 大阪大学医学部学友会館「銀杏会館」)

＜講演会＞

1. ICH における発がん性試験ガイドラインの動向および今後の展望：
トランスジェニックマウスを用いた短期発がん性試験法
三森 国敏 (国立衛生試験所安全性生物試験研究センター)
2. 前癌病変を指標とした中期発癌性試験
立松 正衛 (愛知県がんセンター研究所)

＜維持会員ニュース＞

1. 白銀工業 (株) 「エアーカーテンの改良」
2. 白井松器械 (株) 「小動物解剖・手術台の改良とその有用性」

3) 第 55 回研究会 (平成 9 年 9 月 12 日 於 国際交流会館「芝蘭会館」)

＜講演会＞

1. 生体組織への遺伝子導入による新たな実験動物系の開発
金田 安史 (大阪大学細胞生体工学センター)
2. in vivo 遺伝子導入法を用いた糸球体病変の病態解析
猪阪 善隆 (大阪大学医学部第一内科)

＜維持会員ニュース＞

1. (株) オリエンタルバイオサービス
「遺伝子導入動物の SPF 化、胚の凍結保存および各種受託業務」
2. (株) 大気社 「実験動物室の気流制御」

幹事会、評議員会、総会の議事概要

1) 幹事会の概要 (平成9年2月24日 於 京都大学医学部附属動物実験施設)

1. 出席：浅野、飯田、海野、岡本、喜多、北田、黒澤、芹川、新谷、三日月、宮脇、森岡、森本、山中、山本（15名）

2. 議事

- (1) 平成8年度事業報告 平成8年度の事業について話し合わせ、平成8年度事業報告が作成された。
- (2) 平成8年度機関誌発行報告 平成8年度事業計画案においては、会報発行を年2回予定していたところ、編集の都合上、本年度は2巻を1巻にまとめ、第17号のみの発行となったことが報告された。
- (3) 平成8年度決算報告 平成8年度の決算について話し合わせ、平成8年度決算報告が作成された。
- (4) 平成9年度事業計画案 平成9年度の事業計画について話し合わせ、平成9年度事業計画案が作成された。
- (5) 平成9年度機関誌発行計画案 平成9年度の機関誌発行計画について話し合わせ、従来、年2回の会報発行を実施してきたが、今年度より年1回の発行とすることを、評議員会に諮ることが決定された。
- (6) 平成9年度予算案 平成9年度の予算について話し合わせ、平成9年度予算案が作成された。
- (7) 新評議員として、浅田孝氏（藤沢薬品）、橋本正晴氏（藤沢薬品）の推薦を、評議員会に諮ることが決定された。
- (8) 関西実験動物研究会の活動を積極的に公開することを目的として、案内のポスターを関係諸機関に送付すること、メーリングリスト上で流布することが提案、了承された。

2) 第15回評議員会の概要 (平成9年3月7日 於 京大会館)

1. 出席：浅田、阿部、池田、内海、海野、及川、岡本、河井、喜多、北田、久保、笹川、塩見、志村、芹川、相馬、高島、螺良（愛）、新谷、橋本、前田、牧野、増岡、松村、三日月、宮脇、宮嶋、宮脇、森岡、森本、安田、山本、吉田（33名）

2. 議事

- (1) 平成8年度事業報告 海野幹事（集会）より平成8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、当初、会報発行を年2回予定していたところ、編集の都合上、本年度は2巻を1巻にまとめ、第17号のみの発行となったことが報告され、承認された。
- (3) 平成8年度決算報告 喜多幹事（庶務）より平成8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) 新評議員の選出 新評議員として、浅田孝氏（藤沢薬品）、橋本正晴氏（藤沢薬品）

の 2 名が推薦され、選出された。

- (5) 平成 9 年度事業計画案 海野幹事（集会）より平成 9 年度事業計画案が説明され、承認された。
- (6) 平成 9 年度機関誌発行計画案 山本幹事（編集）より、従来、年 2 回の会報発行を実施してきたが、今年度より年 1 回の発行とすることが提案され、承認された。また、今後、コスト削減や紙面の品質向上等の一層の努力をする旨説明された。
- (7) 平成 9 年度予算案 喜多幹事（庶務）より平成 9 年度の予算案の説明が行われ、承認された。
- (8) その他 芹川会長より、総会において、故山田淳三名誉会員と宮畠宏彰名誉会員に、名誉会員証を贈呈することが説明された。

3) 第 14 回総会の概要（平成 9 年 3 月 7 日 於 京大会館）

- (1) 平成 8 年度事業報告が行われ、承認された。
- (2) 機関誌の発行を年 2 回予定していたところ、編集の都合上、本年度は 2 巻を 1 巻にまとめ、第 17 号のみの発行となったことが報告された。
- (3) 平成 8 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) 新評議員として、浅田孝氏（藤沢薬品）、橋本正晴氏（藤沢薬品）の 2 名が選出されたことが報告され、承認された。
- (5) 平成 9 年度事業計画案が説明され、承認された。
- (6) 従来、年 2 回の会報発行を実施してきたが、今年度より年 1 回の発行とすることが説明され、承認された。また、今後、コスト削減や紙面の品質向上等の一層の努力をする旨説明された。
- (7) 故山田淳三名誉会員と宮畠宏彰名誉会員への名誉会員証の贈呈式が挙行された。

関西実験動物研究会 会長・幹事・監事名簿

(平成9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：	浅野 裕三	田辺製薬(株) 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
	○ 海野 隆	日本シエーリング(株) 研究開発本部
	黒澤 努	大阪大学医学部附属動物実験施設
	森岡 宏至	大阪府立大学農学部獣医学科
	森本 純司	大阪医科大学・実験動物センター
編集：	鳥居 隆三	滋賀医科大学附属動物実験施設
(京都 G)	三日月 勝見	塩野義製薬(株) 実験動物研究センター
	宮脇 茂樹	日本新薬(株) 東部創薬研究所
	○ 山本 好男	滋賀医科大学・法医学教室
編集：	飯田 晶敏	(株) 資生堂 医薬品研究所
(大阪 G)	岡本 宗裕	大阪大学医学部附属動物実験施設
	○ 新谷 聰	国立循環器病センター 研究所
	山中 久	(株) イナリサーチ 大阪支所
監事：	清水 英男	清水実験材料(株)
	高木 貞明	日本エスエルシー(株)
○ 印 各委員長		

関西実験動物研究会 評議員名簿 (平成 9 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
浅田 孝	藤沢薬品工業 (株) 開発第一研究所
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
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	日本シェーリング(株)
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	(株) 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 聡	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
橋本 正晴	藤沢薬品工業 (株) 安全性研究所
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) 研究管理部動飼室
牧野 進	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9年度)

名前	所属
増岡通夫	(株) ケーエーシー生物科学センター
松村 理一郎	
三日月 勝見	塩野義製薬 (株) 油日ラボラトリーズ
宮嶋 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)東部創薬研究所
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
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 維持会員》

(五十音順) (平成9年9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	(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
5	加商 (株)	103	東京都中央区日本橋 2-14-9
6	鐘紡 (株) 薬品安全性研究所	534	大阪市都島区友淵町 1-5-90
7	北山ラベス (株)	396	長野県伊那市荒井区川北 3052
8	(株) ケアリー	531	大阪市北区豊崎 4-12-1
9	(株) ケー・エー・シー	604	京都市中京区西の京西月光町40
10	参天製薬 (株) 中央研究所	553	大阪市東淀川区下新庄 3-9-19
11	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
12	(株) 資生堂 医薬品研究所	236	横浜市金沢区福浦 2-12-1
13	(株) 実医研	377-09	群馬県吾妻郡吾妻町大字大戸 3303-58
14	白井松器械 (株)	540	大阪市中央区森ノ宮中央 1-19-16
15	白銀工業 (株)	547	大阪市平野区加美北 4-6-19
16	(株) 新日本科学	891-13	鹿児島県鹿児島郡吉田宮之浦 2438
17	(株) 新薬開発研究所 関西支所	573	枚方市河原町 6-10-205
18	セアック吉富 (株)	871	福岡県築上郡吉富町大字小祝 955
19	(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
20	大日本製薬 (株) 開発研究所・安全研	564	吹田市江の木町 33-94
21	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
22	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
23	(株) 夏目製作所	113	東京都文京区湯島 2-18-6
24	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
25	日本クレア (株)	550	大阪市西区京町堀 1-13-2
26	日本商事 (株) 医薬研究所	567	茨木市庄 2-24-3
27	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
28	日本チャールスリバー (株)	550	大阪市西区西本町 1-11-7
29	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
30	(株) ハイゲン	349-01	埼玉県蓮田市末広 1-2-7
31	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
32	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
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

《会員の異動》

(平成8年12月～平成9年9月)

入会者	足立 民子	田辺製薬(株) 安全研
	矢野 賢一	(株) ミドリ十字・安全性研究所
	津村 秀樹	三重大学医学部附属動物実験施設
	日高 隆義	鐘淵化学工業(株) 高砂研究所
	加藤 雅門	(株) トーメンケミカル大阪 ファインケミカル部
	庫本 高志	国立がんセンター 発がん研究部
	有富 博之	シオノギ製薬 新薬研 実験動物管理室
	松代 創一郎	日清食品(株) 中央研 安全研
	奥本 正昭	大阪府立大学先端科学研究所
	並河 知子	沢井製薬(株) 研究部
	赤川 利加寿	ハムリー(株) 大阪出張所
	橋詰 俊雄	白銀工業(株)
	岩堀 恭祐	(株) ケーエーシー
退会者	織田 茂	武田薬品工業(株)薬剤安全性研究所
	永江 祐輔	日本チバガイギー(株) 医薬研究部
	宮本 政樹	日本チバガイギー (株) 薬剤安全性ユニット
	森本 宏一	日本チバガイギー (株) 薬剤安全性ユニット
	方山 和幸	(株) ミドリ十字安全性研究所
	木村 和幸	(株) ミドリ十字安全性研究所
	柴田 博	(株) ミドリ十字安全性研究所
	福永 裕樹	(株) ミドリ十字安全性研究所
	宮本 博好	(株) ミドリ十字安全性研究所
	岩堂 俊雄	日本チバガイギー (株) 研究開発統括部
	小西 喬郎	塩野義製薬(株) 研究開発調整室
	小村 宗平	鐘淵化学工業(株) 高砂研究所
	高橋 哲哉	石原産業(株) 中央研究所安全性研究室
	葛岡 勝則	(株) 新薬開発研究所・関西事業本部
	高田 頼一	塩野義製薬(株) 摂津工場
	辻 繁勝	和歌山県立医科大学第二生理学教室
	糸賀 鋭治	
	佐治 久江	
	坪田 裕司	和歌山県立医大第2生理学教室
	中尾 準一	(株) トーメンケミカル大阪 産業資材第2部
	森 浩志	大阪医科大学実験動物センター
	岡田 いすづ	ラボリックサービス(株)
	小笠原 定則	日清食品(株)
	藤田 和男	(株) 大気社
	牧野 奈津代	藤沢薬品工業(株) 安全研・病理

関西実験動物研究会（個人会員名簿） 1997年9月現在

(五十音順)			☆は名誉会員、○は評議員、◎は幹事、△は監事
氏名	〒	住所	所属
あ			
青木 純二	543	大阪市天王寺区悲田院町 8-26-903	アニマルケア
青野 皆基	532	大阪市淀川区十三本町 2-17-85	武田薬品工業（株）監査室
赤川 利加寿	532	大阪市淀川区西中島 7-14-35	ハムリー（株）大阪出張所
秋元 博一	520-32	滋賀県甲賀郡甲西町北山台 1丁目 18-9	
秋山 潔	480-11	愛知県愛知郡長久手町大字岩作字雁又	愛知医科大学附属動物実験施設
秋山 純一	651-11	神戸市中央区熊内橋通 3-3-25	（株）加美乃素本舗 開発研究部
○ 浅田 孝	532	大阪市淀川区加島 2-1-6	藤沢薬品工業（株）開発第一研究所
◎◎ 浅野 裕三	532	大阪市淀川区加島 3-16-89	田辺製薬（株）安全性研究所
東 文男	640-14	和歌山県海草郡美里町毛原宮 486	（株）紀和実験動物研究所
足立 民子	532	大阪市淀川区加島 3-16-89	田辺製薬（株）安全研
◎◎ 阿部 敏男	569	高槻市氷室町 6-10-1	武田薬品工業（株）実験動物研究管理室
安倍 宏明	550	大阪市西区西本町 1-11-7	日本チャールズリバー（株）
荒木 宏昌	536	大阪市城東区森ノ宮 2-3-3	扶桑薬品工業（株）研究開発センター
有富 博之	561	大阪府豊中市二葉町 3-1-1	シオノギ製薬 新薬研 実験動物管理室
有行 史男	532	大阪市淀川区加島 3-16-89	田辺製薬（株）安全性研究所
安藤 孝夫	532	大阪市淀川区十三本町 2-17-85	武田薬品工業（株）薬剤安全性研究所
い◎◎ 飯田 晶敏	236	横浜市中心区金沢区福浦 2-12-1	（株）資生堂 研究開発本部 医薬品研究所
飯塚 三喜	666-01	川西市矢間字高田 103	日本ペーリンガー・インゲルハイム（株）
○ 池田 卓也	619-02	京都府相楽郡木津町州見台 6-5-1-3	バイエル薬品（株）中央研究所
池田 克己	693	出雲市塩冶町 89-1	島根難病研究所
石井 昭男	755	山口県宇部市藤曲 2548	協和発酵工業（株）安全性研究所
石川 尚明	300-03	茨城県稲敷郡阿見町中央 8-5-1	（株）実生研・筑波研究所
石川 隆司	564	吹田市江ノ木町 3 3-9 4	大日本製薬（株）総合研究所
石東 英治	349-01	埼玉県蓮田郡末広 1-2-7	（株）ハイゲン
石割 秀樹	505-03	岐阜県加茂郡八百津町野上字火打平 1649-11	日本クレア（株）
市川 一	530	大阪市北区梅田 1-2-2-800	加商（株）ライフサイエンスグループ
市田 州	569	大阪府高槻市紫町 1-1	（財）たばこ産業弘済会 高槻事業所
伊藤 隆康	532	大阪市淀川区十三本町 2-17-85	武田薬品工業（株）薬剤安全性研究所
稲垣 晴久	520-34	滋賀県甲賀郡甲賀町五反田 1405	塩野義製薬（株）油日ラボラトリーズ
乾 俊秀	532	大阪市淀川区加島 3丁目 16-89	田辺製薬（株）安全性研究所
井上 勉	578	東大阪市加納 7丁目 23-3-112	
今井 章浩	665	兵庫県宝塚市中山台 1-3-14	大阪府立成人病センター研究所
今西 るみ	666-01	川西市矢間字高田 103	日本ペーリンガー・インゲルハイム（株）
新比恵 啓志	532	大阪市淀川区加島 3丁目 16-89	田辺製薬（株）安全性研究所
岩知道 公彦	532	大阪市淀川区十三本町 2-17-85	武田薬品工業（株）創薬研究本部分子薬理研
岩堀 恭祐	520-30	滋賀県栗太郡栗東町東坂 91	（株）ケーエーシー
う 上島 育二	580	大阪府松原市西大塚 1-3-40	藤本製薬（株）
植野 一郎	619-02	京都府相楽郡木津町州見台 6-5-1-3	バイエル薬品（株）中央研究所
○ 内海 健二郎	604	京都市中京区西の京西月光町 40	（株）ケーエーシー
浦谷 衛	525	草津市西渡川 2-3-1	石原産業（株）中央研究所
◎◎ 海野 隆	532	大阪市淀川区西宮原 2-6-64	（株）シェーリング（株）
え○ 江崎 孝三郎	593	堺市学園町 1-1	大阪府立大学農学部
○ 江角 吉造	532	大阪市淀川区西宮原 2-6-64	日本シェーリング（株）
榎本 康弘	220-81	横浜市西区みなとみらい 2-2-1 ランドマーク7-46階	日本農産工業（株）
江馬 真	540	大阪市東区法門坂 1-4-43	国立衛生試験所大阪支所
お○ 及川 弘	525	滋賀県草津市上笠 2-1-8-1	
大江 治	532	大阪市淀川区加島 2-1-6	藤沢薬品工業（株）実験サービスセンター
大津 弘	561	豊中市大黒町 1丁目 1-11	大日本除虫菊（株）中央研究所
大島 洋次郎	532	大阪市淀川区十三本町 2-17-85	武田薬品工業（株）薬剤安全性研究所
大島 五紀	520-34	滋賀県甲賀郡甲賀町五反田 1405	塩野義製薬（株）実験動物研究センター
大坪 義和	535	大阪市旭区生江 1-8-14	沢井製薬（株）大阪研究所
大野 周三	532	大阪市淀川区加島 2-1-6	藤沢テクニクス（株）業務Ⅱ部
大原 忠雄	520-34	滋賀県甲賀郡甲賀町五反田 1405	塩野義製薬（株）実験動物研究センター
大森 吉明	532	高槻市淀川区十三本町 2-17-85	武田薬品工業（株）研究支援部
岡 智通	408	山梨県北巨摩郡小淵沢町 10221	（株）富士バイオメディックス
岡崎 彰亮	105	東京都港区芝大門 2-12-9	エデストロムジャパン（株）
○ 岡庭 梓	532	淀川区宮原 5-1-3	（株）ボゾリサーチセンター
岡本 明	669-13	三田市テクノパーク 9-1	日本メジフィジックス（株）兵庫工場
◎◎ 岡本 宗裕	565	吹田市山田丘 2-2	大阪大学医学部附属動物実験施設
沖本 一夫	564	吹田市江ノ木町 33-94	大日本製薬（株）総合研究所
小木曾 敬吉	464	名古屋市中千種区自由ヶ丘 2-12-4-104	

関西実験動物研究会（個人会員名簿） 1997年9月現在

	氏名	〒	住所	所属
か	荻野 信二	567	大阪府茨木市藏垣内 1-3-45	住友製薬（株）茨木工場
	奥田 誠治	586	河内長野市松ヶ丘中町 1330-1	堺化学工業（株）医薬事業部研究開発部
	奥村 正直	462	名古屋市北区辻町字流 7-6	愛知県衛生研究所
	奥本 正昭	593	大阪府堺市学園町 1-2	大阪府立大学先端科学研究所
	尾崎 晴茂	569	高槻市氷室町 6-10-1	武田薬品工業(株)薬剤安全性研究所
	岳 乗飛	565	吹田市山田丘 2-2	大阪大学医学部附属動物施設
	鍵山 莊一郎	565	大阪府吹田市山田丘 2-2	大阪大学医学部附属動物実験施設
	樫原 昭裕	771-01	徳島市川内町平石字夷野 224-2	大鵬薬品（株）
	片山 泰人	703	岡山市湊 1365-12	
	加藤 鋭二	550	大阪市西区京町堀 1-13-2	日本クレア（株）大阪営業所
	加藤 仁五	532	大阪市淀川区加島 2-1-6	藤沢薬品工業(株)実験サービスセンター
	加藤 雅門	541	大阪市中央区瓦町 1-6-7	（株）トーマンケミカル大阪 ファインケミ部
	加堂 洋一	532	大阪市淀川区加島 2-1-6	藤沢薬品工業(株)実験サービスセンター
	金城 義明	598	泉佐野市住吉町 26	日本製薬（株）大阪研究部
	金田 平八郎	677	西脇市中畑町 718	ラビトン研究所
	川合 是彰	335	埼玉県戸田市市川岸 2-2-50	田辺製薬（株）医薬育成研究所
	○ 河井 祥一郎	538	大阪市鶴見区今津中 2-2-18	丸石製薬（株）中央研究所
	川路 尚徳	600	京都市下京区中堂寺南町 17	（株）ケーエーシー京都技術センター
	川西 和夫	520-21	津市月輪 3丁目 5-25	科研製薬（株）製剤研究部
き	○ 川俣 順一	665	宝塚市野上 2-2-12	
	神田 政典	520-34	滋賀県甲賀郡甲賀町五反田 1405	塩野義製薬（株）実験動物研究センター
	岸本 嘉夫	520-34	滋賀県甲賀郡甲賀町五反田 1405	塩野義製薬（株）油日ラボトリーズ
	◎◎ 喜多 正和	602	京都市上京区河原町広小路	京都府立医科大学 実験動物室
	◎◎ 北田 一博	606-01	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
	北山 博章	615	京都市右京区西京極葛野町 28 番	オリエンタルバイオサービス
	く 久世 博	532	大阪市淀川区加島 3-16-89	田辺製薬（株）安全性研究所
	国友 一朗	550	大阪市西区南堀江 1-12-2	岡崎産業（株）大阪営業所
	○ 久保 薫	643	橿原市四条町 840	奈良県立医科大学 動物実験施設
	倉林 譲	700	岡山市鹿田町 2-5-1	岡山大学医学部附属動物実験施設
こ	庫本 高志	104	東京都中央区築地 5-1-1	国立がんセンター 発がん研究部
	◎◎ 黒澤 努	565	吹田市山田丘 2-2	大阪大学医学部附属動物実験施設
	小泉 清	240	神奈川県横浜市保土ヶ谷区神戸町 4-5-206	
	小泉 勤	911-11	福井県吉田郡松岡町下合月 23-3	福井医科大学動物実験施設
	甲田 彰	554	大阪市此花区春日出中 3丁目1-98	住友化学工業（株）生物環境化学研究所
	○ 小嶋 明廣	532	大阪市淀川区加島 3-16-89	（株）マルゴ・リサーチ・サービス
	小谷 猛夫	593	堺市学園町 1-1	大阪府立大学農学部獣医学科獣医病理
	小林 嘉代	589	大阪府狭山市大野東 377-2	近畿大学ライフサイエンス研究所
	小林 忍	601	京都市南区西大路八条下ル	日本新薬(株)
	小松 正美	586	河内長野市小山田町 345	日本農薬(株)安全性研究所
さ	小森 彰	607	京都市山科区四宮南河原町14	科研製薬(株)中央研究所薬理研究部
	近藤 正熙	532	大阪市淀川区十三本町2-17-85	武田薬品工業（株）実験動物研究管理室
	近藤 靖	532	大阪市淀川区加島 3-16-89	田辺製薬(株)安全性研究所
	坂田 太二	514	大阪市淀川区加島 3-16-89 田辺製薬内	マルゴ・リサーチサービス
	○ 笹川 祐成	603	京都市北区紫野上若草町 20	
	佐々木 弘	243-02	神奈川県厚木市下古沢 795	日本チャールズリバー（株）
	佐藤 公道	606-01	京都市左京区吉田下阿達町	京都大学薬学部薬理学教室
	○ 佐藤 良夫	565	吹田市山田丘 1-8	大阪大学歯学部中央研究室
	鮫島 秀暢	890	鹿児島市玉里団地 1丁目 22-19	
	し 塩田 恒三	602	京都市上京区河原町広小路	京都府立医科大学医動物学教室
し	○ 塩見 雅志	650	神戸市中央区楠町 7-5-1	神戸大学医学部附属動物実験施設
	柴生田 正樹	541	大阪府中央区道修町 2-3-6	武田薬品工業（株）監査室
	嶋川 幸三	532	大阪市淀川区十三本町2-17-85	武田薬品工業（株）創薬研究本部分子薬理研
	為田 好文	520-31	滋賀県甲賀郡石部町東寺 1038	日本クレア（株）石部生育場
	清水 大	604	京都市中京区西の京西月光町 40	（株）ケーエーシー
	△ 清水 英男	606	京都市左京区吉田下阿達町 37	清水実験材料（株）
	清水 雅良	501-62	羽島市福寿町間島 6-104	（株）日本バイオリサーチセンター羽島研
	○ 志村 圭志郎	514	津市江戸橋 2-174	三重大学医学部附属動物実験施設
	下西 功	534	大阪市都島区友淵町 1-5-90	鐘紡（株）薬品研究所
	城 勝哉	663	西宮市武庫川町 1-1	兵庫医科大学第一解剖学教室
す	銀一之	547	大阪市平野区加美北 4-6-19	白銀工業（株）
	菅 千里	0-0-4	北海道札幌市豊平区真栄363-24	（株）化合物安全性研究所 病理検査室
	菅原 努	606	京都市左京区田中門前町 103	パストゥールビル京都イメリタスクラ
	杉井 学	576	大阪府交野市森南 1-15-1	（株）ケーエーシー 営業本部

関西実験動物研究会（個人会員名簿） 1997年9月現在

	氏名	〒	住所	所属
	杉谷順康	743	山口県光市光井字武田 4720	武田薬品工業（株）薬剤安全性研究所光支所
	鈴木 秀作	890	鹿児島市宇宿町 1208-1	鹿児島大学医学部動物実験施設
	鈴木 靖郎	913	福井県坂井郡三国町山岸 50-10	小野薬品工業（株）福井安全性研究所
	須田 浩	553	大阪市東淀川区下新庄 3-9-19	参天製薬（株）中央研究所
せ○◎	芹川 忠夫	606-01	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
そ○	相馬 正志	573	枚方市川原町 6-10-205	（株）新薬開発研究所 関西支所
	曾我 正彦	520-34	滋賀県甲賀郡甲賀町五反田 1405	塩野義製薬（株）実験動物研究センター
た○	高折 修二	693	出雲市塩冶町 89-1	島根医科大学
△	高木 貞明	601	京都市南区上鳥羽塔森東向町 93-8	日本エス・エル・シー（株）
○	高島 俊行	300-03	茨城県稲敷郡阿見町中央 8-5-1	（株）実生研・筑波研究所
	高橋 明男	554	大阪市此花区春日出中 3-1-98	住友製薬（株）総合研究所
	高橋 明之	569	高槻市紫町 1-1	（財）たばこ産業弘済会 高槻事業所
	竹下 崇	607	京都市南区西大路八条下ル	日本新薬（株）安全性研究部動物管理課
	武下 政一	532	大阪市淀川区加島 3-16-89	田辺製薬（株）マルゴリサーチ、サービス
	武田 篤彦	606	京都市左京区田中門前町 103-5	パスツールビル5F（財）体質研究会
	竹之下 美恵	649-73	橋本市隅田町山内 514	
○	竹之下 洋司	649-73	和歌山県橋本市隅田町山内 514	
	竹村 公延	522-02	彦根市高宮町 2763	マルホ（株）研究所彦根分室
	田島 優	565	吹田市山田丘 2-2	大阪大学医学部附属実験動物施設
	辰巳 光義	532	大阪市淀川区加島 2-1-6	藤沢テクノス（株）業務4部 RI 施設
	田邊 好男	651-22	神戸市西区室谷 1-5-4	千寿製薬（株）クリエイティブセンター
○	谷村 孝	589	大阪府狹山市大野東 377-2	近畿大学医学部第一解剖学教室
	谷本 純一	532	大阪市淀川区加島 2-1-6	藤沢薬品工業（株）安全性研究所
	多根井 昌孝	604	京都市中京区西の京西月光町 40	（株）ケーエーシー 営業本部
	田畑 一樹	550	大阪市西区西本町 1-11-7	日本チャールスリバー（株）大阪営業所
	玉田 尋通	593	堺市学園町 1-1	大阪府立大学農学部獣医学科
ち○	千葉 薫	569	高槻市紫町 1-1	（財）たばこ産業弘済会 高槻事業所
	千葉 博喜	520-34	滋賀県甲賀郡甲賀町五反田 1405	塩野義製薬（株）実験動物研究センター
つ	塚原 清志	520-34	滋賀県甲賀郡甲賀町五反田 1405	塩野義製薬（株）実験動物研究センター
	都築 政起	739	東広島市鏡山1-4-4	広島大学生物生産学部畜産育種学教室
○	蝶良 愛郎	570	守口市文園町10-15	関西医大・第2病理
○	蝶良 義彦	661	尼崎市塚口町 1-33-21	
	津村 秀樹	514	三重県津市江戸橋 2-174	三重大学医学部附属動物実験施設
て	寺島 幸男	426	藤枝市源助 301	科研製薬（株）中央研究所 G L P 室
と	堂前 嘉代子	565	吹田市山田丘 3-1	大阪大学微生物病研究所
	徳本 和弥	566	摂津市三島 2丁目5番1号	塩野義製薬（株）摂津工場生物試験課
	富田 喜久雄	520-34	滋賀県甲賀郡甲賀町五反田 1405	塩野義製薬（株）実験動物研究センター
○◎	鳥居 隆三	520-21	滋賀県大津市瀬田月輪町	滋賀医科大学医学部附属動物実験施設
な	中井 健史	520-34	滋賀県甲賀郡甲賀町五反田 1405	塩野義製薬（株）実験動物研究センター
	中井 伸子	601	京都市南区西大路八条下ル	日本新薬（株）中央研究所
	中井 洋一	569	高槻市氷室町 6-10-1	武田薬品工業（株）医薬開発本部
	中尾 博之	520-34	滋賀県甲賀郡甲賀町五反田 1405	塩野義製薬（株）実験動物研究センター
	中尾 康裕	618	大阪府三島郡島本町桜井 3-1-1	小野薬品工業（株）動物管理課
	中川 和年	771-01	徳島市川内町平石字夷野 224-2	大鵬薬品（株）
	中川 博司	596	大阪府岸和田市三田町 380	（株）新日本ラボラトリー
	中川 洋子	532	大阪市淀川区加島 3-16-89	田辺製薬（株）安全性研究所
	中口 武	532	淀川区十三本町 2-17-85 武田薬品工業（株）	大阪工場内（株）武田ラビックス
	長崎 徹	514	大阪市淀川区加島 3-16-89	田辺製薬（株）安全性研究所
	長澤 久充	610-01	京都府城陽市寺田深谷 7-76	
	中島 健博	531	大阪市大淀区豊崎 4-12-17	（株）ケアリー
	中島 文博	564	吹田市江の木町 33-94	大日本製薬（株）開発研究所安全性研究部
	中村 公章	607	山科区四ノ宮南河原町 14	科研製薬（株）中央研究所薬理研究部
	中村 智恵美	700	岡山市鹿田町 2-5-1	岡山大学医学部法医学教室
	中村 政美	930-01	富山市杉谷 2630	富山医科薬科大学動物実験センター
	中山 亮	660-01	川西市大和西 3-28-10	
	夏目 克彦	113	東京都文京区湯島 2-18-6	夏目製作所（株）
	並河 知子	535	大阪市旭区生江 1丁目 8-14	沢井製薬（株）研究部
に○◎	新谷 聰	565	吹田市篠白台 5-125	国立循環器病センター研究所
	西川 健志	601	京都市南区西大路通り八条下ル	日本新薬（株）安全性研究所
	西川 哲	431-31	浜松市半田町 3600	浜松医科大学 動物実験施設
	西田 伊久男	529-17	滋賀県甲賀郡水口町大字宇川字稲馬	環境保健生物研究センター
○	西宗 義武	565	吹田市山田丘 3-1	大阪大学微生物病研究所
	西村 孝義	529-17	滋賀県甲賀郡水口町宇川稲場 555	（株）環境バイロクス研究所

関西実験動物研究会（個人会員名簿） 1997年9月現在

	氏名	〒	住所	所属
	西村 正彦	431-31	浜松市半田町 3600	浜松医科大学動物実験施設
	西村 弘道	596	岸和田市小松里町 1161-6-210	(株) アニマルケア 西日本営業所
	西山 秀志	532	淀川区十三本町 2-17-85	(株) 武田ラビックス
ぬ	沼沢 拓身	673-14	兵庫県加東郡社町木梨	日本臓器製薬(株)
の	野澤 謙	467	名古屋市瑞穂区月見ヶ丘 21-2	
	野村 彰	573	枚方市池之宮3-4-20 703号	(株) 新薬開発研究所
は	橋本 岩雄	520-23	滋賀県野洲郡野洲町大篠原1658	日本ベイト・マリン・セル(株) 研究開発本部
	橋本 正晴	532	大阪市淀川区加島 2-1-6	藤沢薬品工業(株) 安全性研究所
	橋詰 俊雄	547	大阪市平野区加美北 4-6-19	白銀工業
	長谷川 治子	565	大阪府吹田市山田丘 2-2	大阪大学医学部附属動物実験施設
	浜田 祐二	871	福岡県築上郡吉富町小祝 955	セアック吉富
	早川純一郎	920	金沢市宝町 13-1	金沢大学医学部附属動物実験施設
	林 新茂	565	吹田市津雲台 5-18 D75-102	
○	原田 正史	545	大阪市阿倍野区旭町	大阪市立大学医学部
ひ	東 稔広	532	大阪市淀川区西宮原 2-6-64	日本シェーリング(株)
	東山 昇	565	豊中市二葉町 3-1-1	塩野義製薬(株) 新薬研究所
	疋田 精一	607	京都市山科区四ノ宮南河原町	科研製薬(株)中研、研究企画部
	日高 隆義	676	兵庫県高砂市高砂町宮前町 1-8	鐘淵化学工業(株) 高砂研究所
	日野 雅生	561	大阪府豊中市二葉町 3-1-1	塩野義製薬(株) 新薬研究所
	平川 公昭	534	大阪市都島区友澗町 1-5-90	鐘紡(株)薬品安全性研究所
	平沢 勉	520-34	滋賀県甲賀郡甲賀町五反田 1405	塩野義製薬(株) 実験動物研究センター
	平松 保造	573-01	大阪府枚方市長尾峠 45-1	摂南大学薬物安全科学研究所
ふ	福岡 俊文	555	大阪市此花区春日出中3-1-98	住友化学工業(株) 生物環境科学研究所
	福西 克弘	534	大阪市都島区友澗町 1-5-90	鐘紡(株) 薬品安全性研究所
	藤井 恒雄	532	大阪市淀川区加島 2-1-6	藤沢薬品工業(株) 安全性研究所
	藤井 登志之	532	大阪市淀川区加島 2-1-6	藤沢薬品工業(株) 安全性研究所
○	藤村 一	606	京都市左京区下鴨森本町 15	(財) 生産開発科学研究所
○	古河 恵一	589	大阪府大阪狭山市大野東 377-2	近畿大学医学部共同研究実験動物室
ほ	朴木 進	516	三重県伊勢市黒瀬町 1425	御木本製薬(株)研究開発部
	干堀 純治	700	岡山市鹿田町 2-5-1	岡山大学医学部附属動物実験施設
	細野 和裕	569	高槻市水室 6-10-1	武田薬品工業(株) 実験動物研究管理室
	堀 孝司	564	吹田市南吹田 4丁目 4-1	オリエンタル酵母工業(株) 大阪営業所
	堀江 良一	693	出雲市塩治町 89-1	島根医科大学第2病理学教室
ま	前田 勝弘	564	吹田市江の木町 33-94	大日本製薬(株)研究管理部飼育室
○	前田 敏宏	564	吹田市江の木町 33-94	大日本製薬(株)研究管理部飼育室
	真壁 恭子	640	和歌山市九番町 27	和歌山県立医科大学 第2生理学教室
○	牧野 進	520-34	滋賀県甲賀郡甲賀町五反田	塩野義製薬(株) 実験動物研究センター
	政本 浩二	729-64	広島県高田郡甲田町下甲立 1624	湧永製薬(株)中央研究所
	増井 則夫	433	静岡県浜松市葵 3-5-1	日本エスエルシー(株) 品質管理部
○	増岡通夫	520-30	滋賀県栗太郡栗東町東坂 91	(株)KAC生物科学センター
	町尾 久夫	564	吹田市南吹田 4-4-1	オリエンタル酵母工業(株) 大阪バイオ営業所
	松浦 稔	569	高槻市大蔵司 2-46-2	
	松代 創一郎	525	滋賀県草津市野路町2247	日清食品(株) 中央研 安全研
	松林 清明	484	犬山市官林	京都大学霊長類研究所
○	松村 理一郎	666-01	川西市水明台 3-5-76	
	松本 耕三	770	徳島市蔵本町 3	徳島大学医学部附属動物実験施設
	萬野 賢児	573-01	枚方市長尾峠町45-1	摂南大学薬物安全科学研究所
み○◎	三日月 勝見	520-34	滋賀県甲賀郡甲賀町五反田 1405	塩野義製薬(株) 実験動物研究センター
	三日月 幸治	520-34	滋賀県甲賀郡甲賀町五反田 1405	塩野義製薬(株) 実験動物研究センター
	神子田 武	532	大阪市淀川区十三本町 2-17-85	(株)武田ラビックス
	水内 博	532	大阪市淀川区加島 3-16-89	田辺製薬(株) 分析化学研究所
	水野 信哉	565	吹田市山田丘 2-2	大阪大学・医学部・附属動物実験施設
	三原 径子		静岡県沼津市市道町 13-4 本山方	
	三村 哲夫	546	大阪市淀川区加島 3-16-89	田辺製薬(株) 安全性研究所
☆○	宮嶋 宏彰	891-13	鹿児島県鹿児島市吉田町宮之浦 2438	(株) 新日本科学
○	宮嶋 正康	640	和歌山市九番町 27	和歌山県立医科大学動物室
	宮本 誠	553	福島県福島 1-1-50	大阪大学医学部附属病院病理部
○◎	宮脇 茂樹	305	つくば市桜 3丁目14-1	日本新薬(株)東部創薬研究所
む	椛本 末男	532	大阪市淀川区加島 2-1-6	藤沢薬品工業(株) 開発第一研究所
	武藤 通彦	520-34	滋賀県甲賀郡甲賀町五反田1405	塩野義製薬(株) 実験動物研究センター
	村口 武彦	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
	村本 泰一	567	大阪府茨木市庄2-24-3	日本商事(株) 医薬研究所・安全研
も	本山 守夫	530	大阪市北区中ノ島 2-2-2ニビル' 13F	実医研(株)

関西実験動物研究会（個人会員名簿） 1997年9月現在

	氏名	〒	住所	所属
	森 聖	561	大阪市中央区道修町3-1-8	塩野義製薬（株）医薬情報部
	森 幸生	567	茨木市庄 2 丁目 5-1	日本商事（株）医薬研究所
〇〇	森岡 宏至	593	堺市学園町 1-1	大阪府立大学農学部獣医学科実験動物
	森島 英喜	743	山口県光市大字光井字武田 4720	武田薬品工業（株）薬剤安全性研究所光支所
〇〇	森本 純司	569	高槻市大学町 2-7	大阪医科大学実験動物センター
や〇	安田 正秀	569-11	高槻市奈佐原 4-20-1	大阪薬科大学実験動物センター
	安原 吉高	569	大阪府高槻市氷室町 6-10-1	武田薬品工業（株）薬剤安全性研究所
	谷内 孝次	565	吹田市山田丘2-2	大阪大学医学部附属動物実験施設
	柳本 行雄	550	大阪府西成区西本町 2-5-19	生活化学研究所
	矢野 賢一	679-22	兵庫県神崎郡福崎町山崎 214-1	（株）ミドリ十字・安全性研究所
	藪中 淳	522-02	滋賀県彦根市高宮町 2763	マルホ（株）研究所彦根分室
	山北 修	771-01	徳島市川内町平石字夷野 224-2	大鵬薬品工業（株）研究部
	山口 哲生	171	東京都豊島区高田 3-41-8	（株）CSKリサーチパーク
	山崎 俊幸	666-01	兵庫県川西市水明台4丁目2-35	
	山下 武夫	520-34	滋賀県甲賀郡甲賀町五反田 1405	塩野義製薬（株）実験動物研究センター
	山下 浩文	520-34	滋賀県甲賀郡甲賀町五反田 1405	塩野義製薬（株）実験動物研究センター
	山添 裕之	555	大阪市此花区春日出中3-1-98	住友化学工業（株）生物環境科学研究所
〇〇	山中 久	541	中央区道修町2-2-6道修町後藤ビル3F	（株）イナリサーチ 大阪支所
	山元 勝一	520-34	滋賀県甲賀郡甲賀町五反田 1450	塩野義製薬（株）実験動物研究センター
	山本 孝史	598	大阪府泉佐野市住吉町一番地	不二製油（株）生物化学研究所
	山本 利彦	535	大阪市旭区生江 1-8-14	沢井製薬 大阪研究所 生物研究課
〇	山本 博	930-01	富山市杉谷 2630	富山医科薬科大学動物実験センター
〇〇	山本 好男	520-01	天津市瀬田月輪町	滋賀医科大学法医学教室
	山本 淑子	606-01	京都市左京区吉田近衛町	京都大学医学部法医学教室
〇	家森 幸男	606-01	京都市左京区吉田二本松町	京都大学人間環境学部
ゆ	湯浅 啓史	532	大阪市淀川区加島 3-16-89	田辺製薬（株）安全性研究所
よ	吉岡 勝	569	大阪府高槻市氷室町 6-10-1	武田薬品工業（株）薬剤安全性研究所
	吉澤 達	604	京都市中京区西ノ京西月光町40	（株）ケーエーシー
	吉田 豊彦	561	豊中市二葉町 3-1-1	塩野義製薬（株）研究所神崎川分室
〇	吉田 元信	563	池田市伏尾町103	大日本製薬（株）アミロゲン部研究所
	吉船 伸一	567	茨木市庄 2 丁目 24-3	日本商事（株）医薬品研究所
わ	渡辺 信介	589	大阪府大阪狭山市大野東 377-2	近畿大学ライフサイエンス研究所
	渡辺 清	520-34	滋賀県甲賀郡甲賀町五反田 1405	塩野義製薬（株）実験動物研究センター
	和田 あづみ	593	堺市学園町 1-1	大阪府立大学農学部獣医学科

平成 9 年 12 月 12 日 印 刷
平成 9 年 12 月 15 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