

関西実験動物研究会会報

Kansai Journal of Laboratory Animals

平成10年12月 19号

関西実験動物研究会

Kansai Laboratory Animal Reserch Association

目 次

〈第55回研究会（平成9年9月12日）〉

テーマ：「HVJリポソーム法による生体への遺伝子導入法とその応用」

1. HVJ-リポソームを用いた遺伝子導入による新しい実験動物系の開発

金田 安史（大阪大学細胞生体工学センター）----- 3

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）----- 11

〈第56回研究会（平成9年12月5日）〉

特別講演

1. 個体レベルでの遺伝子機能研究と動物実験

日下部 守昭（理化学研究所ライフサイエンス筑波研究センター）
----- 21

2. 医薬品開発過程における薬物体内動態予測：実験動物からヒトへ、 試験管から個体へ

杉山 雄一（東京大学大学院薬学系研究科）
伊藤 清美（北里大学薬学部）----- 34

3. 会員による研究発表（20題）----- 51

〈第57回研究会（平成10年3月6日）〉

テーマ：「マウスの新たな利用法を求めて」

1. マウス突然変異を利用した形態形成機構の遺伝学的解析

城石 俊彦（国立遺伝学研究所系統生物研究センター）----- 73

〈第58回研究会（平成10年6月19日）〉

テーマ：「実験動物を用いた新興細菌感染症の研究と伝染病予防法の改正」

1. ヒトにおけるHelicobacter 感染と動物モデル

喜多 正和（京都府立医大実験動物室）----- 79

2. マウスモデルにおける腸管出血性大腸菌O157感染の病態解析

喜多 英二（奈良県立医大細菌学）----- 88

3. 伝染病予防法改正に伴う動物由来感染症対応の方向性

内田 幸憲（神戸検疫所）----- 101

〈関西実験動物研究会だより〉	117
〈幹事会、評議員会、総会の議事概要〉	118
〈会長、幹事、監事名簿〉	120
〈評議員名簿〉	121
〈維持会員名簿〉	123
〈会員の異動〉	124
〈個人会員名簿〉	125

< 第 55 回研究会（平成 9 年 9 月 12 日）>

テーマ：「HVJ リポソーム法による生体への遺伝子導入法とその応用」

1. HVJ-リポソームを用いた遺伝子導入による新しい実験動物系の開発
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）

HVJ-リボソームを用いた遺伝子導入による新しい実験動物系の開発

金田安史（大阪大学細胞生体工学センター）

（はじめに）

遺伝子導入ベクターは大別してウイルスベクターと非ウイルスベクターに分類される。前者はウイルスゲノムの一部を、発現させたい外来遺伝子に置換した組み換えウイルスであり、一般的にはウイルスの殻を産生するパッケイジング細胞への組み換えウイルスゲノムの導入によって作製される。一方非ウイルスベクターはウイルスゲノムの組み換えやパッケイジング細胞などは用いずに遺伝子を導入する方法であり、DNAを高分子のキャリアーを用いて細胞内に導入する場合が多く、リボソームやポリリジン-DNA-蛋白複合体がこれにあたる。リボソームは1965年Bangham によって脂質二重層を有する閉鎖小胞として定義づけられ、その中に水溶液に溶けた物質を封入できることからDDS (Drug Delivery System)として注目されてきた。これにDNAを封入する試みもなされてきたが、現在までのところボルテックス振盪法、逆相蒸発法、カルシウム融合-EDTAキレート法など限られた方法しか分子量的に巨大なプラスミドDNAを包埋できないし、導入効率、再現性において初期のリボソームは全くといっていいほど適さなかった。一方、1987年Felgnerらは正電荷をもつ合成脂質によるリボソームを作り、電荷によってDNAの周りをこのリボソームで取り囲んだDNA-リボソーム複合体を考案し、細胞への付着性を高め、培養細胞での高い遺伝子発現が可能な方法（リボフェクション）を報告する（1）と共に製品化もなされた。この方法では正電荷を帯びたリボソーム-DNA複合体が細胞表面に付着し細胞の貪食作用で細胞に取り込まれる。同様な手法による改良型リボフェクションが開発されてきている。しかし生体組織における遺伝子発現には依然として効率が低かった。私達は細胞融合に基づく遺伝子導入法の研究からHVJ-リボソーム法の開発を行ってきた。これは特に生体組織における遺伝子導入にすぐれ、いくつもの動物実験での成果が報告されているが、欠点も多い。最近では改良型HVJ-リボソームも開発されている。このような生体組織への遺伝子導入法は、1つには生体組織における遺伝子機能を解明し疾病発症の分子機構の解析に有用であり、そこから新たなモデル動物の作成も可能であろう。もう1つは社会的にも注目を集めている遺伝子治療の可能性を開くことである。ここでは遺伝子導入法についてとそれを用いた応用例を病態解析と遺伝子治療の両面から我々のデータをもとに紹介する。

（HVJ-リボソーム法の開発）

正電荷脂質によるリボフェクションの項で述べたように、この方法による遺伝子導入と発現の問題点は多くが細胞の貪食作用を期待しているところにある。そこで私達は細胞融合による遺伝子導入をめざし細

細胞融合をおこすウイルスであるHVJ(Hemmagglutinating Virus of Japan; Sendai virus)利用することと導入遺伝子の発現を高めるための核蛋白質の共導入の考えから最終的にHVJ-リボソーム法を開発した(2,3)

(図1)。これは非ウイルスベクターであるがウイルスとリボソームの融合ベクターであることからハイブリッドベクターの草分けと言えるだろう。磷脂質とコレステロールからなるリボソームが紫外線で不活化したHVJと融合できるという中西らの発見(4)に基づき、DNA(と核蛋白質)を封入したリボソームを不活化HVJと融合させ、HVJ由来の融合蛋白FとHNを含むベジクルが作製された。また共導入する核蛋白質は最終的にHMG-1(Non-histone chromosomal protein, High Mobility Group-1)を用いた(2)。この方法によるとリボソームに封入された遺伝子はエンドソームやリソソームによって破壊されることなく細胞質に導入され、核蛋白質の働きでその発現を高めることができる。HMG-1の作用はDNAを凝縮させ核移行を補助しているのか、核内で安定化させたり転写活性を高めているのかなどいくつかの機構が考えられている。HVJの細胞表面のレセプターはシアル酸の付いた糖脂質、糖蛋白質であり、リンパ球以外の殆どの細胞に融合し遺伝子の導入が可能であり、約10分のインキュベーションではほぼ融合、導入が完成する。細胞の分裂、非分裂を問わず遺伝子の導入、発現が可能であり、連続投与も可能である。DNAサイズは100kbまでなら10-20%の率でリボソームに封入できる。大阪大学医学部小児科の柳原らは全長12kbに及ぶジストロフィン遺伝子(cDNA)の筋ジストロフィーモデルマウスへの導入、発現に成功した(5)。大阪大学医学部第四内科の森下らの研究によってアンチセンスオリゴヌクレオチド(AS-ODN)の導入に極めて(直接投与や正電荷リボソームの約100倍)有効であることがわかった(6、7)。またこのベクターは負電荷を帯びており培養細胞系での細胞との接着は弱い、組織への透過性に優れ血管内皮をすりぬけ組織内部へ拡がり様々な細胞に遺伝子導入が可能である。九州大学医学部第一病理の米満らはHVJ-liposomeの血管壁細胞への遺伝子導入について詳細なデータを報告している(8)。これらの特質を生かし表1に示すように多くの動物臓器への遺伝子導入により、遺伝子治療の研究のみならず遺伝子レベルでの病態解析に成功している(9)。

(HVJ-リボソームを用いた生体組織での遺伝子機能解析)

遺伝子の生体組織での機能解析は培養細胞や形質転換動物の実験系では十分解析できなかった新たな研究領域であろうと考えられる。形成された組織での遺伝子機能解析を可能とするためには目的部位に均一に遺伝子が効率よく導入できかつ組織細胞に障害を与えないことが肝要である。細胞融合を利用したHVJ-リボソーム法は最もその目的に適した遺伝子導入法であろうと考えられる。

1) 肝炎ラットの作成(10)

既に我々はヒトB型肝炎ウイルス(HBV)遺伝子をラット肝臓に導入・発現させることによってウイルス肝炎様の病理変化を誘発する事を報告してきた。ラットやマウスはHBVレセプターをもたないためにウイ

ルス感染はおこせない。そこでHBV遺伝子を受精卵に導入し形質転換動物が作成されたが、これでは個体がウイルスに対して免疫寛容になって病的変化はおこらずヒト肝炎モデル動物にはなり得なかった。免疫が成立した成育マウスやラットの肝臓で強力に遺伝子を発現させる必要があった。HVJ-liposomeによってHBVの表面抗原遺伝子を肝臓に発現させるとHBVの表面抗原に対する抗体がラットの個体で産生され、さらに繰り返し毎週一回HVJ-liposomeによって遺伝子導入を繰り返すと肝細胞の融解壊死とリンパ球の浸潤像が認められ、さらにグリソン鞘炎も見られ、ほぼヒトのB型肝炎と類似の病変が認められた。しかし肝細胞の破壊はこれ以上進行せず肝機能の悪化も一過性であった。恐らく発現のレベルが低いのか、ウイルスの他のコンポーネントが病態の進行に必要ではないかと考えられる。

2) 高血圧ラットの作成 (11)

同様な手法によって我々は高血圧ラットの作成に成功した。ヒトレニン遺伝子をHVJ-liposomeによってラット肝臓に導入・発現させると1週間にわたってラット血中に活性型レニンが分泌されラットの収縮期血圧は最大約40mmHg上昇し、血圧の変動は血中活性型レニン価、ラットのアンジオテンシンII価とよく相関した。またヒトレニン特異的阻害剤によってこの高血圧は抑制された。この実験を通じて従来不明であった事実が幾つか解明された。1つはレニンは種特異性が高くヒトレニンはラットの基質(アンジオテンシノーゲン)に働かないといわれてきたが、アンジオテンシノーゲン産生の場合である肝細胞に導入した場合にはアンジオテンシンを産生できること、2つ目は腎系球体細胞以外でレニンの活性化がおこるかどうかは不明であったが、肝臓で発現させることにより活性化も起こりうること、3つ目は従来ヒトレニン阻害剤の検討はサルを用いないと不可能と考えられてきたが、ラットのモデルが可能になったことでまだ不十分かもしれないが小動物での検討の可能性も生まれてきた。

3) 線維症の病態解析

ここではTGF- β 、PDGF- β 遺伝子の導入による腎硬化症と間質性肺炎の誘発例を示す。

慢性糸球体腎炎や糖尿病性腎症など多くの腎疾患の最終像はメサンジウム細胞の増殖と細胞外基質の増生により特徴づけられる腎硬化症といった病理像である。腎硬化症においてはTGF- β やPDGFなどの増殖因子が腎硬化症の病態の形成に関わっていることが示唆されてきた。私達はこれらの因子と腎硬化症の関わりを直接証明するために腎臓への直接的遺伝子導入法を利用することにした。ヒトのTGF- β 及びPDGF- β 遺伝子をそれぞれchick- β actin promoterのもとで発現させるプラスミドDNAをHVJ-リポソームに包埋し、これを成育ラットの左腎動脈に注入した(12)。TGF- β 、PDGF- β それぞれの抗体を用いた間接蛍光抗体法により導入3日目以降に各因子の腎系球体での発現が認められた。遺伝子が発現したのは全糸球体の30-40%であった。経日的に遺伝子導入ラットの腎臓の組織学的変化をPAS(periodic Acid-Schiff)染色で調べると、TGF- β 導入群では腎系球体が淡赤色の塊状の物質で覆われ細胞外基質の増生

が示唆された。PDGF- β 導入群では細胞外基質の増生は顕著ではなかったが糸球体の核の数が増加し細胞増殖が著明に誘発されていた。これら細胞外基質や細胞数の増加は導入3日目より認められ5日、7日と時間と共に顕著になった。TGF- β 、PDGF- β 導入群いずれのラットも蛋白尿を呈したが、血中クレアチンや尿素窒素の上昇は認めなかった。TGF- β 導入群での細胞外基質の構成成分としてI、III、IV型コラーゲンについて蛍光抗体法で調べたところ間質型のI、III型が著明に増加し基底膜型のIV型は軽度の増加にとどまった。この所見はヒトの腎硬化症の病変に近似しており、培養メサンジウム細胞を用いては認められなかった所見であり、この方法がヒトの病態解析に有用であることを示している。

同様の手法を用い、大阪大学医学部第三内科のグループは増殖因子と肺線維症の関連について遺伝子レベルでの病態解析に成功した(13)。TGF- β 遺伝子を導入したラット肺では肺胞壁の肥厚、細胞数の増加が認められたが炎症細胞の浸潤は殆どみられなかった。間質にはコラーゲンと考えられる細胞外基質の増生が顕著であった。これは細胞数の増加と炎症細胞浸潤が見られたPDGF- β 遺伝子導入のケースとは異なっており、肺線維症の各病相に各因子が関与していることが示された。

(今後の展開)

生体組織への遺伝子導入による組織での遺伝子機能の解析は培養細胞や形質転換動物とは異なる実験系として今後益々注目されるようになるであろうが、より均一な実験系を獲得するためにはやはり導入効率の増強の必要性が増すであろう。遺伝子導入法はウイルスベクター、非ウイルスベクターそれぞれ或いは相互を組み合わせたハイブリッドベクターが開発され短所を相補できるようになるであろう。遺伝子もプラスミドから人工染色体に移行したり、相同組み換えにより変異部位の修正が行われるであろうが、これらにはまだ多くの研究と時間が要するであろう。最近我々は、さらに強力な遺伝子導入HJV-liposomeとして正電荷脂質を用いたHJV-cationic liposomeを開発した(14)。これは特に培養細胞や癌組織への導入に適しているが、生体組織の局所での高発現にも利用できる。我々はこの新型HJV-liposomeによって発生過程のニワトリ胎仔の心臓や脳室などの部位に局限した遺伝子発現に成功しており(15)、今後発生に関与する遺伝子の解析も可能になると期待している。

(引用文献)

1. Felgner, P.L., et al. Lipofection; a highly efficient lipid-mediated DNA transfection procedure. Proc. Natl. Acad. Sci. (USA) 84, 7413-7417, 1987.
2. Kaneda, Y., et al. : Increased expression of exogenous DNA by cointroduction with nuclear protein in adult rat liver. Science 243, 375-378, 1989.

3. Kato, K., et al. : Expression of hepatitis B virus surface antigen in adult rat liver. *J. Biol. Chem.* 266, 3361-3364, 1991.
4. Nakanishi, M., et al. : Efficient introduction of contents of liposomes into cells using HVJ (Sendai virus). *Exp. Cell Res.* 159, 399-409, 1985.
5. Yanagihara, I., et al. : Expression of full-length human dystrophin cDNA in mdx mouse muscle by HVJ-liposome. *Gene Therapy* 3, 549-553, 1996.
6. Morishita, R. et al. : Pharmacokinetics of antisense oligonucleotides (cyclin B1 and cdc 2 kinase) in the vessel wall; enhanced therapeutic utility for restenosis b
7. Morishita, R. et al. : Single intraluminal delivery of antisense cdc2 kinase and proliferating-cell nuclear antigen oligonucleotides results in chronic inhibition of neointimal hyperplasia. *Proc. Natl. Acad. Sci. (USA)* 90: 8474-8478, 1993.
8. Yonemitsu, Y., et al. : Characterization of in vivo gene transfer into the arterial wall mediated by the Sendai Virus (Hemagglutinating Virus of Japan) liposomes: An effective tool for the in vivo study of arterial diseases. *Laboratory Investigation* 75, 313-323, 1996.
9. Dzau, V.J., et al. : Fusigenic viral liposome for gene therapy in cardiovascular diseases. *Proc. Natl. Acad. Sci. (USA)* 93, 11421-11425, 1996.
10. Kato, K., Kaneda, Y., Sakurai, M., Nakanishi, M. & Okada, Y. : Direct injection of hepatitis B virus DNA induced hepatitis in adult rat liver. *J. Biol. Chem.* 266, 22071-22074, 1991.
11. Tomita, N., Higaki, J., Kaneda, Y., Yu, H., Morishita, R., Mikami, H. & Ogihara, T. : Hypertensive rats produced by in vivo introduction of the human renin gene. *Circulation Res.* 73, 898-905, 1993.
12. Isaka, Y., Fujiwara, Y., Ueda, N., Kaneda, Y., Kamada, T. & Imai, E. : Glomerulosclerosis induced by in vivo transfection with TGF-beta or PDGF gene into rat kidney. *J. Clin. Invest.* 92, 2597-2601, 1993.
13. Yoshida, M., Sakuma, J., Hayashi, S., Abe, K., Saito, I., Harada, S., Yamamoto, A., Matsumoto, N., Kaneda, Y. & Kishimoto, T. : Histologically distinctive interstitial pneumonia induced by overexpression of IL-6, TGF-beta or PDGF gene. *Proc. Natl. Acad. Sci. (USA)* 92, 9570-9574, 1995.
14. Saeki, Y., Matsumoto, N., Nakano, Y., Mori, M., Awai, K., & Kaneda Y. : Development and characterization of cationic liposomes conjugated with HVJ (Sendai virus); Reciprocal effect of cationic lipid for in vitro and in vivo gene transfer. *Human Gene Therapy* 8, 1965-1972, 1997.
15. Yamada, G., Nakamura, S., Haraguchi, R., Sakai, M., Terashi, T., Sakisaka, S., Toyoda, T., Ogino, Y., Hatanaka, H., and Kaneda, Y. : An efficient liposome-mediated gene transfer into the branchial arch, neural tube and

the heart of chick embryos; A strategy to elucidate the organogenesis. Cell. Moll. Biol. 43, in press.

図1：HVJ-リボソームによる遺伝子導入

DNAとそれに結合する核蛋白質(HMG-1)を混ぜ合わせそれらを磷脂質とコレステロールよりなるリボソームに封入する。このリボソームを紫外線で不活化したHVJと融合させ融合ベジクルを形成させる。このベジクルは細胞表面のHVJのレセプターに結合し、膜融合をおこす。これによって内包されていたDNA-HMG-1が細胞質に導入され、DNAは核内に移行し発現が増強される。

表1：HVJ-リボソームによる生体組織への遺伝子導入の成果

图 1

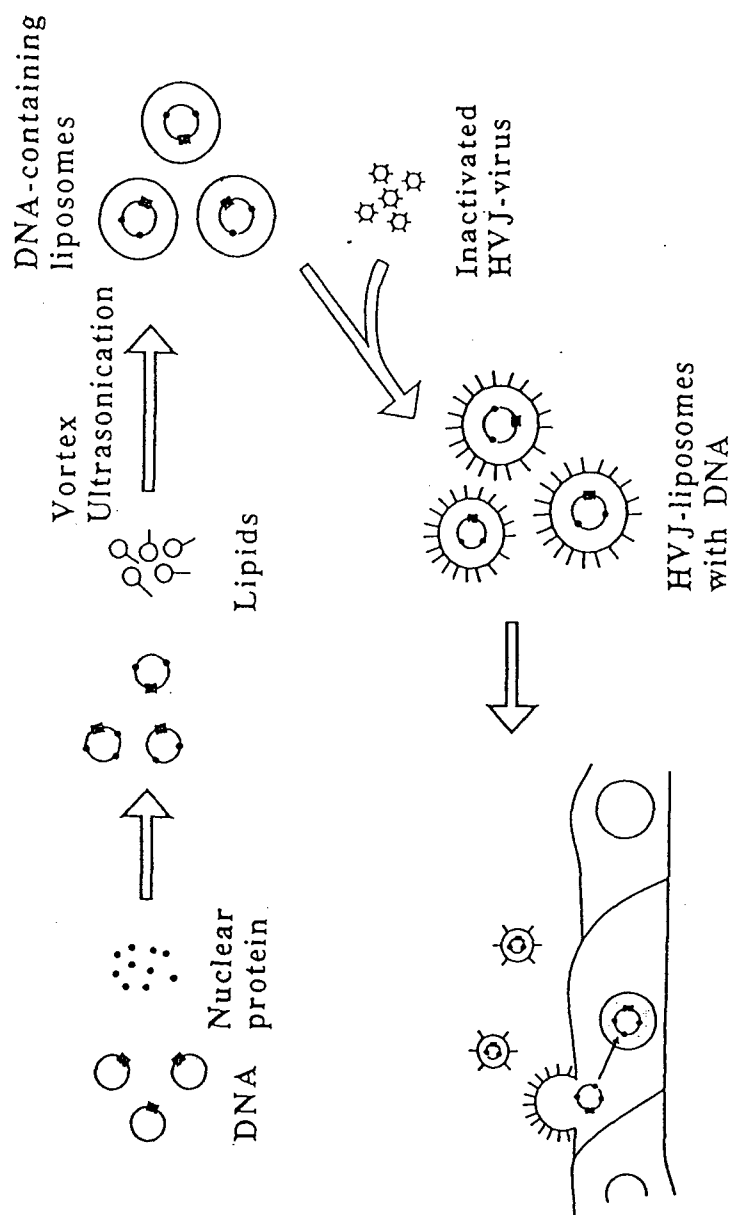


Table 1. Application of HVJ-liposome method

Organ	Gene introduced	Duration	Effect of gene transfection
Liver	Insulin	10-14 days	Decrease in blood glucose
	Hepatitis B Antigen	7 days	Liver cell degeneration and infiltration
	Renin	7 days	High blood pressure
Kidney	TGF-b, PDGF-B	7 days	Glomerulosclerosis
	Renin and Angiotensinogen	7 days	Glomerulosclerosis
Heart	TGF-b	2 weeks	Cardiac hypertrophy
Skeletal Muscle	Dystrophin	>2 weeks	Dystrophin expression in mdx mouse muscle
Artery	Renin ACE	>2 weeks	Hyperplasia and hypertrophy of VSMC
	Nitric Oxide Synthase	>2 weeks	Inhibition of neointima formation of balloon injury
Vein Graft	Antisense ODNs for PCNA and cdc2 kinase	>2 weeks	Prevention of atherosclerosis
Lung	TGF-b	>2 weeks	Fibrosis
Patellar Ligament	b-galactosidase	>4 weeks	n.d.
Testis	CAT	>8 months	no change
Brain	ACE	4 weeks	Hypertension
	b-galactosidase	4 weeks	n.d.
Fetus	b-galactosidase	3 weeks	n.d.

Abbreviations: CAT: Chloramphenicolacetyl transferase, VSMC: Vascular Smooth Muscle Cells, TGF-b: Transforming Growth Factor-b, PDGF-B: Platelet-derived growth factor-B, PCNA: proliferating cell nuclear antigen, n.d.: not determined.

慢性腎不全の病態は、糸球体腎炎や糖尿病性腎症などの原因疾患にかかわらず、ある一定のメカニズムで糸球体線維化が進行していくと考えられている。その過程には非免疫学的な共通の因子の関与が示唆されており、特に増殖因子やサイトカインが主たる役割を果たしていることを示唆する報告が集積してきている。この糸球体硬化がなぜ起こるか、そしてどうすればこれを阻止できるのかという問題は今日の腎臓病学の焦点となっている。細胞外基質(extracellular matrix; ECM)産生を制御するtransforming growth factor- β (TGF- β) は、糸球体傷害時に本来は一過性に発現して組織修復に関与していると合目的に考えられている増殖因子であるが、糸球体硬化進展での過程ではそれが過剰発現する結果、いわば 'overhealing' の状態となり、線維化をきたすと考えられている。TGF- β がin vivoで糸球体硬化病変の進展を促進するという仮説を支持する傍証は多く報告されているが、この仮説をin vivoで直接的に証明する研究はなされていなかった。そこで今回我々はTGF- β 遺伝子をHVJ-リボソーム法で直接腎臓糸球体細胞に導入することによって糸球体局所でそれら遺伝子の過剰発現を引き起こし、糸球体にいかなる組織変化が惹起されるかを検討した¹⁾。さらに、腎臓糸球体細胞への遺伝子導入は、様々な生理活性物質の糸球体に対する直接的な作用をin vivoで検討する上で極めて有用な実験系であるとともに、慢性糸球体腎炎に対する遺伝子治療の可能性を秘めている。すなわち糸球体硬化病変の進展には糸球体構成細胞自身が産生するautocrine/paracrine因子が関与すると考えられている。一方、TGF- β に対する中和抗体を投与することにより実験腎炎の進展を防止し得たことも報告されている²⁾。従って、過剰に発現したTGF- β の作用を抑制することは、腎障害の進展を阻止するために有効な戦略であると考えられる。すなわち、糸球体障害進展時に過剰発現するTGF- β を遺伝子操作により是正することにより、糸球体障害の進展を抑制しうると考えられる。そこで、抗Thy-1抗体腎炎モデルラットを用い、1.TGF- β に対するアンチセンスオリゴを腎糸球体に導入し、TGF- β 遺伝子発現自体を抑制する方法³⁾と、2.TGF- β の中和活

性を持つ蛋白を発現させ、発現増加しているTGF- β の作用を抑制する方法⁴⁾について検討した。後者の方法としてはTGF- β のnatural inhibitorと考えられているデコリンを発現するベクターを筋肉に導入し、これらの蛋白を筋肉で過剰発現させ血流を介して糸球体に作用させることを試みた。

1. 方法

(1) 発現ベクターの作製

ヒトTGF- β の発現ベクターはヒトTGF- β 1のcDNA全長をチキン β アクチンのプロモーターをもつベクターに組み込んで作製した。

(2) HVJ-リポソームの調製およびラット腎への遺伝子導入

HVJ-リポソームは金田らの方法に従って作製した。Sprague-Dawley(SD)ラットを麻酔下に開腹し、血行を遮断した状態で左腎動脈にカテーテルを挿入し、DNAを含むHVJ-リポソームを腎臓に選択的に注入した。

(3) 組織学的検索

1. 遺伝子導入の確認

In vivo遺伝子導入後、3、5、7日目にラットを麻酔下に屠殺。TGF- β 遺伝子導入群は抗ヒトTGF- β ポリクローナル抗体を1次抗体とする間接蛍光抗体法によりヒトTGF- β の発現の確認を行った。

2. 顕微鏡による病理学的変化の検討

メサンギウム細胞の増殖やECMの増加などの糸球体腎炎様の変化について検討を加えた。細胞増殖、ECM産生の程度を定量するために、7日目のラット腎臓は顕微鏡標本(PAS染色)を作製して、各切片の糸球体をランダムに30個選び、糸球体内の細胞数をカウントするとともに、Raijらが報告した方法に従ってECMの増生の程度について検討を行った。また、間質型コラーゲン(I型,III型コラーゲン)、 α -smooth muscle actin(α -SMA)が糸球体内に発現するかどうかを免疫組織化学的に検討した。

(4) ラット糸球体細胞へのFITCラベル・オリゴ(FITC-ODN)の導入

HVJ-リポソーム法により、TGF- β のアンチセンスオリゴヌクレオチドを腎臓に導入した場合、どの細胞にTGF- β のアンチセンスオリゴヌクレオチドが取り込まれるかを観察した。なぜなら、TGF- β が腎糸球体のメサンギウム細胞に

においてautocrine的に作用することが腎炎の進展に重要な役割を果たすと考えられており、しかも核内のリボヌクレアーゼHがアンチセンスオリゴヌクレオチドと結合したmRNAを分解することがアンチセンスオリゴヌクレオチドの作用機序であると報告されているからである。そこで、FITCラベルしたTGF- β のアンチセンスオリゴヌクレオチドをHVJ-リポソーム法により、腎動脈からラット腎に導入し、20分後に腎臓を単離し、腎組織のFITCの蛍光を観察した。

(5) 抗Thy 1腎炎ラットへのTGF- β AS-ODNの導入

抗Thy-1抗体により腎炎を惹起した2日後に、腎炎モデルラットの左腎動脈から、HVJ-リポソーム法により、TGF- β のアンチセンスオリゴヌクレオチドを導入した。アンチセンスオリゴヌクレオチドのコントロールとして、スクランブルオリゴヌクレオチド、リバーズオリゴヌクレオチド、センスオリゴヌクレオチドを使用した。また、TGF- β のアンチセンスオリゴヌクレオチドを左腎に導入したラットの反対側の右の腎臓を無治療群として実験に供した。導入するODNの30%はFITCをラベルした。

(6) antisense ODNによる糸球体TGF- β mRNAの抑制

抗Thy-1抗体により腎炎を惹起した2日後に、腎炎モデルラットの左腎動脈から、HVJ-リポソーム法により、TGF- β のアンチセンスオリゴヌクレオチドを導入した。抗Thy-1腎炎においてTGF- β のmRNAレベルがピークとなる腎炎惹起4日目に腎糸球体をシービング法により単離し、腎糸球体のTGF- β のmRNAレベルをNorthern blot法により検討した。

(7) 抗Thy 1腎炎の糸球体組織病変に対するTGF- β AS-ODN導入療法の検討

ODN導入7日後、細胞増殖、ECM産生の程度を定量するために、上記(3)-2方法に従って各6匹のラットについて検討を行った。さらに、 α -SMAの発現の程度を免疫組織化学的に検討した。

(8) in vitroでのデコリン発現の検討

サイトメガロウイルスエンハンサー、アクチンプロモーターの下流にデコリン遺伝子を組み込んだ発現ベクターを作製し、培養C2C12細胞に遺伝子導入を行い、培養C2C12細胞の遺伝子発現をNorthern blot法により、また、培養上清中に糖鎖を持ったデコリンが分泌されるかを、 ^{35}S -sulfateでmetabolic labelを行い、SDS-PAGEにより解析した。

(9)正常ラット筋肉へのデコリン遺伝子導入の検討

正常ラットへデコリンを静注するとデコリンは、腎臓、肺、肝臓に取り込まれることはすでに検討済みである。そこで、正常ラット筋肉へHVJ-リポソーム法によりデコリン遺伝子を導入し、実際に正常ラットの筋肉でデコリンが発現しているかをNorthern blot法により、また、筋肉で発現したデコリンが血流を介して腎臓に沈着が認められるかをデコリンに対する抗体を用いて、蛍光抗体法により検討した。

(10)デコリン遺伝子導入によるTGF- β のmRNAレベルの検討

抗Thy-1抗体により腎炎を惹起した前日に、腎炎モデルラットの筋肉に、HVJ-リポソーム法により、デコリン遺伝子発現ベクターを導入した。デコリンのコントロールとして、CAT遺伝子発現ベクターを使用した。腎炎惹起6日目に腎糸球体をシービング法により単離し、腎糸球体のTGF- β のmRNAレベルをNorthern blot法により検討した。

(11)デコリン遺伝子導入による抗Thy-1腎炎の組織学的検討

抗Thy-1抗体により腎炎を惹起した前日に、腎炎モデルラットの筋肉に、HVJ-リポソーム法により、デコリン遺伝子発現ベクターを導入した。デコリンのコントロールとして、CAT遺伝子発現ベクターを使用した。腎炎惹起6日目、14日目に腎臓を単離し、PAS染色および酵素抗体法を用いて組織学的検討を行った。

2. 結果

(1)導入遺伝子の発現

ヒトTGF- β 遺伝子を導入3日後、間接蛍光抗体法にてヒトTGF- β 蛋白を証明した。

(2)TGF- β 遺伝子導入腎の組織学的変化

TGF- β 遺伝子導入群において、7日目の腎組織で著明なECMの増加が認められた。また、メサングウム細胞数も増加傾向を示していた。ヒトおよび実験動物の糸球体硬化ではECMの増加は通常糸球体にはみられない α -SMAやI型、III型コラーゲンといった間質型コラーゲンの増加をみることが知られている。 α -SMAはメサングウム細胞が形質転換して増殖、ECM過剰産生をきたすとマーカーとして考えられている。そこでTGF- β 遺伝子導入ラットの腎について α

-SMAや糸球体のメサンギウム基質に含まれるコラーゲンのタイプをそれに特異的な抗体を用いて調べた。コントロールでは α -SMAや間質型コラーゲンはみられなかったのに対してTGF- β 遺伝子導入群では α -SMAならびにI型・III型コラーゲンの出現を認めた。これらのことからTGF- β の過剰発現によりメサンギウム細胞の形質転換がおこり、正常糸球体ではみられない α -SMA、間質型コラーゲンの産生をおこしたと結論付けられた。

(3) 正常ラット腎臓糸球体細胞へのFITC-ODN導入

HVJーリボソーム法によりラット左腎に選択的にFITC-ODNを導入し、20分後FITCを観察したところ、FITC-ODNは20分以内にほぼ100%の糸球体の細胞の核内に速やかに取り込まれていた。また、抗Thy-1抗体を1次抗体として用いてメサンギウム細胞をRITCで蛍光染色したところ、FITCによって緑色の蛍光を発する細胞核はRITCによって赤色の蛍光で示されるメサンギウム領域の中に存在したことから、ODNが導入された糸球体細胞は主にメサンギウム細胞であると考えられた。

(4) antisense ODNによる糸球体TGF- β mRNAの抑制

スクランブルオリゴヌクレオチド、リバーソオリゴヌクレオチド、センスオリゴヌクレオチド治療群においては、TGF- β のmRNAレベルは無治療群と比較して差は認められなかったが、アンチセンスオリゴヌクレオチド治療群では、劇的にTGF- β のmRNAレベルは低下し、正常コントロールのレベルに近いものであった。house keeping geneとしてのGAPDHmRNAレベルはいずれの群においても差は認められなかった。これら2匹についてのRT-PCRの検討の結果、TGF- β AS-ODN導入2日後の糸球体内TGF- β mRNA量はコントロールに対して有意に抑えられていることがわかった。

(5) 抗Thy 1腎炎の糸球体組織病変に対するTGF- β AS-ODN導入療法の検討

TGF- β に対する一次抗体を用いて、糸球体でのTGF- β の発現抑制効果を蛋白レベルで検討したところ、スクランブルオリゴヌクレオチド、リバーソオリゴヌクレオチド、センスオリゴヌクレオチド治療群においては、TGF- β のmRNAレベルは無治療群と比較して差は認められなかったが、アンチセンスオリゴヌクレオチド治療群では、TGF- β の発現は抑制されていた。また、PAS染色による糸球体のExtracellular matrix score および糸球体細胞数を検討したところ、アンチ

センスオリゴヌクレオチド治療群では、細胞数では有意な変化は認められなかったが、Extracellular matrix score は有意に低下していた。

(6) in vitroでのデコリン発現

培養C2C12細胞にデコリン遺伝子の導入を行い、培養C2C12細胞の遺伝子発現をNorthern blot法により検討したところ、コントロールとして用いたCAT遺伝子導入群に比し、デコリン遺伝子を導入した細胞でデコリンの強い発現が認められた。また、培養上清中に糖鎖を持ったデコリンが分泌されるかを、³⁵S-sulfateでmetabolic labelを行い、SDS-PAGEにより解析したところ、デコリン遺伝子導入群で110kDのデコリンの強いバンドが認められた。

(7) 正常ラット筋肉へのデコリン遺伝子導入の検討

正常ラット筋肉に遺伝子導入を行った後、3日後に導入を行った筋肉のデコリンおよびGAPDHのmRNAレベルをNorthern blotにより調べたところ、in vivoの系においてもデコリン遺伝子を導入した筋肉において、強いデコリンの発現を認めた。また、過剰発現したデコリンが血流を介して腎に到達しうるかどうかを、デコリンおよびCAT遺伝子を筋肉に導入したラットの糸球体をデコリンに対する抗体を用いて、蛍光抗体法により検討した。その結果、デコリン遺伝子導入群では糸球体を中心としてデコリンの強い沈着を認めた。

(8) デコリン遺伝子導入によるTGF-β mRNAの抑制

腎炎惹起6日目のラット腎糸球体をシービング法により単離し、腎糸球体のTGF-β mRNAレベルを調べたところ、デコリン遺伝子導入群においてTGF-βの発現は抑制されました。一方GAPDHには差は認めなかった。

(9) デコリン遺伝子導入による抗Thy-1腎炎の組織学的検討

デコリン遺伝子導入の細胞外基質産生に対する影響を調べるために、Matrix indexを半定量的に評価した。腎炎惹起後6日目および14日目の糸球体硬化度をデコリン導入群およびCAT導入群について正常群と比較したところ、デコリン遺伝子導入群においては、6日目からMatrixはDisease controlのCAT遺伝子導入群に比し、低下傾向にあり、14日目には有意にExtracellular matrix scoreは正常に近い値まで抑制された。TGF-βに鋭敏に反応して、特異的に発現されることが知られている、type I collagen, fibronectin EDA, tenascinの蛍光抗体法による染色性を半定量的に評価することにより、デコリン遺伝子導入の細胞外基質産生に

対する影響を調べた。この結果、デコリン遺伝子導入群ではCAT遺伝子導入群に比べてこれらのマトリックス蛋白の増加は認められなかった。しかし、CAT遺伝子導入群ではこれらの蛋白の発現はDisease controlと同様に増強したままであり、その染色性が14日目も持続した。一方、デコリン遺伝子導入群では14日目ではすでにその染色性が低下していた。

3. 考察

我々はTGF- β 遺伝子をラット腎臓糸球体に導入し、糸球体硬化病変を引き起こすことをin vivoにおいて初めて証明した。ヒトの慢性糸球体腎炎や実験腎炎、糸球体硬化症ではメサンギウム細胞に α -SMAの発現をみたり、ECM成分として間質型コラーゲンの出現をみることが知られている。これらは本来正常の糸球体ではみられないものであり、メサンギウム細胞の形質転換のマーカーとして認識されている。今回TGF- β 遺伝子を糸球体細胞に導入することにより、糸球体内に α -SMA、間質型コラーゲンの発現が認められたことから、TGF- β の腎局所での過剰発現がメサンギウム細胞の形質転換を起こしうることが示された。

HVJ-リボソーム法により、FITCラベルしたTGF- β のアンチセンスオリゴヌクレオチドが導入された細胞の核は、主にメサンギウム細胞の核であることが判明した。従って、我々が用いているHVJ-リボソーム法により、TGF- β のアンチセンスオリゴヌクレオチドをメサンギウム細胞の核に導入することが可能となり、TGF- β がautocrine的に作用すると考えられている腎糸球体のメサンギウム細胞において効率よくアンチセンスオリゴヌクレオチドを作用させることが可能になったと考えられた。アンチセンスによりTGF- β mRNAは抑制され、この低下に応じて糸球体硬化はアンチセンスオリゴヌクレオチドにて有意に抑制された。このことから、今後、新たな、腎硬化症に対する薬剤としてアンチセンスオリゴヌクレオチドを使用できる可能性が示唆され、新しい薬剤を創造するという視点から注目される。

また、TGF- β に対する中和物質であるデコリンを筋肉に過剰発現させて腎糸球体に対する抑制を試みたところ、糸球体硬化症が抑制された。この方法は上記アンチセンスオリゴヌクレオチドを用いた治療法と同様に新しい薬剤を創造す

るという視点から注目される。さらに、この方法はアンチセンス療法に比し、侵襲性が少ないとともに、腎炎のみならず肝硬変、肺線維症に対する治療薬としても注目される。

参考文献

- 1) Isaka Y, Fujiwara Y, Ueda N, Kaneda Y, Kamada T , and Imai E.: Glomerulosclerosis induced by in vivo transfection of TGF β or PDGF gene into the rat kidney. J Clin Invest 92: 2597-2601,1993
- 2) Border WA, Okuda S, Languino LR, Sporn MB, Ruoslahti E: Suppression of experimental glomerulonephritis by antiserum against transforming growth factor β 1. Nature 346: 371-4, 1990
- 3) Akagi Y, Isaka Y, Arai M, Kaneko T, Takenaka T, Moriyama T, Kaneda Y, Ando Y, Orita Y, Kamada T, Ueda N, and Imai E.: Inhibition of transforming growth factor- β 1 expression by antisense oligonucleotides suppresses extracellular matrix accumulation in experimental glomerulonephritis. Kidney Int 50: 148-155, 1996
- 4) Isaka Y, Bress DK, Ikegaya K, Kaneda Y, Imai E, Noble NA, and Border WA.: Gene therapy by skeletal muscle expression of decorin prevents fibrotic disease in rat kidney. Nature Medicine 2: 418-423, 1996

< 第 56 回研究会 (平成 9 年 12 月 5 日) >

特別講演

1. 個体レベルでの遺伝子機能研究と動物実験

日下部 守昭 (理化学研究所ライフサイエンス筑波研究センター)

2. 医薬品開発過程における薬物体内動態予測: 実験動物からヒトへ、試験管から個体へ

杉山 雄一 (東京大学大学院薬学系研究科)

伊藤 清美 (北里大学薬学部)

3. 会員による研究発表

個体レベルでの遺伝子機能研究と動物実験

理化学研究所・実験動物室

日下部守昭

はじめに

近年の発生工学や遺伝子工学の技術の進歩に伴って、種々の遺伝子が単離され、それらの遺伝子機能が研究解明されてきた。特に、トランスジェニック動物や遺伝子欠損動物はマウスを中心としてその技術がほぼ完成され多くの個体を作成され、個体レベルでの遺伝子機能解明の基盤となっている。これらの実験動物は、単に遺伝子機能の研究のみならずヒト遺伝疾患モデル動物としても有用である。

本稿では、個体レベルでの遺伝子機能解析系である発生工学技術について紹介するとともに我々の研究室で開発した、テネイシン欠損動物を用いた糸球体腎炎モデル実験について紹介する。

実験動物とは？

最近の医用工学の目覚ましい発達によって医学は、ロボットなどを用いた医用機械もその研究開発の範疇に包含するようになってきた。しかし、より精巧な人工組織・器官の開発には、生き物としてのヒトの研究が必要であり、特に医学生物学研究において、実験動物は、ヒト疾患のモデルとして重要な役割を担ってきた。これらを扱う領域を「モデル動物学」と呼ぶことができる（図1）。勿論、ヒト疾患の研究において、ヒトを直接研究対象とすることが種々の病因解明のために最も短距離であるとはいえ、ヒトに対していろいろと処置を施すことは倫理上大変な問題であるので当然許可されるはずもない。また、新薬の開発の最終段階において臨床試験を行う時にも、安全性の確定していない場合、患者の承諾が必要である。このように、研究開発が臨床レベルへと進行する過程において、モデルとなる適切な実験動物の利用が重要な役割を担っていることは周知の事実である。しかし、単に動物を実験研究に用いさえすれば良いのではなく、動物を実験に用いるためには、実験動物化をしなければならない。例えば、野山を走っているウサギを捕獲して何らかの実験的処置を加えた場合、このウサギがすでに病気にかかっていたかもしれないとか、処理後出た症状が、そのウサギ固有のものであって、人間の疾患モデルとはならないこともある。そのため、動物を野性からつかまえてきた後、家畜の様に慣らし、人による飼育・繁殖を可能とし、品質がそろった動物を作り上げる必要がある（図2）。これを実験動物化という。図3は、通常の実験動物化の手順を示

している。まず野性動物を捕獲した後、その習性などを調べて、適切な飼育法を確立する。次に人が与えてた環境において繁殖できる様にそれらの動物の特性を研究解析する。この間に遺伝的特性、生理学的特性や疾病などについて検索する。サルなどヒトに近い動物種では、エボラウィルス、コレラや赤痢など人獣共通の伝染病についての十分な事前検査が必要となる。これらの検査を基に計画繁殖を行い、更には遺伝制御を行って品質の高い実験動物の生産をおこなう。つまり、実験動物化とは、野性動物を導入、飼育管理、繁殖という段階を経てヒト疾患のモデルとなる特性を検索し、これらの遺伝形質を制御しながら計画生産によって更に繁殖をさせ、品質の高い動物を生み出すことである。ところが、20年ほど前から、遺伝子を操作するという技術が、盛んに行われるようになり、このような遺伝子操作動物が遺伝子機能の研究や人の病気のモデル動物として注目される様になってきた。各種の病気もその原因遺伝子の変異によって起こることが、最近ではヒトの病気でもかなり明らかにされてきている。そのために、対象になる遺伝子をいろいろ操作し、ヒト疾患モデル動物をつくって、新しい実験動物を作成していくという流れが生まれてきた。特に、遺伝子を組換えたマウスがどんどん作成され、ヒトの遺伝病のモデルとして研究に用いられている。これらのマウスも、やはり野性動物の時と同様に実験動物化という手順を踏んでヒト疾患モデルとして確立する必要がある。

実験用マウス

現在、ヒト疾患モデル動物としてのマウスの役割は大きいものである。これらは自然発生ミュータントと人為的ミュータントの二つのグループに分けることができる。例えば、図4に示したように、アルビノと呼ばれる白子動物は古くから知られており、自然界でも発見できる。また、ヌードマウスと呼ばれる体に毛の生えないマウスは、免疫系のT細胞をつくる胸腺という組織がない動物である。いまから20年以上前、日本に導入されて以来、その特性についての研究がなされた。現在、このマウスは、ヒトの癌細胞を移植しても拒絶されないで、ヒトの癌を移植されたヌードマウスを抗癌剤のテストに用いるようになった。今までは、これらのマウスの様に自然に発生してきた自然ミュータント動物を用いて関連遺伝子の探索とか病因の研究がなされてきた。一方、遺伝子の塩基配列や染色体上の位置などが既に分かっている遺伝子の生体に於ける機能を知るためには、個体レベルでの研究をしなければならない。人為的ミュータントとは、遺伝子を改変してその遺伝子だけ発現させない様にした動物（遺伝子ノックアウト動物）、もしくは遺伝子を外から導入して、個体内でどの様に機能するかを観察するため作成された動物（トランスジェニック動物）などのことを言う。また、X線や他の放射線を当てて、突然変異を誘導してつくられたマウスは、人為的ミュータントの範疇に入る。このようにして現

在までに多くの遺伝子組換え動物が作成されてきた。

発生工学技術

未受精卵に精子が受精すると卵は一つの受精卵となり、これが2細胞、4細胞、8細胞と分裂してその細胞数を増やしていきコンパクション（細胞一つ一つが識別できない様に纏まった塊になる現象）によって桑実胚となり、その後、将来胎児となる内部細胞塊と栄養芽細胞からなる胚盤胞期胚へと発生していく（図5と6）。ここで面白いのは、われわれ哺乳類の胚は、トリの卵と違って殻を持たないが、表面には厚い透明帯という殻の様な構造体を持っており、母体中で、この殻から出て子宮壁に着床する。透明帯は精子と卵子が受精をする際、より強い精子を選択する障壁となっている。しかし、胚はこの透明帯からハッチ（ヒヨコが卵から生まれること）できないと、母体に着床できない（図7）。

家畜の品種改良、ヒトの不妊治療や遺伝子機能の研究のために、ここ20数年の間、実験動物を用いた多くの技術が開発されてきた。そのひとつの技術は、卵子や精子または受精卵を体外に取り出して、人為的に操作するという発生工学技術である。もうひとつは、遺伝子の構造を自由に組換え操作する技術で遺伝子工学という。こういった二つの技術の進歩に伴って、組換え動物を作成することが可能になってきた（図8）。

発生工学的手法では、四細胞期胚、または八細胞期胚を二つ以上集合させて、一つの胚にして発達させたり（集合キメラ）、顕微鏡下で、胚盤胞に胚性未分化幹細胞を注入（注入キメラ）してキメラマウスを作成する技術の他、精子の顕微受精や体外受精などの技術がある。また、受精卵の雄性前核にDNAを注入して作成するトランスジェニック作成技術も発生工学技術の一つである（図9）。

ここでキメラマウスについて紹介する。キメラというのは、スフィンクスの様に、上半身が人間で、背中にトリの羽を持ち、下半身はライオンである生きもののことで、遺伝的に独立した2つ以上の細胞によって、ひとつの個体を形成している生物のことである。

図10にあるキメラマウスは、ヌードマウスの胚と、毛のあるマウスの胚を二つ集合させて作成したものである。発育中に個々のマウス由来の細胞は、お互いに細胞分化や増殖の制御をうけて一匹のマウスとして誕生するので、キメラマウスの表現型には、特に一定の法則は観察できない。したがって同じ組み合わせのキメラマウスでも毛のないマウス由来細胞が主体になったものや、毛のあるマウスが主体になったものが出現してくる（図10）。

集合キメラマウスの作成手順は、以下の様にする（図11）。

- 1) 妊娠3日目のマウスの卵管から受精卵を洗い出してくる。
- 2) これらの受精卵は透明帯という膜に包まれているので、これを酵素などで消化して取り除く。酵素消化は膜が完全に溶ける前まで行わずに、この様に薄くなった状態で停止した後、ガラス管を延ばして作った細いピペットで吸ったり吐いたりしてこの薄くなった透明体を取り除く。
- 3) 片方の胚をレクチンという接着物質で処理した後、未処理の受精卵と互いに接着させる。そうすると、二つの胚はお互い一つであると認識して集合して一つの細胞塊となる。
- 4) これを偽妊娠雌の子宮に移植する。妊娠が成立すると、キメラマウスが産まれてくる。

キメラマウスは、細胞間相互作用による遺伝子発現調節機構の研究に用いられている他、胚性未分化幹細胞を用いたノックアウトマウスの作成の過程においても作成されている。例えば、遺伝子の異常をもつ突然変異マウスがいて、その原因遺伝子の発現調節が細胞自律的であるか、環境依存的に調節されているのかを研究する際、この突然変異マウス胚と正常マウス胚よりキメラマウスを作成する。突然変異遺伝子は発育中のどこかの段階で機能するので、キメラ個体が、正常であれば、変異遺伝子は環境依存的発現調節を受けており、異常を示せば、細胞自律的調整を受けていると判断できる。

実際に、キメラ個体を構成する細胞を特殊な方法で識別してみると、図12に示したように、黒く染色された細胞と染まらないものとで構成されていることが分かる。これをキメリズムと言い、心臓でも小腸でも、由来の異なった細胞が混ざって組織を形成していることを観察することができる。

次に発生工学技術のなかで特に有名なマイクロマニピュレーション法について説明する。この技術は要するに顕微鏡下で受精卵を操作するための技術のことである。図13の写真の人はいま顕微鏡の下に受精卵等を置いて操作をしているところである。用いている装置をマニピュレーターと呼んでいる。図14の左の上下の写真はDNA注入の様子を示している。受精卵に観察できる大きい雄性前核を目指して針を刺して、DNAを注入すると、下の写真で分かる様に核が大きく膨らむ。DNAの入った液を注入しますのでこの様に膨らむのである。この後、この胚を偽妊娠雌の卵管へ移植する。誕生したマウス個体のうち、導入した遺伝子を継承している個体がトランスジェニックマウスである。右の写真は、胚盤胞期胚に胚性未分化幹細胞を注入しているところである。

次に胚性未分化幹細胞について説明する。個体というのは、胚盤胞期胚の内部細胞塊の細胞が分化し形成された組織によって構成されている。胚盤胞期胚(図15A)をハッチさせた後(図15B)、培養すると、表面の栄養芽細胞が培養皿に接着する(図15C)。内部細胞塊は、伸びてくっついた細胞の上に、コロニーと呼ばれる細胞の集団として成長していく。この中央の細胞塊を酵素に

よって剥がして、フィーダー細胞と呼ばれる支持細胞上で共培養すると、一つの細胞からまた新しいコロニーが何個も出現してくる（図15D）。このコロニーを再び酵素によって剥がしてフィーダー細胞上で培養し、コロニーを形成させる。この操作を10回くらい繰り返した後、出来てきた細胞集団を、胚性未分化幹細胞と呼んでいる。この細胞は、一つの受精卵から由来しているので、個々の細胞のもつ遺伝情報は皆同じである。仮に、この細胞が100万個とれば、1個のマウスの胚から100万匹のマウスを作成することが可能となる理屈である。それでは、なぜこの細胞が有用なのか？それは、この細胞を用いることによって安定した遺伝子操作が可能となったからである。また、100万匹の動物を飼育維持することは、飼育場所、飼育者などを初め膨大なお金が必要となり、考えただけでも気の遠くなるような話であるが、細胞となれば話は別で、100万匹の個体を作成できる数のマウスの細胞を、たった2CC程のアンプルに入れて、-190℃の液体窒素の中に保存していくことも可能になるので保存が簡便にできるのである。また、培養細胞を用いれば遺伝子の導入などの操作が簡便化するばかりか、効率の良い遺伝子操作が可能となる。

胚性未分化幹細胞を用いた動物作成手順を、図16にまとめた。左上の2枚の写真は、胚性未分化幹細胞である。左側は普通の顕微鏡の像で、右側は、この細胞だけを認識できる抗体で識別をすることによって、このコロニーの形態を示してある免疫組織化学の組織像である。胚性未分化幹細胞だけが染色され、フィーダーになっている支持細胞は染まっていないことが分かる。この細胞を酵素消化後、一つ一つバラバラの細胞にして、そのうち数個ピペットで吸って、胚盤胞期胚の中に注入した後、免疫染色で胚性未分化幹細胞を染め出してみると内部細胞塊に移動していることがわかる。胚性未分化幹細胞を注入された胚盤胞期胚を仮親に移植後、産まれてくるのはキメラマウスである。この場合、胚性未分化幹細胞は茶色のマウス由来なので、白いマウスと交配すると、生まれてくる子供が茶色であったことから、注入した胚性未分化幹細胞が個体になったことが分かる。この胚性未分化幹細胞に遺伝子操作をすれば、ノックアウトマウスやトランスジェニックマウスの作成が可能となるのである。

今まで述べたことを以下にまとめる（図17）。

初めに、細胞間相互作用の研究実験・解析系として、キメラマウスを紹介した。

2番目は、導入遺伝子の生理機能とか発現調節機構研究のためのトランスジェニックマウスについて紹介した。

3番目としては、特に胚性未分化幹細胞について紹介した。この細胞は、培養した胚性未分化幹細胞に遺伝子を導入して、特定遺伝子だけを破壊し発現しなくさせてしまう、遺伝子欠損動物作成に良く用いられる。最近では、このような技術を用いて、アルツハイマー病、ハンチントン舞蹈病、パーキンソンな

どの神経異常に関連した遺伝子を導入したマウスが作成され、人間の病気を解明するためのモデル動物が開発されている。

次にこれらの技術を用いて作成したテネイシン欠損マウスを用いた動物実験について述べる。

テネイシンとは？

テネイシンは、癌胎児性にその発現調節を受けている細胞外マトリックス糖蛋白である。N末端から順に、中心塊、コイルドコイル構造、EGF様反復配列、フィブロネクチンタイプIII様反復配列およびC末端のフィブリノーゲン様構造よりなる分子が、中心塊とコイルドコイル構造によってN末付近で3本より合わされ、更にこれらの2つがジスルフィド結合によって結合して、6量体となった特異的な分子形態を持つ分子である（図18）。この分子の作用としては、細胞の接着および反接着、フィブロネクチンによる細胞接着の特異的な阻害、細胞増殖、分化、細胞移動の促進、他の細胞外マトリックスや成長因子などとの結合および免疫抑制などが知られている。個体レベルでの機能は、創傷治癒、組織発生や発癌における役割が注目されていたが、Sagaら（1）による遺伝子ノックアウトマウス作成によって本遺伝子が欠損したマウスは正常に発育して何も異常が観察されなかったことが報告された。それ以後、上述の機能に関する研究は暗礁に乗り上げたのである。

遺伝子欠損動物における表現型について

現在、世界中の多くの研究者は、個体レベルでの遺伝子機能の研究のために、遺伝子を欠損した動物を作成してその機能を解析しようと試みている。しかし、テネイシン欠損マウスの様に何らの変化も示さないマウスも多く多くの問題が山積していることから目を背けることはできない。その原因として、1）本来は該当遺伝子の機能は必要がないものであった。2）他のファミリー分子が欠損遺伝子に代わって機能している。3）遺伝子機能が用いたマウスの遺伝背景による影響をうけて、欠損による形質変化が表面化していない（図21）などの推測がなされてきた。

我々はテネイシン欠損マウスが何ら異常を示さなかった原因として、これらの状況のうち、1）の考えは、他の研究状況から判断して、当然受け入れられるものではないので、2）の他のファミリー分子の発現を解析したところ、分かっている範囲では（他にテネイシン-R、テネイシン-Xが知られている）ファミリー分子の発現に特段の影響を観察できなかった（2）。最終的に、テネイシン欠損動物は雑種であるため、遺伝子欠損の影響が遺伝背景に依ると考

え、テネイシン欠損マウスの遺伝背景を安定させ、適切な動物実験を実行できるようコンジェニック系統の作成を行った。その結果として、テネイシン欠損マウスでは、ハプテンによる皮膚炎誘導実験、抗一糸球体基底膜抗体による腎炎誘導実験、癌細胞の浸潤転移実験などにおいて、テネイシン欠損環境は、創傷治癒過程において不十分であることを見い出した（3～5）。更に、テネイシン欠損マウスのなかに行動異常動物を発見して解析したところ、神経伝達物質であるセロトニンやドーパミンの代謝に異常がありこの異常がテネイシン欠損環境に依存したものであることを見い出した（6～8）。

実験的糸球体腎炎モデルによるテネイシン機能の解析

図23に示した、病理組織像は、人の半月体系球体腎炎のテネイシンの免疫組織像である。半月体を形成し殆ど構造を失った糸球体周囲にテネイシンが沈着している。これらの所見から糸球体腎炎におけるテネイシンの機能を研究すべく、ハプ毒によって糸球体メサンギウム細胞を侵襲して糸球体機能を壊し、その後の創傷治癒過程におけるテネイシン機能を解析することとした。図24は、糸球体の組織構造を示している。ターゲットとなっているメサンギウム細胞は、糸球体毛細血管を内側から繋ぎ止め、糸球体構造の維持と、老廃物の清掃に関わっていると考えられている細胞である。

この実験系では、正常マウスは、糸球体腎炎を誘導された後、一ヵ月で組織は修復して、死亡するマウスはないが、テネイシン欠損マウスでは、処置後2ヵ月目ぐらいから、死亡する個体が増加して、4ヵ月目では全てが死亡した。この原因として考えられるのは、糸球体に誘導された創傷の治癒がテネイシンなしでは治癒しないからであると考えられた。図25に示したように、血中尿酸値や尿蛋白値は欠損群では正常値に戻らず、マウスが腎機能障害によって死亡したと推測できた。また、同一実験を行う際に最も注意したことは、マウスの系統つまり遺伝背景を考慮する必要があることである。図26に示したグラフは、正常と欠損群の各コンジェニックマウス間の蛋白尿の推移を比較したものであるが、明らかに系統差が観察できる。ここでは、最も反応が顕著に観察できたGRS/A系統を用いた。

病理組織学的な解析を行うと、本誘導実験系では、正常マウス群は障害された糸球体は時間経過に伴って修復している（図27）が、欠損群では経時的に糸球体は線維化が進み糸球体の構造が消失していることがわかる（図28）。この原因として考えられるのは、糸球体が障害されたのちにおこるメサンギウム細胞の増殖の違いである。両群の糸球体におけるメサンギウム細胞の増殖を計測すると図29に示したように、欠損群は、正常群と比べて有意に増殖抑制されていることが観察できた。そこで我々は、双方のマウスの糸球体から、メサンギウム細胞培養細胞株を樹立して、培養細胞を用いて、テネイシンの機能

を解析した。

メサングウム細胞株の増殖におけるテネインの作用

図30のグラフはそれぞれのメサングウム細胞の増殖を示している。白丸（テネインコート上培養）と白四角（プラスチック上培養）は正常由来細胞で、黒丸（テネインコート上培養）と黒四角（プラスチック上培養）を示している。欠損細胞はテネインコート上で培養すると正常細胞と同等な増殖を示すが、正常細胞は、テネインの存在の有無に関わらず増殖していることが分かる。一方、欠損細胞をテネインコート上で培養しこれに抗テネイン抗体を添加するとプラスチック上で培養したものと同様な増殖しかできないことが示された（図31）。同様に、正常由来細胞培養中に抗テネイン抗体を添加するとテネイン機能の阻害によって細胞増殖は抑制された（図32）。

以上、動物実験およびそれから派生してきた培養実験系による解析の結果、テネインは創傷治癒過程におけるメサングウム細胞の増殖に不可欠な分子であることが判明した。この分子は、細胞外シグナル伝達物質として何かしらの機能を果たしていることが推測された（3）。

おわりに

本小文で紹介した個体レベルでの遺伝子機能解析技術において、今後我々が最も注意しなければいけないことは、使用するマウスの遺伝背景を適宜選択することである。また、これらの遺伝子組換え動物はヒト疾患モデルとして、新薬の開発にもその活用を広めていく必要があるため、単に動物を作成して、目に見える表現型の変化にのみ注目するのではなく、動物個体として、動物実験に用いることのできるモデル動物として作り上げていくことが必要である。我々の研究対象であるテネイン欠損マウスは、正常状態では、何らの表現型の異常を観察できなかったが、疾患モデルとしてこのマウスの活路を見い出そうとしたとき、コンジェニックマウスの作成によって行った遺伝背景の安定化はその後の研究に重要な条件であった。その努力の結果として現在、テネイン機能は個体レベルで解析できるようになったと思う。しかし、マウスの遺伝背景を安定させるためには長い年月が必要であり、これらの作業は地味でなかなか大変なことであるが、我々は今後とも、その必要性を信じて作業を継続し、研究を推進していくつもりである。

参考文献

- 1) Saga, Y., Yagi, T., Ikawa, Y., Sakakura, T., and Aizawa, S., Mice develop normally without tenascin. *Genes & Develop.*, 6:1821-1831, 1992
- 2) Steindler, D.A., Settles, D., Erickson, H.P., Laywell, E.D., Yoshiki, A., Faissner, A., and Kusakabe, M., Tenascin knockout mice: Barrels, boundary molecules, and glial scars. *J. Neuroscience*, 15:1971-1983, 1995
- 3) Nakao, N., Hiraiwa, N., Yoshiki, A., Ike, F., and Kusakabe, M., Tenascin-C promotes healing of Habu-Snake Venom-induced glomerulonephritis. Studies in knockout congenic mice and in culture., *Am. J. Pathol.*, 152(5):1237-1245, 1998
- 4) 日下部守昭、平岩典子、坂倉照好、"乳癌の増殖と転移におけるテネイシンの役割：テネイシン欠損マウスを用いて"、*乳癌基礎研究*、5:41-45, 1996
- 5) Koyama Y-I., Kusubata, M., Yoshiki, A., Hiraiwa, N., Ohashi, T., Irie, S., and Kusakabe, M., Effect of tenascin-C deficiency on chemically induced dermatitis in the mouse., *J. Inv. Derm.*, in press, 1998
- 6) Fukamauch, F., Mataga, N., Wang, Y., Sato, S., Yoshiki, A., and Kusakabe, M., Abnormal Behavior and Neurotransmissions of Tenascin Gene Knockout Mouse, *BBRC*, 221:151-156, 1996,
- 7) Fukamauch, F., Mataga, N., Wang, Y., Sato, S., Yoshiki, A., and Kusakabe, M., Tyrosin hydroxylase activity and its mRNA level in dopaminergic neurons of tenascin gene knockout mouse. *BBRC*, 231:356-359, 1997
- 8) Fukamauchi, F., Wang, Y-J., Mataga, N., and Kusakabe, M., Paradoxical behavioral response to apomorphine in tenascin-gene knockout mouse. *Euro. J. Pharmacol.*, *Eur. J. Pharm.* 338:7-10, 1997

図1

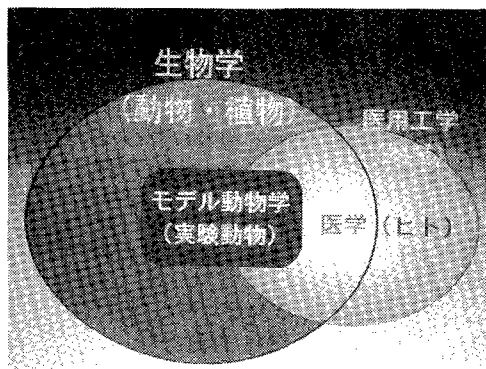


図2

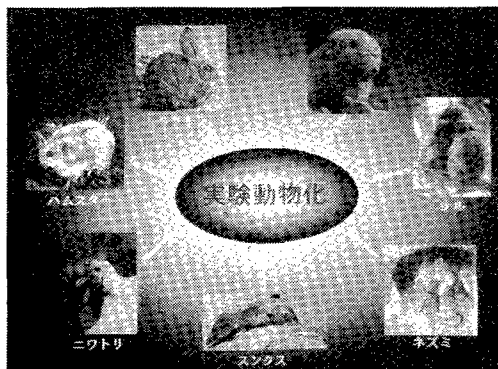


図3

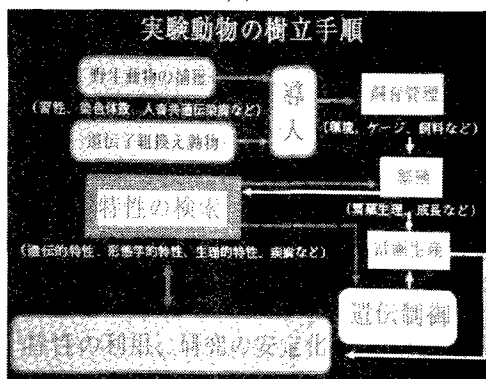


図4



図5

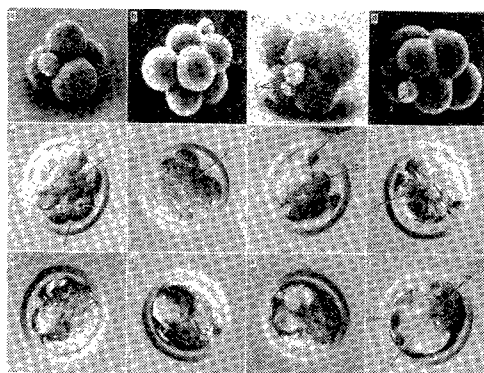


図6

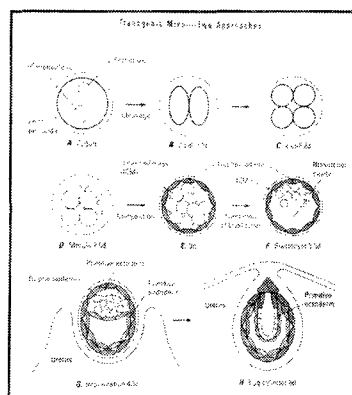


図7

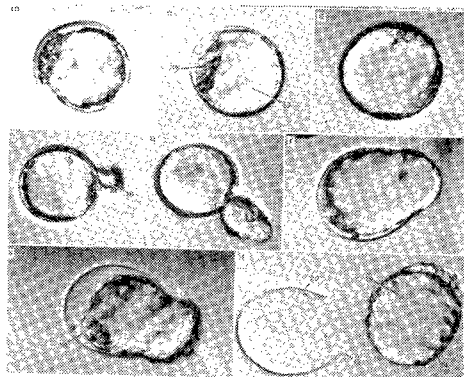


図8

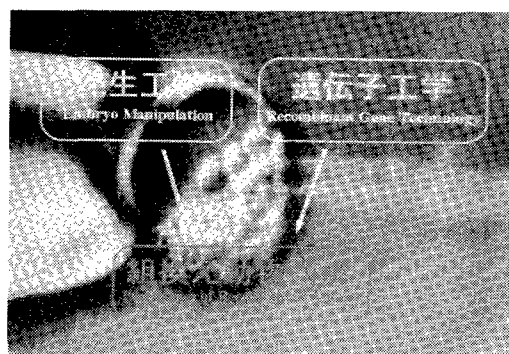


図9

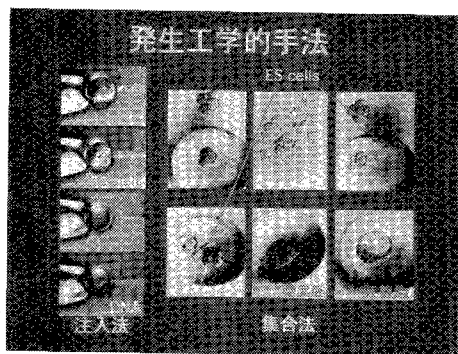


図10



図11

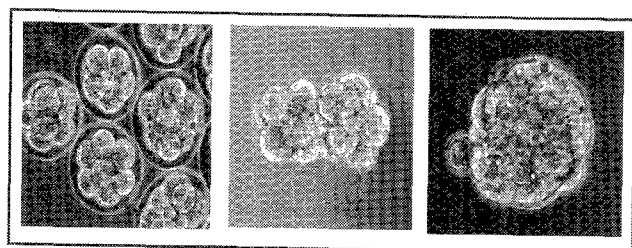


図12

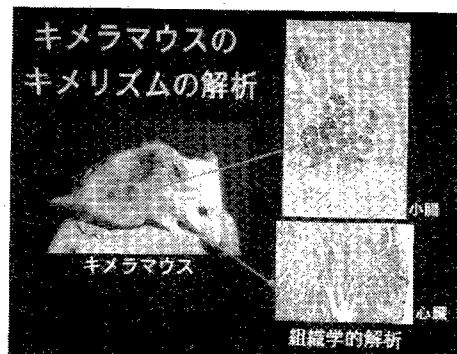


図13

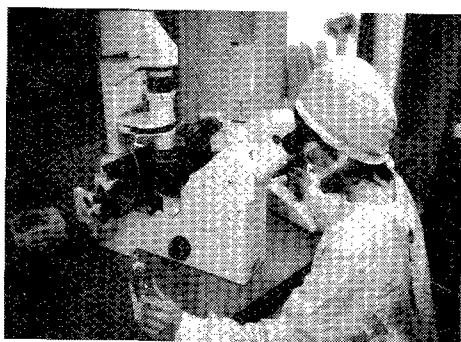


図14

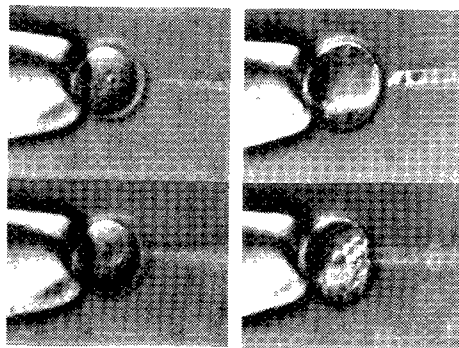


図15

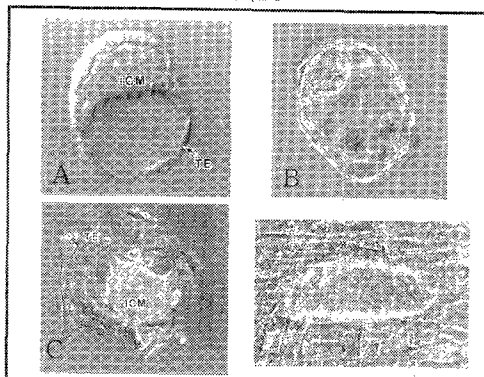


図16

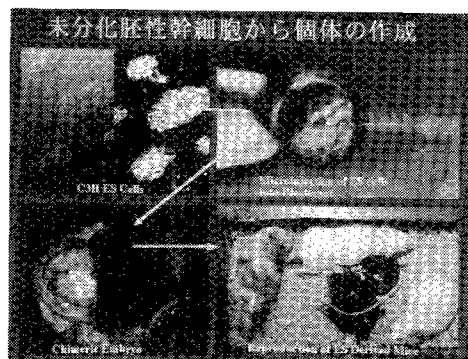


図17

遺伝子機能の個体レベルでの 実験・解析系の確立

1) キメラマウス

細胞間相互作用、細胞の表現型と細胞環境の解析
細胞の系統由来の識別
CD系特異的抗原 (CSA)-hsc74

2) トランスジェニックマウス

導入遺伝子の生理機能、発現調節機構の解析

3) 遺伝子ノックアウトマウス

遺伝子欠損による影響解析

図19

POSSIBLE FUNCTIONS OF TENASCIN

Cellular level:

Cell-adhesion/cell-anti-adhesion
Inhibition of adhesion mediated by Fibronectin
Cell-proliferation/cell-differentiation
Cell-migration
Binding to ECM, Cytokines, and Heparin
Immunosuppression

Tissue or whole body level:

Wound healing
Embryogenesis
Oncogenesis

図21

図18



図20

Design of targeting vector for the homologous recombination of the tenascin gene

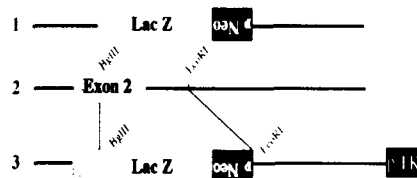


図22

Gene disruption

Abnormal phenotype
Dysfunction

? Redundancy ?
Replacement of related genes ?
? Influences of genetic background of host mouse strain ?

図23

Tenascin deficient mouse

Tenascin deficient mice develop normally.

- 1) Dermatitis against hapten
- 2) Glomerulonephritis induced by anti-glomerular basement membrane antibody injection.
- 3) Hyperlocomotion due to deficiency of neurotransmitter metabolism.
- 4) Lack of support in cancer cell growth in vivo.

図24

TENASCIN EXPRESSION IN GLOMERULONEPHRITIS



Crescents
Proliferating endocapillary tufts
Pericapsular interstitium
Walls of vessels

renal corpuscle

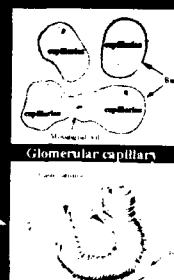
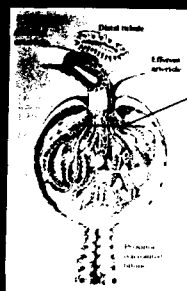


図25

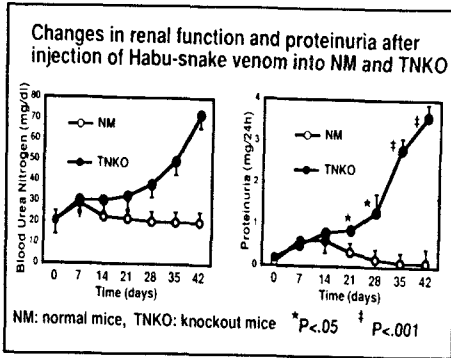


図27

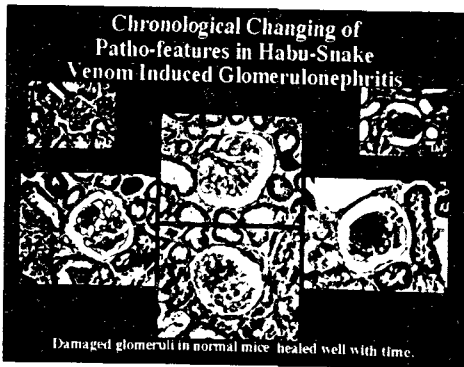


図29

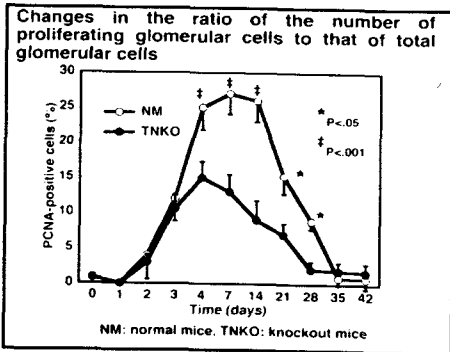


図31

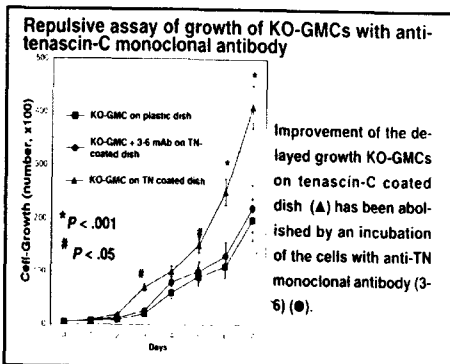


図26

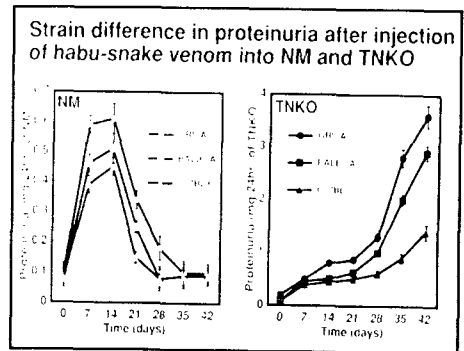


図28

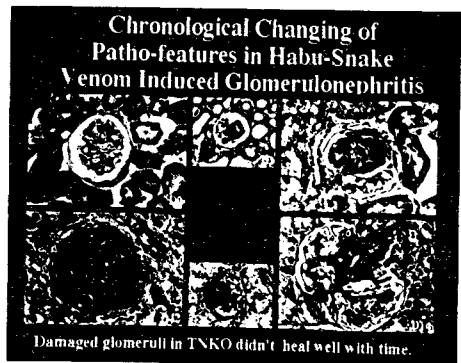


図30

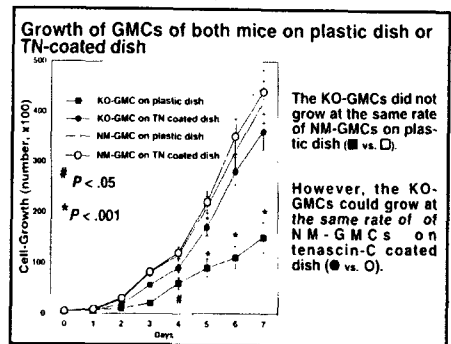
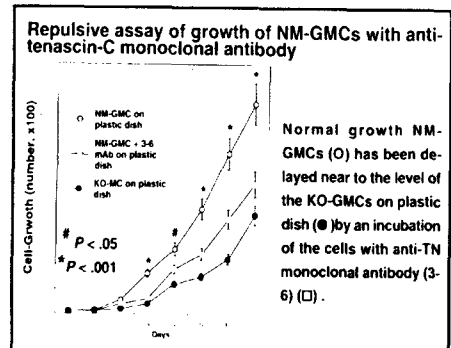


図32



医薬品開発過程における薬物体内動態予測：実験動物からヒトへ、試験管から個体へ

杉山雄一¹⁾、伊藤清美²⁾

¹⁾東京大学大学院薬学系研究科、²⁾北里大学薬学部

(はじめに) ¹⁻³⁾

ヒトにおける薬物動態、代謝試験の意義が、最終的には効果的で副作用の少ない薬物治療を行うためのものであることを考えると、ヒトにおけるファーマコキネティクス(PK)、トキシコキネティクス(TK)試験の結果は、さらに”薬物血中濃度推移と薬効、副作用との関係”に関する試験結果と統合されることによってはじめて臨床における薬効、副作用を推測するための有意義な情報となり得る。これは、作用(薬効、副作用)に直接関係するものは標的組織における薬物濃度推移であるものの、測定が困難であるため、それに代用できるものとして(非結合型)血中濃度推移を用いるという考え方に由来している。

これまで、医学、薬学の分野においては、個体レベルでの現象の本質(機構)を理解するために、臓器、細胞、蛋白、遺伝子レベルへと遡る解析的な研究が推進され大いなる成果をあげてきた。しかしながら、こうして解明された分子レベルでの機構をもとに、個体レベルでの現象を定量的に再構築することを可能にするような方法論が開発されないかぎり、“効果と安全性の予測と制御”という目的を果たすことはできない。医薬品が投与されて最終的に薬効を発揮するまでの諸過程は、生理解剖学的パラメータと、血中、組織中の蛋白への結合性、生体膜透過性、輸送キャリアーおよび代謝酵素と薬物の相互作用、薬効および副作用に関わる受容体への結合などを表す生化学的パラメータにより表現することが可能である。従って、これらパラメータを適切な数学モデルに組み込むことにより、“薬の投与量、投与経路”、“投与される患者の病態”という入力情報から、“薬効および副作用の発現”という出力を予測することを試みており、既にいくつかの成功例を得ており、後述する。

近年、医薬品の開発過程が大きく変動しようとしている。すなわち、リード化合物創製のためのcombinatorial chemistry(CC)の発展により数多くの化合物を短時間で作り、ヒトにおける薬理活性のみならず薬物動態学的特性の優れた化合物を開発初期のスクリーニング段階でピックアップしようというhighthroughput screening(HTS)の動きが欧米の製薬企業を中心に高まってきている。これまで、国の内外をとわず、in vitroの薬効の強さ(例えば受容体、酵素などに対するIC₅₀、Ki値など)のみを指標に医薬品の開発をすすめていった場合、それらの薬物動態的特性の悪さ(バイオアベイラビリティの低さ、薬物相互作用の受けやすさ、個人差の大きさ、病態の程度による変動の大きさなど)のために開発が中止になることが続出している。こうした経験を通して、また、以下に示すような近年のテクノロジーの発展とあいまって、開発の早い段階で薬物動態特性の至適化の必要性が唱えられ始めている。すなわち、(1)分子生物学、細胞生物学の発展により、ヒト組織、オルガネラのみならず、ヒト

型酵素、トランスポーターを発現させた細胞の利用性が高まった、(2)LC/MS/MSなどのように感度の高い、分離能の高い分析法が開発されたことにより低血中濃度の測定が可能となった、ことなどをあげることができる。

このような理由により、数多くの化合物を短時間で作り、薬理活性のみならず薬物動態学的特性の優れた化合物を開発初期のスクリーニング段階でピックアップしようという動きが欧米の製薬企業を中心に高まってきている。以上の背景のものとで、医薬品開発において、ヒトにおける薬物動態を外挿・予測する重要性が理解されるであろう。以下に述べる種々の方法論に基づくヒト外挿において、この20年ほどの間に発展してきた生理学的薬物速度論(PBPK model)の果たした役割は大きい。我々の研究室での成果を中心に、どのような動態スクリーニング系を確立すべきか、今後の医薬品開発のあり方について考えてみたい。ヒトにおける動態予測が重要と思われる対象を挙げると以下ようになる。個々について、順次記述する。

[1] 消化管吸収性の予測⁴⁻⁶⁾

ある程度のバイオアベイラビリティ(BA)の大きさを確保することは必要である。特に治療ウインドーの狭い医薬品においてBAが低くなると消化管吸収性の個人差のため血中濃度の個人差が大きくなり避けるべきである。比較的初期の開発段階で用いられる消化管吸収性の予測法として、ヒト大腸癌由来のCaco-2細胞を用いる方法がある。この細胞を用いて評価した消化管上皮細胞透過性を基にin vivoにおける吸収性を予測した例が数多く報告されている。受動輸送により吸収される化合物については、本方法論による予測性は高いものと考えているが、問題は近年その存在が明らかになってきた輸送担体(トランスポーター)介在性能動輸送の存在する場合である。Caco-2細胞では幾つかのトランスポーターの発現が低下(ダウンレギュレーション)していることが知られており、担体輸送をうける基質の吸収性の評価には適しているとはいえない。また、近年、消化管における薬物吸収性を低下させる要因として、代謝酵素であるCYP3A4とP-糖蛋白が注目されている。Caco-2細胞にはP-糖蛋白の発現は知られているが、CYP3A4の発現量は極めて低い。さらに最近では、我々の研究室でMRPファミリーに所属する輸送担体がアニオン性化合物の排出に関わることおよびこれら輸送担体がCaco-2細胞に発現していることを明らかにしてきた。今後、代謝酵素CYP3A4および種々の薬物トランスポーターをCaco-2細胞に発現させた安定トランスフェクタントの開発が強く望まれる。しかしながら、こうした技術発展が完遂するまで、ただ待っているわけにはいかない。大胆に言えば、私は、開発初期の段階での評価においては通常のCaco-2細胞を用いれば良いと考えている。それは、この方法で吸収性が良いと判定された化合物はin vivoでも吸収性が良いと考えているからである。上述のように本法の現段階での問題点はトランスポーターのダウンレギュレーションであるが、そのことは、"Caco-2の系で吸収性が悪いと判断された化合物の中にも、in vivoでは輸送担体によって良く吸収されるものも存在する"ということにつながってくる。すなわち、フォールスネガティブな予測の可能性はあるが、フォー

ルスポジティブな予測を与えることは極めて低いと考えられるからである。従って、in vitroで薬効を有することのわかっている数多くの化合物の中から、吸収性の良い化合物を選択する初期の過程には十分に使えるものと考えている。

[2] 生理学的ファーマコキネティックスの考え方に基づく分布、代謝、排泄の予測
1-2, 7-14)

薬物の体内動態を支配する重要なパラメータであるクリアランス (CL) と分布容積 (Vd) は幾つかの生理学的な要因と生化学的な要因によって決定されている。生化学的な要因を様々な実験動物で測定し、それらの値の体重や体表面積とのアロメトリックな関係を用いてヒトでの体内動態を予測する、いわゆる相関論に基づく animal scale-upの手法は古くから用いられ、多くの成功例が知られている。一方、適切な実験によりこれら生化学的要因をin vitro試験管レベルで測定し、組織レベル、さらには個体レベルの体内動態を構築するアプローチは、生理的・病態的な生体側の変動や他の薬物の共存などの外的要因が、目的とする薬剤の体内動態へおよぼす影響を予測することを可能にする。

薬効、副作用の重要なindexである血中濃度下面積 (AUC)、定常状態血中濃度 (Css) を支配する重要なパラメータ、全身クリアランスは主として肝代謝クリアランスと腎排泄クリアランスにより構成される。腎での薬物排泄クリアランスは各種実験動物での値を基に animal scale-upの手法でヒトでの値を予測する試みが成果を上げている。しかし肝代謝クリアランスは種差の大きいことが知られており、animal scale-up手法の適用には限度がある。このような場合でも、in vitroでの代謝データ、生体膜透過に関するデータ、蛋白結合性のデータが正確に得られ、それらを生理解剖学的パラメータと統合するならば、in vivoでの薬物動態をある程度正確に予測することが可能になってきた。

(2-1) アニマルスケールアップ

CL, Vdなどのパラメータは、血中蛋白結合性や臓器血流速度などで補正することにより、素過程を表すパラメータ (例えば、固有クリアランス (CL_{int}) や非結合型薬物に対する分布容積 (V_{du})) に変換することができる。V_{du}については多くの薬物で種差が小さいことが調べられており、“動物からヒト”への予測を行う際の基盤となっている。この事は、血中蛋白結合に比べて組織結合の種特異性は小さく、単純に脂溶性などの物理化学的要因に支配されることが多いためと考察される。しかしながら、能動輸送により組織内に取り込まれる多くの薬物が最近明かにされており、このような化合物に対してもこの考え方が成立するかどうかについて今後の検討が必要である。また、クリアランスについても、臓器血流速度、血中蛋白結合性の補正を行い固有クリアランス (CL_{int}) に変換した後に、次式に示されるアロメトリック式を適用し予測する方法論が一般的に用いられる。

$$\text{固有クリアランス (CL}_{\text{int}}) = \text{比例定数} \times (\text{体重})^B$$

ここで、指数値 (B) は通常 1 より小さい値をとる。このことは、CLint が体重に比例して増大せず、体重あたりのクリアランスは大動物ほど低いことを意味している。実際、腎クリアランスについては、このアロメトリック式が驚くほどよく成立することが知られており、腎排泄の機構 (糸球体濾過、分泌、再吸収) のいかんによらず、指数値 (B) として 0.6-0.8 程度の値が得られている。それに比べ肝代謝能力については予測確率が低い。アロメトリック式の適用が基本的には補外法であることを考慮すると、補外法が適用できないという例外の存在を否定できない。従って肝代謝の予測については、次に示すより科学的な根拠に基づいた *in vitro*/*in vivo* スケーリングの方法論を適用することが望ましい。

(2-2) *In vitro* (細胞、オルガネラ) での代謝データから *in vivo* での代謝クリアランスの予測

In vivo の肝臓における本質的な薬物の代謝能力を表すパラメータ (肝固有クリアランス: CLint) を予測することを目的として *in vitro* での代謝反応速度を測定する場合、できるだけ生理的な条件に近い実験設定をすることが必要である。

肝臓での薬物除去が代謝反応によるものである場合、肝クリアランス (CL_H) は肝固有クリアランス (CLint)、肝血流量 (Q_H) および血中蛋白結合率 (f_B)、生体膜透過性などによって支配される。肝抽出率 (E_H)、肝アベイラビリティ (F_H) を予測するためには適切な数学モデルを使うことが必要である。我々のラット、ヒトを用いた解析によると、dispersion model を用いることにより、*in vitro* 系 (microsome を用いた実験) から *in vivo* での肝代謝クリアランスを予測できることが明らかにされている。

我々は P450 が関与する 32 種の代謝反応について、主にヒト肝ミクロソームを用いた代謝試験の文献情報を基に、*in vitro* の CLint を算出した。一方、当該薬物の体内動態に関する文献情報から、dispersion model にしたがって *in vivo* の CLint を算出し、両者を比較した (図 1)。*In vivo* の親化合物の血中消失、尿中排泄、代謝物の尿中 recovery より CLint を算出するに当たっては、肝外での代謝は生じないという仮定および、肝臓への分布は瞬時平衡、受動輸送によるという仮定のもとに行った。両者の比が 3 倍以内のものが約 50%、また 5 倍以内のものが約 70% を示すという程度の一致性が得られた。不一致の要因としては、代謝の個体差のほか、小腸など肝臓以外の臓器における代謝の寄与、膜透過性が低いことによる *in vivo* の CLint の過小評価、肝細胞への influx あるいは肝細胞からの efflux に能動輸送が関与していることによる *in vivo* の CLint の過大評価あるいは過小評価などが考えられる。また、痴呆症状改善薬として開発中の YM796 について、ラット、イヌ、およびヒトの肝ミクロソームを用いて代謝試験を行い、初回通過代謝の非線形性を考慮した解析により経口投与後の AUC およびバイオアベイラビリティを予測した結果、代謝が非線形の場合にも実測値とほぼ一致する結果が得られた (図 2)。

しかしながら、ヒト肝という限られたサンプルを用いて、厳密な実験条件を探ることが困難なことも多々あることを考えると、上記のような厳密に実験データをとるこ

とは多くの医薬品のスクリーニングには適さない可能性もある。そうした場合、ヒトにおけるin vivo肝代謝クリアランス既知の類似化合物（できれば2種類以上）を対照化合物として用い、同条件でin vitro代謝を測定することが望まれる。例えば、次のような方法が考えられる。

具体的な解析法：既存の類似化合物 a,b のヒトでのin vivo pharmacokineticsデータ解析から肝代謝クリアランス (CL_H) がわかっている。ヒト血液を用いて非結合型分率を測定し、数学モデル（例えば、dispersion model）に基づき肝代謝固有クリアランス (CL_{int}) に変換する。新規化合物 c の代謝速度をヒト肝（肝ミクロソーム、S9, 肝細胞）を用いて測定する。この際、化合物 a,b についても同条件で測定し、得られた代謝速度を薬物濃度で除すことによりin vitro代謝固有クリアランス ($CL_{int,vitro}$) を得る。こうして得られた代謝固有クリアランスは、肝臓の入手状況、厳密な意味での初速度の測定、in vivoに近い実験条件の確保という観点からは、絶対値を直接in vivoのそれと比較することは困難であろう。一方、化合物 a,b については、in vivoでの CL_{int} がわかっているから、そのin vitro値との比(R)をとってみる。

$$Ra = CL_{int,vivo}(a) / CL_{int,vitro}(a)$$

$$Rb = CL_{int,vivo}(b) / CL_{int,vitro}(b)$$

こうして得られるRa, Rbは、in vivoとin vitroの違いの補正ファクターである。両値が類似の値を示すことが期待されるので、その平均値をとって化合物 c の値を予測する。

$$CL_{int,vivo}(c) = 0.5 (Ra + Rb) CL_{int,vitro}(c)$$

しかる後に、再び数学モデルに基づき、in vivoでの肝代謝クリアランスや肝アベイラビリティ（肝初回通過率）を推定することができる。

[3] 薬物間相互作用の予測¹⁵⁻¹⁸⁾

薬物相互作用により体内動態が変動する原因として、以下のことを挙げることができる。(1) 薬物吸収に関する相互作用、(2) 血漿蛋白結合に関する相互作用、(3) 輸送担体による生体膜透過過程における相互作用（肝、腎への取り込み、胆汁、尿中排泄過程を含む）、(4) 代謝過程における相互作用。以下、臨床上特に問題となる(4)を中心に、ヒト肝組織を用いたin vivoでの薬物間相互作用の定量的予測がどの程度可能であるかについて述べ、また、相互作用を回避するための基本的戦略について、薬物動態学の観点から提言する。

(3-1) 血漿蛋白結合に関する相互作用

血漿蛋白結合の置換が生じる場合に置換される薬物の非結合型分率 (f_u) は上昇する。定常状態血中濃度 (C_{ss}) や、血中濃度下面積 (AUC) に与える影響を予測するためには、全身クリアランス (CL) に対する効果について考えることが必要になる。この効果については、クリアランスの大きさ、投与ルートの違いによって結果が異なることに注意する必要がある。しかしながら、クリアランスの大きさに関わらず、経口

投与後においては薬効毒性に関わる非結合型薬物濃度に関わるパラメータ ($C_{u,ss}$, AUC_u) は、血中蛋白結合阻害によってほとんど影響を受けないことが理論的に明かにされている。血漿蛋白結合の置換は何れの教科書にも書かれている良く知られた現象であるが、それが臨床上で思ったほどには問題にならないことの多いことは、このように説明される。

(3-2) 代謝過程における薬物相互作用の予測

近年、*in vitro*系の代謝阻害実験の実施の必要性が提唱されている。しかしながら、*in vitro*実験により代謝阻害が観察されたからといって、*in vivo*でも相互作用が生じるとは限らない。従って、薬物相互作用に関する“*in vitro/in vivo*補外”ができない限り、いたずらに相互作用を恐れすぎるという問題が生じることになる。薬物相互作用が*in vivo*で生じることにより全身クリアランス(CL_{tot})が低下し C_{ss} , AUC 値が上昇するかどうかは、以下の要因により決定される。(i) CL_{tot} における肝クリアランス(CL_H)の割合(f_h), (ii) CL_H において阻害の生じる代謝過程の占める割合(f_m), (iii) 酵素の存在部位における阻害剤の非結合型濃度(I_u), (iv) 阻害定数(K_i), (v) 阻害を受ける薬物の血中非結合型濃度($C_{u,ss}$), (vi) 阻害を受ける薬物の K_m 値。

f_m の概略は尿中への各代謝物の回収率から推定可能である。また、 K_i 値はヒト酵素分画(ヒト肝ミクロソームや酵素発現系)を用いた*in vitro*代謝実験により実測できる。厳密に言うとも I_u の推定は容易でないが、概略値(最大値)については、循環血中の非結合型濃度及び、投与量、消化管からの吸収速度定数の値より推定可能である。当日はこうした理論に基づいて文献値をretrospectiveに探索することにより、薬物相互作用に関する“*in vitro/in vivo*補外”の可能性について述べたいと思う。今後、予測確率を上昇させるために解明されなければならない問題として、次の事柄を挙げることができる。(1) 肝臓で阻害剤が能動輸送によって取り込まれる場合の細胞内非結合型阻害剤濃度の推定、(2) 薬物が経口投与されるときに小腸での薬物代謝の寄与率および小腸での代謝阻害率の推定。前者については、ヒト肝細胞、肝スライスなどを使用する方法論の開発が期待される。また、後者についても、ヒト小腸を用いた*in vitro*データから*in vivo*での小腸初回通過代謝を予測する方法論の開発が期待される。

上記の検討結果をふまえて開発中の新規薬物の*in vivo*において併用されることの予想される他剤による代謝阻害の可能性を予測する手順を、以下のように提言したい。この方法においては、競合阻害、非競合阻害の場合、阻害定数(K_i)を*in vitro*での代謝阻害実験より決定し、肝臓中の酵素近傍におけるフリーの阻害剤濃度(I_u)をヒトにおけるpharmacokinetics情報より推定し、その比(I_u/K_i)を基に危険性を判断するものである。一方、阻害剤の代謝物が酵素と共有結合することによるmechanism-based inhibitionの場合には、阻害剤濃度および酵素とのプレインキュベーション時間を変化させた*in vitro*試験を行い、得られた阻害パラメータと酵素のturnover rateなどを用いて、*in vivo*での相互作用を予測する。薬害事件として問題になったソリブジンと

5-FUとの相互作用について、5-FUの代謝律速酵素である dihydropyrimidine dehydrogenase (DPD) の発現系を用いた *in vitro* 代謝試験の結果から、ソリブジンの併用により DPD が失活し、それに伴って 5-FU の血中濃度が大きく上昇することが予測された (図 3)。

今後、本方法論をより予測性の良いものに改良していくことが必要であるが、現状でも、この方法論で相互作用の心配がないという判断をくだすものについては、その判断は正しいものであると考えている。今回の方法論は、”危険性を拾うことを重要と考え (言い換えれば、false negative を出さないように注意して)” 提唱したものである。薬物間相互作用に限らず、予想を行う場合には、自分がどこに中心をおいて予想を行うのかについて明瞭な意識をもって行うべきである。

併用薬による *in vivo* における代謝阻害の有無を予測する方法の提言

- 1) P-450 関与の実証 (ヒトミクロソーム、肝細胞等を用いた *in vitro* 代謝試験) :
SKF-525A や CO による阻害
- 2) P-450 isozyme の同定 (*in vitro* 代謝試験) :
ヒト P-450 発現系、抗体、特異的阻害剤を用いた阻害実験
- 3) 代謝阻害様式の確認 (*in vitro* 代謝試験) :
酵素と阻害剤とのプレインキュベーション時間依存性の検討
[Mechanism-based inhibition が示唆された場合 →
阻害パラメータに基づくシミュレーション]
- 4) 併用剤 (阻害剤) の門脈血中最大非結合型濃度 ($I_{in,max,u}$) の推定 :
併用剤の *in vivo* における pharmacokinetics 情報の検索
- 5) 肝臓における能動的取り込み能力の推定 :
(i) 実験動物 (ラット) 遊離肝細胞を用いた測定 : ラットで得られた濃縮率の 2 倍の値 (?)
(ii) ヒト肝細胞、肝スライスを用いた実測
(iii) 何も情報が無い場合 : 濃縮率として 10 倍のマージン
- 6) 阻害剤の K_i 値の実測 (ヒトミクロソーム、ヒト P-450 発現系) :
- 7) 代謝阻害の可能性の判断 :
 $I_{in,max,u}$ と K_i の比較 ($I_{in,max,u}/K_i > 0.2^*$)

* *in vivo* における限界値として、今回は 0.2 を提言しているが、本来この値は、薬の pharmacodynamics, toxicodynamics の特性によって変えるべきものである。

[4] 胆汁排泄、尿中排泄の予測 : トランスポーターの関与¹⁹⁻²²⁾

肝臓、腎臓は種々の内因性・外因性の物質を血液側から取り込み、胆汁中、尿中に排泄することにより解毒化する重要な臓器である。血液側から肝、腎細胞内への取り込みおよび細胞内から管腔側細胞膜を介した排泄過程機構に関しては、種々の実験系を用いて多くの研究がなされた結果、多くの医薬品の肝胆系への移行が担体輸送によ

ることが証明され、現在では輸送蛋白、遺伝子の同定を目指した多くの研究が世界中で展開されている(図4)。我々の研究グループでも、最近、胆管側の有機アニオン輸送担体、canalicular multispecific organic anion transporter (cMOAT) のクローニングを行い、cMOATの基質認識特異性を明らかにするとともに、一連の一次性能動輸送担体は、保存性の高いATP binding cassette (ABC) 領域を有すること、類似のトランスポーターが複数存在することなどを明らかにしている。肝、腎における輸送担体と医薬品動態の関わりが明らかになっている多くの実例がある。例えば、HMG-CoA還元酵素阻害剤であるプラバスタチン(有機アニオン性化合物)は、肝臓でのコレステロール合成阻害活性が薬効に関わっている。この薬が経口投与されると、消化管から門脈中への吸収、門脈から肝への取り込み、肝細胞内から胆汁中への排泄のいずれの過程にも能動輸送担体の関与することが明らかになっている。そのため、効率のよい腸管循環が生じており、大部分の薬物分子を薬効の標的である肝臓に留め、循環血中への出現を最小化することにより副作用の軽減に役立っている。今後はこうした輸送特性を開発段階で考慮し、よりstrategicな開発研究が望まれるところである。この他にも、肝、腎におけるトランスポーター研究が生かされる例として、肝、腎ふりわけの問題が挙げられる。例えば、抗生物質、ACE阻害剤など、使用される対象である患者の腎機能、肝機能の個人間変動が予測される場合には、それぞれ胆汁排泄、尿中排泄が主な消失経路になるように薬をデザインすると、血中濃度の個人間変動を最小限に押さえることができるであろう。

今後の課題としては、MDCK細胞などのような極性を有する細胞を用いて、血管側からの取り込みに関与する輸送担体、排泄に関与する輸送担体をそれぞれ血管側、管腔側の形質膜上に共発現させることである。こうした細胞をトランスウエル上にconfluent状態で培養し、経細胞輸送を測定することにより、血中空間から胆汁中、尿中への排泄に相当する能力を評価することが可能になると信じて研究を進めている。この場合にも、発現細胞系とin vivo系とは、トランスポーターの発現量の違い、空間的構造の違いがあり、in vitroからin vivoへの定量的予測には、数学的モデルの使用が必須となるであろう。

[5] ヒトにおける体内動態の個体差を支配する要因の解析^{1-2, 8)}

ヒトにおける体内動態の個体差(病態差も含む)は、投与量・対・作用(薬効、副作用)の関係における個体差につながるため、その支配要因を理解することは極めて重要である。個体差の原因となり得る素反応過程として、(1)投与部位から循環血中への吸収性、(2)肝代謝固有能力(代謝酵素の量、質)、(3)血中蛋白結合性、(4)腎での排泄能力(糸球体濾過能力、能動的分泌固有能力)、(5)代謝、排泄に関与する臓器での血流速度などを挙げることができる。ヒトにおけるファーマコキネティクスパラメータが得られた場合、その大きさから上記のどの要因が個体差を支配するかについてある程度の考察が可能である。その推定に基づいて限られたヒト試験データから真実を抽出することが重要となろう。例えば、薬物のクリアランスの大きさ、尿中への親化合

物の排泄率などの情報から肝での初回通過効果の大きな薬物かどうかの考察が可能である。また、クリアランスの大きさを知ることにより、血流支配か、固有クリアランス支配かを推定できるので、個体差の要因を絞ることが可能となる。また、全身クリアランスが主に腎からの排泄によるものであることを知ることにより、クレアチニン測定などによる個体差の予測も可能となる。

〔6〕 血中濃度測定だけで充分であろうか？

(6-1) 血中フリー薬物濃度の測定の必要性

これまで、PK/PDの研究領域では血中蛋白と結合していない遊離型（フリー）薬物濃度の測定の必要性を示す多くの事例が蓄積してきている。蛋白結合性に、種差、個体差の大きいことを考えると、蛋白結合性の大きい（80-90%以上の結合性を示す）薬物においては、このことは特に重要となる。

(6-2) 副作用のターゲットが消化管、肝臓にある場合

これまで血中濃度を基準にしたAUC, C_{max}, MRTがTKのパラメータとして用いられてきた。しながら、経口投与される薬で消化管、肝臓を初回通過するときその大部分が取り込まれる場合を想定すると、決して血中濃度基準のAUCが消化管、肝臓中濃度基準のAUCの良い指標とはならないことがわかる。効率良い腸肝循環の生じる場合にも同様のことが言える。このような場合には、動物実験のレベルで、投与ルート、採血部位を変える実験を組み合わせデータをとることにより、速度論モデルに基づいて、各組織中での濃度プロファイルを予測することが必要となる。

(6-3) 血中-組織への移行に閥門のある場合、能動輸送が関与する場合

血中から組織への分布が比較的速やかに生じ、かつ組織への分布の程度が血中蛋白結合性と組織高分子への比較的非特異的結合により決まってくる場合には、血中結合性の種差を補正してやれば、ヒトでの組織分布性（分布容積に反映される）を動物データから予測することは可能である。しかしながら、血液-脳閥門に代表されるように、血中と組織中の分布平衡に時間がかかる場合、あるいは最近多くの化合物で証明されているように、肝、腎、小腸などに存在する能動輸送系により薬物分布が支配される場合には、血中-臓器の間をつなぐ伝達閥数にどの程度の種差が存在するかについて、ほとんど情報がないため、ヒトにおける予測が困難であるという現状である。今後、この点についても、多くの基礎研究が蓄積されることが望まれる。

（最後に）

薬物投与から薬効発現に至るまでのプロセスをin vitroデータから予測することはファーマコキネティクスの分野に携わる者の一つの目標である。その第一のプロセスである血中濃度推移の予測や薬効発現部位における薬物濃度の予測が、比較的単純な動態を示す薬剤でやっと可能になりつつある。薬物の薬理受容体への結合性や受容体

情報の伝達の過程をin vitroのデータに基づき予測することにより、薬効や副作用の発現の時間推移をin vitroデータのみから予測するという夢が実現する時も必ずしも遠い将来ではないように思っている。

(参考文献) [総説、ブックチャプターのみ]

- (1) 「医薬品開発における薬物動態研究」、杉山雄一 編、薬業時報社 (1998)
- (2) 「ファーマコキネティクス研究の方法と技術－前臨床から臨床第1相へ－」、杉山雄一 編、日本薬物動態学会、pp. 87-108 (1993)
- (3) 杉山雄一：医薬品開発における薬物動態解析の重要性. Medchem News 8:10-12 (1998)
- (4) 「薬物バイオアベイラビリティ評価と改善の科学：より良き医薬品開発のために」、杉山雄一 編、現代医療社 (1998)
- (5) K.Ito, H.Kusuhara and Y.Sugiyama: Effects of intestinal CYP3A4 and P-glycoprotein on oral drug absorption -Theoretical approach -. Pharm. Res., in press.
- (6) 玉井郁巳、辻 彰: ペプチドトランスポーターと医薬品の消化管吸収. ファルマシア 31: 493-497 (1995)
- (7) T.Iwatsubo, N.Hirota, T.Ooie, H.Suzuki and Y.Sugiyama: Prediction of in vivo drug disposition from in vitro data based on physiological pharmacokinetics. Biopharm. Drug Dispos (review). 17: 273-310 (1996)
- (8) T.Iwatsubo, N.Hirota, T.Ooie, H.Suzuki, N.Shimada, K.Chiba, T.Ishizaki, C.E.Green, C.A.Tyson and Y.Sugiyama: Prediction of in vivo drug metabolism in the human liver from in vitro metabolism data. Pharmacol. Ther.(review) 73: 147-171 (1997)
- (9) K.Ito, T.Iwatsubo, S.Kanamitsu, Y.Nakajima and Y.Sugiyama: Quantitative prediction of in vivo drug clearance and drug interactions from in vitro data on binding, transport, and metabolism. Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol. 38: 461-499 (1998)
- (10) E.Fuse, T.Kobayashi, M.Inaba and Y.Sugiyama: Prediction of the maximal tolerated dose (MTD) and therapeutic effect of anticancer drugs in humans: Integration of pharmacokinetics with pharmacodynamics and toxicodynamics. Cancer Treatment Reviews 21: 133-157 (1995)
- (11) H.Suzuki, T.Iwatsubo and H.Suzuki: Application and prospects for physiologically-based pharmacokinetic (PB-PK) models involving pharmaceutical agents. Proceeding of International Congress of Toxicology Toxicology Letters 82/83 349-355 (1995)
- (12) Y.Sugiyama, K.Ito, M.Tsuda and I.Horii: Future prospects for toxicokinetics: its ability to predict drug adverse events in humans J. Toxicol.

Sci. 21: 511-516 (1996)

(13) 杉山雄一、大家 毅: In vitro試験管内でのデータを基にした薬物体内動態の予測. "ファーマコキネティクス研究の方法と技術" 一前臨床から臨床第1相へー 杉山雄一 編、pp.87-108、日本薬物動態学会 (1993)

(14) 杉山雄一、鈴木洋史: ファーマコキネティクス. 薬理学 (上) (廣川書店) 高折、福田 編、pp.36-82 (1996)

(15) K.Ito, T.Iwatsubo, S.Kanamitsu, K.Ueda, H.Suzuki and Y.Sugiyama: Prediction of pharmacokinetic alterations caused by drug-drug interactions: Metabolic interaction in the liver. *Pharmacol. Rev.* 50: 387-411 (1998)

(16) Y.Sugiyama, T.Iwatsubo, K.Ueda and K.Ito: Strategic proposals for avoiding toxic interactions with drugs for clinical use during development and after marketing of a new drug pharmacokinetic consideration. *J. Toxicol. Sci.* 21: 309-316 (1996)

(17) 「抗癌剤の相互作用ーこれからの抗癌剤治療戦略ー」、杉山雄一、佐々木康綱 編、医薬ジャーナル社 (1998)

(18) 杉山雄一、岩坪隆史: 薬物相互作用に伴う体内動態変動. *薬物動態* 11: 286-293 (1996)

(19) H.Suzuki, T.Terasaki and Y.Sugiyama: Role of efflux transport across the blood-brain barrier and blood-cerebrospinal fluid barrier on the disposition of xenobiotics in the central nervous system (Review Article). *Adv. Drug Deliv. Rev.* 25: 257-285 (1997)

(20) H.Suzuki, D.Nakai, T.Seita and Y.Sugiyama: Design of drug delivery system for targeting based on pharmacokinetic consideration. "Pharmacokinetics in drug delivery systems" in "Advanced Drug Delivery Reviews" ed. by Y.Sugiyama, pp.335-357, Elsevier, 1996

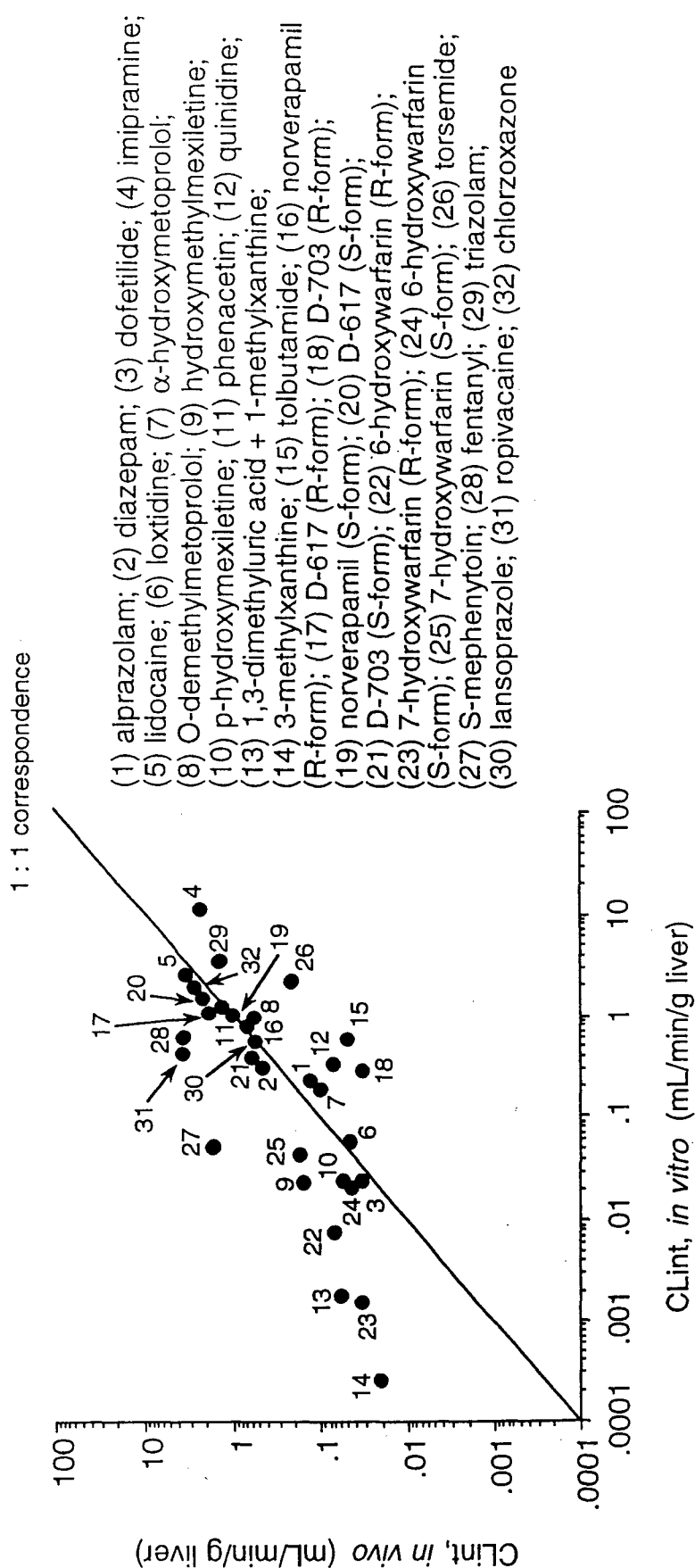


図1 *In vitro* と *in vivo* の肝固有クリアランス (CLint) の比較

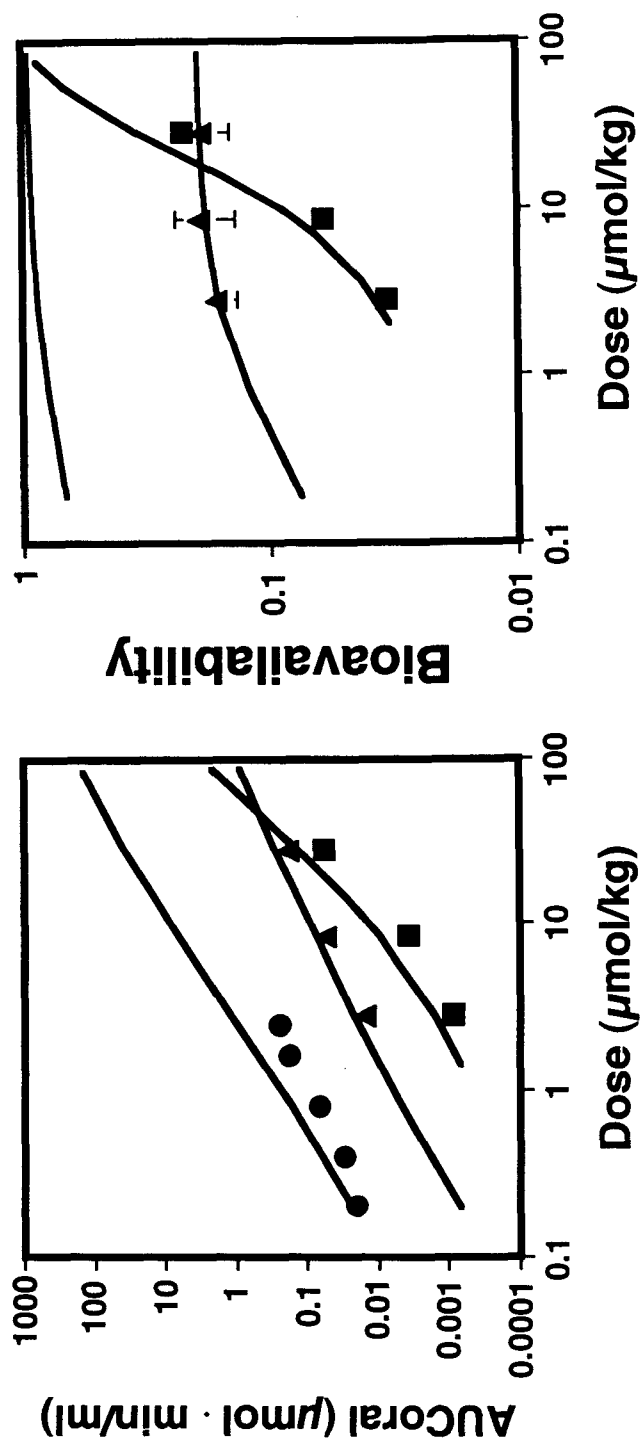
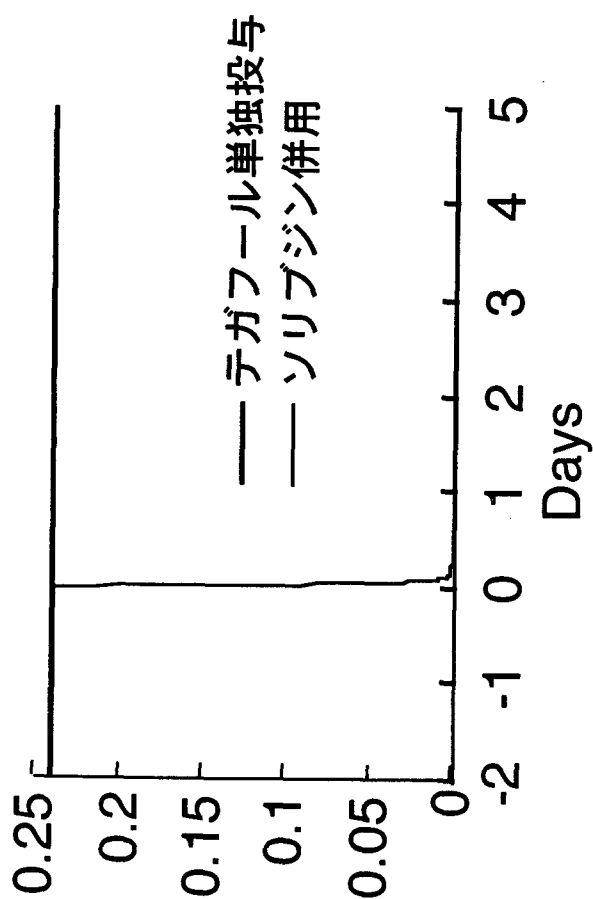


図2 YM796 の AUC およびバイオアベイラビリティの *in vitro* 試験からの予測
 ■: ラット, ▲: イヌ, ●: ヒト, 実線: 予測値

活性型DPD量 (nmol DPD/g liver)



血中5-FU濃度 (μM)

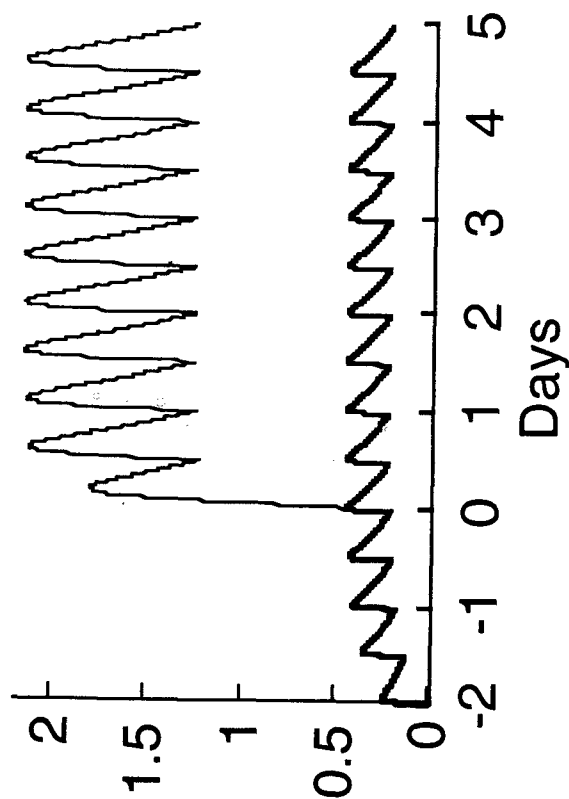


図3 Sorivudine の併用による活性型 DPD 量および血中 5-FU 濃度変化の予測

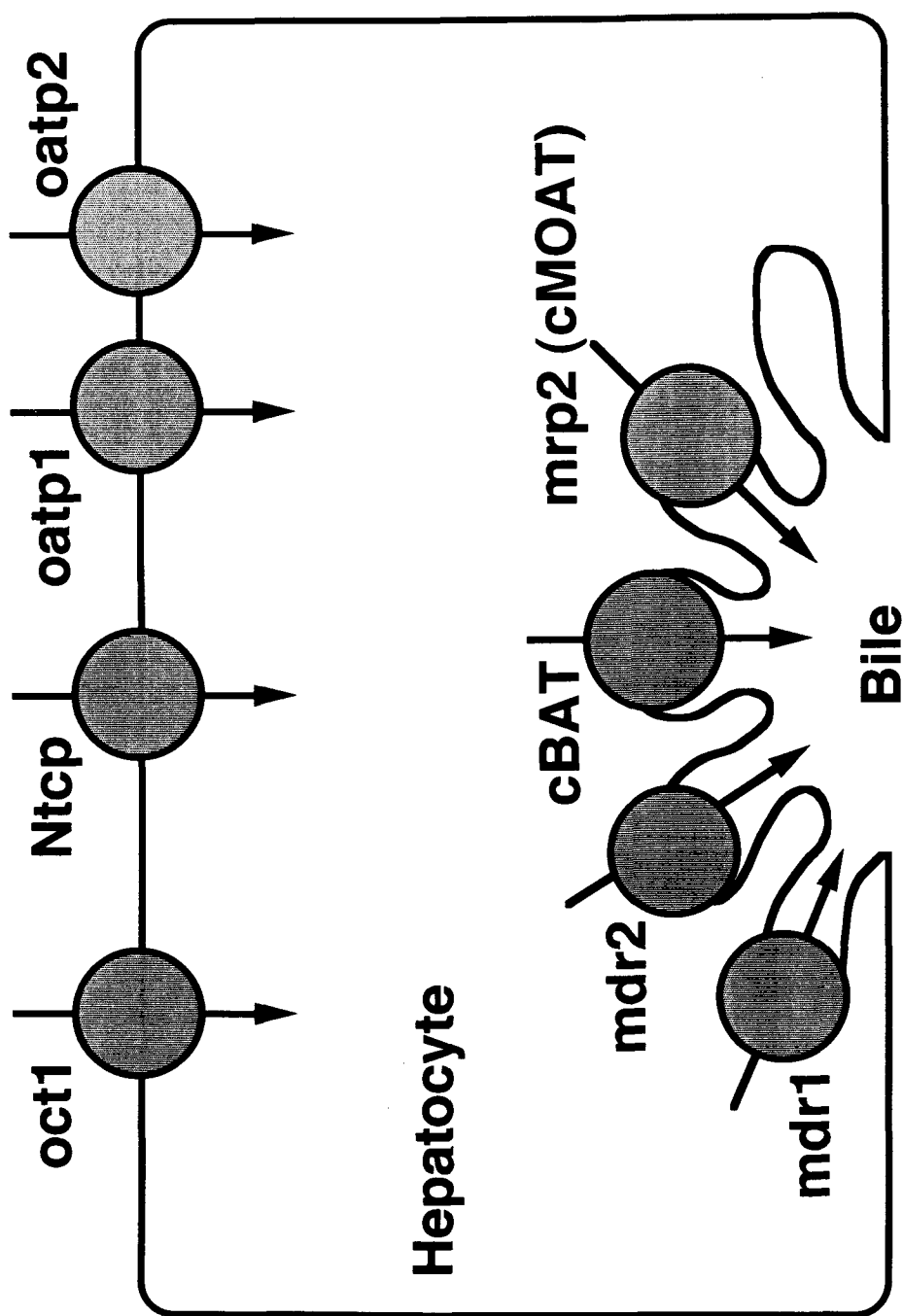


図 4 肝細胞における輸送担体

第56回関西実験動物研究会研究発表抄録

1. *Corynebacterium Kutscheri* 感染事例と血清学的診断法としてのELISAの利用性
2. ケージ内強制換気システムによる *Pasteuralla pneumotropica* 伝播防御試験
3. 遺伝子操作マウスの清浄化システムとその実験
4. 大阪産モロシヌスマウスが保存する新たなmelanocortin 1 receptor allele; “tawny” の塩基配列
5. 中枢神経系の脱髄病変を引き起こすラットdmy遺伝子の同定研究：dmy座近傍と相同なマウスゲノム領域の特定
6. ヒトESTとマウスESTのラット染色体マッピング
7. ヌード・ライノダブルミュータントマウスの病理組織学的研究
8. WOLFラットの中枢神経病変およびその経時的变化
9. 肥満、糖尿、脂質代謝異常をともなう新規コンジェニックマウス：FLS(Fatty Liver Shionogi)-ob/obの作出と特徴
10. ネフローゼ自然発症マウス(ICGN系)：ステロイド抵抗性ネフローゼ症候群モデルとしての可能性
11. 新たな乳癌高発系マウスと移植による転移実験モデル
12. ウイルス性心筋炎におけるインターフェロン- γ (IFN- γ)の役割
13. 遺伝性小脳虫部欠損雄ラットの行動発達
14. 長期飼育B6C3F₁マウスで見られた自然発生強直性痙攣について
15. スナネズミ系統繁殖の試みⅡ
16. 肝臓細胞質アラニルアミノペプチターゼの種差について (予報)
17. 血漿中のTG安定性の検討
18. ペントバルピタール1回投与によるラット排卵抑制の系統差
19. 霊鳥類の室内人工繁殖法：ニホンザルおよびカニクイザルの人工授精法
20. カニクイザルにおける薬物誘発性皮膚掻き行動の観察

Corynebacterium kutscheri 感染事例と血清学的診断法としてのELISAの利用率

○ 境 陽子、根縫弘子、千葉博喜、大原真代子、高橋恵子、余野清香、三日月勝見

(塩野義製薬(株) 実験動物研究センター)

ネズミコリネ菌(*Corynebacterium kutscheri* : *C. kutscheri*) 病は主としてマウス、ラットに発生する化膿性疾患であり、一般的に発生例の多くは動物実験の過程で経験されており、本菌感染の報告例も相当数にのぼる。本菌感染症は不顕性感染例が多く、菌分離法よりも血清診断法の方が有効であり我々の施設でも、マイクロ凝集反応法を中心に検査を実施してきた。今回我々は、ラット集団の本菌感染の検査にELISAの適用を試みた。本報告では、我々の施設での過去の感染事例を紹介すると共に血清学的診断法としてのELISAの有効性について述べる。

＜材料および方法＞

供試動物：自家繁殖しているラット、および外部機関よりの導入動物について検査を実施した。

菌分離法：*C. kutscheri* 菌分離は血液寒天およびFNC寒天培地を用い、肺、肝、腎を中心に腸管内容物からも実施した。

C. kutscheri 菌同定法：ウサギ血液寒天培地上での発育性状および溶血性について観察した。また、菌形観察を行った後、カタラーゼおよびオキシダーゼ産生能、硝酸還元能、炭水化物の分解能等の生化学的性状を試験した。

マイクロ凝集反応法：マイクロプレートはリジットVプレート(三光純薬)を用い、抗原はCK-抗原(デンカ生研)を用いた。

ELISA実施法：ELISA抗原は*C. kutscheri* 菌の超音波処理上清を用いた。ELISAの実施は被検血清を抗原固相化プレートに分注し、酵素標識抗体、基質液の順に加えて発色させ、硫酸により反応を停止した後、吸光度を測定した。

CK-1株および分離菌株間の交叉性：両菌株の免疫血清について、凝集反応およびELISAによる交叉性を試験した。

C. kutscheri 感染実験法：WSラット皮下に菌液を接種した後、経時的に菌分離、病変の出現、凝集抗体価およびELISA吸光度を測定し、比較検討した。

＜結果および考察＞

自家繁殖したラット、マウスの1991年4月から1995年3月までの*C. kutscheri* 検査成績はすべて陰性であり、バリア環境下で十分本菌をフリーの状態に維持することが可能であった。一方、*C. kutscheri* 感染は1978年および1980年に外部機関からの導入動物について認められた。感染動物からの分離菌株は参考菌株として用いたCK-1株と生物学的性状においてよく一致した成績が得られた。また、分離菌株とCK-1株の免疫血清に対する交叉性試験結果では、両菌株共に抗原性にはほとんど差は認められなかった。WSラットを用いた感染実験結果では、病変は1週後より高率に肺に認められ、3週後まで続いて発現したが、その後は実験終了時まで認められなかった。菌分離結果では1週後より実験終了時まで本菌は高率に証明され、主として腸管内に定着した。凝集反応結果では2週後より抗体価は上昇し、その後実験終了時の10週で最高となった。ELISA抗体価は1週頃から上昇し、3週頃でほぼ最高値を示し、そのまま実験終了時まで推移した。ELISAは凝集反応に比し、より早期に陽性判定が可能であり、感染実験の実施範囲では十分有効である成績を得た。

ケージ内強制換気システムによる

Pasteurella pneumotropica 伝播防御試験

○長谷川 治子¹⁾、鍵山 壮一郎¹⁾、長谷川 雅一²⁾、吉田 一也²⁾、黒澤 努¹⁾

1) 大阪大学医学部附属動物実験施設、2) ダイダシ (株) 技術研究所

目的：実験動物飼育環境の微生物学的統御を目的として、シューボックスタイプケージとフィルター付ハードカバーによるMicro Isolation System (MIS) の使用が広がりつつある。このシステムはケージ間の相互感染防止に対して有効だが、ケージ内の換気量が低下することから、物理的環境の悪化が指摘されている。このため、MISを強制換気する強制換気マイクロアイソレーションシステム (FVMIS) が開発された。そこで、われわれも新しいFVMIS (=VIC システム) を開発し、ケージ内NH₃濃度上昇の大幅な抑制に加え、換気、気流、湿度、温度、CO₂、NH₃、O₂ といったケージ内物理的環境統御に対するVIC システムの有効性を明らかにした。しかし、本FVMISのケージ間微生物伝播防御能については未だ明らかにされていない。

材料と方法：FVMISは新たに開発したVICシステムを用いた。本研究会で発表したように*Pasteurella pneumotropica*のPCRを用いた被検動物の殺処分を伴わない検出法を開発しているため、伝播状況の経時的な観察が可能な微生物伝播試験の対象微生物として*P. pneumotropica*を選択した。

P. pneumotropica 汚染飼育室内で、VICシステムを用いて*P. pneumotropica*に汚染していないICRマウス（清浄マウス）を12週間飼育した。清浄マウスのケージ（清浄ケージ）の両側に前記の*P. pneumotropica*検出法により*P. pneumotropica*汚染が確認された同飼育室内飼育ICRマウス（汚染マウス）ケージ（汚染ケージ）を配置し、清浄マウスの汚染状況を経時的に検査した。また、対照として、通常のラックにオープンケージを設置し（オープンラック）、同様に飼育、検査を行った。*P. pneumotropica*検出法は、麻酔下で滅菌綿棒を口腔より差し入れ咽喉頭部ぬぐい液を採取し、Wangら（1996）の方法に準じて行った（咽喉頭PCR）。VICシステム、オープンケージラックともに、清浄ケージ全7個（4匹/ケージ）と汚染ケージ全8個（4匹/ケージ）を5列、3段に汚染ケージと清浄ケージが市松模様となるように配置した。ケージ交換は週1回クリーンベンチ内で行い、試料採取は4週間毎にクリーンベンチ内で行った。

結果とまとめ：VICシステム清浄ケージでは全実験期間を通じて陽性個体例が全く認められず、被検動物の清浄が維持されていた。他方、オープンラック清浄ケージでは飼育4週間目で1ケージにおいて全個体4匹が咽喉頭PCR陽性となり、*P. pneumotropica*のケージ間伝播が確認された。また、同ケージは8週間目でも全個体陽性が維持され、汚染室飼育12週間目には、同ケージに加え、更に2ケージが陽性となり、最終的に8匹のマウスについて、*P. pneumotropica*のケージ間伝播が確認された。以上の結果から、今回の飼育環境においてVICシステムの微生物伝播防御能が確認された。

遺伝子操作マウスの清浄化システムとその実績

○村口武彦、小岸克美、藤井修、中島一男、山崎賢一、芹川忠夫
(京都大学医学部附属動物実験施設)

京都大学医学部附属動物実験施設（以下、動物実験施設と略す。）では、SPF 飼育領域へ新たに動物を導入する際、過去の経験に基づき新規導入動物の許可基準を設けて、その可否を判断している。

その許可基準は、飼育管理体制と品質管理体制に分けられる。飼育管理体制としては、(1) 隔離された飼育領域或いは、隔離飼育装置を設けていること、(2) 飼育器材などは、適切な装置により殺菌されていること、(3) 清浄な衣服、帽子、マスクなどを着用していること、4) 飼育領域は、消毒により清浄環境が保たれていることである。品質管理体制としては、(1) 定期的な微生物モニタリング及び異常動物に対する検査を実施し、清浄状態の監視を行っていること、(2) 微生物モニタリングの検査項目は、指定する項目をすべて含むこと、(3) 搬入する動物は、信頼性における業者等が供給するものに限っていること、(4) 移植細胞株等に対し、何らかの制限を加えていること、(5) 汚染事故が発生していないか、発生した場合においても清浄環境を再構築し、その後長期間汚染事故が発生していないことである。

近年、遺伝子操作マウスを用いた研究希望が増加するに伴って、SPF 環境下での飼育実験の必要性が求められるようになった。しかし、国内外の諸機関で作製・維持されていた遺伝子操作動物は、必ずしも SPF 動物とは限らないことから、それらの動物を清浄化することが必要となる。そこで、新たに清浄化システムを確立、運営することとなった。

清浄化の方法は、その動物が汚染されている微生物によって異なっている。すなわち、MHV 及び非病原性内部寄生虫に感染している動物や定期的な微生物モニタリングにおいて、すべての項目は陰性であるが、飼育管理体制において許可基準を満たしていない動物は、施設内の感染防御用陰圧飼育装置内に生体を収容し、体外受精による受精卵移植法或いは子宮切断術によって清浄化される。HVJ等の伝播力が強く動物に致死的な作用を持つ感染症に汚染されていて収容できない動物は、受精卵或いは精子のみを施設外から導入する受精卵移植法によって清浄化される。受精卵移植された動物や里親マウスは、アイソレータ内の SPF 環境下で隔離飼育し、離乳後、親動物、或いは離乳動物を検査動物として、SPF 検査を実施し、清浄化の確認を行なった後、SPF 飼育領域に導入される。

これにより、1995 年 4 月から 1997 年 10 月までに、77 系統の遺伝子操作動物が清浄化され、SPF マウス飼育領域内に導入されている。その内訳は、受精卵移植法による清浄化が 68 系統、子宮切断術による清浄化が 9 系統となっている。

大阪産モロシヌスマウスが保有する新たな *melanocortin 1 receptor* allele ; "tawny" の塩基配列

○和田あづみ、国枝哲夫¹、都築政起²

(大阪府大・農、¹岡大・農、²広大・生物生産)

我々は1992年5月に大阪府堺市において、黄色味を帯びた淡褐色の毛色をもつ雌のモロシヌスマウス (*Mus musculus molossinus*) を捕獲して以来、この毛色突然変異をもつモロシヌス近交系; Mol-skiR ラインを育成しつつ、解析を行っている。昨年度本研究会にて、この毛色突然変異が第8染色体末端部付近に存在する *melanocortin 1 receptor* (*Mc1r*) locus の劣性対立遺伝子によって支配されていること、既報の劣性対立遺伝子 "recessive yellow" とは異なる表現型を示すこと、および "tawny" が "recessive yellow" に対し優性であることを報告した。今回 "tawny" 遺伝子の塩基配列について報告する。

Mol-skiR ラインマウスのゲノムDNAを用いて *tawny* allele の塩基配列を決定し、1992年に Mountjoy らにより報告されている野生型 *Mc1r* 遺伝子の配列と比較した。*tawny* 遺伝子には、5つの塩基置換が存在し、その内3つがアミノ酸置換を伴っていた (101 valine → alanine (1), 216 valine → alanine (2), 252 tryptophan → cysteine (3))。この内、(1)の塩基置換は1993年に Robbins らも発見しており、機能に影響を及ぼさない多型であると報告している。そこで、我々は (2), (3) のアミノ酸置換を生じる塩基置換が、野生型 *Mc1r* 遺伝子に存在する制限酵素 *Mva* I, *Apa* I 切断サイトをそれぞれ消失させることを利用し、*tawny* 毛色を持つマウスと *tawny* 毛色を持たないマウスの *Mc1r* 遺伝子の *Mva* I, *Apa* I サイトを調査した。この調査には、*tawny* 毛色を持つ Mol-skiR ラインおよび Mol-axsW ラインのマウスと、*tawny* 毛色を持たないマウスとして代表的な近交系マウス5系統、野生捕獲マウスから直接近交系化された系統7系統、*Mc1r* locus の他の突然変異 allele をもつ congenic strain 2 系統、Tawny マウスの起源となった個体の捕獲地点の近くで捕らえたマウス由来の野生型毛色を持つ2ラインを用いた。その結果、*tawny* 毛色を持つマウスにのみ (3) のアミノ酸置換を生じる塩基置換が存在し、このアミノ酸置換により *tawny* 形質が発現すると考えられた。

中枢神経系の脱髄病変を引き起こすラット *dmy* 遺伝子の同定研究：
dmy 遺伝子座近傍と相同なマウスゲノム領域の特定

○矢木利香、北田一博、芹川忠夫（京都大学医学部附属動物実験施設）

【緒言】 *dmy* (demyelination) ラットは、バルセロナ大学（スペイン）の Sprague Dawley ラットコロニーで見い出された後躯麻痺の症状を呈するミュータントで、中枢神経系におけるミエリンの崩壊、空胞化を伴っている。すなわち、病理組織学的に、3週齢からミエリンの崩壊（特に脊髄の腹索部）が観察され始め、3ヵ月齢では、空胞が中枢神経系全体に拡大するようになる。この病理像の変化と相関して、後躯麻痺の症状は、加齢とともにより強く発現する。庫本らは、上記の異常が、単一の常染色体上劣性遺伝子によって支配されていることを示し、原因遺伝子 *dmy* をラット第17染色体上の *Hh1ts* 遺伝子と *Agtr1a* 遺伝子（旧 *At1a* 遺伝子）との間に当てはめた。さらに、69匹の戻し交雑仔において、*Pr1* 遺伝子と病態発症との間に分離をおこしていないことを示して、*dmy* 遺伝子は *Pr1* 遺伝子の近傍に存在することを推定した。今回、*dmy* 遺伝子の同定研究を開始するにあたり、*dmy* 遺伝子が存在する領域と相同なマウスゲノムの領域を特定し、また、*dmy* 遺伝子座近傍の一部と推測される領域を含む YAC コンティグを構築して物理地図を作成したので報告する。

【方法と結果】

1. *dmy* 遺伝子座近傍の遺伝学的地図の作成：ラットにおける *dmy* 遺伝子の存在する領域と相同なマウスのゲノム領域を推定するため、*Hh1ts* 遺伝子と *Agtr1a* 遺伝子をマウスゲノム上にマッピングした。これには、ラット *Hh1ts* マイクロサテライトマーカーのプライマーペア、および今回ラットの *Agtr1a* 遺伝子の塩基配列をもとにデザインし直したプライマーペアを、マウスゲノム DNA に応用した。その結果、ALY と MSM との間で多型を示す PCR 産物が得られ、両系統による戻し交雑仔パネルを用いて、それぞれ、マウス第13染色体のセントロメアから約9cM および約11cM の位置に当てはめることができた。

2. YAC コンティグによる物理地図の作成：MIT のデータベースを検索して、マウス第13染色体のセントロメアから約9cM および約11cM の領域の一部を包含する YAC クローンを選択した。さらに、この領域にマップされているマイクロサテライトマーカーや STS マーカー（遺伝子、EST マーカーを含む）を用いて、YAC クローンの整列を行った。その結果、今回構築されたコンティグは、現在判明している 2cM の *dmy* 遺伝子が存在する critical region のうち、少なくとも 0.3cM の領域をカバーしていることが明らかとなった。

【結語】 ラット *dmy* 遺伝子座近傍と相同なマウスゲノム領域を特定できた。これにより、マウスゲノムの豊富な遺伝学的ツールや情報を、*dmy* 遺伝子の同定研究に活用することが可能となった。今後、*dmy* ラットによる交配実験を追加して、*dmy* 遺伝子の存在する範囲を狭めることを予定している。

ヒト EST とマウス EST のラット染色体マッピング

○北田一博¹、近藤靖^{1,2,3}、Dominique Simon-Chazottes³、Jean-Louis Guenet³、
芹川忠夫¹ (¹京大・医・動物実験施設、²田辺製薬・安全研、³Institut Pasteur)

【緒言】 ヒトのゲノム上には、70,000 から 100,000 個の遺伝子が存在すると考えられている。そのほぼすべての遺伝子を網羅することを目標として、異なる組織由来の cDNA クローンの塩基配列を、部分的に決定するプロジェクトが推進されるようになった。現在ヒトでは、約 80,000 個の EST (Expressed sequence tag) がデータベース化され、これらは 40,000 から 50,000 個の遺伝子を包含しているものと推測されている。さらには、3'側の塩基配列情報から final exon を増幅する PCR プライマーをデザインし、radiation hybrid パネルを用いて EST マッピングを行うことも可能である。現在では、ヒト染色体の特定の領域にマップされた EST マーカーは約 16,000 個に上り、ポジショナルクローニング等の研究に極めて有益な情報となっている。本研究においては、豊富なヒトやマウスの EST マーカーをラットゲノムに応用することにより、それらと相同なラット EST ホモログの存在する染色体を同定したので報告する。

【方法と結果】 マウスゲノムに応用可能であることが確認されているヒト EST プライマーは GENETHON 社の Gabor 博士から、マウス EST プライマーは Glasgow 大学の Davies 教授から、それぞれ分与していただいた。まず、これらのプライマーの中から、ラットゲノム DNA をテンプレートにして PCR 産物を増幅させ得るプライマーをスクリーニングした。その結果、278 のヒト EST プライマーから 80 (29%) のプライマーが、また、24 のマウス EST プライマーから 17 (71%) のプライマーが、それぞれ選択された。続いて、このプライマーを用いて、ラット x マウス体細胞交雑株 DNA に対する PCR-SSCP 法を行った。この結果、80 のヒト EST マーカーのうち 39 (39/278=14%) のマーカーを、また、24 のマウス EST マーカーのうち 14 (14/24=58%) のマーカーを、特定のラット染色体にあてはめることができた。

【結語】 今回のプレリミナリーな検討により、現在、数多く用意されているヒトやマウスの EST マーカーが、ラットにおける EST ホモログのマッピングにも応用可能であることが示唆された。なお、その結果を解釈する場合、PCR 産物の塩基配列を決定して、注意深く相同性を吟味する必要があると考えられる。この方法によって得られた情報は、ラットミュータントの原因遺伝子を同定する研究分野に極めて有益なものとなろう。また、詳細なヒト・マウス・ラット間の比較遺伝子地図の作成も可能となろう。

ヌード・ライノダブルミュータントマウスの病理組織学的研究

川路尚徳（環境バイリス研究所）

ヌードマウスは胸腺由来T細胞の未発達のヘアレスマウスとしてよく知られている。一方ライノマウスは皮膚と胸腺ハッサル小体のケラチン過形成の結果、T細胞の低形成を経て自己免疫が発生するヘアレスマウスである。ヌードマウスにも抗核抗体発生等の自己免疫状態があり免疫不全と自己免疫は裏と表を形成する。ヌードマウスは染色体11に突然変異遺伝子を持ち、ライノマウスは染色体14に突然変異遺伝子を持ち、いずれも常染色体劣性遺伝を示すマウスである。

そこでヌードマウスとライノマウスのダブルミュータントを作る試みを行った。ヌードマウスの雌にライノマウスの雄を掛け合わせF1を作りF1同士を掛け合わせると36分の3にダブルミュータントが生じることになる。生じたダブルミュータント臓器組織のH-E標本をつくり生後1ヶ月以上のマウスに関し雌14例、雄8例の病理組織学的検討を行った。リンパ節の副皮質T細胞依存性領域、脾臓の中心動脈周囲のT細胞依存性領域には全例にリンパ球は認められなかった。リンパ節二次小節の欠如は雌9例雄2例、形質細胞様細胞浸潤は雌14例雄8例の全例に認められた。雌の白脾髄消失は雌11例雄5例、脾の線維化は雌12例雄5例、脾における形質細胞様細胞の浸潤は雌11例雄6例であった。皮膚はライノマウスによく似たHypotrichosis cysticaが雌雄全例に認められたが真皮の嚢胞が少なかった。肝の中心静脈周囲性線維化は雌12例雄7例に認められた。肝の門脈周囲性線維化巣は雌12例雄5例、胆管増生は雌6例雄3例であった。

結語：ヌードマウスとライノマウスのダブルミュータントマウスでは双方の形質が入り交じることが多いが肝の胆管増生の様に何れの突然変異マウスにも見られない病変も希に認められた。

WOLF ラットの中枢神経病変およびその経時的変化

○足立民子、西村友成、藤原利久、乾俊秀、浅野裕三、
山崎賢一*、北田一博*、芹川忠夫*
(田辺製薬・安全研、*：京大、医、付属動物実験施設)

WOLF ラットは、てんかん性発作および振戦を特徴とする TRM を継代維持中にみいだされた新規ミュータントラットである。両者の原因遺伝子は異なり、現在は TRM とは分離された系として継代されている。WOLF ラットは TRM と同様に 4 週から 8 週齢をピークとする振戦を示すが、震えの程度・質には微妙な差がみられる。また、WOLF ラットは TRM と異なり被毛・触毛の曲がりはいずれも、かつ雌雄とも正常な生殖能力をもつ。今回、TRM と WOLF ラットの中枢神経病変を比較し、あわせて WOLF ラットの中枢神経病変の経時的な変化を検索したので報告する。

[材料と方法]

WOLF ラットと TRM の中枢神経病変の比較

5 週齢の WOLF ラットを中性緩衝ホルマリン液で灌流固定した後、脳および脊髄を常法に従ってパラフィン包埋し、H-E 染色標本とし病理学的検索を行った。その後、同週齢の TRM の中枢神経病変と比較検討した。

WOLF ラットの中枢神経病変の経時的変化

3、4、8、11、14、15、45 および 60 週齢の WOLF ラットについて、同様の標本作製したのち中枢神経の病理組織学的検索を行い、その経時的変化を観察した。

[結果]

WOLF ラットと TRM の中枢神経病変の比較

WOLF ラットでは中脳被蓋および延髄の神経網、小脳および脊髄の白質に空胞が認められた。空胞形成は TRM と比べると軽微なものであり、かつ病変の分布も中脳の赤核付近および小脳白質などに限局されていた。一方、TRM では、空胞形成は脳幹中心に広範囲に認められ、特に視床、中脳蓋、脳幹網様体および小脳白質に顕著であると報告されている。今回行った病理学的検索でも、同様の病変の分布および程度が確認された。脊髄における空胞形成を比較すると、TRM では主に灰白質に認められたのに対し、WOLF ラットでは白質に分布した。

WOLF ラットの空胞は類円形で限界明瞭であり、内容は全く空虚で蛋白成分などはみられなかった。このような空胞の性状は TRM のそれとほぼ一致していた。

WOLF ラットの中枢神経病変の経時的変化

中脳の神経網、小脳および脊髄の白質に認められた空胞は、週齢が進むにつれ減少する傾向にあった。しかしニューロビルは週齢とともにエオジンの染色性を増すため、この変化についてはさらに詳細な病理学的検索が必要と考えられた。

[まとめ]

TRM と比較すると、WOLF ラットの中枢神経病変は軽度であり、また分布も大きく異なっていた。病変の程度および分布に差があったことから、WOLF ラットと TRM では遺伝的形質は異なるものと判断された。

肥満、糖尿、脂質代謝異常をともなう新規コンジェニックマウス：

FLS (Fatty Liver Shionogi)-*ob/ob* の作出と特徴

曾我正彦、佐治久江、中井幸子、宮崎貴子、大島五紀、大原忠雄、牧野 進

(塩野義製薬(株) 実験動物研究センター)

1994 年、Friedman らにより肥満マウスの *ob* (*obese*) 遺伝子がクローニングされ、その遺伝子産物である摂食調節因子レプチンの生理機能が注目されている。

我々は非肥満で脂肪肝を自然発症する FLS (Fatty Liver Shionogi) マウスを dd 系マウスから分離した後、脂質代謝異常動物を作る目的で、FLS に C57BL/6J/*shi-ob/ob* (B6-*ob/ob*) マウスの *ob* 遺伝子を戻し交配で移入した。本実験では新しく作出された FLS-*ob/ob* コンジェニックマウスの一般性状ならびに生化学的特徴を調べた。

【方法】＜一般性状＞ 雌雄の FLS-*ob/ob*、B6-*ob/ob* マウスを用いて、体重、糖尿発症率、摂餌・摂水量を経時的に調べた。＜生化学的測定＞ 10 週齢の雌性 FLS-*ob/ob*、B6-*ob/ob* マウスおよび対照マウスとして FLS-+/+, C57BL/6J/*shi* を用いて以下の実験を行った。一晩絶食させたマウスにグルコース (2g/kg body wt.) を経口負荷し、耐糖能を調べた。また、非絶食条件下で採血し、血清コレステロール (CHO)、トリグリセライド (TG)、リン脂質 (PL)、グルコース (GLU) レベルを市販の酵素法キットで測定した。血清インスリンレベルは酵素抗体法で測定した。摘出肝からは Folch 法で脂質を抽出し、CHO、TG、PL 含量を調べた。また、5 匹分のプール血清を 1 検体とし、超遠心密度勾配法でリポ蛋白分画を行い、各リポ蛋白における脂質の分布を検討した。＜組織学的観察＞ FLS-*ob/ob* マウスの肝臓からパラフィン包埋切片を作製し、HE 染色で光顕的に観察した。

【結果および考察】FLS-*ob/ob* マウスは雌雄とも若齢期から著しい体重増加がみられ、若年性肥満と位置づけることができた。さらに、本マウスは 3 週齢ですでに雌雄とも糖尿発症個体が認められ、10 週齢時の糖尿発症率は 100% であった (B6-*ob/ob* は 20~40%)。しかし、加齢によりその発症率は緩やかに低下した。FLS-*ob/ob* マウスの糖尿発症がピークを示す 10 週齢では多飲・多尿がみられ、*ob* 遺伝子に起因すると考えられる過食も検討したすべての週齢 (5~20 週齢) で認められた。耐糖能試験の結果から、FLS-*ob/ob* はグルコース負荷 30 分後の血糖値が 570mg/dl を超え (FLS-+/+ の約 2 倍)、180 分後も依然として高血糖 (390mg/dl) を示し、耐糖能異常のあることが示唆された。この時、非絶食条件下で測定した FLS-*ob/ob* マウスの血清 TG、CHO レベルはそれぞれ 497mg/dl、552mg/dl であり、B6-*ob/ob* マウスを上回る高 TG、CHO 血症を呈した。さらに、本マウスでは高インスリン血症も認められ、その値は対照マウスである FLS-+/+ の約 16 倍であった。FLS-*ob/ob* マウスでみられる脂肪肝は TG の高度な沈着によるもので、組織学的にはびまん性の脂肪滴沈着として観察された。これはヒトの脂肪肝とも酷似している。リポ蛋白脂質の測定からは、VLDL-TG、LDL-CHO の増加がみられ、肝からの脂質分泌の亢進、肝への LDL 取込み低下のある可能性が考えられた。

本実験から FLS-*ob/ob* マウスは高脂血症、脂肪肝をともなう肥満性糖尿病のモデルとして興味深い性質を有していると考えられた。今後、さらにその特徴を詳細に検討していく予定である。

ネフローゼ自然発症マウス（ICGN系）： ステロイド抵抗性ネフローゼ症候群モデルとしての可能性

○堀川洋子、水野信哉、是金宏昭、岡本宗裕、黒澤努（阪大・医・動験）

はじめに

我々はネフローゼ自然発症モデル(ICGN系)が慢性腎不全を発症することに注目し、本モデルの病態解析を進めてきた。この系統のホモ個体は生後直後よりアルブミン尿および3週齢以降低アルブミン血症を発現する。このことから、小児ネフローゼ症候群の良いモデルと考えられる。一方、小児のネフローゼ症候群の第一選択剤としてステロイド剤が臨床的に汎用されている。そこで3週齢のホモにステロイドの投与実験を行った。本モデルにおけるネフローゼ症候群に及ぼすステロイド剤の効果を臨床検査および病理組織学的検査によって評価したので報告する。

材料および方法

3週齢の雌のICGNマウス（ホモ）に、実験群としてステロイドのうちプレドニゾロン（プレドニン、塩野義）5mg/kg/dayの連日投与を行った。連日投与期間は短期投与の1週間および長期投与の3週間とした。対照群として同週齢のICGNマウス（ホモ）に生理食塩水を同様に投与した。尿は毎週採取し、尿中アルブミン(uAlb)値の測定をおこなった。実験終了後に血中尿素窒素(BUN)値、血清コレステロール(Tcho)値、血清アルブミン(sAlb)値および尿中アルブミン(uAlb)値の測定を行い、マウスを剖検し、糸球体病変の観察を行った。

結果

- 1) 尿中アルブミン値はステロイド1週間投与では対照群より投与群において低値の傾向を示したが、統計学的な有意差はなかった。3週間の投与においても同様の結果が得られた。
- 2) BUN値、Tcho値、sAlb値については1週間の投与および3週間の投与における投与群および対照群との間に統計学的な有意差は無かった。
- 3) 糸球体硬化を示す ECM index は3週間の投与において対照群よりむしろ投与群で高値 ($P < 0.05$) を示した。
- 4) 糸球体の大きさは1週間の投与においてのみ投与群が対照群に比べ、有意に小さかった ($P < 0.001$)。
- 5) 糸球体へのIgM沈着は統計学的な有意差は認められなかった。

考察

小児のネフローゼ症候群の約20%はステロイド抵抗性であり、糸球体硬化を呈する症例では慢性腎不全に移行し、予後も良くないとされる。このようなステロイド抵抗性のネフローゼ症候群の発生機序、治療の開発のためにもモデル動物が必要である。今回、ステロイド投与したホモのICGNマウスにおいて、臨床検査値の改善および糸球体の顕著な改善は得られなかった。このことからICGNマウスはステロイド抵抗性ネフローゼ発症していると考えられ、小児のステロイド抵抗性ネフローゼ症候群モデルとしての可能性が示唆された。さらにステロイド抵抗性であったことから、ICGNマウスの糸球体硬化の進行様式については炎症反応や免疫反応の異常が関与する糸球体硬化の可能性は少なく、遺伝的因子が直接的にメサングウム細胞に作用し糸球体硬化が進む可能性が高いものと考えられた。

新たな乳癌高発系マウスと移植による転移実験モデル

○森本純司¹、広石伸互²、谷口雄三³、森 浩志⁴

(¹大阪医大・動物センター、⁴同・2病理、²福井県立大・生物資源、³日本精化(株))

癌転移機構の解明ならびに転移抑制物質の検索には適切な転移実験モデル動物が必要である。我々は以前に中国産野生マウス(JYGマウス)に発生した乳癌が高率に多臓器転移を起こすことを報告したが、その後この系統は絶え、JYGマウス由来の乳癌培養細胞株が残されているのみである。よって今回、我々はJYGマウス由来の乳癌ウイルス(JygMMTV)をBALB/cマウスに感染させて、高率に肺転移を起こす新たな乳癌高発系マウスを作出し、さらに皮下移植による転移実験モデルの作製を試みた。

【方法】JYGマウス乳癌培養細胞株JygMC(B)の培養上清から採取した乳癌ウイルス(JygMMTV)の濃縮液をBALB/c雌マウスに接種した後、兄妹交配・系統維持を行い、乳癌の発生状況、組織像、転移の有無を観察した。また、転移実験モデル作製の為、担癌マウスの肺転移組織片の移植針による皮下移植を繰り返した。

【結果】JygMMTVを接種したBALB/cマウスは接種後7ヶ月を経過する頃より乳癌の発生を認め、最終的に乳癌発生率は100%(10/10) (平均11.3ヶ月)であり、剖検時(平均12.5ヶ月)には50%(組織学的検索)に肺転移を認めた。次世代F1での発癌率は83%(77/93)、転移率は69%、F2での発癌率は94%(73/78)、転移率は67%であり、平均発癌月齢は12~13ヶ月であった。これら乳癌の発生は多くは多発性であり、組織像は乳頭状腺管癌を主体に、面癌や髓様腺管癌さらには嚢胞的な部分も数多く観察された。また、肺転移した乳癌組織片の皮下移植を5~6代繰り返すことにより、移植2ヶ月で高率(約80%：肉眼的観察)に肺転移を起こす実験系が得られた。

【結語】JygMMTVをBALB/cマウスに感染させて新たな乳癌高発・高転移モデルマウスを作出したが、肝転移の1例を除き、転移臓器は肺のみであった。JYGマウスにおける多臓器転移とは大きく異なっており、この違いが如何なる原因によるものかの解析は、転移の臓器特異性を考える上で重要である。また、肺転移組織片の皮下移植による転移実験モデルは、転移抑制物質のスクリーニングとして有用である。

ウイルス性心筋炎における インターフェロン- γ (IFN- γ) の役割

○喜多正和、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インターフェロン- γ (IFN- γ) 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法あるいは生物学的活性測定法で測定した。また、抗IFN- γ 抗体投与によるEMCV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。さらに、IFN- γ ノックアウトマウスを用いて、EMCウイルス感染後の生存率ならびに麻痺などの症状の発現を比較検討した。

【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。

4) IFN- γ ノックアウトマウスにおいては、正常マウスに比べ、生存期間の延長ならびに麻痺などの症状発現率の低下が認められた。

【考察】EMCVによるウイルス性心筋炎モデルにおいては、IFN- γ は感染防御因子として作用するが、一方では炎症誘発因子として作用していると考えられた。

(本研究は東大医科研、田川陽一、岩倉洋一郎先生との共同研究である)

遺伝性小脳虫部欠損雄ラットの行動発達

桑村有規、浅野裕三、乾俊秀、桑村充¹⁾、佐久間貞重²⁾
(田辺製薬 安全性研究所、¹⁾大阪府立大学獣医病理学講座)

遺伝性小脳虫部欠損(CVD)ラットは小脳虫部の欠損を特徴とするミュータントであり(Kuwamura *et al.*,1994)、その形質は常染色体性劣性遺伝によって発現する(Kuwamura *et al.*,1996)。CVD のホモ型ラットは 14 日齢頃より運動失調を呈するが(Kuwamura *et al.*, 1994)、出生後早期のラットの成長に伴う行動発達の詳細な知見は極めて乏しい。哺乳期に完成する反射・運動系の発達過程の観察は、行動機能の異常を知る重要な手がかりとなると考えられている(Asano *et al.*,1984)。本報では CVD ラットの病態解析の一環として、主に哺乳期の初期行動の発達を調べ、CVD ラットおよび CVD ラットの由来系統である Donryu および LEW 系ラットについてこれらの発達推移を比較した。

[材料および方法]

実験には各 10 匹の雄の CVD ホモ型ラットと雌の CVD ヘテロ型ラットを交配し、得られたすべての雄の新生仔を用いた。また、対照として LEW 系(LEW/Crj)および Donryu 系(Crj:Donryu) の妊娠ラットを各 10 匹購入し、得られた雄の新生仔 3 匹/腹を観察した。新生仔は出産後 3 日に各腹 8 匹に哺育制限した。

体重測定および眼瞼開裂の状況により発育を、生後間もない時期に正向反射(平衡機能、協調機能)、回転運動(四肢の運動性)、背地走性(四肢の運動性)、棒つかみ反射(前肢の運動性)を、眼が開いた時期に自由落下反射(平衡機能)、牽引反射(協調機能)および回転棒運動(協調機能)の検査を行って運動能力の発達を観察した。すべての観察データは定量化し、観察実施日ごとに Tukey の多重比較検定を行い CVD ホモ型、CVD ヘテロ型、Donryu および LEW 系の各群間の比較を行った。

行動観察終了後、すべての個体を剖検し、脳を摘出し常法に従ってパラフィン包埋後、光学顕微鏡による観察を行った。

[結果および考察]

小脳虫部の欠損した CVD ホモ型個体ではヘテロ型に比較して平衡機能、協調機能および四肢の運動性をみる検査項目において行動発達の抑制がみられた。このことから、これらの運動性の発達は小脳虫部と密接な関係があることが示唆された。また、ヘテロ型においても協調機能の発達が Donryu および LEW 系と比較して遅滞していたため、ヘテロ型ラットにおける未知の形態的あるいは機能的異常の可能性が考えられた。

参考文献

- M. KUWAMURA *et al.* Developmental Brain Research 83,294-298,1994.
M. KUWAMURA *et al.* The Journal of Heredity 87,161-162,1996.
Y. ASANO *et al.* Congenital Anomalies 24,103-110,1984.

長期飼育 B6C3F₁ マウスでみられた自然発生強直性痙攣について

○小田厚子、今井良悦、永藪徳久、西田信之(武田薬品・薬剤安全性研究所)

当研究所で実施しているマウスのがん原性試験では、主に Crj:B6C3F₁ あるいは Jcl:B6C3F₁ マウスを用いている。経験上から Crj:B6C3F₁ マウスでは自然発生的に起こる強直性痙攣が多いことが分かっている。そこで我々は、これまで実施された B6C3F₁ マウスのがん原性試験における強直性痙攣の発現状況について Crj:B6C3F₁ と Jcl:B6C3F₁ マウス間で比較した。さらに、痙攣の有無による生存率、腫瘍発生率、体重、摂餌量などの比較を行い B6C3F₁ マウスでみられる強直性痙攣が試験成績の評価に及ぼす影響を考察した。

Crj:B6C3F₁ マウスでは、がん原性3試験の雌雄各 750 匹について、Jcl:B6C3F₁ マウスではがん原性1試験の雌雄各 300 匹について強直性痙攣の初発時期、発現率、発現週数、痙攣後の生死及び生存率を、さらに、痙攣が動物へ及ぼす影響として痙攣の有無による生存率、腫瘍発生率、体重及び摂餌量を調べた。その結果、Crj:B6C3F₁ マウスでは、Jcl:B6C3F₁ マウスに比べ痙攣の初発時期が早く、発現率も高い傾向を示した。雄では痙攣後に死亡した動物もみられた。痙攣の発現週数においては両者間の差はなかった。さらに、痙攣の有無による比較では雄の痙攣群で生存率がやや低い傾向がみられた。腫瘍発生率、体重及び摂餌量に両者間の差はなかった。

以上の結果から、Crj:B6C3F₁ マウスでは Jcl:B6C3F₁ マウスに比べ痙攣が起こりやすく、同マウスの雄では痙攣に起因した死亡があることが確認できた。しかし、Crj:B6C3F₁ マウスの生存率はがん原性の評価に十分な程高率であり、腫瘍の発生率にも影響がないことから、長期飼育 Crj:B6C3F₁ マウスで高頻度に見られた痙攣ががん原性試験の評価に及ぼす影響はないと考えられた。

スナネズミ系統繁殖の試み II

一側総頸動脈結紮法による脳梗塞発症率の検討と組織所見

新谷 聡、*川路尚徳(循環器センター・研 * (株)環境バイリス・研)

スナネズミ (Mongolian Gerbil) の一側総頸動脈結紮による脳梗塞発症の頻度は、30～60%で、多数例の成績では大体40%代と言われている。我々は、脳梗塞発症率の低い系統の作成を目指して、系統繁殖を行っている。すなわち術後72時間の時点で100%生存する群を求めている。昨年の本研究会で、1988. 7. 11から1996. 8. 27までに実施した実験I～VIにおいて、術後72時間目に生存している個体が、各実験を通じて徐々に増加していること、および100%生存群が出現したことを報告した。

今回は、今年10カ月間に行った96群428例の実験VIIの成績を示すと共に、5匹のスナネズミに付いて、脳の病理組織学的検索を実施したので合わせて報告する。

『実験VIIの72時間生存すなわち完全に正常の状態』

一側総頸動脈結紮を実施した428例中296例、69. 2%であり、雌雄を別にと、雄68. 7%、雌69. 7%で、雌がわずかに雄を上回っていた。100%生存群は96群中11群に見られ、その率は12%であった。

『スナネズミ5例の脳の海馬付近の病理組織学的検索』

動物は、ペントバルビタールナトリウムの麻酔下に放血死させた。脳の固定は、10%ホルマリン燐酸緩衝液を用いて行った。組織標本の作成は、方の通り、切り出し、包埋、薄切、脱パラを行い、H-E染色、ニッスル染色を施した。オリンパス光学顕微鏡で、歯状回神経細胞の海馬の核濃縮、アンモン角神経細胞の核濃縮、マイネルト角の出血、頭頂部皮質の神経細胞の核濃縮の有無を検索した。

『組織病理学的所見の結論』

スナネズミのNo1～4では、特に異常が見られず、No5は剖検の10分位前に、一側総頸動脈を結紮したもので、海馬には異常が認められなかったものの、マイネルト角に神経細胞の核濃縮と軽度の出血ならびに頭頂部皮質に神経細胞の核濃縮が見られ、明らかに病変が認められた。このスナネズミは、脳底の側副血行路すなわちウイリス輪の発達の悪い動物であることが、示唆された。しかし、これらの病変はごく初期のもので、さらに虚血性病変として発展する可能性があものと予想された。

肝臓細胞質アラニルアミノペプチダーゼの種差について (予報)

山本好男¹⁾、李 堯華²⁾、大久保岩男²⁾、西 克治¹⁾ (¹⁾ 滋賀医大法医学、²⁾ 同生化学第二)

Alanyl aminopeptidase (AAP) は、種々の哺乳類の肝臓、腎臓等に存在するタンパク質分解酵素の一つで、enkephalinやMet-Lys-bradykinin等の生理活性物質を不活化することが知られている。また、本酵素には、細胞膜に局在するものと細胞質に存在する二種類の酵素が知られている。今回、私共は細胞質に存在するAAPをラットおよびヒトの肝臓より精製し、その物理化学的諸性質を比較検討したので報告する。

材料および方法

ラットおよびヒト肝臓をホモジナイズし、 $105,000 \times g$ にて遠心し、上清を得た。次いで、硫安分画、Q-Sepharose、Red A、Sephacryl S-300、Hydroxyapatite等のカラムを用いて、分離、精製した。得られた精製酵素 (AAP-S) について、分子量、基質特異性、pH安定性、N末端のアミノ酸配列、puromycinに対する感受性などを含む物理化学的諸性質を比較検討した。

結果および考察

- 1) ラットAAP-Sの分子量はゲル濾過法で100,000、SDS-PAGEにて90,000 (+SH) であり、ヒトAAP-Sの分子量はゲル濾過法で89,000、SDS-PAGEにて90,000 (+SH) であり、ともに native な状態での精製酵素は単量体であると考えられた。
- 2) AAP-Sの至適pHはともに7.5であり、Ala-MCAに対するKmおよびVmaxは、ラットAAP-Sで $330 \mu M$ 、 $5.0 \mu \text{ moles/mg/min}$ およびヒトAAP-Sで $182 \mu M$ 、 $4.7 \mu \text{ moles/mg/min}$ であった。
- 3) 基質特異性、活性阻害剤に対する結果から、ラットAAP-Sはmetalloenzyme、ヒトAAP-Sはmetalloenzyme と serine protease の両方の性質を有すると考えられた。
- 4) ラットおよびヒトAAP-SのN末端のアミノ酸配列は相同性が高く、さらにpuromycinで活性が強く阻害されたことなどから、両AAP-Sがpuromycin-sensitive aminopeptidaseとして知られている酵素と同一酵素であると考えられた。

以上より、ラットとヒトAAP-Sの物理化学的諸性質は類似していることが明らかになった。

血漿中のTG安定性の検討

○田畑信子、後藤敏子、藤原幸子、北崎 直（武田薬品 薬剤安全性研究所）

〔目的〕血液生化学的検査項目の一つであるトリグリセリド（TG）の測定法には、現在当施設で実施している内因性のグリセリンを含み測定するグリセリン非消去法と、これを消去して測定するグリセリン消去法がある。血漿中のTGは肝リパーゼの作用を受けて分解し遊離の脂肪酸とグリセロールに変化する。これらの点をふまえグリセリン消去法をルーチン検査に適用するための検討実験を行った。今回は、三つの動物種の血漿を室温または冷所に保存し、時間によるTG値の変化を調べた。

〔材料及び方法〕ラット（絶食、非絶食）、イヌ（絶食）及びサル（絶食）の血液を遠心分離後、血漿を採取し測定試料とした。

①測定項目（測定機器）：TGグリセリン非消去法（H-7150）

TGグリセリン消去法（H-7150）

グリセリン（島津 UV-2100）

NEFA（H-7150）

②測定ポイント：0、2、4 及び 24 時間後（冷所保存）、冷所 24 時間＋
室温 4 時間後

〔結果及び考察〕

①非消去法のTG値は消去法の値より大きかった。

②非消去法値＝消去法値＋グリセリン（または NEFA）値との関係がほぼ成立した。

③しかし、ラットは非消去法値＜消去法値＋グリセリンの傾向がみられた。

④非消去法では血漿で 24 時間保存しても、ほとんど変化しなかった。消去法では 24 時間の保存でTGは低値化、グリセリンは高値化の傾向を示した。

⑤以上より、ラットの場合、消去法を毒性試験に導入するには問題があると考えられた。

ペントバルビタール1回投与によるラット排卵抑制の系統差

○森岡宏至（大阪府大・農・実験動物）

〔目的〕ラットでは、発情前期の日の臨界期（critical period）に中枢神経麻酔剤を投与することにより午後に起こるLHサージが抑制され、排卵が1日遅延する。また同処置を翌日も継続すると、さらに排卵は1日遅延することが知られている。性周期の揃った動物を必要とするとき、この方法を利用して性周期の同期化が図られる。本実験では、Dark Agouti(DA)系ラットとSprague-Dawley(SD)系ラットを用いて、性周期の同期化を目的として、ペントバルビタールナトリウム(PB)1回投与による排卵の1日遅延を試みたところ、両ラット間でPBに対する感受性に差異が見られたので報告する。

〔方法〕使用動物は3～5か月齢のDAおよびSD系未経産ラットで、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、規則正しく4日の性周期を連続3回以上繰り返して示したものを実験に供した。PB(Nembutal、35mg/kg)は発情前期の10:30 h～17:00 hの間で1回腹腔内に投与した。PB投与2日後または3日後に卵管を取り出し、卵管圧平法により排卵検査し、卵管内卵子の存在部位(卵管膨大部または狭部)により排卵日を判定した。

〔結果〕1) 10:30 hのPB投与：DAラットの排卵は全例(12例)とも抑制されなかった。SDラットでは12例中7例(58%)の排卵は抑制されなかったが、5例(42%)で排卵は1日遅延した。2) 12:00 hのPB投与：DAラットは16例中8例(50%)の排卵が抑制されなかったが2例(13%)は1日遅延し、6例(38%)は2日間遅延した。SDラットは12例全例の排卵が1日遅延した。3) 13:00 hのPB投与：DAラットは25例中10例(40%)の排卵が1日遅延し、10例(40%)は2日間以上遅延した。SDラットは18例中16例(89%)が1日遅延した。4) 15:00 hのPB投与：DAラットは26例中、1日遅延したのが2例(13%)、2日間遅延したのが12例(75%)であった。SDラットは、1日遅延したのが16例中12例(75%)で、2日間遅延したのが3例(19%)であった。5) 17:00 hのPB投与：DAラット、SDラットともに排卵は抑制されなかった。6) DAラットでは、15:00 hのPB投与によって排卵遅延が2日間またはそれ以上の期間におよぶ例が多く観察されたので、PB投与3日後に排卵検査し、追加検討した。その結果、25例中9例(36%)が1日、7例(28%)が2日、4例(16%)が3日間の排卵遅延を示した。

〔結論〕以上の結果より、発情前期の臨界期でのPB投与によるLHサージの抑制に伴う排卵抑制に対して、SDラットでは、1日の排卵遅延が高率に起こった。しかし、DAラットでは、2日間あるいは3日間の排卵遅延が見られ、DAラットとSDラットでは臨界期におけるPBに対する感受性に差異のあることが認められた。PBの1回投与で、排卵の1日遅延による性周期の同期化は、DAラットではSDラットほど高率には起こらないことが示唆された。

霊長類の室内人工繁殖法 —ニホンザルおよびカニクイザルの人工授精法—

○鳥居 隆三（滋賀医大・動物施設）・和 秀雄（大阪大・人間科学部）

霊長類の中のマカカ属サル類は医学研究用動物として広く用いられてきているが、最近では脳研究、成人病・老人病研究等での需要がさらに増している。しかしながら、実験用霊長類の大部分を占めるマカカ属サル類のカニクイザル、アカゲザル等はそのほとんどを外国からの輸入に頼っている。一方、同じマカカ属であり、我が国にのみ生存するニホンザルも一部用いられているが、それらは有害鳥獣として捕獲された野生の個体であり、実験動物として利用するに当たって幾つかの問題がある。そこで我々は遺伝学的に均一でありかつ微生物学的に清浄な国産の医学研究用霊長類を作出することを目的として、ニホンザルの実験動物化を進めるに当たってその基礎となる室内周年人工繁殖方法の確立を試みている。今回は、その中の人工授精法についてニホンザルとカニクイザルの経膈的精液注入法による成績を報告する。

（方法）

ニホンザルは、交尾期、非交尾期に各々6頭、計12頭を、カニクイザルでは4頭の、各々成熟メスを用いた。ニホンザルの交尾期およびカニクイザルでは腹腔鏡により卵胞の発育状態から排卵日を推定し、またニホンザルの非交尾期ではPMSGにより卵胞を発育させ、hCGによって排卵を誘起した後、各々精液を経膈的に注入した。精液はペニス法による電気刺激法によって採取し、液化後、Whitten's mediumにより洗浄、caffeineを加えてcapacitationを行いswim upしたもののみを $2.5-5.0 \times 10^7/\text{ml}$ の濃度に調整して用いた。注入方法は、直腸から指で子宮、頸管部を支持しつつ、1 mlの注射筒を付けたラット用経口ゾンデを経膈的に子宮体部内に誘導する方法によった。なお、2～3回/週、橈側皮静脈から無麻酔下にて採血し、血中のProgesterone(P)とEstradiol- 17β (E_2)の測定を行った。

（結果および考察）

ニホンザルの交尾期の6頭の中で、精子を子宮体部内に注入出来た3頭は全て妊娠し、内2頭は出産(168、171日目)を認めたが1頭は途中流産(151日目)した。精子注入が子宮頸部内に止まった3頭ではいずれも妊娠しなかった。また非交尾期では子宮体部内に注入出来た4頭を含め、6頭いずれも妊娠しなかった。一方、カニクイザルでは子宮体部内に注入できたもの、子宮頸部に止まったもの、各2頭の内、各々1頭で妊娠が見られ、内1頭は出産(158日目)、1頭は流産(117日目)した。この時の血中Pと E_2 は人工授精後40～70日頃から増加が見られ出産前まで高い値が見られた。一方妊娠途中で流産した例では、流産の約10日前頃より急激なPと E_2 の低下が見られたが、流産児には形態学的に何ら異常は見られなかった。以上の様に経膈法による人工授精法は、比較的簡便な方法であり、しかも子宮体部内に精子を注入することによって高い妊娠率を得ることから、室内人工繁殖方法として有用な手段であると考えられる。しかしながらニホンザルの非交尾期では妊娠には至らなかったことから、ニホンザルの室内周年人工繁殖法の確立にはこの期での精子活性、受精、着床、妊娠維持等の問題点を解決しなければならず、現在、体外受精・顕微授精—胚移植法とともにさらなる検討を進めている。

カニクイザルにおける薬物誘発性皮膚掻き行動の観察

若狭芳男 (株式会社 イナ リサーチ・薬理・依存性)

ヒトではモルヒネの投与により掻痒症 (Pruritus) が発現することが知られているが、これを動物で再現した報告は少ない。今回、3 種類のオピオイドをカニクイザルに静脈内投与して全身の皮膚掻き行動を観察し、さらに、モルヒネ静脈内投与による皮膚掻き行動の発現機序におけるヒスタミン受容体の関与を検討した。

【方法および結果】体重 3.6 から 4.7 kg のオスのカニクイザル 4 頭を用いた。動物をモンキーチェアーに保定して薬物を投与し、投与 10 分前から 1.5 時間後までビデオ撮影して皮膚掻き回数をカウントした。その結果、モルヒネ (Fig. 1) およびメサドンの 0.25 および 1 mg/kg, i.v. では頭部、軀幹および四肢に皮膚掻きが発現しその回数は用量依存的に増加したが、U-50,488 の 16 および 64 μ g/kg, i.v. では皮膚掻きは発現しなかった。モルヒネ 1 mg/kg, i.v. による皮膚掻きは、ナロキソン 1 mg/kg, s.c. の前処置で完全に拮抗され (Fig. 1)、ヒスタミン H_1 受容体拮抗薬のピリラミン 4 および 16 mg/kg, s.c. の前処置で用量依存的に抑制されたが (Fig. 2), H_2 受容体拮抗薬のランチジン 1 および 4 mg/kg, i.v. の前処置では影響されなかった。モルヒネ 1 mg/kg, i.v. による皮膚掻きの観察を 2 ないし 8 ヶ月の間隔で 4 回繰り返した結果、3 頭で皮膚掻き回数が漸増した。

【考察】カニクイザルではオピオイドの静脈内投与により全身性の皮膚掻きが発現し、その発現機序にはオピオイド μ あるいは δ 受容体が関与するが κ 受容体は関与しないことが示唆された。モルヒネによる皮膚掻き行動の発現機序にはヒスタミン H_1 受容体が関与するが H_2 受容体は関与しない可能性が示唆されたが、ピリラミン前処置ではモルヒネ投与後に中枢抑制症候が観察されたことから、皮膚掻き行動が非特異的に抑制された可能性も考えられた。また、モルヒネによる皮膚掻き行動には感受性亢進が認められたが、その発現機序は不明である。

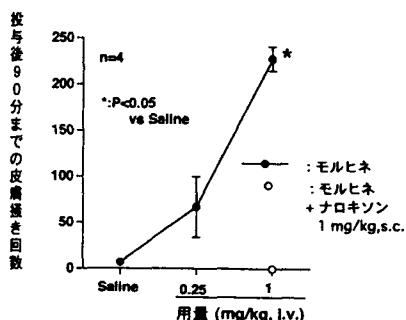


Fig. 1 カニクイザルにおけるモルヒネによる皮膚掻き行動

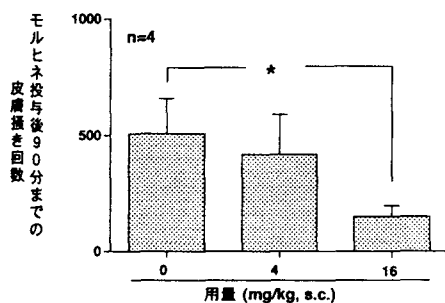


Fig. 2 カニクイザルのモルヒネ皮膚掻き行動に及ぼすピリラミンの影響

< 第 57 回研究会 (平成 10 年 3 月 6 日)>

テーマ：「マウスの新たな利用法を求めて」

1. マウス突然変異を利用した形態形成機構の遺伝学的解析
城石 俊彦 (国立遺伝学研究所系統生物研究センター)

マウス突然変異を利用した形態形成機構の 遺伝学的解析

国立遺伝学研究所・系統生物研究センター・

哺乳動物遺伝研究室 城石 俊彦

マウス遺伝学は、ここ数年間に目覚ましい発展を遂げてきた。特に、PCR法で検出できるマイクロサテライトに代表されるDNA多型マーカー座位が9,000近く開発されゲノム上に詳細にマップされている。これらのマーカーを指標にして突然変異遺伝子の連鎖解析を行えば、高密度な遺伝的地図の作成が可能である。また、人工酵母染色体（YAC）やBacterial Artificial Chromosome (BAC) をベクターとしたゲノムライブラリーも複数作製されており、これらを利用した物理的地図作成法が開発されている。さらに遺伝的地図と物理的地図を結合させることによって、染色体上の位置情報を出発点として突然変異の原因遺伝子をクローニングするいわゆるポジショナル・クローニング法が確立されてきた。この方法によって疾患関連遺伝子や形態形成関連遺伝子等の単離が次々と成功している。

私たちの研究室では、上記のマウス遺伝学の進歩を基礎として、四肢形成や中軸形成に異常を示すマウス突然変異の原因遺伝子をポジショナル・クローニング法によって単離し、形態形成機構を遺伝学的視点から解析しようとしている。脊椎動物の四肢の前後軸は、発生胚の肢芽の後端部のZPAと呼ばれる中胚葉領域に、ショウジョウバエのセグメントポラリティー遺伝子のホモログであるSonic hedgehog (*Shh*) 遺伝子が特異的に発現されることで決定される。しかし、*Shh* 遺伝子の領域特異的な発現制御や肢芽前後軸形成の基本的な遺伝的制御機構については不明のことが多い。私たちは、これまで四肢形態形成に異常を示すマウス突然変異を国内外から多数収集し、それらを用いた形態形成の遺伝的制御に関する研究を押し進めてきた。それらの突然変異の中で軸前側多指症（親指が小指化する）を示すマウス突然変異では、*Shh* 遺伝子の肢芽前端部での異所的発現がみられ、*Shh* 遺伝子の領域特異的な発現制御の破綻により変異表現型が表れることが明らかとなってきた¹。従って前述のマウス突然変異の

原因遺伝子の本来の機能は、*Shh*遺伝子の発現を肢芽後端部のZPA領域に局在化させることにありと考えられる。また、マウス軸前側多指症突然変異の多くは、神経管形成異常などの中軸系の異常を伴うことが多い。*Shh*遺伝子は、神経管形成の背腹軸の形成にも働いていることが知られており、これらのマウス四肢異常の突然変異の原因遺伝子は、四肢にとどまらず初期胚発生の形態形成において重要な機能を有すると考えられる。しかし、これらの遺伝子の機能をさらに深く理解するためには、問題とする遺伝子の単離が不可欠である。私たちは、軸前側多指症を呈し*Shh*遺伝子の肢芽軸前側での異所的発現が観察される代表的突然変異であるHemimelic extratoes (*Hx*)の原因遺伝子をポジショナル・クローニング法で単離するために大規模な連鎖解析を行い、現在、高密度な遺伝的地図とBACによる物理的地図の作製が完了している。

また、私たちの研究室で長年にわたって樹立してきた野生マウス由来の系統が多数の軸前側多指症突然変異の表現型を抑制することが最近になって明らかになってきた。これらの独自のマウス系統を用いた交配実験によって突然変異遺伝子の作用を修飾する修飾遺伝子 (Modifier Genes) が存在することも確かになってきた。このように、私たちは、マウス形態形成に働く未知遺伝子をポジショナル・クローニングの手法で単離し、合わせてそれらの遺伝子と相互作用する修飾遺伝子を遺伝学的手法で明らかにして四肢や中軸系の形態形成に関与する遺伝子ネットワークを明らかにすることを目的に研究を進めている²。

上記に述べてきたような特定の生物機能に障害を持った突然変異系統やヒト疾患モデルマウス系統の示す個体レベルでの表現型を出発点として、それらの表現型を制御する遺伝子を同定し遺伝子機能を解明する方法論は、一般にForward Geneticsと呼ばれている。マウスの四肢の形態形成においては、幸いなことに多数の既存の突然変異系統が存在し、それらを用いることで基本的な形態形成に係わる遺伝子のネットワークの理解が原則として可能と思われる。しかし、他の研究分野では多くの場合これほど利用できる突然変異が存在するわけではなく、また、次々と既存の変異遺伝子がポジショナルクローニングによって明らかにされ研究対象とすべき生物学的に重要な突然変異系統が枯渇するという状況が生ずる懸念がある。そこで、欧米では、化学変異原を用いた大規模なミュータジェネシス計画が提唱され、一部は既にスタートしている。こ

これらの計画では、幅広い遺伝形質について網羅的に突然変異をスクリーニングすることを目的としており、出来れば表現型変異を示す全ての遺伝子座における突然変異を収集しようということから飽和ミュータジェネシスと呼ばれている。

このような状況下で、国立遺伝学研究所系統生物研究センターでも化学変異原であるクロラムブシル (CHL) によるミュータジェネシスプログラムを開始している。DNA鎖クロスリンカーでもあるアルキル化剤のCHLは、減数分裂後の精細胞に対して遺伝子欠失型の突然変異を高頻度に誘発する。私たちのプロジェクトは、表現型のスクリーニングを優先する Phenotype-driven のスクリーニング以外に、特定の遺伝子を欠失した突然変異をスクリーニングする遺伝子優先 (Gene-driven) のミュータジェネシスを含んでいる。CHLによる突然変異の頻度は、1遺伝子座1配偶子当たり 13×10^{-4} であるから、変異原処理されたマウスを独立に1,000個体以上調べれば、理論上、特定の遺伝子が欠失した1つの突然変異マウスが検出される確率はかなり高くなる。このプロジェクトでは、進化上大きく離れた日本産野生マウス由来のMSM系統の雄にCHLを投与し、標準的な実験用マウスのC3H系統の雌と交配して少なくとも1,000個体以上のF1マウス雄を作製する。それらの精子を個体毎に全て凍結し凍結精子バンクを構築する。これと平行して、これらのF1マウス個体からゲノムDNAを調製する。MSMとC3H系統の間では遺伝子の3'末端の非翻訳領域の塩基配列にDNA長の多型が高率にみられるから、適当なPCRプライマーを設定すればゲノムDNAをテンプレートにして多くの遺伝子で父母由来のアリルを簡単に区別することができる。この方法でMSM系統由来のアリルに対して遺伝子欠失を示すマウス個体が検出されたら凍結精子を用いた試験管内受精によって突然変異マウス個体を作製する。この方法は、遺伝子優先のミュータジェネシスであるが、同時にF1マウスについて表現型のスクリーニングを行えば通常の化学変異原を用いた場合と同様に表現型優先のミュータジェネシスとなる。劣性変異のスクリーニングをしたいときは3世代にわたる交配実験を行う必要がある。現在、特に優性突然変異に絞って表現型スクリーニングを開始しており、さらに遺伝子優先のスクリーニングを2次元ゲル電気泳動によるゲノムスキャンニング法やPCR法で進めている。

参考文献

1. Masuya, H., Sagai, T., Wakana, S., Moriwaki, K. and Shiroishi, T.: A duplicated zone of polarizing activity (ZPA) in polydactylous mouse mutants. *Genes & Dev.*, 9: 1645-1653, 1995.
2. Masuya, H., Sagai, T., Moriwaki, K. and Shiroishi, T. :Multigenic control of the localization of the zone of polarizing activity in limb morphogenesis in the mouse. *Devl. Biol.*, 182: 42-51, 1997.

< 第 58 回研究会（平成 10 年 6 月 19 日）>

テーマ：「実験動物を用いた新興細菌感染症の研究と伝染病予防法の改正」

1. ヒトにおける *Helicobacter* 感染と動物モデル

喜多 正和（京都府立医大実験動物室）

2. マウスモデルにおける腸管出血性大腸菌 O 157 感染の病態解析

喜多 英二（奈良県立医大細菌学）

3. 伝染病予防法改正に伴う動物由来感染症対応の方向性

内田 幸憲（神戸検疫所）

ヒトにおける*Helicobacter* 感染と動物モデル

京都府立医科大学実験動物室

喜多 正和

1、新興感染症

新興感染症 (emerging infectious disease) とは、新しく発見された病原体による感染症であり、再興感染症 (re-emerging infectious disease) とは、すでになら抑制されていたにもかかわらず再び増加してきている感染症を指す。これは1995年、新興および再興感染症に関するワーキンググループがクリントン大統領に提出した報告書による定義で、当時から数えておよそ20年以内に発見された病原体による感染症が新興感染症、その20年間に増加してきたものが再興感染症とされている。主な新興感染症には、エイズ、ウイルス性肝炎、ウイルス性出血熱などウイルス感染症が多いが、1996年日本で大流行した腸管出血性大腸菌O157をはじめ新型コレラやヘリコバクター・ピロリ感染症など細菌感染症も数多く含まれている (図1)。

2、*Helicobacter pylori* (*H. pylori*)

1983年オーストラリアのWarren and Marshallにより、慢性活動性胃炎患者から分離されたグラム陰性螺旋状細菌である (表1)。ヒトの胃炎の原因菌であるとともに、胃十二指腸潰瘍の再発因子・治癒遅延因子であることが明らかとなっている。また、1994年、NIHでは、*H. pylori* を消化性潰瘍の重要な病因因子として消化性潰瘍の治療には*H. pylori* の除菌が必要であるとする統一見解を公表し、同年WHOは*H. pylori* をGroup 1 (Definite carcinogen) の癌原性を有するものと規定している。

1) *H. pylori* 感染と胃炎

1985年、Marshall は*H. pylori* 培養液を経口摂取し、急性胃炎を生じることがヒトで証明した。さらに、1987年にはMorris and Nicholsonにより、同じく*H. pylori* 培養液を経口摂取することにより急性胃炎から慢性胃炎を生じることが証明している。また、内視鏡検査後に胃炎を起こす症例が報告されており、消毒不十分な内視鏡に付着している*H. pylori* による感染が原因であることが明らかとなっている (内視鏡検査後急性胃粘膜病変: Acute Gastric Mucosal Lesion)。数多くの動物感染モデルの結果を合わせて、*H. pylori* 感染により胃炎が惹起されることは間違いのない事実と考えられる。

2) *H. pylori* 感染と消化性潰瘍

従来、no acid no ulcer と言われているように、胃酸、ペプシンなどの攻撃因子と、粘液、血液などの防御因子のバランスが崩れて消化性潰瘍が発症すると考えられていた。しかし、*H. pylori* の発見以来、消化性潰瘍と*H. pylori* の関連が次々と明らかにされてきた。胃潰瘍患者の60～80%、十二指腸潰瘍患者の90～95%が*H. pylori* 陽性であるとされ、潰瘍発症の原因因子として*H. pylori* の役割はほぼ確定されてきている。

また、消化性潰瘍に対する治療法についても、従来は酸分泌抑制剤を長期間投与することで治療していた消化性潰瘍が、抗生物質を中心としたわずか1～2週間の除菌療法により*H. pylori* を除菌することで治癒させることが可能となってきた。現在、プロトンポンプ阻害剤と抗生剤2種類を組み合わせたNew Triple Therapy が主体となっており、除菌率は86～95%であるが、耐性菌の出現が問題になりつつある（表2）。

3) *H. pylori* 感染と胃癌、MALTリンパ腫

萎縮性胃炎は、一般に胃癌の前癌状態と考えられている。そして、その萎縮性胃炎は*H. pylori* 感染が成因として広く認識されている慢性胃炎の最終的過程と考えられることが、胃癌発生と*H. pylori* 感染との関連性を推測される要因である。また、前述したようにWHOが「*H. pylori* はdefinite carcinogen である」と結論した根拠は、膨大な疫学調査の結果から胃癌発生と*H. pylori* 感染の間に統計学的に有意な関連が認められたからである。

一方、胃癌以外の腫瘍としてMALTリンパ腫が知られている。胃は本来、正常ではリンパ組織の存在しない臓器であるが、胃壁を介して常に外界と接触しているため、その防御機構として、粘膜内にリンパ組織が後天的に形成される。これがmucosa-associated lymphoid tissue (MALT) である。また、REAL分類において、MALTリンパ腫はmarginal zone のB細胞から発生した腫瘍であるとされている。

H. pylori 感染と胃癌あるいはMALTリンパ腫の関連については、その関連性は認められているものの、発癌機序など不明な点が多い。我が国においても厚生省科学研究の「*H. pylori* 感染の早期発見とその除菌による胃癌の予防に関する研究」が現在進行中であり、その成果が期待される。

3、*Helicobacter* 感染動物モデル

H. pylori の発見以来、ヒト以外の動物の胃からも各種の*Helicobacter* 属に属する菌が多数発見され報告されている（表3）。

従来、*H. pylori* の感染モデルは、この菌が定着しうる宿主が限定されていると考えられていたため、サルなどの霊長類を用いた実験系、あるいは無菌ブ

タや無菌ビーグルなどの大動物での感染実験の成功例しか報告されていなかった。しかし、最近になってヌードマウスに本菌が定着することが報告され、実験用小動物でも感染実験が可能となり、特にスナネズミでは慢性胃炎から潰瘍形成、腸上皮化生が起こることが報告され、本年には胃癌発症も報告されている（表4）。マウスにおいても、*H. felis* の感染により高率に慢性胃炎が発症することが証明され、実験用小動物を用いた感染系が確立されつつある。

我々も、*H. pylori* 臨床分離株とC57BL/6マウスを用いた感染モデルを確立し、菌株により感染率は異なるものの、CPY2052株などは1回の経口投与により100%感染が成立すること、少なくとも15カ月以上は定着が確認され、感染4週間後より胃粘膜下に細胞浸潤を伴う急性胃炎像が認められること、長期感染では慢性胃炎あるいは胃粘膜のびらんも認められることを報告している。

4、*Helicobacter* 感染における γ 型インターフェロン (IFN- γ) の役割

微生物の感染に対し、宿主は多様な生体反応により感染防御を行っている。生体防御機構として、非特異的防御機構、体液性免疫、細胞性免疫などがあるが、これらの免疫機構を調節する因子として多数のサイトカインが深く関わっていることはよく知られた事実である。

感染症における生体内でのサイトカインの役割を研究する方法として、感染動物モデルを用いて感染にともない誘導されてくるサイトカインを検出する方法、サイトカインを外部から投与する方法、サイトカインに対する中和抗体を投与する方法、サイトカインに対するアンタゴニストを投与する方法などがあるが、最近、特定のサイトカイン遺伝子やレセプター遺伝子を不活性化したノックアウトマウスやサイトカイン遺伝子を導入したトランスジェニックマウスを作成し、サイトカインの役割を研究する報告が増加している。

感染により誘導されるサイトカインとしては、IL-1, -2, -3, -4, -5, -6, -7, -8, -10, -11, -12, IFN- α , - β , - γ , TNF- α , CSF, TGF- α , - β などが報告されているが、これらがすべて感染防御因子として働いているわけではなく、感染増悪因子として働いているものもある。これまでの報告では、細菌感染、ウイルス感染、寄生虫感染に対して、IFN- γ は主に感染防御因子として働いていることが明らかとなっている。しかし、最近、con. A 誘発肝炎においてIFN- γ は炎症誘導因子であることが報告されている。

我々は*H. pylori* 感染におけるIFN- γ の役割を明らかにするため、IFN- γ ノックアウト (KO) マウスを用いて感染実験を行なった。*H. pylori* 臨床分離株8株をwild type C57BL/6 マウスとIFN- γ KOマウスに感染させたところ、ATCC43504株、CPY2052株、HPK127株はwild type C57BL/6 マウスには100%感染したが、他の株では感染が成立しないマウスが見られた。しかし、100%感染が成立しなかった株においても、IFN- γ KOマウスに感染させると100%感染が成立した

(表5)。また、感染が成立した臨床分離株の胃内定着菌数を検討した結果、いずれの株においても、IFN- γ KOマウスの胃内菌数は正常マウスに比較して有意に多かった(図2)。これらの結果から、*H. pylori* 感染においてIFN- γ は感染防御因子として働いていることが明らかとなった。

一方、感染マウス胃の病理学的検討を行なった結果、CPY2052株の感染により、感染4週間後より胃粘膜下に細胞浸潤を伴う急性胃炎像が認められ、感染15カ月後には一部びらんを伴う慢性胃炎像を示した。しかし、IFN- γ KOマウスにおいてはまったく細胞浸潤が認められず、正常の胃組織像であった。この結果より、*H. pylori* 感染においてIFN- γ は炎症誘導因子としても働いていることが明らかとなった。

これらの*H. pylori* 感染マウスモデルは、*H. pylori* 感染に対する感染防御のメカニズムを解析する一つのモデルになるばかりでなく、胃炎の発症機序の解明、さらには胃癌発生機序の解明に有用であると考えられる。さらに、*H. pylori* 感染に対する治療法ならびに予防法の開発にも有用と考えられる。

図1 Emerging infectious diseases(新興感染症)

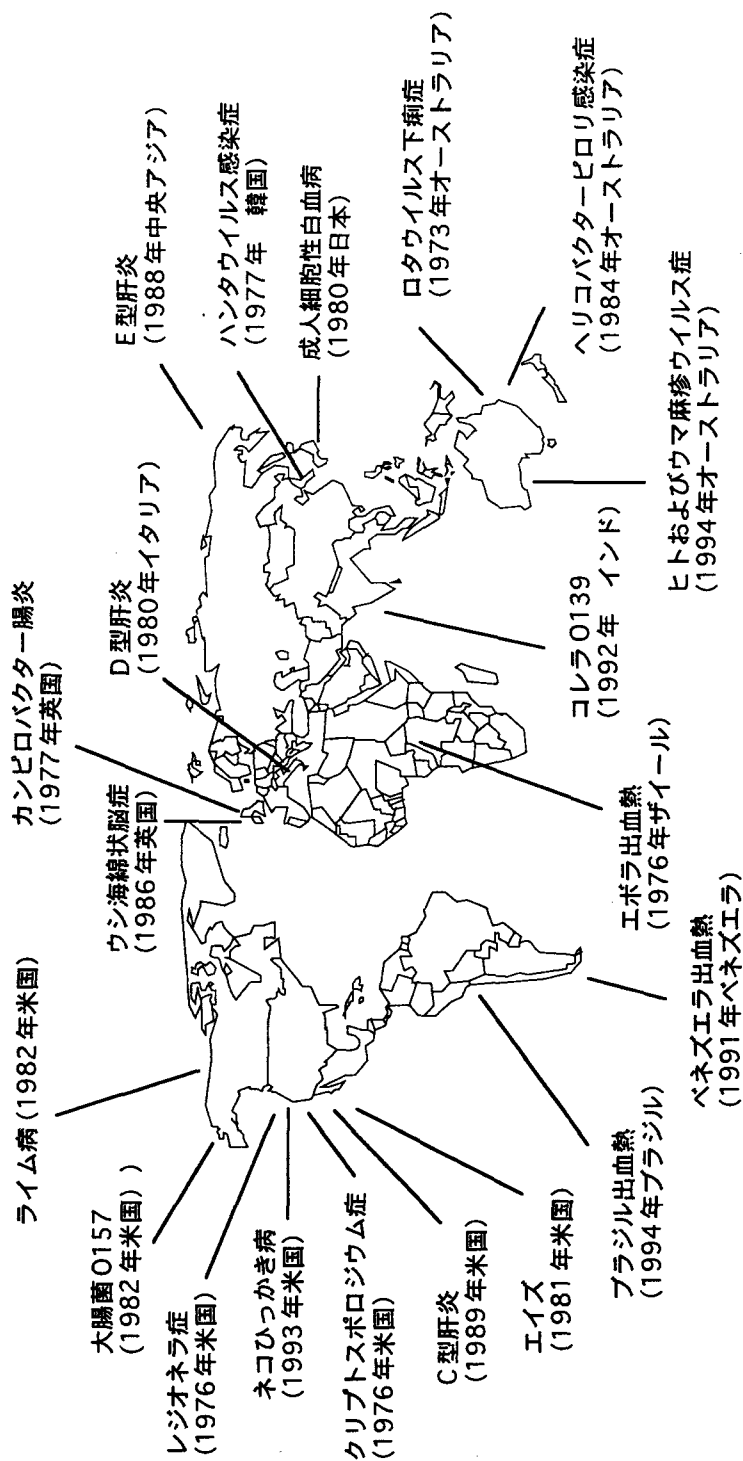


表 1 *H. pylori* の細菌学

分類	: <i>Helicobacter</i> 属
形態	: 0.5~1.0 X 2.5~4.0 μ m のグラム陰性螺旋菌 有鞘鞭毛 (単極に 5 本前後) 至適培養条件を逸脱すると球状 (coccoid form) に変化
培養条件	: 微好気環境 (5 %O ₂ , 10~15%CO ₂ , 80~85%N ₂) pH 6.0~7.0 血液、血清添加 高湿度 最低 3 ~ 4 日 (5 ~ 7 日)
選択培地	: Skirrow's medium HPA 培地 など
生物学的特徴	: ウレアーゼ活性が他の腸内細菌よりも 100~1000 倍高い カタラーゼ陽性、オキシダーゼ陽性

表2. *H. pylori* の除菌治療

-
- 1、Classical triple therapy : 除菌率 73~94%
ビスマス製剤 + 抗生剤 2 種類
 - 2、Dual therapy : 除菌率 40~83%
プロトンポンプ阻害剤 (PPI) + 抗生剤 1 種類
 - 3、New triple therapy : 除菌率 86~95%
プロトンポンプ阻害剤 (PPI) + 抗生剤 2 種類

プロトンポンプ阻害剤 (PPI) : オメプラゾール 20mg
 抗生剤 : クラリスロマイシン (CAM) 400mg
 アモキシシリン (AMOX) 1500mg
 メトロニダゾール (MNZ) 400mg

耐性菌出現頻度 : クラリスロマイシン (CAM) 0~7%
 アモキシシリン (AMOX) 0%
 メトロニダゾール (MNZ) 14~54%

表3 各種動物から分離されたヘリコバクター属菌

菌種	宿主(所在)	病原性	ウレアーゼ	GC(mol%)
<i>H. pylori</i>	ヒト(胃)	ヒト胃炎・胃潰瘍(胃癌?)	+	35-37
<i>H. acinnox</i>	チータ(胃)	チータ胃炎	+	30
<i>H. canis</i>	イヌ(腸管)	不明	-	48
<i>H. cinaedi</i>	同性愛者(腸管)	ヒト腸炎	-	37-38
<i>H. felis</i>	ネコ・イヌ(胃)	マウス胃炎	+	42
<i>H. fennelliae</i>	同性愛者(腸管)	ヒト腸炎(?)	-	35
<i>H. heilmannii</i>	ヒト・ネコ・イヌ(胃)	ヒト胃炎(?)	不明	-
<i>H. hepaticus</i>	マウス(肝臓・腸管)	マウス壊死性肝炎	+	-
<i>H. muridarum</i>	ネズミ(腸管・胃)	ネズミ胃炎	+	34
<i>H. mustelae</i>	フェレット(胃)	フェレット胃炎・胃潰瘍	+	36
<i>H. nemestrinae</i>	ブタオザル(胃)	不明	+	24
<i>H. pametenis</i>	トリ・ブタ(腸管)	不明	-	38
<i>H. pullorum</i>	トリ・ヒト(腸管)	ヒツジ流産・ヒト腸炎	+	34-35

表4 現在報告されているヘリコバクター感染動物モデル

動物種		前処置	感染率	胃病変
サル	カニクイザル	無	0～100%	慢性胃炎
	アカゲザル	ファモチジン	25～100%	慢性胃炎
	ニホンザル	ファモチジン	58%	慢性胃炎
ブタ	無菌ブタ	オメプラゾール他	73～100%	慢性胃炎
	ミニブタ	ファモチジン+Agar	100%	慢性胃炎
イヌ	無菌ビーグル	無	100%	
マストミス		無	100%	慢性胃炎
スナネズミ		無	100%	慢性胃炎
マウス	ヌードマウス	無	100%	
	ddY	無	50～100%	慢性胃炎
	C57BL/6	無	100%	慢性胃炎

Table 5. Colonization of various *H. pylori* strains in C57BL/6(IFN- $\gamma^{+/+}$) and C57BL/6(IFN- $\gamma^{-/-}$) mice 4 weeks after infection.

	C57BL/6 (IFN- $\gamma^{+/+}$) mice		C57BL/6 (IFN- $\gamma^{-/-}$) mice	
	Infection rate (infected/total)	Magnitude of infection (log of CFU/g tissue)	Infection rate (infected/total)	Magnitude of infection (log of CFU/g tissue)
ATCC43504	10/10	4.0 $\pm$ 0.1	10/10	4.9 $\pm$ 0.1
ATCC51110	0/6	-	0/6	-
CPY2052	10/10	3.8 $\pm$ 0.1	7/7	4.8 $\pm$ 0.2
CPY3401	1/8	3.4	9/9	3.7 $\pm$ 0.3
HPK127	7/7	3.5 $\pm$ 0.1	8/8	4.3 $\pm$ 0.2
KP41a	5/6	4.2 $\pm$ 0.3	6/6	4.6 $\pm$ 0.2
KP64b	3/6	3.6 $\pm$ 0.1	6/6	4.3 $\pm$ 0.4
KP48a	0/6	-	6/6	4.1 $\pm$ 0.2

*Data was expressed as means $\pm$ SE

Table 6. Colonization and histopathological inflammation degree after long-term infection with *H. pylori* in C57BL/6 (IFN- $\gamma^{+/+}$) and C57BL/6 (IFN- $\gamma^{-/-}$) mice.

Mice	<i>H. pylori</i>	Time after infection			
		4 weeks	8 weeks	15 months	
C57BL/6 (IFN- $\gamma^{+/+}$)	CPY2052	*Magnitude of infection	3.8 $\pm$ 0.1	3.8 $\pm$ 0.2	5.1 $\pm$ 0.5
		Inflammation	moderate	moderate	severe
	ATCC43504	*Magnitude of infection	4.0 $\pm$ 0.1	3.9 $\pm$ 0.1	^b NT
C57BL/6 (IFN- $\gamma^{-/-}$)	CPY2052	Inflammation	none	none	^b NT
		*Magnitude of infection	4.8 $\pm$ 0.2	4.5 $\pm$ 0.2	5.1 $\pm$ 0.3
	ATCC43504	Inflammation	none	none	none
		*Magnitude of infection	4.9 $\pm$ 0.1	4.2 $\pm$ 0.2	^b NT
		Inflammation	none	none	^b NT

*Magnitude of infection was expressed as log for CFU/g tissue. Data were expressed as means $\pm$ SE.

^bNT : not tested

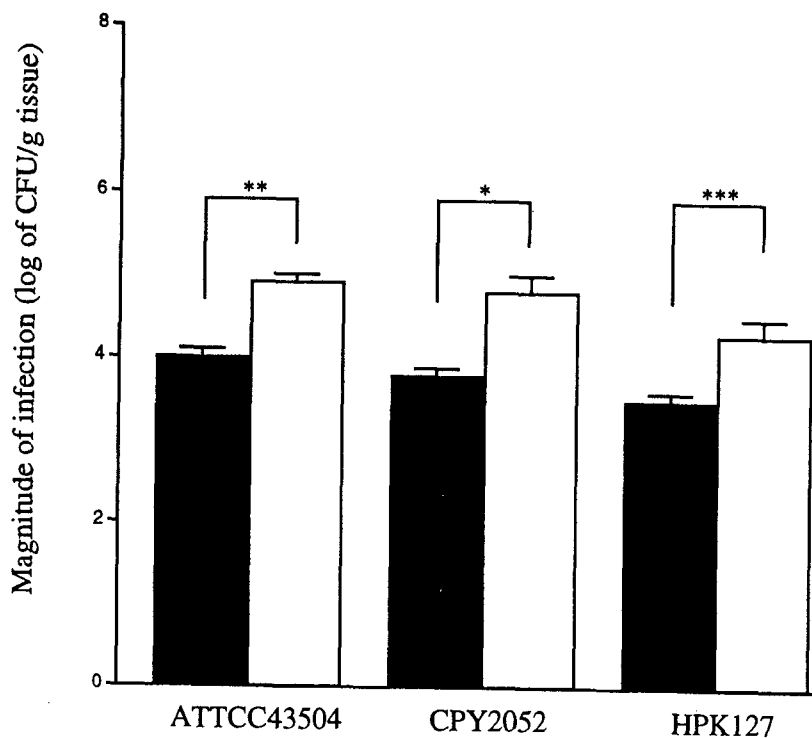


Fig. 2. Colonization of *H. pylori* strains in C57BL/6 (IFN- $\gamma^{+/+}$) and C57BL/6 (IFN- $\gamma^{-/-}$) mice 4 weeks after infection. Data are expressed as means $\pm$ SE. * : $p < 0.001$, ** : $p < 0.005$, *** : $p < 0.05$.

■ : C57BL/6 (IFN- $\gamma^{+/+}$) mice, □ : C57BL/6 (IFN- $\gamma^{-/-}$) mice

マウスモデルにおける腸管出血性大腸菌O157感染の病態解析

喜多英二

奈良医大、細菌学

1. 目的

腸管出血性大腸菌(enterohemorrhagic *E. coli*, EHEC) O157による出血性大腸炎及び併発する溶血性尿毒症症候群(HUS)は、小児や高齢者が標的となりやすい(1-4)。1996年度の堺を中心とする*E. coli* O157感染の流行時に、多くの開業医から患者の多くに偏食傾向や肉嫌いの子供が存在するという情報を得た。小児の腸粘膜上皮の発育は成人レベルに迄十分達していないが、マウスモデルを作成するについては、現在研究室で用いられているマウス飼料は蛋白25%含有し、過多栄養であるため幼若マウスでさえ、成熟マウス並の腸上皮の発育が認められる。そこで我々は低蛋白食を用いて低栄養マウスを作成することで、腸の発育不全状態を実現した。本年度は、この低栄養マウスを用いることでEHECマウスモデルを作成し、感染後の細菌学的・病理組織学的及び免疫組織学的検索を行い、本症の発症機序を*in vivo*において解析した。

2. 方法

1 マウス：離乳直後から5%蛋白食で2週間飼育した5週令雌C57BL/6マウスを低栄養マウスとして実験に用いた。対照には25%正常蛋白食で飼育した同年齢雌C57BL/6を用いた。両飼料の組成をTable 1に示した。

2 菌株：*E. coli* O157:H7 N-5、N-9 (Stx1⁺/Stx2⁺)及びN-10株(Stx1⁺/Stx2⁻)、*E. coli* O157:H7のN-20株(Stx1⁺/Stx2⁻)、*E. coli* O26:H11 (Stx1⁺/Stx2⁺) NM6株、いずれも臨床分離株を用いた。N-9株からはgradient plate法にてストレプトマイシン(SM) 100mg/ml耐性株(SM^rN-9)を誘導し実験に供した。いずれの菌株もgelatin-disk法(5)にて-80℃で保存し、各実験毎に新しい保存ディスクを融解して用いた。感染実験には、tryptic soy brothで18時間37℃静置培養菌株を洗浄して用いた。各菌株の特性はTable 2に示した。

3 感染：種々の濃度に調整した菌液0.1mlをステンレス経口ゾンデにて直接マウス胃内へ接種した。SM耐性株感染実験では感染3日前からSM (100mg/L)含有飲料水を投与し、感染後も同飲料水を投与した。低栄養マウスでは感染後も低蛋白食を継続した。

4 感染後の腸管内菌数測定：糞便1mg中のSM^rN-9株の定量はSM 100mg/ml含有のsorbitol IPA bile salts (SM-SIB)培地を用いて行った。マウス下腹部を指先で圧迫することで強制的に排出させた糞便をサンプルチューブに採取し重量測定後、50mg/mlになる様にSM (100mg/ml)含有のPBSを加え、滅菌プラスチック・スティックで十分にホモジネートした。同PBSで種々の希釈液をつくり、希釈液100mlをSM-SIB培地で培養し、コロニー数を算定した。同プレート上のコロニーでsorbitol(-)で、O157抗血清で凝集するコロニーのみを計算した。

5 腸管内及び血中Stx量の測定：Meridian Diagnostic社製のO157 LPS定量ELISAキットを用いて測定した。O157 LPS量の同キットにおける定量性を以下の方法で確認した。SM^rN-9株の 5×10^8 cfu/ml濃度の生菌液を作製し、PBSにて段階希釈後、正常マウス糞便のホモジネート液100mlに同量の希釈菌液をまぜ、十分にVortex mixingを行った後SM-SIB培地にてコロニー数を測定した。同混合液をELISAキット添付の希釈液にて4倍希釈した後、その100mlをELISAプレートウエルに添加し添付書の方法に従ってアッセイ後吸光度を測定し、吸光度と菌数の標準曲線を求めた。同法では、糞便mg中に 9×10^2 - 5×10^6 cfu数のSM^rN-9が存在するときに吸光度と菌数に相関性が得られた。感染マウスから得られた糞便をPBSを用いて50mg/mlの濃度にホモジネートし、その100ml中のO157 LPS量を同ELISAプレートを用いて解析し450nmにおける吸光度を求め、標準曲線より糞便中のO157 LPS量を決定した。LPS量は相当する菌数で表示した。

血中Stx量は、同じくMeridian Diagnostic社製のPREMIER EHEC ELISAキットを用いて定量した。本キットではStx1とStx2を区別して定量出来ないため、精製Stx1(6)を用いて本キットにおける標準曲線を作製した。本キットでの毒素の測定限界は便中では10pg/mg、血清中では20pg/mlであった。マウスの便検体はPBS中で50mg/mlのホモジネートを作製し、血清は限界濾過で20倍に濃縮し、キット添付の検体希釈液にて5倍に希釈した後、それぞれの検体の本キッ

トによる測定吸光度(A_{450})を求め、標準曲線から毒素量を算定した。

6. 組織学的検索：パラフィン切片を用いて、HE染色、Alcian blue/PAS染色及びLuxol fast blue (LFB)/HE染色を行った。LFB染色は有髄神経を特異的に染色し、脱髄部位ではLFBに染色されず、eosinに染色される。

7. 免疫染色：脱パラフィン切片を用い、 H_2O_2 液で内因性ペルオキシダーゼを不活化し、BSAによるブロッキングを施した後、2,000倍希釈抗Stx1⁺Stx2モノクロン抗体(Toxin Technology社)を4℃一晩反応させ、その後常法に従ってビオチン化抗マウスIgG F(ab')₂抗体、streptavidin-peroxidaseを反応させ、発色はDBAを用いた。

8. 血液検査：マウス血清中の尿素窒素、クレアチニン量を全自動日立液体アナライザーを用いて測定した。血中の白血球数及び血小板数はEDTA添加血液を用いて測定した。

3. 結果

1. 低栄養マウスと正常マウスに対するN-9株及びSM^rN-9株の致死感染に必要な最小有効菌量をTable 3に示した。両菌株とも 2×10^6 cfu量以上の経口感染で低栄養マウスの80%以上を感染後10日目迄に死亡させ得ることが認められた。一方、正常栄養食マウスでは 2×10^7 cfu量でも両菌による感染死は認められなかった。Table には示さないが、正常食マウスでは 5×10^9 cfu量で約20%のマウスが死亡するにとどまった。また、感染3日前からSM投与を行っても、 2×10^6 cfu量のSM^rN-9感染低栄養マウスの死亡率は有意に上昇しなかった。

2. 各菌株のマウス致死活性の比較をTable 4に示した。Stx1のみを産生するN-10、N-20株の致死活性はStx1・Stx2両毒素産生性のN-9、N-5株より低く($P < 0.05$)、低栄養マウスにおいては、Stx2がStx1よりも毒性が強いと考えられた。さらにStx1・Stx2両毒素を産生するO26のNM6株の致死活性は、O157の各株より低かった。

3. SM^rN-9感染後の便中生菌数及びO157 LPS量の測定結果をFig. 1に示した。(A)低栄養マウスにおいては、感染後2日目迄はLPS量と生菌数は同じ変化を示し、接種菌の多くが2日目迄に腸管内から排泄されるものと思われた。2日目以降急激に生菌数の増加がみられ、4日目にピークを認めた後、ほぼ直線

的に生菌数は減少した。しかしLPS量は感染2～4日目迄は増加がなく、生菌数が減少し始める4～5日目に一過性に増加後、ゆっくりと低下した。(B)一方、正常食マウスでは感染1日目から低栄養マウスに比して、生菌数は少なく約1/10量で、3日目までに算定可能レベル以下に減少した。しかしLPS量はゆっくりと減少し5日目まで測定可能であった。このことから、正常食マウスではSM^rN-9株は腸管内で定着・増殖し得ないものと考えられた。

4 SM^rN-9株感染後の便中・血中毒素量の変化をTable 5に示した。低栄養マウスでは感染2日目から便中のStxが検出され、4日目がピークであった。さらに血中には感染3～5日に微量の毒素が検出された。一方、正常食マウスでは、感染後1～8日目迄の間、便中・血中共に毒素が検出されなかった。

5 組織学的検索

感染前の低栄養食マウスの腸管組織像は、正常食マウスに比して、小腸粘膜(空腸)の絨毛の数が少なく、浮腫状で発育が悪いのが特徴的であった。

この傾向は回盲部で特に著しかった。腸管全体にAlician blue/PAS染色でAlician blue陽性の細胞の数が少なく、粘液層形成能が低いと考えられた。

SM^rN-9感染マウスの腎では尿細胞上皮の変性や浮腫状変化が認められたが、糸球体には顕著な病理所見を認めなかった。大腸・空腸には一部びらん性変化が認められたが、出血性変化や潰瘍は存在しなかった。一方、死亡直前のマウスでは大脳側頭葉皮質に細胞浸潤を伴う出血性変化が認められた。しかし、LFB/HE染色では脳全体に強い変性所見は認められなかった。

6 Stxの免疫染色

大脳の出血部位にStxの免疫反応は認められなかったが、海馬領域にはStxの免疫染色陽性所見が確認された。この部位はLFB/HE染色陽性部位と一致することから有髄神経がStxの存在部位と考えられた。腎では、尿細管上皮に弱いながらStxの免疫反応が認められたが、糸球体には存在しなかった。

7 血液所見

SM^rN-9感染3日目以降の低栄養マウスの血液塗末標本で、いわゆるhelmet様血球の存在が確認された。血液化学では尿素窒素が優位に上昇したが、クレアチニンの上昇は認めなかった(Table 6)。感染後白血球数の上昇が認められたが、血小板には優位の変化が確認されなかった。

4. 考察

低栄養マウスは、Stx2を産生する*E. coli* O157に対して、高い感受性を示し、死亡原因は脳病変が主体ではないかと推察された。一方、正常栄養マウスにおいては 2×10^6 cfu量の経口感染ではStx産生*E. coli* O157が全く定着できない事が確認された。

低栄養マウスの本菌に対する高感受性の理由については、本研究では解析を試みなかったが、既に低蛋白食飼育マウスの生体防禦機構の変化について多くの報告がある。特にChan et al. (7)は、低蛋白食が細胞性免疫を特異的に低下させることを結核感染モデルを用いて明らかにしている。しかし、低栄養マウスにおける*E. coli* O157感染は、結核と異なり感染後数日で病状が進行し、80%以上のマウスが10日前後で死亡する。このような急激な病態の進行においては細胞性免疫が初期抵抗性を担っているとは考え難く、寧ろ非特異的抵抗性の障害が、易感染因子になっていると考えられる。腸管の組織学的検索結果から、低栄養マウスでは空腸～結腸にかけての腸管上皮の発育不良が顕著であり、粘液層も薄い。正常マウスと低栄養マウスにおける腸管上皮層の差異は、生体内の真の腸管上皮と粘液層を欠く培養腸上皮細胞の差異に一致するものである。低栄養マウスの腸管上皮細胞では、物理的バリアーが少ないことで、*E. coli* O157が容易に接着できるものと思われる。この事は、腸管粘膜上皮の発育が成人レベルに達していない10才以下の子供や、粘膜上皮バリアーに衰退の見られる高齢者に本感染症の多い理由と推察される。

多くのマウス感染実験においては、SMによるマウスの前処置に加えて $10^8 \sim 10^9$ cfu量以上の感染菌量を必要とする。しかし、低栄養マウスのSM⁺N-9に対する感受性はSM処理で有意の亢進は認められなかった。この事実は、離乳直後から低蛋白食で飼育することで、既に腸内の正常細菌叢の変化が生じている可能性を示唆するものである。このような細菌叢の変化は免疫系の発育のために営まれている細菌抗原刺激の量的・質的变化をもたらし、局所における粘膜免疫の発達も悪いものと思われる。事実、組織学的検索では低栄養マウス的小腸粘膜下のリンパ組織の発育不良が観察された。(我々は現在、ELISPOT法によりIgA分泌細胞数を低栄養及び正常栄養マウス間で比較中である)。低蛋白食によって誘導されるこれらの非特異的防禦因子の低下が、低栄養マウスに対する

SM^rN-9株の最小致死菌量を正常マウスのそれに比して、約1/1000に低下させ得る理由と考えられた。

Fujii et al. (8)は、Stx産生*E. coli* O157のマウス感染モデルにおいて、経口感染後マイトマイシン(MMC)(2.5mg/kg)を腹腔内接種することで、*E. coli* O157の致死活性が亢進することを報告している。MMCはStxをコードするtemperate phageを活性化したり(9)、微小血管傷害(microangiopathy)を誘発(10、11)する薬剤である。このことから、MMCが腸管粘膜上皮を傷害することで、腸上皮における透過性が亢進するものと推察されている(8)。低蛋白食による低栄養は組織像からもみても、腸粘膜上皮での透過性亢進を招いており、事実、感染初期に感染マウス血中でTNF- α 産生が起り得(未発表データ)、微量ながらLPSが透過性の亢進した腸上皮から吸収されているものと思われる。特にTNF- α (12)やIL-1 β (12、13)等の炎症性サイトカインがStxの作用を増強させることが報告されていることから、腸管粘膜上皮からStxのみならず、LPSも吸収されることが本症の病態成立に重要な役割を担っていると推察された。Stx2を産生する*E. coli* O26のマウス致死活性が低かったことから、O157 LPSが他の血清型LPSよりも強い毒性を有している可能性も示唆され、現在検討中である。

低栄養マウスでは接種菌の多くが腸管内に定着することなく、感染1～2日間で排出され、この間菌体の溶菌やStxの菌体外への排出は検出レベル以下で、毒素産生は感染3～5日目にみられる菌の増殖に伴ってのみ認められた。その後は溶菌現象が起り、糞便中のLPS量が増加すると考えられ、この時期には感染菌からのStxの放出は増殖期と違って少量であった。また増殖期にのみ血中から微量の毒素が検出されたことは、この時期に腸管上皮粘膜の傷害が最も強いものと考えられる。腸管上皮に付着した*E. coli* O157が増殖時に大量のStxを産生するものと考えられる。一方、正常マウスでは接種菌は腸管内で増殖することなく排出されるため、Stx産生が検出レベル以下であったと思われる。これらの事実から、粘膜上皮の物理的バリアーが*E. coli* O157感染に対する抵抗性因子として極めて重要であると考えられた。

マウスではヒトと異なり腎病変が比較的少なく、寧ろ脳病変が主体をなしていると考えられた。特に出血性病変は最も顕著な病変であった。しかし、免疫染色でこの部位に毒素の存在は確認できず、海馬部に最も顕著な毒素に対する

免疫染色陽性像が得られた。LFB/HE染色では免疫反応陽性部位に有髄神経の存在が確認されたが、脱髄性の変化は確認できなかった。これは、低栄養マウスにおける病態の進行が急性であるため、変性所見が出現する前にマウスが死亡するためと思われる。いずれにせよ、海馬部位でのStxの沈着は、海馬が視床下部と交通していることから、自律神経の機能障害を誘発する可能性が推察される。

以上の成績から、*E. coli* O157感染が小児や高齢者に多い理由として、腸粘膜上皮が健康成人の腸に比して十分発育していないか、衰退傾向にあることが一因ではないかと考えられた。特に小児では、腸管における防禦機構が、腸内フローラのバランスや食事内容さらにはストレス等によって大きく変化すると考えられる。現在我々は、蛋白食(糖質過多食)におけるフローラの変化、IgA分泌細胞の変化等を中心に*E. coli* O157に対する易感染要因を更に解析中である。更に、腸管内におけるStx産生機構を、菌の上皮細胞への接着との関連から解析をすすめている。

5. まとめ

5%蛋白含有飼料で飼育した低栄養マウスはStx2産生能を有する*E. coli* O157:H7に高い感受性を示した。高感受性の要因として、腸管粘膜上皮の発育不良が関与していると考えられた。低栄養マウスは 2×10^6 cfu量の*E. coli* O157:H7感染で、感染後3-5日目に腸管内での感染菌の増殖とStxの産生、及び血中Stxの検出が可能であった。感染マウスは10日目迄に80%以上が死亡し、Stxによる脳障害が死亡原因と推察された。本研究に用いた低栄養マウスが*E. coli* O157:H7に高感受性であることは、小児において本菌の感染症が重症化しやすい理由の一つを説明し得るものと思われる。

6. 参考文献

- 1) Riley, L.W., R.S. Remis, S.D. Helegerson, H.B. McGee, J.G. Wells, B.R. Davis, R.J. Hebert, E.S. Olcott, L.M. Johnson, N.T. Hargrett, P.A. Blake, and M.L. Cohen. 1983. Hemorrhagic colitis associated with a rare *Escherichia coli* serotype. N. Engl. J. Med. 308:681-685.

- 2) Karmali, M.A., M. Petric, C. Lim, P.C. Fleming, G.S. Arbus, and H. Lior. 1985. The association between idiopathic hemolytic uremic syndrome and infection by verotoxin-producing *Escherichia coli*. J. Infect. Dis. 151:775-782.
- 3) Karmali, M.A., B.T. Steele, M. Petric, and C. Lim. 1983. Sporadic cases of haemolytic-uraemic syndrome associated with faecal cytotoxin and cytotoxin-producing *Escherichia coli* in stools. Lancet i:619-620.
- 4) Morrison, D.M., D.L.J. Tyrrell, and L.D. Jewell. 1986. Colonic biopsy in verotoxin-induced hemorrhagic colitis and thrombotic thrombocytopenic purpura (TTP). Am. J. Clin. Pathol. 86:108-112.
- 5) Yamai, S., Y. Obara, T. Nikkawa, Y. Shimoda, and Y. Miyamoto. 1979. Preservation of *Neisseria gonorrhoeae* by the gelatin-disc method. Br. J. Vener. Dis. 55:90-93.
- 6) Noda, M., T. Yutsudo, N. Nakabayashi, T. Hirayama, and Y. Takeda. 1987. Purification and some properties of Shiga-like toxin from *Escherichia coli* O157:H7 that is immunologically identical to Shiga toxin. Microb. Pathog. 2:339-349.
- 7) Chan, J., Y. Tian, K.E. Tanaka, M.S. Tsang, K. Yu, P. Salgame, D. Carroll, Y. Kress, R. Teitelbaum, and B.R. Bloom. 1996. Effects of protein calorie malnutrition on tuberculosis in mice. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 93:14857-14861.
- 8) Fujii, J., T. Kita, S. Yoshida, T. Kakeda, H. Kobayashi, N. Nakata, K. Ohsato, and Y. Mizuguchi. 1994. Direct evidence of neuron impairment by oral infection with verotoxin-producing *Escherichia coli* O157:H- in mitomycin-treated mice. Infect. Immun. 62:3447-3453.
- 9) Al-Jumaili, I., D.A. Burke, S.M. Scotland, H.M. Al-Mardini, and C.O. Record. 1992. A method of enhancing verocytotoxin production by *Escherichia coli*. FEMS Microbiol. Lett. 93:121-126.
- 10) Antman, K.H., A.T. Skarin, R.J. Mayer, H.K. Hargreaves, and G.P. Canellos. 1979. Microangiopathic hemolytic anemia and cancer: a review.

Medicine (Baltimore) 58:377-384.

- 11) Valavaara, R., and E. Nordman. 1985. Renal complication of mitomycin C therapy with special reference to the total dose. *Cancer* 55:47-50.
- 12) Louise, C. B., and T.G. Obrig. 1991. Shiga toxin-associated hemolytic uremic syndrome: combined cytotoxic effects of Shiga toxin, interleukin-1 β , and tumor necrosis factor alpha on human vascular endothelial cells *in vitro*. *Infect. Immun.* 59:4173-4179.
- 13) Kaye, S.A., C.B. Louise, B. Boyd, C.A. Lingwood, and T.G. Obrig. 1993. Shiga toxin-associated hemolytic uremic syndrome: interleukin-1 β , enhancement of Shiga toxin cytotoxicity toward human vascular endothelial cells *in vitro*. *Infect. Immun.* 61:3886-3891.

Table 1 Ingredients of two diets used in this study

Ingredients	Full-protein diets (%)	Low-protein diets (%)
β-cornstarch	41.5	61.5
mild casein	25.0	5.0
α-potatostarch	10.0	10.0
cellulose powder	8.0	8.0
soybean oil	6.0	6.0
minerals	3.5	3.5
sugar	5.0	5.0
vitamins	1.0	1.0

Table 2 Characteristics of bacterial strains used in this study.

Bacterial strains	Serotype	<i>stx</i> ₁ / <i>stx</i> ₂ ^a	<i>eae</i> ^b	EHEC ^c	EA _{gg} EC ^d
EHEC:					
N-9	O157:H7	+ / +	+	+	—
N-5	O157:H7	+ / +	+	+	—
N-10	O157:H7	+ / —	+	+	—
N-20	O157:H—	+ / —	+	+	—
Control:					
<i>E. coli</i> NP-4 (isolated from a healthy adult)		— / —	—	—	—
<i>S. soerenga</i> O301		— / —	—	—	—

- by PCR using primer specific primers for *stx*₁ and *stx*₂
- by DNA hybridization using a probe specific for *eae* (*E. coli* attaching and effacing)
- by DNA hybridization using a probe specific for the EHEC 60-MDa plasmid
- by DNA hybridization using a probe specific for enteroaggregative *E. coli*

Table 3 Susceptibility of malnourished mice (PCM) to *E. coli* O157:H7 strain N-9.

Mice fed with: ^a	Inoculum size (cfu)	Mortality(%) at 10 days postinfection ^b	
		N-9	SM ^r N-9
Low-protein diet (PCM)	2x10 ⁵	55	50
	2x10 ⁶	90	85
	2x10 ⁷	95	90
Full-protein diet	2x10 ⁵	0	0
	2x10 ⁶	0	0
	2x10 ⁷	0	0

a. Groups of 10 mice were given either a low-protein diet or a full-protein diet from 2 weeks before and during the experiment.

b. Experiments were repeated 4 times, and the mortality rate is expressed as the mean of 4 tests.

Table 4 Comparison of the mortality rate in malnourished C57BL/6 mice after oral infection with various strains of *E. coli* O157 used in this study.

Bacterial strains	Mortality (%) at 10 days postinfection ^a
EHEC:	
N- 9 (O157:H7)	90
N- 5 (O157:H7)	75
N-10 (O157:H7)	40
N-20 (O157:H—)	35
NM-6 (O26:H11)	30
<i>E. coli</i> NP-4 (isolated from a healthy adult)	0
Salmonella	
<i>S. soerenga</i> (O301)	0

a. Groups of 10 mice with PCM were infected intragastrically with 2x10⁶ CFU of Stx-producing *E. coli*, nonpathogenic *E. coli* or *S. soerenga*. Each group consisted of 10 mice. Data were obtained from two separate experiments, and are expressed as the mean of two results.

Table 5 Quantitation of Stx in the stool and serum of mice after infection with strain SM^rN-9.

Days after ^a infection	Malnourished mice		Normonourished mice	
	Stool (pg/mg) ^c	Serum (pg/ml)	Stool (pg/mg)	Serum (pg/ml)
1	ND ^b	ND	ND	ND
2	18.5±2.4	ND	ND	ND
3	32.4±4.3	20±3	ND	ND
4	67.8±9.3	34±5	ND	ND
5	24.6±3.5	26±5	ND	ND
6	12.6±2.2	ND	ND	ND
7	ND	ND	ND	ND
8	ND	ND	ND	ND

a. Mice were intragastrically infected with 2×10^6 cfu of strain SM^rN-9. At each time point, 3 mice randomly selected from each group were sacrificed by extracting blood. Each group consisted of 24 mice. Data were obtained from 2 different experiments and results are expressed as the mean ± SD for 6 samples.

b. ND; not detectable.

Table 6 Blood examination after infection with strain SM^rN-9

Test	Malnourished mice				Normonourished mice			
	Days after infection				Days after infection			
	-1	2	4	6	-1	2	4	6
Leukocytes ($\times 10^3/\text{mm}^3$)	11.5±2.4	19.8±3.6	31.7±8.4	26.4±7.2	12.7±1.6	13.5±2.2	13.3±3.6	14.2±5.8
Platelets ($\times 10^4/\text{mm}^3$)	31.4±9.5	40.8±5.4	30.3±6.7	28.9±4.9	34.8±8.5	36.3±7.9	35.8±6.4	35.2±7.3
Urea nitrogen (mg/dl)	17.4±6.2	21.2±7.1	33.3±15.9	46.6±19.8	18.6±5.8	19.9±7.5	20.7±4.5	19.2±8.9
Creatinine (mg/dl)	0.54±0.19	0.59±0.13	0.63±0.21	0.65±0.17	0.63±0.11	0.61±0.24	0.59±0.18	0.60±0.21

At each time point, three infected or uninfected mice were used.

Data were obtained from three separate experiments and results are expressed as the mean ± SD for nine individual samples.

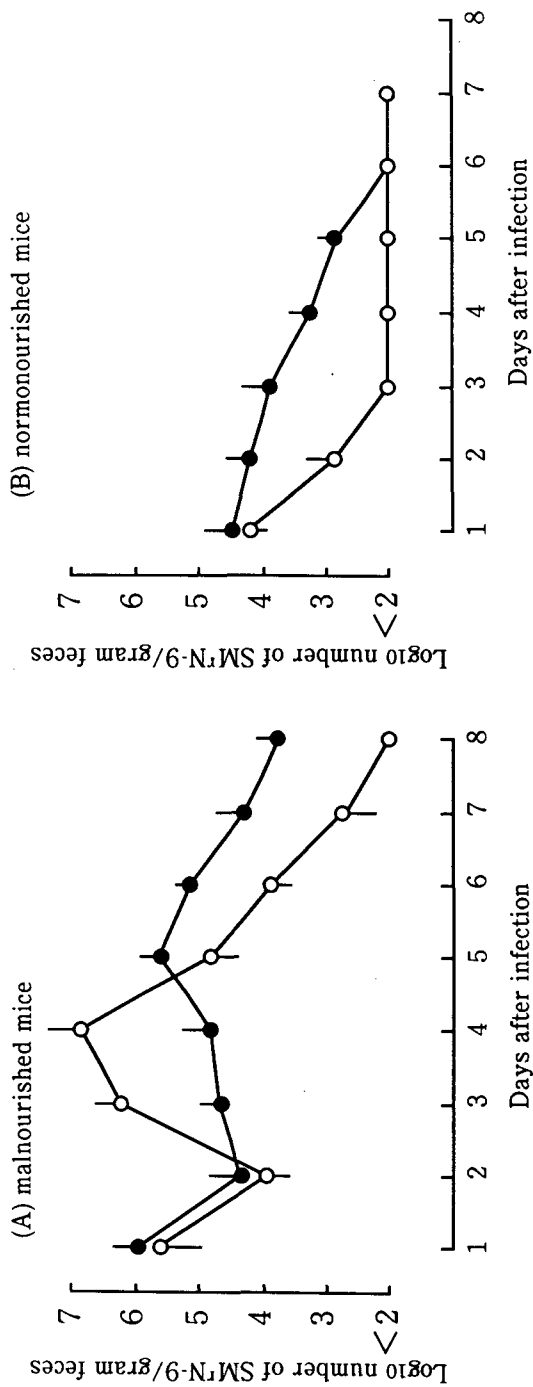


Fig. 1 Quantitation of the viable count and LPS of strain SMrN-9 in the stool of infected mice. The number of CFUs was determined by the plate count and expressed as log₁₀ CFU per gram feces (○). The amount of LPS was measured by ELISA and expressed as the equivalent number (log₁₀) of SMrN-9 organisms per gram feces (●). At each time point, three mice were used and individual samples were assayed in triplicate. Each point represents the geometric mean value of three separate experiments. The bar at each point indicates 1 standard error of the geometric mean value. There was a significant difference between the geometric mean CFU and the geometric mean LPS quantity on days 3, 4, and 7 in malnourished mice as determined by Student's unpaired *t* test ($P < 0.05$). In well-nourished (normonourished) mice, there was a significant difference between these two mean values only on day 2 ($P < 0.05$).

伝染病予防法改正に伴う動物由来感染症対応の方向性

神戸検疫所長

内田 幸 憲

1. はじめに

感染症対策に関わる現行法（平成10年7月現在）は、家畜伝染病予防法及び伝染病予防法という2つの法律を中心に運用されているが、家畜以外の動物と人との間を移行する疾病および感染症（人獣共通感染症）に対応できる法律は狂犬病予防法以外皆無である。このような現状下、近年ペット動物の飼育が盛んとなり、それらのペットもコンパニオンアニマルとしての存在位置にまで人間生活と一体化してきている。一方、地球上におけるグローバリゼーション及び貨物の大量高速化及びコンテナリゼーションのもと、世界各地から我が国への侵入動物・ベクターの侵入確率は高まってきている。このような状況下、我が国において人獣共通感染症対応の視点をもった感染症対応が強く望まれると考える。

2. 我が国への動物輸入および侵入動物の実態

このテーマに対しての正確な数字は犬、猿、鳥類以外は全く不明である。犬（表1）は狂犬病予防法により輸入実態は明らかで、年間1万3千～1万7千頭が輸入されている。猿（表2）、鳥類（表3）は税関、動物検疫所の自助努力で統計がとられ、猿は4～5千頭、鳥類は60万羽余が輸入されている。その他の動物の実態把握は困難に近く、表4に示す聞き取り調査による数値は輸入実数の何割になるのか不明である。税関統計に示された「その他の生きた動物」の数値は2億～1億匹であり、この中から養殖魚の餌となる系ミミズ、ゴカイなど差し引くと年間約7千6百万匹の生きた動物が我が国に輸入されている（食用となるものは含まない）。また、狂犬病予防法においては犬に対してのみ予防接種を義務付けているが、ペットフード工業会調査（表5）によれば飼い犬の登録率（狂犬病ワクチン摂取率）は45.5%であり、猫飼育数とあわせて考えると、予防摂取率は25.5%と狂犬病流行予防が不可能と思われる低率となっている。北海道地区、新潟地区、北部九州地区では密輸入の存在がうわさされている。侵入動物・ベクターに関しては全国検疫所において行った調査研究データがあるが、船舶コンテナ

(表6-1、表6-2)、航空機及びそのコンテナ(表7)(表8)から数パーセントの鼠族の証跡、10パーセント以上の衛生害虫の侵入が証明されている。1995年に話題となったセアカゴケグモの国内定着もうなずける話である。

3. 海外諸国の家畜以外の動物検疫体制(表9)

先進国といわれている国々を調査した。欧米諸国ではマールブルグ病の事件、狂犬病の流行などの過去の事例の反省に立っているのか、多くの国々では動物の海外からの輸入に関しては厳しい規制を行っている。犬以外、何ら輸入規制のないのは我が国くらいである。現在地球上で問題となっている Emerging Infectious Diseases の約半数が人獣共通感染症であることを考えると、我が国での規制が皆無であってよいとはとても思えないことである。

4. 演者が考える重要な人獣共通感染症(表10)

演者がこれまで知り得た情報の中から、人への感染力及び発症した時の重症度(いずれも5段階判定)及び医療経済損失(概算)などのいくつかのファクターから人獣共通感染症対策として是非ともとりあげるべきと考える疾病及び対象動物(含ベクター)を表10に示す。すでに国内で定着、拡散しつつあるエキノコックス症、ライム病などは国内対策のモデルとして取り組み方、対策を確立すべきであろう。サルモネラ、病原性大腸菌群に対してはHACCPの考え方を生産現場にまで広げて対応策を考えるべきではなかろうか。いまだ持ち込まれていない病原体に対しては検疫の確立と国内流通後のチェックシステム、アクティブサーベイランスを含めた対応策が必要であろうと考える。

5. 公衆衛生審議会伝染病予防部会基本問題検討小委員会における動物由来感染症対応の考え方

基本問題検討小委員会の中に Zoonosis 検討作業班(班長・東大農学部 吉川 泰弘教授)が設けられ、200種余りの疾病をその特性(動物から人への感染力、発症率、重症度等)から、動物群別に感染症の重要性の重み付けを行い表11に示した。この作業において、知見が十分に得られていないものもあり、判定、位置づけに苦慮したものもあったが、とりあえず班員の納得できるところに収めた。そして網掛け部分の疾病に対して今後、行政的対応が必要であるとの意見を基本問題検討小委員会に報告した。

結果的には霊長類（ヒトを除く）対応および狂犬病対策としての対象動物の拡大の２点に制限された動物由来感染症対策案としての国会上程となった。しかし、その他の疾病に関しては、今後、科学的データをさらに詳しく示すことを含めた対策確立が望まれている。

6. おわりに

人獣共通感染症（動物由来感染症）対策は我が国においてはようやくその一歩を踏み出したにすぎない。今、地球上で新たに問題となってきた Emerging and Re-emerging infectious diseases の約半数が Zoonosis であることを十分に認識し、今後は医師・獣医師の協力体制を高めなければならない時代になったと思われる。

表1. Zoonosis関連動物輸入実態 動検統計

【犬】

	H.1 (1989)	H.2 (1990)	H.3 (1991)	H.4 (1992)	H.5 (1993)	H.6 (1994)	H.7 (1995)
ア ジ ア 州	789	742	896	1,497	1,063	2,185	4,733
ヨーロッパ州	751	995	1,049	739	821	1,275	1,142
アフリカ州	23	16	15	14	23	23	24
大洋州	95	117	133	176	336	845	762
北米州	12,084	12,257	12,428	10,459	10,676	9,542	11,031
中米州	7	22	40	15	24	26	18
南米州	29	40	40	48	40	33	42
合 計	13,778	14,189	14,601	12,948	12,983	13,929	17,752

表2. Zoonosis関連動物輸入実態 税関統計(動検統計なし)

【猿】 (0106.00-091)							
	1991	1992	1993	1994	1995	1996	1997. ~ 11.
中 国	192	180	353	718	1,822	1,788	2,147
フィリピン	998	828	820	752	401	204	331
ベトナム	—	—	—	—	20	256	253
インドネシア	1,815	1,637	1,632	2,060	914	510	41
マレーシア	—	—	—	4	—	25	—
シンガポール	—	—	—	—	—	—	2
スリランカ	—	—	—	—	—	—	2
ヨーロッパ	196	253	181	55	79	42	81
タイ	43	32	36	290	108	44	82
トルゴ	112	129	212	180	92	—	47
マリ	—	—	—	—	27	—	—
カメルーン	—	—	—	20	82	50	90
タンザニア	65	95	4	102	18	—	—
モーリシャス	—	21	22	53	84	69	—
南アフリカ	—	—	—	—	—	—	10
カナダ	8	3	1	—	—	—	—
アメリカ	74	6	35	22	63	41	70
ガイアナ	1,699	1,874	525	—	91	1,050	476
ブラジル	162	63	78	2	—	—	—
スリナム	—	—	—	—	190	467	577
ペルー	—	—	—	—	—	—	40
その他	2	4	2	—	3	—	—
合 計	5,366	5,125	3,901	4,258	3,994	4,546	4,249

表3. Zoonosis関連動物輸入実態 動検統計

【指定外の鳥類（インコ、オウム、キュウカン鳥）】

	H.1 (1989)	H.2 (1990)	H.3 (1991)	H.4 (1992)	H.5 (1993)	H.6 (1994)	H.7 (1995)
ア ジ ア 州	733,142	613,369	570,271	551,619	528,325	494,792	548,269
ヨ ー ロ ッ パ 州	59,436	53,157	32,056	34,161	57,764	62,139	75,082
ア フ リ カ 州	33,642	33,302	51,968	3,087	2,056	2,748	1,524
大 洋 州	60	267	2,885	1,201	175	397	991
北 米 州	3,785	2,918	5,386	1,483	984	1,116	1,594
中 米 州	591	582	—	—	862	1,121	827
南 米 州	3,650	2,725	2,773	1,188	1,404	669	176
合 計	834,306	706,320	665,339	592,739	591,570	562,982	628,463

表4. 指定外動物の輸入状況 (全日本動物輸入業者協議会及び動物検疫所聞き取り調査)
(1997. 1月～11月)

動物種	全日本動物輸入業者協議会		動物検疫所	
	輸出国	輸入頭数	輸出国等	輸入頭数
※ ネコ		0	携帯 貨物	1,300 800 2,100 (推定値)
※ アライグマ	アメリカ	502		300
キツネ	アメリカ	182	アメリカ (人工繁殖)	182
スカンク	アメリカ	207	アメリカ (人工繁殖)	200
※ フェレット	アメリカ ニュージーランド	8,240 2,767	アメリカ カナダ ニュージーランド	14,768
※ コウモリ	エジプト トゴ イギリス	71 24 10	エジプト	200
リス	?	?	中国 (マレーシア) (野生)	133,088
ハムスター	?	?	ヨーロッパ (人口繁殖)	500,000
その他犬以外の 食物種	アメリカ ヨーロッパ 南アフリカ等	148		

表. 5 日本における犬・猫飼育頭数※と蓄犬登録数(除く沖縄)

地区別飼育頭数及び飼育率

	犬		
	飼育頭数※(千頭)	蓄犬登録数	登録率(%)
全 国 計	9,067	4,140,871	45.5
北海道	379	180,707	47.7
東北	604	391,497	64.8
関東	676	368,658	54.5
京 浜	2,120	945,500	44.6
北 陸	401	299,552	74.7
東 海	1,185	632,349	53.4
京阪神	1,417	491,309	34.7
中 国	686	258,987	37.8
四 国	472	136,418	28.9
九 州	1,127	435,894	38.7
全国誤差	± 454		± 617

※ペットフード工業会調査(1995. 8) (全国 6, 800所帯を抽出し、2ヶ月間に個々に面接調査をして推計)

注 : 関東＝茨城・栃木・群馬・山梨、 京浜＝東京・千葉・埼玉・神奈川、 北陸＝新潟・長野・富山・石川・福井
 東海＝静岡・愛知・岐阜・三重、 京阪神＝大阪・兵庫・京都・滋賀・奈良・和歌山

※犬の飼育率(全国平均 17. 8%)、 ※猫の飼育率(全国平均 10. 6%)

表6-1. 全国の検疫所が実施した船舶のねずみ族駆除免除検査における不合格件数

	1985	1986	1987	1988	1989	1990	1991	1992	1993	(1985~1993) 合計
件数	15/7563	15/7068	11/6754	13/6335	5/6098	5/5965	9/5757	7/5607	4/5201	95/56350
%	0.34%	0.21%	0.16%	0.21%	0.08%	0.08%	0.16%	0.12%	0.08%	0.17%

表6-2. 船舶コンテナ貨物のねずみに関する衛生実態調査

	1975	1993	1994	合計
東京検疫所		5/71 7.04%	6/264 2.27%	11/335 3.28%
横浜検疫所		2/328 0.61%	0/42 0%	2/370 0.54%
名古屋検疫所		0/13 0%	0/47 0%	0/60 0%
大阪検疫所	8/363 2.20%	0/74 1.00%	0/3 0%	8/440 1.82%
神戸検疫所	4/101※※ 4.00%	1/125 0.80%		5/226 2.20%
門司検疫所		0/100 1.00%		0/60 0%
総計	12/464 2.60%	8/711 1.13%	6/356 1.69%	26/1531 1.70%

※ねずみの証跡が見られたコンテナ数/調査コンテナ数

※※1975, 1976年度調査⁴⁾

表7. 航空機及びコンテナ貨物におけるねずみ・衛生害虫の衛生実態調査

調査年度	検疫所	調査航空機 コンテナ数	要 約
1997～94	成田	4, 141機	・衛生害虫が781機(18. 9%)から採取 多い年では60. 4%の航空機から衛生害虫を認める
1981～94	成田		・ねずみの輸入事例10件(機内6例、貨物内2例、手荷物コンテナ1例、 旅行鞆内1例) 12頭を採取
1986～94	大阪	1, 439機	・衛生害虫が252機(16. 9%)から採取
1994	仙台	47機	・衛生害虫が10機の貨物室から多数採取 ・ねずみの生息及び証跡は認められない
	東京 (羽田)	6機 (12コンテナ)	・衛生害虫が4本のコンテナから採取 ・ねずみの生息及び証跡は認められない
	関空	53コンテナ	・ねずみの生息及び証跡、衛生害虫は認められない
	長崎	11機 (17コンテナ)	・衛生害虫(ハエ、アカイエカ)が3機から5種41個体を採用 ・2本のコンテナにアカイエカ、テナガハエトリグモ ・ねずみの生息及び証跡は認められない
	那覇	32機	・ねずみの古い糞が1機 ・衛生害虫が3機から蚊の死骸、2機からハエ、6機からゴキブリを採取 ・その他の虫類が18機から92種、207個体
		(90コンテナ)	・ねずみの証跡なし ・コガタイエカの死骸が1個体 ・その他の虫類が15本のコンテナから採取
			・ねずみの証跡1機、ねずみの輸入事例10件12頭 ・衛生害虫 1, 075機(18. 8%)、22コンテナ(12. 8%)
合 計		5, 730機 172コンテナ	

表8. 新東京国際空港におけるねずみ族の輸入例

成 田 空 港 検 疫 所

No.	年 月	便名・航路	捕 獲 場 所	ねずみの種類	捕獲頭数	備 考
1	May. 1981	JAL 712便 SIN ⇒ NRT	旅客機の貨物室	Suncus murinus ジャコウネズミ	1	
2	May. 1984	JAL 061便 LAX ⇒ NRT	旅客機の客室	Rattus rattus クマネズミ	1	乗組員が航行中に確認し 到着後捕獲
3	Mar. 1986	THA 642便 BKK ⇒ MNL ⇒ NRT	植物防疫所貨物検査場	Mus musculus ハツカネズミ	1	マニラ産パイナップルの梱包内
4	Sep. 1987	MSR 864便 CAI⇒BKK⇒MNL⇒NRT	北緯税関検査場 旅行者の旅行鞆	Rattus sp.	1	マニラの知人宅に宿泊した際に 紛れ込んだと思う(トランク所有者)
5	Oct. 1987	PAL 436便 MNL ⇒ NRT	植物防疫所貨物検査場	Rattus sp.	3	マニラ産洗髪洗剤用添加剤原料の 植物の梱包内
6	Mar. 1989	UAL 820便 MNL ⇒ NRT	南緯手荷物荷揚場 手荷物コンテナ内	Rattus sp.	1	マニラ空港で手荷物コンテナに 侵入したと推定
7	Jun. 1991	FJI 302便 NAN ⇒ NRT	旅客機の操縦室内	Rattus sp.	1	コックピットクルーが航行中に 確認し捕獲
8	Dec. 1992	JAL 019便 ATL ⇒ NRT	旅客機の客室座席下	Mus musculus ハツカネズミ	1	メンテナンス職員が捕獲
9	Dec. 1993	JAL 064便 HKG ⇒ NRT	旅客機の1階 前部ギャレー	Rattus rattus クマネズミ	1	メンテナンス職員が手づかみ
10	Aug. 1994	JAL 70007便 MSP ⇒ NRT	旅客機の客室	Rattus norvegicus ドブネズミ	1	メンテナンス職員が捕獲

表9. 主要国の動物検疫(家畜は除く)

	犬・猫	鳥類	猿	その他
日本	- 健康証明書 - 狂犬病予防接種証明書(犬のみ) 14日以上のかい留(犬のみ)猫はフリー	フリー	フリー	兎は健康証明書必要
中国	健康証明書と狂犬病予防接種証明書	輸入禁止		
韓国	- 健康証明書と狂犬病予防接種証明書 - 特定の国からの輸入をのぞき10日のこう留	- 健康証明書 - 特定の国からの輸入をのぞき10日のこう留		
米国	- 到着時検視あり異常あれば検査 - 狂犬病予防接種証明書(犬のみ)	- 営業用は輸入禁止 - 個人用としても1人2匹まで - 特定港でしか輸入手続できない - 健康証明書 30日間のこう留	- 輸入業者登録制 - ペットザルは輸入禁止	- 営業用は認められない - 輸入者登録必要
カナダ	- 到着時検視あり - 特定の国からの輸入は30日のこう留 - 予防接種証明書	米国以外は事前の輸入許可がなければ輸入できない		
フランス	- 予防接種証明書 2頭まで可	原則輸入禁止	原則輸入禁止	原則輸入禁止
ドイツ	- 事前許可があれば3頭まで許可 - 予防接種証明書	輸入ライセンスが必要 但し小型インコ、オウムは3羽まで健康証明書があれば可	研究用、サーカス用以外輸入禁止	
英国	- 航空貨物便のみ可 - 事前届出 - 健康証明書 6ヶ月のこう留(この間2回の狂犬病予防接種を受ける)	原則輸入禁止 但し個人用ペットは可	ペット用輸入禁止	
オーストラリア	- 生きた動物は原則輸入禁止 - 特定の国については事前許可必要 - 全て明細付貨物とすること(詳細は公表せず)			

表10. 対象疾病および主な対象動物

疾病分類	対象疾病	主たる対象動物	感染力	重症度	備考
ウイルス性出血熱	エボラ	サル	4	5	
	マールブルグ	サル	4	5	
	クリミアコンゴ	鳥(マダニ)	4	5	
	腎症候出血熱	ネズミ	4	4	
	黄熱	サル	4	5	
	デング(出血)熱	蚊	4	3	
神経系疾患	B-ウイルス病	サル	5	5	
	狂犬病	犬、アライグマ等	2	4	ワクチン摂取率激減・要警戒
	ライム病	鳥(マダニ)	2	2	日本で拡散中・要対策
	日本脳炎	蚊	2	3	
呼吸器疾患	オウム病	鳥	2	2	オキシテトラサイクリン乱用
	ハンタウイルス 肺症候群	ネズミ	4	5	
下痢性疾患	サルモネラ	サル、鶏等	4	3	食中毒対応では不十分
	アメーバ赤痢	サル	3	3	
	赤痢	サル	4	2	
	病原性大腸菌群	(牛)	4	3	食中毒対応では不十分
その他	ペスト	ネズミ(ノミ)	5	5	
	エキノコックス症	キツネ、犬	2	4	日本で拡大中・要対策
	マラリア	蚊	2	3	韓国マラリア定着 空港マラリア・要警戒
	ツツガムシ病	つつが虫	2	2	日本で再拡大・要対策

表11. 動物別の感染症重要性別分類

動物群	対策を必要とする動物	感染症の重要性				
		☆☆☆☆	☆☆☆	☆☆	☆	☆
I	霊長類 (ヒトを除く)	エボラ出血熱 マールブルグ病	Bウイルス病	細菌性赤痢 アメーバ赤痢 サルモネラ、結核 デング熱、黄熱		黄線虫症 ジアルジア症
II	風族 節足動物 習性類 (兎、 フレーリー・トング、 マリス等を含む)		ラッサ熱、ペスト ハンタ肺症候群 腎症候性出血熱 クリミア・コンゴ出血熱	リンパ球性脈絡髄膜炎 トリパノソーマ症 デング熱、黄熱 マラリア等(注) リフトバレー熱	発疹熱、発疹チフス 日本紅斑熱、つがが虫病 鼠咬症、Q熱、ライム病 日本脳炎、リーシュマニア症 回帰熱、サルモネラ症	
	II a 侵入動物 II b 研究用 愛玩用		ラッサ熱、ペスト ハンタ肺症候群 腎症候性出血熱	リンパ球性脈絡髄膜炎	発疹熱 日本紅斑熱 鼠咬症	
III a	ネコ、アライグマ スカンク等		狂犬病		野兔病、ライム病、レストピラ症、 仮性結核、トキソプラズマ症	トキソカラ症、バステラ症 アライグマ回虫症
	キツネ		狂犬病		エキノコックス症(多包虫症)	
	コウモリ		狂犬病 狂犬病関連ウイルス病 ウマモーズリウイルス病 (狂犬病)			
	他に属さないヒトが飼育 する可能性のある動物				サルモネラ症	
III b	鳥類		(クリミア・コンゴ出血熱)	オウム病	ライム病	クリプトコックス症
	イヌ		狂犬病		トリパノソーマ症、レプトスピラ症 仮性結核、ライム病 リーシュマニア症、野兔病	ジアルジア症、トキソカラ症 黄線虫症、ブルセラ症 バステラ症
IV	家畜 (ブタ、ウシ、綿羊、 山羊、ウマ) 家禽		狂犬病	リフトバレー熱 結核	Q熱、炭疽、鼻疽、ブルセラ症 腸管出血性大腸菌感染症 サルモネラ症、エルシニア症 リスデリア症、類丹毒、レストピラ症 ライム病、トキソプラズマ症 エキノコックス症(単包虫症)	クリプトスポリジウム症 ジアルジア症、肝蛭症

網掛けの部分、対策を必要とする感染症・(注)バンクロフト系虫症、マレー系虫症、オンコセルカ症、ロア系虫症、常在系虫症を含む。

関西実験動物研究会だより

＜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 18 号に掲載した第 55 回研究会以後、以下の研究会が開催された。

- 1) 第 56 回研究会（平成 9 年 12 月 5 日 於 大阪大学医学部学友会館「銀杏会館」）
会員による研究発表（20 題）

＜特別講演＞

1. 個体レベルでの遺伝子機能研究と動物実験

日下部 守昭（理化学研究所ライフサイエンス筑波研究センター）

2. 医薬品開発過程における薬物体内動態予測：

実験動物からヒトへ、試験管から個体へ

杉山 雄一（東京大学薬学部製剤設計学）

- 2) 第 57 回研究会（平成 10 年 3 月 6 日 於 京大会館）

＜講演会＞ テーマ：マウスの新たな利用法を求めて

1. マウス突然変異を利用した形態形成機構の解析

城石 俊彦（国立遺伝学研究所遺伝実験生物保存研究センター）

2. ヒト染色体導入マウスの作製とその応用

押村 光雄（鳥取大学医学部細胞工学）

＜維持会員ニュース＞

1. （株）実医研 「毒性病理学の分野における精巢毒性の検索方法」

2. （株）ラビトン研究所「RABITON Research System for Future Drug Development」

- 3) 第 58 回研究会（平成 10 年 6 月 19 日 於 大阪大学コンベンションセンター）

＜講演会＞ テーマ：実験動物を用いた新興細菌感染症の研究と伝染病予防法の改正

1. ヒトにおける *Helicobacter* 感染と動物モデル

喜多 正和（京都府立医科大学実験動物室）

2. マウスモデルにおける腸管出血性大腸菌 O157 感染の病態解析

喜多 英二（奈良県立医科大学細菌学教室）

3. 伝染病予防法改正に伴う動物由来感染症対応の方向性

内田 幸憲（神戸検疫所）

＜維持会員ニュース＞

1. セアック吉富（株）「ヘリコバクター感染モデルとしてのスナネズミの有用性」

幹事会、評議員会、総会の議事録

1) 幹事会の概要（平成 10 年 3 月 6 日 於 京大会館）

1. 出席：浅野、阿部、飯田、海野、岡本、喜多、北田、黒澤、芹川、鳥居、新谷、三日月、宮脇、森岡、森本、山中、山本（17名）
2. 議事
 - (1) 平成 9 年度の幹事会の報告事項について、再確認された。
 - (2) 評議員会と総会の打ち合わせが行われた。
 - (3) 平成 10 年度の研究会の予定について、打ち合わせが行われた。
 - (4) 招待講演者の懇親会費を研究会から支出する件が提案され、承認された。

2) 第 16 回評議員会の概要（平成 10 年 3 月 6 日 於 京大会館）

1. 出席：阿部、浅田、浅野、飯田、池田、内海、海野、岡本、喜多、北田、黒澤、塩見、志村、芹川、相馬、竹之下、谷村、螺良、鳥居、新谷、橋本、原田、古河、前田、牧野、増岡、松村、三日月、宮脇、森岡、森本、安田、山中、山本、家森、吉田（36 名）
2. 議事
 - (1) 平成 9 年度事業報告：海野幹事（集会）より平成 9 年度事業報告が行われ、承認された。
 - (2) 平成 9 年度機関誌発行報告：山本幹事（編集）より、当初の計画案どおり、関西実験動物研究会会報第 18 号が発行されたことが報告され、承認された。
 - (3) 平成 9 年度決算報告：喜多幹事（庶務）より平成 9 年度収支決算報告と、監事による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、西条武俊氏（武田薬品）が推薦され、選出された。また、江崎孝三郎氏（大阪府立大）が退会に伴い評議員を退任、故川俣順一、故笹川祐成の両氏の退任が報告され、了承された。
 - (5) 平成 10 年度事業計画案：阿部幹事（集会）より平成 10 年度事業計画案が説明され、承認された。
 - (6) 平成 10 年度機関誌発行報告：山本幹事（編集）より、関西実験動物研究会会報第 19 号の発行を予定している旨説明され、承認された。また、今後、紙質および装丁の変更を検討することが説明された。
 - (7) 平成 10 年度予算案：喜多幹事（庶務）より平成 10 年度の予算案が説明され、承認された。また、役員の葬儀に際しては、研究会より供花を供えること、講演依頼費を増額すること、招待講演者の懇親会費を研究会から支出することが説明され、承認された。
 - (8) その他：芹川会長より、評議員の川俣順一氏、笹川祐成氏のご逝去について報告された。

3) 第 15 回総会の概要 (平成 10 年 3 月 6 日 於 京大会館)

- (1) 平成 9 年度事業報告が行われ、承認された。
- (2) 平成 9 年度においては、当初の計画案どおり、関西実験動物研究会会報第 18 号が発行された旨報告され、承認された。
- (3) 平成 9 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、西条武俊氏(武田薬品)が選出されたことが報告され、承認された。
また、江崎孝三郎氏(大阪府立大)が退会に伴い評議員を退任、故川俣順一、故笹川祐成の両氏の退任が報告され、承認された。集会幹事の委員長として、海野隆氏に代わり阿部敏男氏が就任することが報告された。
- (5) 平成 10 年度事業計画案が説明され、承認された。
- (6) 平成 10 年において、関西実験動物研究会会報第 19 号の発行を予定していること、今後、紙質および装丁の変更を検討することが説明され、承認された。
- (7) 平成 10 年度の予算案が説明され、承認された。また、役員の葬儀に際しては、研究会より供花を供えること、講演依頼費を増額すること、招待講演者の懇親会費を研究会から支出することが説明され、承認された。
- (8) 総会に先立ち、芹川会長から、評議員の川俣順一氏、笹川祐成氏のご逝去について報告され、黙祷を行った。

関西実験動物研究会 会長・幹事・監事名簿

(平成 10 年度)

	名前	所属
会長：	芹川 忠夫	京都大学大学院医学研究科附属動物実験施設
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	京都大学大学院医学研究科附属動物実験施設
集会：	浅野 裕三	田辺製薬（株）安全性研究所
	○ 阿部 敏男	（株）武田ラビックス系統管理部
	海野 隆	日本シェーリング（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 10 年度)

名前	所属
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
阿部 敏男	(株) 武田ラビックス 系統管理部
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)
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
喜多 正和	京都府立医科大学 実験動物室
北田 一博	京都大学大学院医学研究科附属動物実験施設
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
西条 武俊	武田薬品工業 (株) 薬剤安全性研究所
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	
芹川 忠夫	京都大学大学院医学研究科附属動物実験施設
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 附属動物実験施設
新谷 聰	国立循環器病センター 研究所
西宗 義武	大阪大学 微生物病研究所
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) 研究管理部動物飼育室
牧野 進	塩野義製薬 (株) 実験動物研究センター

関西実験動物研究会 評議員名簿 (平成 10 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) 実験動物研究センター
宮瀧 宏彰	(株) 新日本科学
宮嶋 正康	和歌山県立医科大学 動物室
宮脇 茂樹	日本新薬 (株) 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

上記評議員名簿に追加、訂正等があれば

事務局 (TEL : 075-753-4489, FAX : 075-753-4409,
e-mail : doubutsu@med.kyoto-u.ac.jp) にご連絡下さい

《関西実験動物研究会 維持会員》

(五十音順) (平成10年8月現在)

No.	社名	〒	住所
1	(株) イナリサーチ大阪支所	541-0045	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	772-0017	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	564-0043	吹田市南吹田 4-4-1
4	(株) オリエンタル・バイオサービス	615-0882	京都市右京区西京極葛野町 28 番地
5	加商 (株)	103-0024	東京都中央区日本橋 2-14-9
6	鐘紡 (株) 薬品総合研究開発センター	534-8666	大阪市都島区友淵町 1-5-90
7	北山ラベス (株)	396-0000	長野県伊那市荒井区川北 3052
8	(株) ケアリー	531-0072	大阪市北区豊崎 4-12-1
9	(株) ケー・エー・シー	604-8423	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	533-0021	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	520-3423	滋賀県甲賀郡甲賀町五反田 1405
12	(株) 資生堂 医薬品研究所	236-8643	横浜市金沢区福浦 2-12-1
13	(株) 実医研	103-0021	群馬県吾妻郡吾妻町大字大戸 3303-58
14	白井松器械 (株)	540-0003	大阪市中央区森ノ宮中央 1-19-16
15	白銀工業 (株)	547-0001	大阪市平野区加美北 4-6-19
16	(株) 新日本科学	892-0871	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	573-0028	枚方市河原町 6-10-205
18	セアック吉富 (株)	871-0801	福岡県築上郡吉富町大字小祝 955
19	大日本製薬 (株) 開発研究所・安全研	564-0053	吹田市江の木町 33-94
20	武田薬品工業 (株) 創薬研究本部	532-8686	大阪市淀川区十三本町 2-17-85
21	田辺製薬 (株) 研究開発企画センター総務部事業課	532-8505	大阪市淀川区加島 3-16-89
22	(株) 夏目製作所	113-0034	東京都文京区湯島 2-18-6
23	日本エスエルシー(株)	601-8151	京都市南区上鳥羽塔ノ森東向町 93-8
24	日本クレア (株)	550-0003	大阪市西区京町堀 1-13-2
25	日本商事 (株) 医薬研究所	567-0806	茨木市庄 2-24-3
26	日本新薬 (株) 創薬研究本部	601-8550	京都市南区西大路通八条下ル
27	日本チャールスリバー (株)	550-0005	大阪市西区西本町 1-11-7
28	日本ベーリンガーインゲルハイム (株)	666-0113	川西市矢間字高田 103
29	(株) ハイゲン	349-0124	埼玉県蓮田市末広 1-2-7
30	藤沢薬品工業 (株) 実験 サービスセンター	532-8514	大阪市淀川区加島 2-1-6
31	扶桑薬品工業 (株) 研究開発 センター	536-0025	大阪市城東区森の宮 2-3-30
32	丸石製薬 (株) 中央研究所	538-0042	大阪市鶴見区今津中 2-2-18
33	(株) 三菱化学安全科学研究所大阪支店	530-6035	大阪市中央区北浜三丁目 1-6
34	吉富製薬 (株) 福岡安全性研究所	679-2211	兵庫県神崎郡福崎町山崎 214-1
35	(株) 美濃ラボ	503-0321	岐阜県海津郡平田町今尾 1195-1
36	(株) ラビトン研究所	677-0032	兵庫県西脇市中畑町 718

上記維持会員名簿に追加、訂正等があれば下記までご連絡下さい

事務局 (TEL: 075-753-4489, FAX: 075-753-4409, e-mail: doubutsu@med.kyoto-u.ac.jp)

《会員の異動》

(平成9年10月～平成10年8月)

入会者

藤島 昇一	塩野義製薬(株)新薬研究所
桑村 有規	田辺製薬(株)安全性研究所
境 陽子	塩野義製薬(株)油日ラボラトリーズ
堀川 洋子	大阪大学医学部附属動物実験施設
若狭 芳男	(株)イナリサーチ 薬理研究部
田畑 信子	武田薬品工業(株)薬安研・光支所
小田 厚子	武田薬品工業(株)薬安研・光支所
龍門 徳彦	(財)たばこ産業弘済会
山村 道夫	マルゴ・リサーチサービス
新井 健史	加商(株)
西条 武俊	武田薬品工業(株)薬剤安全性研究所
森岡 一輝	ロート製薬(株)生物臨床研究部開発支援G
中島 文晴	(株)化合物安全性研究所 病理検査室

退会者

長崎 徹	田辺製薬(株)安全性研究所
市川 一	加商(株)ライフサイエンスグループ
上島 育二	藤本製薬(株)
植野 一郎	バイエル薬品(株)中央研究所
岳 乗飛	大阪大学医学部附属動物施設
片山 泰人	
中村 政美	富山医科薬科大学動物実験センター
谷内 孝次	大阪大学医学部附属動物実験施設
佐々木 弘	日本チャールズリバー(株)
桑村 有規	田辺製薬(株)安全性研究所
湯浅 啓史	田辺製薬(株)安全性研究所
川俣 順一	
加堂 洋一	藤沢薬品工業(株)実験サービスセンター
笹川 祐成	
今西 るみ	日本ベーリンガー・インゲルハイム(株)
秋山 純一	(株)加美乃素本舗 開発研究部
松林 清明	京都大学霊長類研究所
江崎 孝三郎	大阪府立大学農学部
朴木 進	御木本製薬(株)研究開発部
日野 雅生	塩野義製薬(株)新薬研究所
江角 吉造	日本シェーリング(株)
菅 千里	(株)化合物安全性研究所 病理検査室
岡本 明	日本メジフィジックス(株)兵庫工場
橋本 岩雄	日本キヤスト・マリオン・レル(株)研究開発本部
田邊 好男	千寿製薬(株)クリエイティブセンター

関西実験動物研究会（個人会員名簿） 1998年8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	543-0055	大阪市天王寺区悲田院町 8-26-903	アニマルケア
青野 皆基	532-8686	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	532-0011	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	520-3241	滋賀県甲賀郡甲西町北山台 1丁目 18-9	
秋山 潔	480-1103	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
○ 浅田 孝	532-0031	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	532-8505	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	640-1473	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	532-8505	大阪市淀川区加島 3-16-89	田辺製薬（株）安全研
◎◎ 阿部 敏男	532-8686	大阪市淀川区十三本町 2-17-85	（株）武田ラビックス 系統管理部
安倍 宏明	550-0005	大阪市西区西本町 1-11-7	日本チャールズリバー（株）
新井 健史	530-0001	大阪市北区梅田 1-2-2-800	加商（株）
荒木 宏昌	536-0025	大阪府城東区森ノ宮 2-3-3	扶桑薬品工業（株）研究開発センター
有富 博之	561-0825	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	541-8505	大阪市中央区道修町 3-2-10	田辺製薬（株）製品開発センター
安藤 孝夫	532-8686	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	236-8643	横浜市中区金沢区福浦 2-12-1	（株）資生堂 研究開発本部 医薬品研究所
飯塚 三喜	666-0131	川西市矢間字高田 103	日本ベーリンガー・インゲルハイム（株）
○ 池田 卓也	619-0200	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	606-8316	京都市左京区吉田二本松町	京都大学大学院人間環境学研究所
石井 昭男	755-0057	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	300-2656	茨城県つくば市真瀬 940-1	三協ラボサービス（株）つくば営業所
石川 隆司	564-0053	吹田市江ノ木町 3 3 - 9 4	大日本製薬（株）総合研究所
石東 蒸治	349-0124	埼玉県蓮田市末広 1-2-7	（株）ハイゲン
石割 秀樹	505-0307	岐阜県加茂郡八百津町野上字火打平 1649-11	日本クレア（株）
市田 州	569-1125	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	532-8686	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	520-3423	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
乾 俊秀	532-8505	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	578-0901	東大阪市加納 7 丁目 23-3-112	
今井 章浩	665-0876	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
新比恵 啓志	532-8505	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	532-8686	大阪市淀川区十三本町 2-17-85	武田薬品工業（株）薬理研究所
岩堀 恭祐	520-3001	滋賀県栗太郡栗東町東坂 91	（株）ケーエーシー
う○ 内海 健二郎	604-8423	京都市中京区西の京西月光町40	（株）ケーエーシー
浦谷 衛	525-0025	草津市西渡川 2-3-1	石原産業（株）中央研究所
◎◎ 海野 隆	532-0004	大阪市淀川区西宮原 2-6-64	日本シェーリング（株）研究開発本部 安全研
え 榎本 康弘	220-8146	横浜市中区みなとみらい 2-2-1 ランドマーク46階	日本農産工業（株）
江馬 真	540-8146	大阪市中央区法円坂 1-4-43	国立衛生試験所大阪支所
お○ 及川 弘	525-0028	滋賀県草津市上笠 2-1-8-1	
大江 治	532-0031	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
大神 弘	561-0827	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	532-8686	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	520-3423	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	535-0004	大阪市旭区生江 1-8-14	沢井製薬（株）大阪研究所
大野 周三	532-0031	大阪市淀川区加島 2-1-6	藤沢テクニス（株）業務Ⅱ部
大原 忠雄	520-3423	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	532-8686	大阪市淀川区十三本町 2-17-85	（株）武田ラビックス 系統管理部
岡 智通	532-0002	大阪市淀川区東三国 4-4-15 コラム新大阪 6 F	（株）富士バイオメディックス
岡崎 彰亮	105-0012	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	532-0003	大阪市淀川区宮原 5-1-3	（株）ボソリサーチセンター
◎◎ 岡本 宗裕	565-0871	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	564-0053	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	464-0044	名古屋千種区自由ヶ丘 2-12-4-104	
萩野 信二	567-0878	大阪府茨木市蔵垣内 1-3-45	住友製薬（株）茨木工場
奥田 誠治	586-0006	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	485-0811	小牧市光ヶ丘 3-39-15	
奥本 正昭	599-8231	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	532-8686	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
小田 厚子	743-0011	山口県光市光井字武田 4720	武田薬品工業（株）薬安研・光支所
か 麓山 莊一郎	565-0871	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

関西実験動物研究会（個人会員名簿） 1998年8月現在

	氏名	〒	住所	所属
	櫻原 昭裕	771-0132	徳島市川内町平石字夷野 224-2	大鵬薬品（株）
	加藤 毅	550-0003	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	532-0031	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	541-0048	大阪市中央区瓦町 1-6-7	（株）トーマンケミカル大阪 ファインケル部
	金城 義明	598-0061	泉佐野市住吉町 26	日本製薬（株）大阪研究部
	金田 平八郎	677-0032	西脇市中畑町 718	ラビトン研究所
	川合 是彰	335-0015	埼玉県戸田市川岸 2-2-50	田辺製薬（株）医薬育成研究所
○	河井 祥一郎	538-0042	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	528-0052	滋賀県甲賀郡水口町大字宇川字稲場 555	（株）環境バイリス研究所
	川西 和夫	520-2152	天津市月輪 3丁目 5-25	科研製薬（株）製剤研究部
	神田 政典	561-0825	大阪府豊中市二葉町 3-1-1	塩野義製薬（株）新薬研究所
き	岸本 嘉夫	520-3423	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
○○	喜多 正和	602-0841	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	606-8501	京都市左京区吉田近衛町	京都大学大学院医学研究科附属動物実験施設
	北山 博章	615-0882	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
<	久世 博	532-8505	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	550-0015	大阪市西区南堀江 1-12-2	岡崎産業（株）大阪営業所
○	久保 薫	634-0813	橿原市四条町 840	奈良県立医科大学 動物実験施設
	倉林 譲	700-0914	岡山市鹿田町 2-5-1	岡山大学医学部附属動物実験施設
	庫本 高志	104-0045	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	565-0871	吹田市山田丘 2-2	大阪大学医学部附属動物実験施設
こ	小泉 清	240-0005	神奈川県横浜市保土ヶ谷区神戸町 4-5-206	福井医科大学動物実験施設
	小泉 勤	910-1104	福井県吉田郡松岡町下合月 23-3	住友化学工業（株）生物環境化学研究所
	甲田 彰	554-0022	大阪市此花区春日出中 3丁目 1-98	（株）マルゴ・リサーチ・サービス
○	小嶋 明廣	532-8505	大阪市淀川区加島 3-16-89	大阪府立大学農学部獣医学科獣医病理
	小谷 猛夫	599-8531	堺市学園町 1-1	近畿大学ライフサイエンス研究所
	小林 嘉代	589-0014	大阪狭山市大野東 377-2	日本新薬（株）
	小林 忍	605-8550	京都市南区西大路八条下ル	日本農薬（株）安全性研究所
	小松 正美	586-0094	河内長野市小山田町 345	科研製薬（株）中央研究所薬理研究部
	小森 彰	607-8042	京都市山科区四宮南河原町14	武田薬品工業（株）
	近藤 正熙	532-8686	大阪市淀川区十三本町2-17-85	田辺製薬（株）安全性研究所
	近藤 靖	532-8505	大阪市淀川区加島 3-16-89	武田薬品工業（株）薬剤安全性研究所
さ○	西条 武俊	532-0024	大阪市淀川区十三本町 2-17-85	塩野義製薬（株）油日ラボラトリーズ
	境 陽子	520-3423	滋賀県甲賀郡甲賀町五反田 1405	マルゴ・リサーチサービス
	坂田 太二	532-8505	大阪市淀川区加島 3-16-89 田辺製薬内	京都大学薬学部薬理学教室
	佐藤 公道	606-8501	京都市左京区吉田下阿達町	大阪大学歯学部中央研究室
○	佐藤 良夫	565-0871	吹田市山田丘 1-8	
	鯨島 秀暢	890-0011	鹿児島市玉里団地 1丁目 22-19	
し	塩田 恒三	602-0000	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
○	塩見 雅志	650-0017	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	541-0045	大阪市中央区道修町 2-3-6	武田薬品工業（株）監査室
	嶋川 幸三	532-8686	大阪市淀川区十三本町2-17-85	武田薬品工業（株）薬理研究所
	嵩田 好文	520-3111	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	604-8423	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	606-8304	京都市左京区吉田下阿達町 37	清水実験材料（株）
	清水 雅良	501-6251	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	515-0033	松阪市垣鼻町 1586	
	下西 功	534-0016	大阪市都島区友淵町 1-5-90	鐘紡（株）薬品研究所
	城 勝哉	663-8131	西宮市武庫川町 1-1	兵庫医科大学第一解剖学教室
	銀 一之	547-0001	大阪市平野区加美北 4-6-19	白銀工業（株）
す	菅原 努	606-8225	京都市左京区田中門前町 103 パストゥールビル	（財）体質研究会
	杉井 学	576-0031	大阪府交野市森南 2-27-3	（株）ケーエーシー 営業本部
	杉谷 順康	743-0011	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	890-0073	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	913-0032	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	533-0021	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	606-8501	京都市左京区吉田近衛町	京都大学大学院医学研究科附属動物実験施設
そ○	相馬 正志	573-0028	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	520-3423	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	693-0021	出雲市塩冶町 89-1	島根医科大学
△	高木 貞明	601-8151	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	300-0332	茨城県稲敷郡阿見町中央 8-5-1	（株）実生研・筑波研究所

関西実験動物研究会（個人会員名簿） 1998年8月現在

	氏名	〒	住所	所属
	高橋 明男	554-0022	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	569-1125	高槻市紫町 1-1	（財）たばこ産業弘済会 高槻事業所
	竹下 崇	605-8550	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	532-8505	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	606-8225	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	648-0003	橋本市隅田町山内 514	
○	竹之下 洋司	648-0003	和歌山県橋本市隅田町山内 514	
	竹村 公延	522-0201	彦根市高宮町 2763	マルホ（株）研究所彦根分室
	田島 俊	565-0871	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	532-0031	大阪市淀川区加島 2-1-6	藤沢テクニス（株）業務4部 RI施設
○	谷村 孝	589-8511	大阪狭山市大野東 377-2	近畿大学医学部第一解剖学教室
	谷本 純一	532-0031	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	604-8423	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	550-0005	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
	田畑 信子	743-0011	山口県光市光井字武田 4720	武田薬品工業（株）薬安研・光支所
	玉田 尋道	599-8231	堺市学園町 1-1	大阪府立大学農学部獣医学科
ち○	千葉 薫	569-1125	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	520-3423	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	520-3423	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	739-0046	東広島市鏡山1-4-4	広島大学生物生産学部家畜育種学教室
○	蝶良 愛郎	570-0074	守口市文園町10-15	関西医大・第2病理
○	蝶良 義彦	661-0002	尼崎市塚口町 1-33-21	
	津村 秀樹	514-0001	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	426-0054	藤枝市源助 301	科研製薬（株）中央研究所GLP室
と	堂前 嘉代子	565-0871	吹田市山田丘 3-1	大阪大学微生物病研究所
	徳本 和弥	566-0022	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	520-3423	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	520-2121	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	520-3423	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	605-8550	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	532-8686	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
	中尾 博之	520-3423	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	618-0022	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	771-0132	徳島市川内町平石字夷野 224-2	大鵬薬品（株）
	中川 博司	596-0808	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	532-0031	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	532-8686	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
	長澤 久充	610-0121	京都府城陽市寺田深谷 7-76	
	中島 健博	531-0072	大阪市北区豊崎 4-12-17	（株）ケアリー
	中島 文博	564-0053	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
	中島 文晴	062-0000	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
	中村 公章	607-8042	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	700-0914	岡山市鹿田町 2-5-1	岡山大学医学部法医学教室
	中山 亮	666-0112	川西市大和西 3-28-10	
	夏目 克彦	113-8551	東京都文京区湯島 2-18-6	夏目製作所（株）
	並河 知子	535-0004	大阪市旭区生江 1丁目 8-14	沢井製薬（株）研究部
に○◎	新谷 聰	565-8565	吹田市藤白台 5-125	国立循環器病センター研究所
	西川 健志	605-8550	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	431-3124	浜松市半田町 3600	浜松医科大学 動物実験施設
	西田 伊久男	528-0052	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	565-0871	吹田市山田丘 3-1	大阪大学微生物病研究所
	西村 孝義	528-0052	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
	西村 正彦	431-3124	浜松市半田町 3600	浜松医科大学動物実験施設
	西村 弘道	596-0821	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	532-8686	淀川区十三本町 2-17-85	（株）武田ラビックス
ぬ	沼沢 拓身	673-1461	兵庫県加東郡社町木梨	日本臓器製薬（株）
の	野澤 謙	467-0035	名古屋市瑞穂区弥富町見ヶ丘 21-2	
	野村 彰	573-0005	枚方市池之宮3-4-20 703号	
は○	橋本 正晴	532-8514	大阪市淀川区加島 2-1-6	（株）新薬開発研究所
	橋詰 俊雄	547-0001	大阪市平野区加美北 4-6-19	藤沢薬品工業（株）安全性研究所
	長谷川 治子	565-0871	大阪府吹田市山田丘 2-2	白銀工業
	浜田 祐二	871-0801	福岡県築上郡吉富町小祝 955	大阪大学医学部附属動物実験施設
				セアック吉富

関西実験動物研究会（個人会員名簿） 1998年8月現在

	氏名	〒	住所	所属
	早川純一郎	920-0934	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	565-0862	吹田市津雲台 5-18 D75-102	
○	原田 正史	545-0051	大阪市阿倍野区旭町	大阪市立大学医学部
ひ	東 稔広	532-0004	大阪市淀川区西宮原 2-6-64	日本シェーリング（株）
	東山 昇	561-0825	豊中市二葉町 3-1-1	塩野義製薬（株）新薬研究所
	疋田 精一	607-8042	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	676-0027	兵庫県高砂市高砂町宮前町 1-8	鍾淵化学工業（株）高砂研究所
	平川 公昭	590-0422	泉州郡熊取町希望が丘 1-4-21	
	平沢 勉	520-3423	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	573-0101	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	554-0022	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	534-0016	大阪市都島区友淵町 1-5-90	鍾紡（株）薬品安全性研究所
	藤井 恒雄	532-0031	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	532-0031	大阪市淀川区加島 2-1-6	藤沢薬品工業（株）安全性研究所
	藤島 昇一	561-0825	大阪府豊中市二葉町 3-1-1	塩野義製薬（株）新薬研究所
○	藤村 一	606-0805	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	589-8511	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	干場 純治	700-0914	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	532-8686	大阪市淀川区十三本町 2-17-85	武田薬品工業（株）薬理研究所
	堀 孝司	564-0043	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	693-0021	出雲市塩冶町 89-1	島根医科大学第2病理学教室
	堀川 洋子	565-0871	吹田市山田丘 2-2	大阪大学医学部附属動物実験施設
ま	前田 勝弘	564-0053	吹田市江の木町 33-94	大日本製薬（株）研究管理部動物飼育室
○	前田 敏宏	564-0053	吹田市江の木町 33-94	大日本製薬（株）研究管理部動物飼育室
	真壁 恭子	640-8155	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	520-3423	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	739-1105	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	433-8111	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	520-3001	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	564-0043	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	569-1034	高槻市大蔵司 2-46-2	
	松代 創一郎	525-0055	滋賀県草津市野路町2247	日清食品（株）中央研 安全研
○	松村 理一郎	666-0116	川西市水明台 3-5-76	
	松本 耕三	770-0042	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	573-0101	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	520-3423	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	520-3423	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	532-8686	大阪市淀川区十三本町 2-17-85	（株）武田ラビックス
	水内 博	532-8505	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	565-0081	吹田市山田丘 2-2	大阪大学医学部A'イオ'動物シシ-腫瘍生化学講座
	三原 啓子	410-0866	静岡県沼津市市道町 13-4 本山方	
	三村 哲夫	532-8505	大阪市淀川区加島 3-16-89	田辺製薬（株）安全性研究所
☆○	宮崎 宏彰	892-0871	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	640-8155	和歌山市九番丁 27	和歌山県立医科大学動物室
	宮本 誠	553-0003	福島区福島 1-1-50	大阪大学医学部附属病院病理部
○◎	宮脇 茂樹	305-0003	つくば市桜 3丁目14-1	日本新薬(株)東部創薬研究所
む	棕本 末男	532-0031	大阪市淀川区加島 2-1-6	藤沢薬品工業（株）分子生物研究室
	武藤 通彦	520-3423	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	606-8501	京都市左京区吉田近衛町	京都大学大学院医学研究科附属動物実験施設
	村本 泰一	567-0806	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	531-0071	大阪市北区中津 1-6-28 約70' 4F	実医研（株）
	森 聖	541-0045	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	567-0806	茨木市庄 2丁目 24-3	日本商事（株）医薬研究所
○◎	森岡 宏至	599-8531	堺市学園町 1-1	大阪府立大学農学部獣医学科実験動物
	森岡 一輝	544-8666	大阪市生野区箕西 1-8-1	ロート製薬（株）生物臨床研究部開発支援G
	森島 英喜	532-8686	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
○◎	森本 純司	569-8686	高槻市大学町 2-7	大阪医科大学実験動物センター
や○	安田 正秀	569-1094	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	532-8686	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
	柳本 行雄	550-0005	大阪市西区西本町 2-5-19	生活化学研究所
	矢野 賢一	679-2296	兵庫県神崎郡福崎町山崎 214-1	吉富製薬（株）安全性研究所
	藪中 淳	522-0201	滋賀県彦根市高宮町 2763	マルホ（株）研究所彦根分室

関西実験動物研究会（個人会員名簿） 1998年8月現在

	氏名	〒	住所	所属
	山北 修	771-0132	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	392-0016	長野県諏訪市豊田 6598	（株）CSKリサーチパーク
	山崎 俊幸	666-0116	兵庫県川西市水明台4丁目2-35	
	山下 武夫	520-3423	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	520-3423	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	554-0022	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	541-0045	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
	山村 道夫	532-8505	大阪市淀川区加島 3-16-89	マルゴ・リサーチサービス
	山元 勝一	520-3423	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	598-0061	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	535-0004	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	930-0152	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	520-2121	大津市瀬田月輪町	滋賀医科大学法医学教室
	山本 淑子	606-8501	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	606-8501	京都市左京区吉田二本松町	京都大学人間環境学部
よ	吉岡 勝	532-8686	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
	吉澤 達	604-8423	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	561-0825	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	563-0011	池田市伏尾町103	大日本製薬（株）アミノ酸部研究所
	吉船 伸一	567-0806	茨木市庄2丁目 24-3	日本商事（株）医薬品研究所
り	龍門 徳彦	569-1125	高槻市紫町 1-1	（財）たばこ産業弘済会
わ	若狭 芳男	399-4501	長野県伊那市西箕輪 8047	（株）イナリサーチ 薬理研究部
	渡辺 信介	589-0014	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	520-3423	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	599-8531	堺市学園町 1-1	大阪府立大学農学部獣医学科

上記個人会員名簿に追加、訂正等があれば

事務局（TEL：075-753-4489, FAX：075-753-4409, e-mail：doubutsu@med.kyoto-u.ac.jp）にご連絡下さい

平成10年12月10日 印 刷
平成10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
〒606-8501 京都市左京区吉田近衛町
京都大学大学院医学研究科附属動物実験施設
印 刷 所 プラスエー株式会社
〒525-0046 滋賀県草津市追分町376番地の10

関西実験動物研究会会報 第19号
Kansai Journal of Laboratory Animals
平成10年12月

第55回研究会：HVJリポソーム法による生体への遺伝子導入法とその応用

金田 安史：HVJ-リポソームを用いた遺伝子導入による新しい実験動物系の開発 3

猪阪 善隆：in vivo 遺伝子導入法を用いた糸球体病変の病態解析 11

第56回研究会

日下部 守昭：個体レベルでの遺伝子機能研究と動物実験 21

杉山 雄一・伊藤 清美：医薬品開発過程における薬物体内動態予測：

実験動物からヒトへ、試験管から個体へ 34

抄録：会員による研究発表（20題） 51

第57回研究会：マウスの新たな利用法を求めて

城石 俊彦：マウス突然変異を利用した形態形成機構の遺伝学的解析 73

第58回研究会：実験動物を用いた新興細菌感染症の研究と伝染病予防法の改正

喜多 正和：ヒトにおけるHelicobacter 感染と動物モデル 79

喜多 英二：マウスモデルにおける腸管出血性大腸菌O157感染の病態解析 88

内田 幸憲：伝染病予防法改正に伴う動物由来感染症対応の方向性 101

〈関西実験動物研究会だより〉

幹事会、評議員会、総会の議事概要 118

会長、幹事、監事名簿 120

評議員名簿 121

維持会員名簿 123

会員の異動 124

個人会員名簿 125