

関西実験動物研究会会報

Kansai Journal of Laboratory Animals

平成11年12月 20号

関西実験動物研究会

Kansai Laboratory Animal Research Association

目 次

<第57回研究会(続)(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. ヒト染色体導入マウスの作製とその応用 3
押村 光雄(鳥取大学医学部生命科学科細胞工学教室)

<第59回研究会(平成10年9月11日)>

テーマ:「受精機構の新たな研究展開と内分泌攪乱物質の生殖系への影響」

1. 遺伝子改変動物と受精の研究 15
岡部 勝(大阪大学遺伝情報実験施設遺伝子組換え研究分野)
2. 内分泌攪乱化学物質(環境ホルモン)が男性生殖能へ及ぼす影響:
特に、ヒト精子形成への影響について 23
森 千里(京都大学大学院医学研究科生体構造医学講座)
3. トリフェニルスズのラットにおける生殖毒性 28
江馬 眞(国立医薬品食品衛生研究所大阪支所生物試験部)

<第60回研究会(平成10年12月4日)>

特別講演

1. 臨床薬理学と非臨床試験データ評価 37
内田英二(昭和大学医学部第二薬理学)
 2. ICH Common Technical Document (CTD) Guideline on Registration of
New Medical Products: Status of CTD Safety Section 44
河合睦文(リリーリサーチラボラトリーズジャパン)
 3. JVS (juvenile visceral steatosis) マウスの原因遺伝子の探索 49
早川純一郎(金沢大学医学部附属動物実験施設)
- 会員の研究発表 13題 57

<第61回研究会(平成11年3月5日)>

テーマ:「実験動物:育種繁殖領域からの新たな展開」

1. リコンビナント・インブレット系マウスを用いた研究 73
西村正彦(名古屋大学医学部附属動物実験施設)
2. 医学・生物学分野における実験用動物としてのサル類の人工繁殖 77
和 秀雄(大阪大学人間科学部)

<第62回研究会（平成11年6月11日）>

テーマ：「生殖発生毒性試験を考える」

1. 毒性試験における精子検査の意義と方法 95
川島邦夫（国立医薬品食品衛生研究所大阪支所）
2. ヒトの先天異常研究における動物実験の意義107
谷村 孝（近畿大学ライフサイエンス研究所）

<関西実験動物研究会だより>133

<幹事会、評議員会、総会の議事概要>135

<会員の異動>138

<会員名簿>139

<維持会員名簿>144

<評議員名簿>145

<会長、幹事、監事名簿>147

<第57回研究会(続)(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. ヒト染色体導入マウスの作製とその応用

押村 光雄(鳥取大学医学部生命科学科細胞工学教室)

ヒト染色体導入マウスの作成とその応用

押村 光雄

鳥取大学医学部生命科学科細胞工学教室

Mitsuo Oshimura

Department of Molecular and Cell Genetics, School of Life
Sciences, Faculty of Medicine, Tottori University

微小核融合法とは、特定の染色体あるいはその一部を目的とする細胞へ選択的に導入する手法であり、受容細胞中の表現形質の変化に起因する遺伝子のマッピングが可能である。この手法を用いてこれまでに、がん抑制遺伝子、細胞老化遺伝子、テロメラーゼ抑制遺伝子、がん転移抑制遺伝子、劣性遺伝病の原因遺伝子などの存在するヒト染色体の同定とマッピングが行われてきた(表1)。また、導入染色体上の遺伝子は人為的に付加された発現プロモーターなどを持たないため、より生理的に近い遺伝子発現パターンを示すことから、遺伝子量効果の解析、受容細胞の由来する組織別や分化度の違いにより発現が制御を受ける遺伝子の解析などに極めて有用な手法として用いられてきている。

一方、遺伝子の機能やその制御機構を生体内で解析するために、遺伝的改変を施した初期胚やES細胞からマウス個体を作製する技術は、分子生物学における必須の方法論として広く利用されるようになってきた。しかし、外来遺伝子をマウス個体で発現させようとする場合、コード領域から離れて存在する全ての発現制御領域をカバーする導入遺伝子を構築し、本来の組織特異性、時期特異性を再現することは困難なことが多く、その主因は導入できる遺伝子DNA断片、すなわちクローニングできるDNAの大きさに限界があるためである。また、このような導入遺伝子の発現は、位置効果などにより、挿入された染色体部位の影響を強く受け、本来の特異性を発揮できないことが多い。近年開発された酵母人工染色体(YAC)を利用したトランスジェニックマウス作製法にしても通

常数百 kb が限界であり、哺乳動物の遺伝子としては珍しくない 1Mb あるいはそれを越える大きさを持つ遺伝子や遺伝子クラスターの導入は不可能であった。このように、これまで個体へ導入可能な遺伝子の大きさはクローン化できる DNA の大きさに依存していた。

最近マウス個体への遺伝子導入ベクターとしてヒト染色体そのものを利用することに成功した⁵⁾。例えばキメラマウスが保持するヒト 22 番染色体はその長さ約 50Mb であり、おそらく一千以上の遺伝子を含むと想像される。これまでは、ES 細胞へのヒト遺伝子導入は YAC ベクターを用いるのが主であったが、Harrington 等のヒト型ベクターを用いたヒト線維肉腫細胞への遺伝子導入により、ES 細胞等への応用が期待されていた⁶⁾。YAC の次は染色体と考えると、当然の技術進歩のように思われるが、以下に述べるように個体レベルでの染色体操作には数々の困難が伴うと想像されてきたこと、また、遺伝子クローニングの過程を経ずに個体への遺伝子導入ができるという点でこの手法の開発は従来法と比較して大きな飛躍といえるだろう。

ES 細胞へのヒト染色体導入

ヒト染色体をマウスに導入し、機能させるために用いた手法の概略を図 1 に示した。この手法は、(1) 微小核融合法によるマウス ES 細胞へのヒト染色体移入¹⁾ (2) 微小核ハイブリッド ES 細胞からのキメラマウス作製からなる。これまでに、様々な遺伝的改変により ES 細胞からキメラマウスが作製されてきたが、体細胞遺伝学の重要な手法である細胞融合や染色体移入が利用されることはなかった。その背景には、一般に ES 細胞の染色体異常はその分化多能に悪影響を与え、特に生殖系列への伝達を阻害すると考えられてきたことがあげられる。

しかし、実際には微小核融合法を用い、ヒト正常線維芽細胞由来の 2 番染色

体断片，14 番染色体断片，22 番染色体を保持するマウス ES 細胞を得ることができた⁵⁾。導入染色体はマウス染色体とは独立して存在し，選択条件下で安定に保持され、また，これらのハイブリッド ES 細胞の形態，増殖速度等は親株 ES 細胞と比較して変化は見られなかった。

ハイブリッド ES 細胞からのキメラマウス作製

得られたハイブリッド ES 細胞の分化多能を検討するため，正常胚への注入によりキメラマウスが作製された。ここで想像される困難はハイブリッド ES 細胞が正常組織に貢献できるか，そしてその場合生存可能なキメラが誕生するか否かであった。ヒトの場合、トリソミーで生存可能なのは 21 番トリソミー（ダウン症）など一部であるが，同様にマウスにおいても染色体の数的異常は多くの場合致死となる。一方，正常細胞とのキメラ（モザイク）の状態になることで病状が緩和され，生存可能となることもある。Tomizuka らがテストした全てのハイブリッド ES 細胞から得られたほとんどのキメラマウスは，そのキメラ率と関係なく外見は全く正常であった⁵⁾。また，胚への注入後，ES 由来の細胞を非選択条件下で増殖，分化させなければならないことから，導入ヒト染色体の安定性が懸念されたが、ハイブリッド ES 細胞は調べた全ての組織に貢献し，かつ大部分の ES 細胞由来の体細胞は導入染色体を保持していた。したがって、ハイブリッド ES 細胞は導入染色体を保持しつつ多様な体組織に分化できる多様性を保持していることが示された。

導入染色体上のヒト遺伝子の発現

クローン羊の誕生により，体細胞由来の核の全能性が示されて間もないが，今回の染色体移入の実験も体細胞由来の染色体が ES 細胞を経由することによって再び種々の組織で機能することを示したものである。上記の 3 種のヒト染

染色体を保持するキメラマウス組織において、組織特異的あるいは構成的な発現様式を示すヒト遺伝子転写産物の存在が RT-PCR 法により検討された。例えば、2 番染色体断片導入キメラマウスにおいては、肝特異的 FABP1 は肝で発現が強く、Igk は胸腺、脾臓、白血球などで強発現であった。特に Ig 遺伝子発現について詳細な解析を行い、血清中 Ig ポリペプチド鎖発現、Ig 転写産物における多様な可変領域 (V) セグメントの使用を観察している。これらのキメラマウスを外来抗原により免疫すると、ヒト Ig 鎖を含む特異的抗体が出現し、線維芽細胞由来のヒト染色体であっても、リンパ球、筋肉等種々の分化した細胞において正常に機能していることが示された。

導入染色体の germline transmission

最も興味深いことは、ヒト 2 番染色体断片が雄、雌どちらのキメラからも子孫に伝達したことである。一般的に染色体異数性は減数分裂の進行を阻害し、正常に配偶子形成が起こらないことにより、不妊になると考えられている。特に雄は染色体異常に対する感受性が高いことが知られている。実際、今回の実験でも 14 番染色体断片、22 番染色体の子孫への伝達は観察されなかった。14 番染色体断片の場合、複数の雄個体が萎縮した精巣を持ち、不妊であった。

今回マウスへの導入に用いられた染色体のうち最も小さい(5-20Mb と想像される)ヒト 2 番染色体断片について子孫への伝播の可能性をより詳細に検討すべく、これを (40, XY) ES 細胞 (雄キメラにおいて精子に分化する) 及び (39, XO) ES 細胞 (雌キメラにおいて卵子に分化する) に導入し、雌雄キメラを作製した。白色マウスとの交配により、ES 細胞由来の野性色の毛色を示す F1 マウスが得られ、ハイブリッド ES 細胞の子孫への伝播が確認された。野性色 F1 マウスにおける 2 番染色体断片の保持が検討された結果、雌キメラだけでなく雄キメラ由来の F1 マウスにおいても 2 番染色体断片を保持する個体の存在が確

認された（雄：2 匹/37 匹，雌：22 匹/67 匹）。さらにこの染色体断片は F1 マウス体細胞においても独立染色体として存在することを含め，減数分裂を経て子孫に伝達した後も構造的，機能的に何ら変化していないことが示された。ここに外来染色体を保持し，子孫に伝達する世界で初めてのマウス“Trans chromosomal (Tc) mice”，が誕生したわけである。この断片の伝達は，現在のところ第 4 世代まで確認されている。子孫への伝達率や体細胞における保持率等は今後の検討課題であり，また導入染色体が子孫伝播のするための必要十分条件について論議するためには，今後種々の染色体（断片）を用いた実験の結果を待つ必要があるだろう。

Tc マウス作製技術の利用価値

本研究は従来法では不可能であったヒト抗体遺伝子全長（1-3Mb）のマウスへの導入を第一の目的として計画された。ヒト抗体遺伝子導入マウスは治療用ヒト抗体（ヒトに投与する際，免疫原性を心配する必要がない）取得の切り札として期待され，多くのグループが YAC 等を利用し，より大きな断片の導入を目指した⁴⁾。より高い親和性のヒトモノクローナル抗体を得るためにはなるべく多くの V セグメント（1-3Mb にわたって散在する）を含む DNA 断片を導入するのが望ましいと考えられたからである。今回の成功はこのゴールに向けた意義のある一歩ということができるが，一方でこの技術がもたらすインパクトは広い分野に及ぶと考えられる。今後個々の遺伝子機能の解明が進むにつれ，染色体上に配置された様々な遺伝子相互関係の理解が一層求められるようになるに違いない。こうした問題へのアプローチの一助として，現状のクローン化技術では扱えない，巨大 DNA の操作，解析技術が今後益々重要になると予想される。この状況における Tc マウス作製技術の登場はまさに時期を得たものである。

おわりに

今後の課題としては、(1) 導入染色体が生殖系列に効率よく伝達する条件の検討 (2) 望みの染色体領域のみを含むミニ染色体の構築技術の確立、などが挙げられる。これらが可能になれば、ヒト疾患モデルマウスの作製や、マウス変異体の染色体による相補及び変異遺伝子の同定等が現実のものになろう。幸いにも染色体操作についてはテロメア配列による断片化、Cre/loxP システム、さらには高頻度相同組み換えを示すトリ DT40 細胞等、有用なツールが近年整備されつつある^{8,9)}。染色体をベースとした新しい遺伝子操作、解析技術の利用により、クローン化 DNA を用いたこれまでの手法ではアプローチ不可能であった生物現象の解析が行われ、真の意味でのゲノム生物学の扉が開かれることを期待したい。

参考文献

1. 上島宗之, 押村光雄: 微小核融合法による染色体導入法 組織培養工学, 23:68-72, 1997
2. Oshimura, M. and Barrett, J.C.: Multiple pathways to cellular senescence: Role of telomerase repressors. Euro. J. Cancer, 33:710-715, 1997
3. 三ツ矢幸造, 目黒牧子, 押村光雄: ヒト染色体移入マウス細胞を用いたゲノム刷り込みの解析 蛋白質核酸酵素, 43:573-582, 1998
4. 押村光雄: ヒト染色体導入マウスの誕生 実験医学, 16:511-514, 1998
5. Tomizuka, K., Yoshida, H., Uejima, H., Kugoh, H., Sato, K., Ohguma, A., Hayasaka, M., Hanaoka, K., Oshimura, M. and Ishida,

- I.: Functional expression and germline transmission of a human chromosome fragment in chimaeric mice *Nature Genet.*, 16:133-143, 1997
6. Harrington, J.J., Bokkelen, G.V., Mays, R.W., Gustashaw, K. and Willard, H.F.: Formation of de novo centromeres and construction of first-generation human artificial microchromosomes. *Nature Genet.*, 15:345-355, 1997
7. Mendez, M.J., Green, L.L., Corvalan, J.R.F., Jia, X-C., Maynard-Currie, C.E., Yang, X-D., Gallo, M.L., Louie, D.M., Lee, D.V., Erickson, K.L., Luna, J., Roy, C.M.-N., Abderrahim, H., Kieschenbaum, F., Noguchi, M., Smith, D.H., Fukushima, A., Hales, J.F., Finer, M.H., Davis, C.G., Zsebo, K.M. and Jakobovits, A.: Functional transplant of megabase human immunoglobulin loci recapitulates human antibody response in mice. *Nature Genet.*, 15:146-156, 1997
8. Dieken, E.S., Epner, E.M., Fiering, S., Fournier, R.E.K. and Groudine, M.: Efficient modification of human chromosomal alleles using recombination-proficient chicken/human microcell hybrids. *Nature Genet.*, 12: 174-182, 1996
9. Kuroiwa, Y., et al.: Efficient modification of a human chromosome by telomere-directed truncation in high homologous recombination-proficient chicken DT40 cells. *Nucleic Acids Res.*, 26:3447-3448, 1998

図の説明

図1 ヒト染色体導入とヒト染色体をもつマウス作製

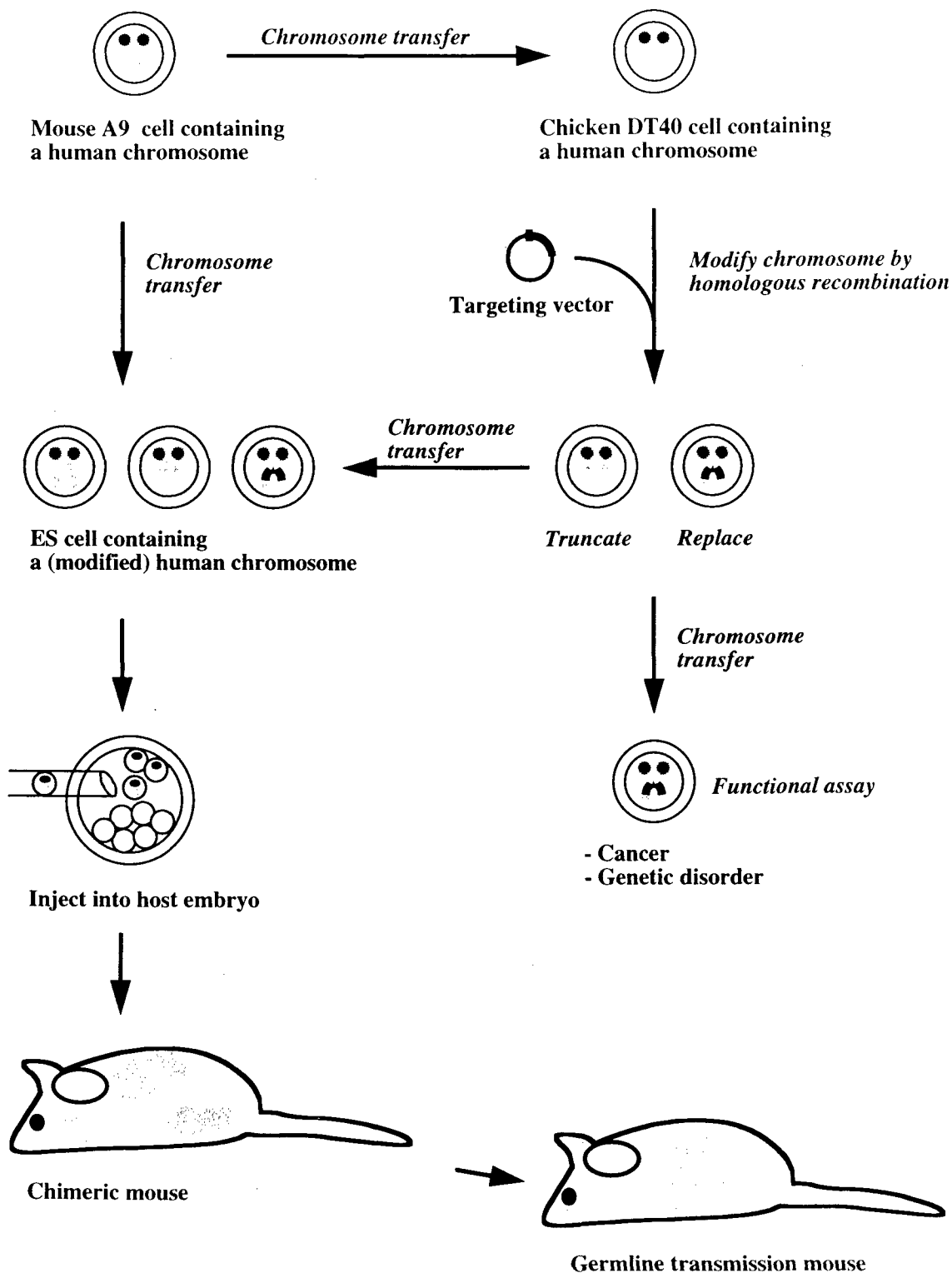
マーカーとしてネオマイシン耐性遺伝子である *pSTneo* 遺伝子をヒト線維芽細胞へ導入し、マウス A9 細胞と融合させる。コルセミド処理により微

小核を形成させ、再びマウス A9 と融合させ、ヒト染色体をもつ A9 細胞を作製する。さらに微小核細胞を分離し、マウス ES 細胞と融合させ、その結果できたヒト染色体を保持するマウス ES 細胞を用いてキメラマウスを作製する。さらに、高頻度にターゲットインテグレーションを起こすトリ pre-B 細胞を用い、テロメアトランケーションを生じさせ、断片化した染色体を ES 細胞に導入させることができる。

表 1 微小核融合法による染色体導入法のもつ利点とその利用

-
- 1) 一本の特定染色体,あるいはその一部を目的とする細胞に選択的に導入することができる
 1. 染色体が導入された細胞クローンを容易に分離することができる
 2. 一本の完全な染色体のみを導入することができる
 3. 導入した染色体を選択的に保持させることができる
 - 2) 発現ベクターなどの組み換えを行うことなくより生理的に近いレベルでの解析が可能である
 - 3) がん形質の抑制に関わる遺伝子(がん抑制遺伝子)の存在する染色体の同定及びその遺伝子のもつ機能を解析する研究に応用することができる
 1. 細胞雑種法によって得られた実験結果の確認
 2. 特定染色体の欠失をもつがん細胞においてその欠失部位にがん抑制遺伝子の存在を示唆した実験結果の確認
 3. 未知のがん抑制遺伝子/染色体の同定
 4. がん抑制遺伝子と考えられる遺伝子(群)のクローニングの資材となる
 - 4) 特定遺伝子発現の欠損を伴う細胞あるいは劣性遺伝病の原因遺伝子/染色体の同定や機能の解析に応用することができる
 - 5) 微小核融合法により作製された単一染色体パネルを用いた遺伝子マッピングへの利用
 - 6) 染色体(領域)特異的 DNA ライブラリーの作製
 - 7) ゲノムインプリンティングの制御機構の解析
 - 8) マウス ES 細胞へのヒト染色体導入によるヒト型マウスの作製
-

Production of Chromosome Transgenic Mice and Functional Assay, Using Chromosome Engineering



<第59回研究会（平成10年9月11日）>

テーマ：「受精機構の新たな研究展開と内分泌攪乱物質の生殖系への影響」

1. 遺伝子改変動物と受精の研究

岡部 勝（大阪大学遺伝情報実験施設遺伝子組換え研究分野）

2. 内分泌攪乱化学物質（環境ホルモン）が男性生殖能へ及ぼす影響：

特に、ヒト精子形成への影響について

森 千里（京都大学大学院医学研究科生体構造医学講座）

3. トリフェニルスズのラットにおける生殖毒性

江馬 眞（国立医薬品食品衛生研究所大阪支所生物試験部）

「遺伝子改変動物と受精の研究」

岡部 勝 okabe@gen-info.osaka-u.ac.jp

【はじめに】

哺乳類(ヒトを含む)のゲノム上には大雑把にいて10万種類の遺伝子が存在するといわれ、それらの発現をお互いに調節することによって複雑な生命現象が営まれている。

30 億塩基対に及ぶ人の全塩基配列を明らかにするというゲノムプロジェクトは完成に近づきつつありヒトゲノムの全塩基配列は 2005 年までにすべて決定される予定である。ゲノムプロジェクトによって得られた膨大な塩基配列情報を生命科学の研究や医学的な応用に生かして行くためには単なる記号である A,G,C,T の羅列を解読し、ゲノム構造が生体の機能とどのように結びついているのかを明らかにしてゆかねばならない。これが次世代の遺伝子研究の世界的な流れであり、我が国においても遺伝子の構造と生体の機能を結びつける遺伝子操作動物を利用した実験がますます重要なものになるであろう。

遺伝子操作動物を用いて始めて可能になる分野は枚挙にいとまがないが、例えば老化に関連した遺伝子群を明らかにするという場合は試験管内ではほぼ不可能である。脳の働きを制御する遺伝子群を明らかにしたい場合でも、脳細胞だけを培養して実験しては十分意義のある研究とはなりにくい。病気の発症に深く関与する免疫機能は多くの細胞の相互作用により成り立っており、多数の遺伝子産物による複雑な反応が関与している。そこでの機能異常などを遺伝子レベルで理解しそれらの本来の生理的意義を明らかにするために、やはり個体を用いなければならない。しかし、これまでの動物を用いた実験にはおのずと限界があった。すなわちポリオや麻疹、HIV などヒトにだけ感染する病原体を研究する場合には無力になってしまう点である。ヒトにだけ存在するヒト型の病原体レセプターを組み込んだ遺伝子操作動物を使用すれば、ヒトと同じように感染が成立し、ワクチンの検定などに実験動物を使用することが可能になるが、すでに実用例として、ポリオのワクチンの力価検定に使用されているマウスが存在する。

このようにゲノムプロジェクトで得られた情報は、遺伝子操作動物などを利用して個体の生理機能と結びつき、老化や脳の高次機能、免疫、感染症の研究など幅広い分野に応用されてはじめてその価値が飛躍的に上昇する。我が国では今後人口の高齢化を迎えようとしており、アルツハイマー病、骨粗鬆症の病因を明らかにしたり、あるいは老化そのものの生理学的な研究など、遺伝子の配列を個体の生理機能と結びつける研究方法として遺伝子操作動物の使用は多くの方面で今後ますます盛んに用いられるであろう。

さて、生物が存続して行くために生殖はもっとも大切な営みの一つであり、配偶子の形成や相互認識のメカニズムは生命の誕生に匹敵する歴史を持っている。しかし、地球の温暖化など物理的環境の変化に警鐘が鳴らされると共に、環境中への化学物質の放出にともなう生物への直接

的影響、特に柱比の崩れなど、生殖に対する障害がとりざたされている。人類の精液中の精子は過半数が異常であることはかなり以前から指摘されているが、最近では、その精子数の減少を警告する報告も見られる。また、我が国や欧米での不妊は全夫婦の1割にも達しており、現在では年間数千人もが体外受精児として生まれている。これらの事実は、ヒトの生殖細胞に何かが起こりつつあることを予感させる。

精子形成や受精現象を分子生物学的に解明するために遺伝子の機能を解析しようとしても、哺乳類の細胞では減数分裂を起こす培養系は存在せず、どうしても動物個体を使用して研究しなければならない。ところが、これまで多くの生化学的な研究に積み重ねられた実験によって重要と判断されていた因子でありながら、その遺伝子を欠損させても受精に差し障りがないことが示されこの分野の研究が根底から問い直さなければならない状況になっている。

我々も遺伝子操作動物を用いて受精機構の解明をおこなったところ、これまで知られていなかった因子が精子の受精能を形成するのに非常に重要な役割を果たしていることが判明した。

【カルメジンノックアウトマウス】

精巣では減数分裂により精子が産生されるが、その際に精巣の中でだけ発現している遺伝子群が存在する。これらの遺伝子群を西宗らはモノクローン抗体やサブトラクション法により精力的にクローニングしているが、カルメジンはそのようにしてとられた遺伝子のひとつである。クローニングしたカルメジン遺伝子のホモロジーサーチをおこなうとカルネキシンと高い相同性を示すことがわかった。カルネキシンはレクチンタイプの分子シャペロンであり、精巣で特異的に発現するカルネキシンも同様な働きを有することが示唆された。そこでカルメジンの働きを明かにするために、カルメジン遺伝子を持たないマウス(ノックアウトマウス)を作製することにした。すなわち、特定の遺伝子に人工的に変異を入れることにより、その遺伝子の働きを個体レベルで明らかにしようというわけである。

そこで図1に示すようなベクターを作製して胚性幹細胞(ES細胞)にトランスフェクトしノックアウトを行った。

このようにして得られたES細胞をプラストシストに注入することによってキメラマウスを作製した。このマウスからはES細胞由来の精子が産生され、交配によりホモ化し、カルメジンノックアウトマウスを作製した(1)。

【カルメジンノックアウトマウスの表現系】

カルメジンをノックアウトしたマウスは正常に发育して雄、雌ともに健康であった。これはカルメジンが精巣でしか発現しないので当然と考えられた。しかし、精巣内では何らかの異常が観察されると予想されたにもかかわらず、正常な減数分裂像が認められた。このことは精巣内ではカルメ

ジンと非常によく似ているカルネキシンと呼ばれる分子シャペロンが存在するためと考えられる。しかし、一見正常に見える精子を産生しながらこの雄はほぼ不妊であった。原因を体外受精を行って調べてみると、一見正常に見える精子であるが卵子の透明帯にまったく結合能を有していないことが判明した。(図2)

【精子機能の解析】

卵子と融合することを目的に作られる精子であるが、一般に哺乳類の精子は射精された時には受精能を持っていない。雌性生殖路内に入ってから、何らかの生理的機能変化を遂げ、初めて受精可能になる。capacitation は哺乳類の精子にのみ認められ、ウニなどの精子にも共通にみられる先体反応とは明らかに別の現象である。また先体反応を起こさない限り、精子は卵子と融合することができない。カルメジンでノックアウトしたマウスの精子にみられる欠陥が受精能を獲得する過程に由来するものなのかあるいは先体反応の過程が影響を受けているのかを次に検討した。そのために我々は再び遺伝子操作動物を用いることにした。

【GFP マウス】

最近、これまでのマーカーと異なり、酵素ではないレポーター蛋白質が報告された。それはオワンクラゲの緑色蛍光蛋白質(GFP)を利用するものである。GFP とは発光クラゲ類のもつ、緑色蛍光蛋白質の総称で、現在では *Aequorea victoria* (和名: 発光オワンクラゲ) の GFP に人工的に変異を加えた mutant が広く使用されている。

GFP は蛋白質でありながら励起エネルギーを受け取れば直ちに蛍光を発する機能があり、この性質のために、いかなる基質もコファクターも必要としない。1992 年に GFP cDNA クローンの塩基配列が報告され、1994 年にレポーターとしての有用性が示されて以来 GFP をなんらかのプロモーターに接続することにより遺伝子の発現の様子や GFP との融合蛋白質を作製することが試みられてきた。GFP のマーカーとしての大きな利点は、観察に先立つ前処理を必要としない点で、そのため生きた細胞における遺伝子の発現を real time にしかも連続して観察することが可能である。

GFP は 238 個のアミノ酸から成る約 27kD のポリペプチドであり、そのうち 65-67 番目のアミノ酸である Ser-Tyr-Gly が環状化した後、酸化されて発色団を形成する。GFP は発色団を取り囲むように 11 枚の beta-sheet が配位する樽型構造をとることが X 線解析により明らかにされている。発色団の形成にはクラゲ由来の因子は必要ではなく、蛋白質が生成されれば、嫌気的条件下限り環状化がおこり、発色に適した高次構造を形成する。つまり GFP をトランスジーンとして導入して発現させれば、バクテリアから植物・哺乳類にいたるまで自然条件下で青色光を吸収し緑色蛍光を出す生物や細胞を作り出すことができ、これまでに緑色の蛍光をもつ培養細胞、植物、線虫、ハエ、魚などが報告されている。我々はトランスジェニックマウスをつくり、個体レベルで全身の殆どすべての細胞において強い緑色蛍光を発するマウスを作製した(2)。GFP をマーカーとすると、観察したい材料になら前処置を施さなくても、蛍光顕微鏡の下で観察すると直ちに

緑色の蛍光を発する。緑色蛍光を発するマウスは観察中、緑色の蛍光を発しながらも全く平気で、長期の飼育後も健康に影響は出ていない。このマウス由来の免疫担当細胞や神経などはすべて緑色蛍光を持つので移植等の実験に有用と思われる。このトランスジェニックマウスは緑色蛍光を発する点を除いて野生型マウスと区別がつかず、組織切片の観察からも GFP 発現による毒性は認められていない。すなわち、マウスの殆どすべての細胞においてしかも発生のすべての時期において GFP をマーカーとして使用する事が可能であることが示されたわけである(図 3)。たとえば X 染色体に GFP 遺伝子が組み込まれた雄の場合、X 型の精子には GFP 遺伝子が乗っており、Y 型の精子には GFP 遺伝子が乗っていないことになる。そうすると着床前の段階で雄と雌の性を分けることが可能になるなどの使い方ができる(3)。しかしながら、精子には細胞質がほとんど無くこのために精子自身は蛍光を持たない。そこで我々は、プロモーターを半数体で発現するアクロシンに変更し、さらに GFP にアクロシンのシグナルペプチドを融合させた遺伝子を構築して別のトランスジェニックマウスを作製したところこのマウスは精子の先体部分にのみ蛍光を持つことが示された。この精子を観察すると精子に何ら前処理を施さず先体反応の様子を明らかにすることができるようになった(4)。そこでこのトランスジェニックマウスをカルメジンノックアウトマウスと交配させて 2 重の遺伝子操作動物を得、解析したところカルメジンノックアウトマウスでも先体反応がおこり、とくにカルシウムイオノフォアに対する反応性などで比較すると野生型と全く同じように挙動することが確かめられた。

【表現系と遺伝子ノックアウトの因果関係】

ノックアウトするには必ず ES 細胞を利用する必要がある。もし、離れた場所におきる変異であれば子孫を継代する間に分離されるので問題はないのであるがこのとき検討不可能な何らかの遺伝子の組換えがカルメジン遺伝子付近でおこっている可能性もある。(そこで遺伝子と表現型の因果関係を証明するために、ノックアウトしたマウスにトランスジーンとしてあらたにカルメジン遺伝子をカルメジンのプロモーターに結合したものを導入した。

その結果、カルメジンをノックアウトしても外来製のカルメジン遺伝子を導入すれば不妊はレスキューできることが判明した。

【研究の将来】

現在、夫婦の 10 組に 1 組は不妊に悩まされていると言われている。そして、不妊のうちで約 15% は原因が不明であるとされる。カルメジンノックアウトマウスの不妊はまさに、この原因不明の不妊の症状を示しており、今後なぜカルメジンノックアウトマウスが卵子に結合したり、透明帯を通過したりできないのかをより詳細に研究することによって先進諸国で問題になっている不妊や、逆に発展途上国で問題になっている人口の爆発など受精に関係した諸問題を解決する糸口になると考えられる。遺伝子操作動物はこのような研究に不可欠の材料となるであろう。

参考論文

- (1) Ikawa, M., Wada, I., Kominami, K., Watanabe, D., Toshimori, K., Nishimune, Y., Okabe, M., The putative chaperone calmeglin is required for sperm fertility, *Nature*, 387, 607-11, 1997
- (2) Ikawa, M., Yamada, S., Nakanishi, T., Okabe, M., 'Green mice' and their potential usage in biological research, *FEBS Lett*, 430, 83-7, 1998
- (3) Hadjantonakis, A. K., Gertsenstein, M., Ikawa, M., Okabe, M., Nagy, A., Non-invasive sexing of preimplantation stage mammalian embryos, *Nature Genet*, 19, 220-2, 1998
- (4) Nakanishi T, Ikawa M, Yamada S, Parvinen M, Baba T, Nishimune Y, Okabe M., Real-time observation of acrosomal dispersal from mouse sperm using GFP as a marker protein. *FEBS Lett* 449, 277-83 1999

〒565-0871 吹田市山田丘 3-1

大阪大学遺伝情報実験施設

TEL (06)879-8375 FAX (06)879-8376

Targeting strategy

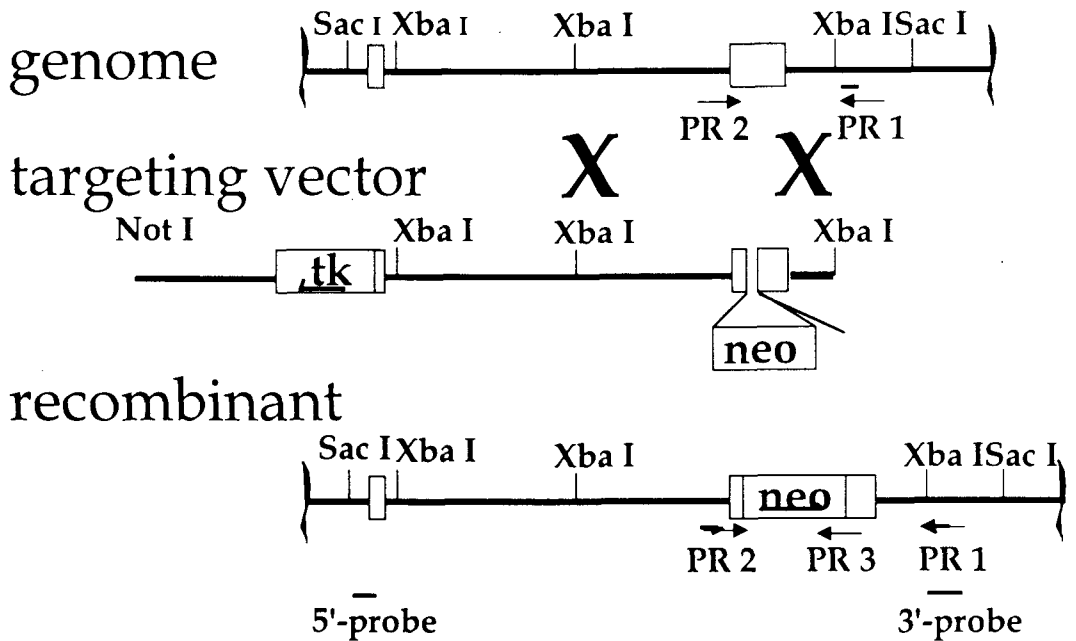


図1 ターゲティングベクターの構造

図中の 2 箇所 の X の位置で相同組換えが起こると目的の遺伝子がノックアウトされた recombinant ができあがる。PCR によりスクリーニングを行う場合には、実際に使用するベクターに比べて両側の相同領域を長くとしたポジティブコントロールベクターを用意し、ES 細胞のゲノムに取り込ませてから PCR の条件設定を行うのが安全である。サザンブロットティングのプローブは、ベクター外の部分を使用した。

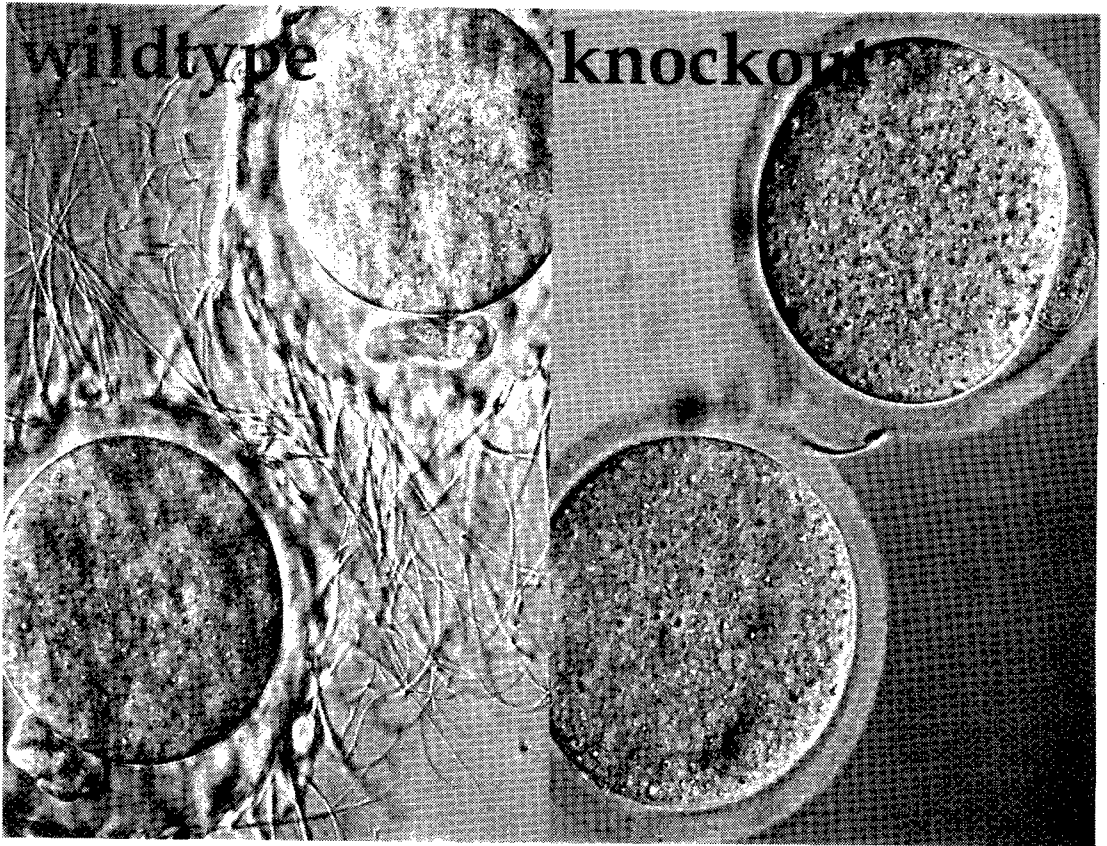


図 2 カルメジンをノックアウトしたために卵子の透明帯に結合できなくなった精子ができる。このような例はヒトの不妊患者中にも認められており、不妊のメカニズム等の研究に役立つものと考えられる。



図 3

右の写真は、3匹の子供マウスに普通光をあててみたところ。左は同じマウスに励起光をあてたところ。3匹中の2匹が GFP 遺伝子を組み込まれたトランスジェニックマウスなので緑の蛍光を出す。残りの一匹は光らないのでこの写真には写っていない。

これらのマウスは外観だけが緑なのではなく、体のあらゆる部分が緑色を呈するので、臓器移植などの研究に使用することが可能である。

内分泌攪乱化学物質（環境ホルモン）が男性生殖能へおよぼす影響： 特に、ヒト精子形成への影響について

京都大学大学院医学研究科

生体構造医学講座

森 千里

要旨

内分泌攪乱化学物質のヒトへの影響として疑われるものの一つとして、「精子数減少」が注目されている。また、精巣腫瘍、尿道下裂などの男性生殖器の発生異常の増加も報告され、この内分泌攪乱化学物質による生殖能力や次世代への影響は、人類を含めた数多くの生物の存続に関係する問題となっている。

ここでは、「内分泌攪乱化学物質（環境ホルモン）が生殖へおよぼす影響」特に、精子形成への影響についてまとめてみる。具体的には、動物実験で内分泌攪乱化学物質が雄性生殖能に悪影響を与える実験結果、エストロゲン・レセプターの機能損失マウスの研究報告やヒトでのエストロゲン・レセプターのmutationの症例報告、ヒトでの精子数減少や精子形成障害に関する諸外国の研究報告、さらに当方の調査結果である日本人での精子形成状態の検討結果やヒト胎児の内分泌攪乱化学物質の曝露に関する調査結果について紹介する。

1、はじめに

内分泌攪乱化学物質による生殖能力や次世代への影響は、人類を含めた数多くの生物の存続を危ぶむ問題として現在非常に注目を浴びている。諸外国より発表された論文では、ヒトにおける「精子数の減少」や「男性生殖器の発生異常の増加」などの生殖異常の原因として、内分泌攪乱化学物質をあげている^{1,2)}。ただし、内分泌攪乱化学物質のヒトに対する影響は、現時点では明白でない。

本稿では、内分泌攪乱化学物質と精子形成を含めた雄性・男性生殖能との関係を明確にするために、動物実験のデータやヒトでの疫学調査・症例報告を整理し、精子数減少を含めた雄性・男性生殖能への内分泌攪乱化学物質の悪影響について概説する。次に、本内分泌攪乱化学物質問題に対して当方が行っている調査・研究の一部を紹介する。

2、動物実験における内分泌攪乱化学物質の雄性生殖能に対する悪影響

出生直後の新生仔マウスに合成エストロジェン剤であるDES (Diethylstilbestrol) を投与すると、投与された雄マウスには4ヶ月後、精巣重量の低下、精巣上体における精子数減少、精子運動能の低下が惹起される。また、内分泌攪乱化学物質の一つと考えられ、環境汚染で問題となっているダイオキシンは、胎生期および授乳期の曝露で精子数の減少、性行動異常を引き起こすことが報告されている³⁾。ただし、このような内分泌攪乱化学物質の投与による雄性生殖能に対する影響を検討する動物実験結果は、作用メカニズムがホルモン作用だけでなく毒性の可能性もある。しかし、ここで注目したいのは、発生毒性学の概念で、胎生期（特に器官形成期）は薬剤や感染などに感受性が高く、その時期に薬剤や有害物質に曝露されると、生まれてくる子に先天異常や生殖異常などが誘発されやすいことである。このことは、内分泌攪乱化学物質の影響を考える上でも重要であり、上述の研究報告が示しているように、ヒトを含めた動物での内分泌攪乱化学物質の影響が最も懸念される時期は、胎生期や新生児などの成長過程といえる。

2、内分泌攪乱作用だけで精子数減少や精子形成障害などの雄性・男性生殖能に対する悪影響がでるのか？

これに対する明瞭な答えが、1996年米国国立環境健康科学研究所 (NIEHS/NIH)のEddy博士ら⁴⁾によって出された。エストロジェンが働かないようにエストロジェン・レセプターの機能損失マウスを作り出した結果、その雄マウスは、精子形成が障害され、精子数が減少し、不妊になった⁴⁾。さらに、実際にヒトでも、エストロジェン・レセプター遺伝子にmutationがあった28才の男性の症例報告⁵⁾がなされており、その男性では精子数の減少と精子の運動性の低下が見られている。つまり、これらの報告は、内分泌攪乱化学物質により、男性が胎児期から成人までの長期間、エストロジェン作用の乱された状態にあると精子数の減少や男性生殖能の異常を起こす可能性を示唆している。

3、ヒトにおける精子数減少や精子形成障害に関する諸外国の研究報告

1992年にSkakkebaek博士率いる研究チームが、ヒトの精子数減少に関する衝撃的な研究報告を発表し⁶⁾、その原因として内分泌攪乱化学物質の可

能性を指摘した。この報告は多くの研究者から懐疑的な意見がだされているのも事実である。しかし、その後、精子数減少に関する同様の調査結果や解析結果がフランス⁷⁾や米国⁸⁾などの諸外国より相次いで報告され、胎児期を含めた男子が内分泌攪乱化学物質に暴露されたことによる可能性を示唆されている⁷⁾。

次に、ヒト精液中の精子数に注目した研究から、精巣での精子形成の状態に関する研究に視点を変えると、非常に興味深い研究⁹⁾が1997年にフィンランドより報告された。それによると、1981年と1991年に死亡した中年男性の精巣の組織像を比較した結果、正常な精子形成を示す割合が、1981年からの10年間で56.4%から26.9%に減少する一方、精子形成不全を示す割合が逆に増加しているという⁹⁾。そして、その原因としてのリスクファクターは、飲酒、喫煙、薬物ではないとしている。

20世紀後半におけるヒト精液中の精子数減少や精子の質の低下に関しては、日本を含め、今なお賛否両論の報告が相次いでいる。Skakkebaek博士が中心になって行っている世界規模の「ヒト精子数の状態」に関する調査の正式な報告が待たれる。

4、日本人の精子形成状態に関する検死体を用いた検討

本邦における男性生殖能の現状を解明するために、我々は、検死体を用いて日本人の精巣重量及び精子形成状態の経年的変化を検討した。方法としては、東京都監察医務院及び東海大学医学部法医学教室における約5000の日本人検死体の精巣重量、生前のプロフィール（身長、体重、生年月日、死亡時年齢、死因など）、精子形成状態に関して、retrospectiveな検討を行った。

死亡時年齢が20才から39才までの日本人検死体について、1960年から1998年まで検討したパイロットスタディの結果、身長及び体重は経年的に増加したが、精巣重量は1960年から1980年前後にかけて上昇した後、1990年後半にかけてやや減少する傾向がみられた。精巣の組織病理学的検討結果では、精子形成が正常と判定された割合は、1978年、1988年、1993年、1998年で有意な差は認められず、また精子形成不全と判定された割合にも1978年から1998年にかけて増加傾向は認められなかった。

以上のパイロットスタディの結果、1980年以降、日本の成人男性の精巣重量は、身長や体重の増加に対し増えていないが、組織病理学的レベルでは1980年前後の精巣重量の高い時期と最近の間で、特に精子形成状態に差はないことがわかった。

5、内分泌攪乱化学物質のヒト胎児曝露に関する調査

内分泌攪乱化学物質がヒトに対して大きな影響を与えると想定されるのは、器官が形成されていく胎児期である。よって、日本人の臍帯および臍帯血中の、内分泌攪乱化学物質と疑われる化学物質の分析を行った。臍帯は胎児組織の一部であり、しかも検体収集が簡便でもあるため、内分泌攪乱化学物質の母体から胎児への移行や蓄積を検証するために用いた。現在までのところ、蓄積性が高いダイオキシン類、PCB類、DDT類、ヘキサクロロシクロヘキサン(BHC)、クロルデン類、重金属が検出されている。また、母体で代謝されやすいことから、胎児への移行はないと思われていたビスフェノールAやノニルフェノールも検出された。よって、日本では、これらの化学物質のヒト胎児への移行及び蓄積が現実に行っており、ヒト胎児は必ずしも内分泌攪乱化学物質から守られていないと判断される。今後、ヒト胎児への内分泌攪乱化学物質の曝露状況の、国内外における大規模な調査が必要である。

6、おわりに

今回、内分泌攪乱化学物質の精子形成や男性生殖能への影響に関する報告の概説を行い、現在当方が行っている研究・調査の一部を紹介した。現在までの研究・調査結果から、内分泌攪乱化学物質によって、ヒトで精子数の減少や精子形成障害が起こっているとは言えない。しかし、野生動物が内分泌攪乱化学物質により生殖障害や発育障害を受けているという報告に加え、実験動物では内分泌攪乱化学物質による精子数減少・精子形成障害が報告されている。また、当方の調査より、日本では、内分泌攪乱化学物質のヒト胎児への移行及び蓄積が現実に行っていることも判明している。

この内分泌攪乱化学物質問題は明白でない点も多いが、現実に内分泌攪乱化学物質によるヒトへの影響が日本で顕著に出る前に、研究・行政などの様々な方面からの対処が必要であると言える。特に、今後、国内外におけるヒト胎児への内分泌攪乱化学物質の曝露状況の大規模な調査や、内分泌攪乱化学物質による精子数減少を含めた男性生殖能障害メカニズムの解明及びその悪影響の予防・治療に関する研究の必要性を強調したい。

文献

- 1) 森 千里：内分泌攪乱化学物質（環境ホルモン）の妊孕性に及ぼす影響、産科と婦人科 65, 860-868, 1998
- 2) 森 千里：環境ホルモンによるヒト精子への影響、科学 68, 524-528, 1998
- 3) Faqi, A.S., Dalsenter, P.R., Merker, H.-J., and Chahoud, I. Reproductive toxicity and tissue concentrations of low doses of 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin in male offspring rats exposed throughout pregnancy and lactation. *Toxicol, Appl. Pharmacol.* 150, 383-392, 1998
- 4) Eddy, E.M., Washburn, T.D., Bunch, D.O., Goulding, E.H., Gladen, B.C., Lubahn, D.B., and Korach, K.S. Targeted Disruption of the estrogen receptor gene in male mice causes alteration of spermatogenesis and infertility. *Endocrinology* 1996; 137; 4796-4805
- 5) Smith, E.P., Boyd, J., Frank, G.R., Takahashi, H., Cohen, R.M., Specker, B., Williams, T., Lubahn, D.B., and Korach, K.S. Estrogen resistance caused by a mutation in the estrogen-receptor gene in a man. *N. Engl. J. Med.* 1994; 331:1056-1061
- 6) Carlsen, E., Giwercman, A., Keiding, N. and Skakkebaek, N.E. Evidence for decreasing quality of semen during past 50 years. *Br. Med. J.* 1992; 305 : 609-613
- 7) Auger, J., Kunstmann, J.M., Czyglik, F. and Jouannet, P. Decline in semen quality among fertile men in Paris during the past 20 years. *New Engl. J. Med.* 1995; 332: 281-285
- 8) Swan, S., Elkin, E. and Fenster, L. Reanalysis of international data finds sharp decline in sperm density. *Environ. Health Perspect.* 1997; 105: 1228-1232
- 9) Pajarinen, J., Laippala, P., Penttila, A. and Karhunen, P. J. Incidence of disorders of spermatogenesis in middle aged Finnish men, 1981-91: two necropsy series. *Br. Med. J.* 1997; 314 : 13-18, 1997

トリフェニルスズのラットにおける生殖毒性

国立医薬品食品衛生研究所大阪支所 生物試験部

江馬 眞

はじめに

有機スズ化合物は工業や農業の分野で広く使用されてきた (Piver, 1973)。有機スズ化合物のうちトリブチルスズ (TBT) やトリフェニルスズ (TPT) は殺生物作用を有することから、殺虫剤や殺菌剤として使われてきた (WHO, 1980)。TPT の主な用途は農作物に対する防黴剤としての使用であり、また、TPT は TBT と共に船底や漁網の付着生物に対する汚染防止剤としても使われてきた。我が国では 1990 年に「化学物質の審査及び製造等の規制に関する法律」に基づき、TBT 及び TPT は第一種または第二種特定化学物質に指定されて以来、船底塗料、漁網防汚剤等の開放系での使用が大幅に減少している。ヨーロッパや東南アジアでは現在でも TPT は農業用殺菌剤として使われている。

TPT による環境汚染は、農作物に防黴剤として使われた TPT が畑から流れ出すことにより、また、汚染防止剤として使われた TPT が水系に移行することによって起こる (Fent, 1996)。環境中の TPT 濃度としては、ボートハーバーの水 1 L 当たり $0.2 \mu\text{g}$ (Fent and Hunn, 1991)、TPT を防黴剤として噴霧した後の排水溝の水 1 L 当たり $1.5 \mu\text{g}$ (Stäbet al., 1993) が検出されている。さらに、魚その他の海産物の汚染も報告されており、生物濃縮係数は、コイ (肝臓) で 2,090 (Tsuda et al., 1987)、カブトガニ (肝臓) で 80,000 から 440,000 (Kannan et al., 1995) であり、日本の小売店で入手した海産物 1 kg 当たり 0.03 から 1.3 mg の TPT が検出されている (Ishizaka et al., 1989)。最近、TPT は TBT と共に内分泌攪乱化学物質 (いわゆる環境ホルモン) として注目されており、巻貝にインポセックス (ペニスや輸精管等の雄性生殖器官が雌に形成され、産卵不能に陥る一連の症状及び個体) を惹起することが報告されている (Horiguchi et al., 1997)。また、TPT は昆虫に対する繁殖障害物質としても知られている (Kenaga, 1965)。

近年、世界各地の野生動物やヒトにおける生殖の異変に関する研究報告がなされ、これらの現象と化学物質との関係が論じられ、環境汚染物質が生体の内分泌系に悪影響を及ぼした結果を示唆するものと解釈され、これらの化学物質は内分泌攪乱化学物質として新たな環境問題を引き起こしている。これらの化学物質による環境汚染は、生殖に対

する悪影響を惹起して生物の生態系を破壊する可能性を秘めており、更に、食物連鎖の頂点に位置するヒトの正常な生殖能力に対して悪影響を及ぼす可能性が懸念されている。このような観点から、内分泌攪乱化学物質とされる化学物質についてそれらの生殖発生毒性を詳細に検討する必要性が益々高まっている。本稿では内分泌攪乱化学物質の一つとされている TPT の生殖発生毒性について妊娠ラットを用いて検討してきた我々の実験結果について現在までに得られた成績をまとめてみた。

1) 塩化トリフェニルスズ (TPTCl) をラット胎児の器官形成期に投与したときの影響

Wistar ラットの妊娠 7-9 日 (精子発見日=妊娠 0 日) に 3.1, 6.3, 9.4 または 12.5 mg/kg、妊娠 10-12 日または妊娠 13-15 日に 6.3, 9.4 または 12.5 mg/kg の TPTCl を経口投与し、妊娠 20 日に妊娠ラットを開腹して胚/胎児に対する影響を調べた。

TPTCl の投与日にかかわらず、すべての TPTCl 投与群において投与期間中の母体重増加が対照群に比べて有意に低かった。妊娠 7-9 日の 6.3 mg/kg 以上、妊娠 10-12 日及び妊娠 13-15 日の 9.4 mg/kg 以上の投与群において着床後の胚死亡率が有意に上昇した。いずれの投与日のいずれの TPTCl 投与群においても奇形胎児発現頻度の有意の上昇は認められなかった。

これらの結果から、胎児の器官形成期に投与した TPTCl は胚致死作用を示し、その作用は妊娠の早い時期に投与したときに強く発現するが、TPTCl には催奇形性はないことが示唆された (Ema et al., 1999a)。

2) 塩化トリフェニルスズ (TPTCl) をラットの妊娠初期に投与したときの影響

Wistar ラットの妊娠 0-3 日 (精子発見日=妊娠 0 日) に 3.1, 4.7 または 6.3 mg/kg の TPTCl または妊娠 4-6 日に 6.3, 12.5 または 25.0 mg/kg の TPTCl を経口投与し、妊娠 20 日に妊娠ラットを開腹して胚/胎児に対する影響を調べた。

TPTCl 投与により着床阻害が認められ、妊娠率は TPTCl 投与量の増加にともなって低下し、妊娠 0-3 日の 4.7 及び 6.3 mg/kg 投与群、妊娠 4-6 日の 12.5 及び 25.0 mg/kg 投与群において対照群に比べて有意に低くなった。また、妊娠 0-3 日の 4.7 及び 6.3 mg/kg 投与群、妊娠 4-6 日の 25.0 mg/kg 投与群における交配ラット当たりの着床数は有意に減少し、交配ラット当たりの着床前胚死亡率は有意に高かった。しかし、妊娠の成立した (着床の

認められた) ラットにおいては、妊娠ラット当たり着床数、生存胎児数、着床前胚死亡率及び着床後胚死亡率にはいずれの投与日の TPTCl 投与群においても対照群との間に差は認められなかった。

これらの結果から、妊娠初期に投与した TPTCl は着床阻害 (着床前胚致死) 作用を示すことが明らかになった (Ema et al., 1997)。

3) 偽妊娠ラットの脱落膜腫形成に及ぼす塩化トリフェニルスズ (TPTCl) の影響

TPTCl の着床阻害作用の機序を検討するために、胚の着床、生存にとって非常に重要である母体の子宮の機能に対する TPTCl の影響について偽妊娠ラットを用いて検討した。不妊交尾によって得られる偽妊娠は妊娠初期と同様な内分泌状態を示し、しかも、胚-胎盤を有していないので、妊娠母体に対する影響を胚から分離して検討することが可能であり、妊娠母体に及ぼす化学物質の影響を検討する有益な手段になりうると考えられる (Cummings, 1990; Ema et al., 1998)。胚盤胞が子宮内膜に接触する刺激によって子宮内膜が肥大増殖し上皮様の形態となり、グリコーゲン、脂質を貯えるようになる。これを脱落膜細胞と云い、この組織層を脱落膜と呼ぶ。偽妊娠動物においては、子宮内膜への機械的な刺激によって脱落膜と全く同じ組織が形成される。このように胚盤胞なしに生じる脱落膜組織は脱落膜腫と呼ばれる。

Wistar ラットの偽妊娠 0-3 日 (陰栓発見日=偽妊娠 0 日) に 3.1, 4.7 または 6.3 mg/kg の TPTCl を経口投与した。偽妊娠 4 日に偽妊娠ラットの子宮の腔側から先端を曲げた細い針金を挿入し、卵管端まで反子宮間膜側を創傷することにより脱落膜反応を惹起し、偽妊娠 9 日の子宮重量を測定して脱落膜腫形成の指標とした。

TPTCl 投与群における卵巣重量及び黄体数は対照群のそれらと同様であった。4.7 または 6.3 mg/kg の TPTCl 投与により偽妊娠 9 日の子宮重量の有意の低下が認められ、TPTCl が偽妊娠ラット子宮における脱落膜腫形成を抑制することが明らかになった。この成績は妊娠ラットにおける着床前の胚死亡率の上昇とよく一致していた。妊娠の維持、子宮の正常な機能維持に不可欠なホルモンであるプロゲステロンを測定したところ、偽妊娠 0-3 日に TPTCl を投与した後の偽妊娠 4 日のラット血清中のプロゲステロンレベルは 4.7 及び 6.3 mg/kg 投与群で対照群に比べて有意に低かった。このプロゲステロンレベルの低下は脱落膜腫形成の抑制とよく一致し、また、これらは妊娠ラットにおける着床前の胚死亡率の上

昇とよく一致していた。

これらの結果から、TPTClはプロゲステロンレベルの低下を引き起こし、子宮における脱落膜反応の抑制、すなわち、子宮の機能障害が惹起され、これらがTPTClによる着床阻害に関与していることが示唆された (Ema et al., 1999b)。

4) 塩化トリフェニルスズ (TPTCl) による着床阻害に対するプロゲステロンの影響

TPTClの着床阻害作用に対するプロゲステロンによる抑制効果について検討するため、Wistar ラットの妊娠0-3日(精子発見日=妊娠0日)に4.7または6.3 mg/kgのTPTClを経口投与し、これらのラットの妊娠0-8日にプロゲステロン2 mg/ratを皮下投与して、妊娠9日に妊娠ラットを開腹して着床に対する影響について調べた。

4.7及び6.3 mg/kgのTPTClとプロゲステロンとの併用投与群では、それぞれのTPTCl単独投与群に比べて交配ラット当たりの着床数は有意に増加し、交配ラット当たりの着床前胚死亡率は有意に低下した。

これらの結果から、TPTClによる着床阻害に対するプロゲステロンの効果が明らかになり、妊娠初期に投与したTPTClによる着床阻害にはプロゲステロンレベルの低下が関与していることが確認された。

5) 二塩化ジフェニルスズ (DPTCl) をラットの妊娠初期に投与したときの影響

TPTClをラットに経口投与したときの主要な代謝物である二塩化ジフェニルスズ (DPTCl) (Freitag and Bock, 1974)のTPTClによる生殖毒性における役割について検討した。Wistar ラットの妊娠0-3日(精子発見日=妊娠0)に4.1, 8.3, 16.5または24.8 mg/kg、妊娠4-7日に8.3, 16.5, 24.8または33.0 mg/kgのDPTClを経口投与し、妊娠20日に妊娠ラットを開腹して胚/胎児に対する影響について調べた。

DPTCl投与により着床阻害が認められ、妊娠率はDPTCl投与量の増加とともに低下し、妊娠0-3日の24.8 mg/kg投与群、妊娠4-7日の33.0 mg/kg投与群において対照群に比べて有意に低くなった。また、妊娠0-3日の16.5 mg/kg以上の投与群、妊娠4-7日の33.0 mg/kg投与群における着床前胚死亡率は対照群に比べて有意に高かった。しかし、妊娠の成立した(着床の認められた)ラットでは、着床数、生存胎児数、着床前胚死亡率及び着床後胚死亡率には妊娠0-3日のいずれのTPTCl投与群においても対照群との間の差は認められな

かった。妊娠4-7日の33.0 mg/kg投与群では着床後胚死亡率が対照群に比べて有意に高かった (Ema et al. 1999c)。

これらの結果から、妊娠初期に投与したDPTClは親化合物のTPTClと同様に生殖障害を引き起こし、DPTClを妊娠のより早い時期に投与したときに強い生殖障害を発現することが明らかになった。TPTCl及びDPTCl投与によって最も顕著に発現する生殖毒性である着床前胚死亡率の有意な上昇は、TPTCl 4.1 mg/kg (12 μ mol/kg) 以上の投与量において、また、DPTCl 16.5 mg/kg (48 μ mol/kg) 以上の投与量において観察された。このように、生殖毒性はDPTCl投与よりもTPTCl投与により強く発現することから、TPTClによる生殖毒性はその主要な代謝物であるDPTClが直接の原因物質となって引き起こされるものではないように考えられる。しかしながら、DPTClを投与したラットの肝臓においてTPTが生成され、投与されたDPTはTPTとして毒性を発揮している可能性のあることが指摘されている (Ohhira and Matsui, 1993) ので、TPTによる生殖毒性発現におけるDPTの関与については更なる検討を要する。

6) 偽妊娠ラットの脱落膜腫形成に及ぼす二塩化ジフェニルスズ (DPTCl) の影響

DPTClの着床前胚致死作用の機序を検討するために、母体の子宮機能に対するDPTClの影響について脱落膜反応を誘起した偽妊娠ラットを用いて検討した。

Wistarラットの偽妊娠0-3日(陰栓発見日=偽妊娠0日)に4.1, 8.3, 16.5または24.8 mg/kgのDPTClを経口投与した。偽妊娠4日に脱落膜反応を起こし、偽妊娠9日の子宮重量を脱落膜腫形成の指標とした。

16.5 mg/kg以上のDPTCl投与により偽妊娠9日の子宮重量の有意の低下が認められ、DPTClが偽妊娠ラット子宮における脱落膜腫形成を抑制することが明らかになった。この成績は妊娠ラットにおける着床前の胚死亡率とよく一致した。また、16.5 mg/kg以上のDPTCl投与により偽妊娠0-3日にDPTClを投与した後の偽妊娠9日のラット血清中のプロゲステロンレベルは対照群に比べて有意に低かった。このプロゲステロンレベルの低下は脱落膜腫形成の抑制及び妊娠ラットにおける着床前の胚死亡率の上昇とよく一致していた。

これらの結果から、DPTClはプロゲステロンレベルの低下を引き起こし、これにより子宮における脱落膜反応が抑制され、これらがDPTClの着床阻害作用の要因となっている

ことが示唆された。

おわりに

TPTは巻貝にインポセックスを惹起する繁殖障害物質であり、内分泌攪乱化学物質と考えられている。TPTClは哺乳動物のラットにおいても生殖毒性を示し、生殖毒性発現には母体血中のプロゲステロンレベルの低下が関与していることが示唆された。また、TPTClの主要な代謝物であるDPTClもTPTClと同様に生殖毒性を示すことが明らかになったが、これらの生殖毒性の詳細な異同については今後の検討が必要である。内分泌攪乱化学物質とされる化学物質の生殖発生毒性の詳細を明らかにし、それらの発現機序を解明することにより、内分泌攪乱化学物質の作用の一端が明らかになるものと考えられる。

文献

- Cummings, A. M. (1990) Toxicological mechanisms of implantation failure. *Fundam. Appl. Toxicol.*, 15, 571-579.
- Ema, M., Miyawaki, E., Harazono, A. and Ogawa, Y. (1997) Effects of triphenyltin chloride on implantation and pregnancy in rats. *Reprod. Toxicol.*, 11, 201-206.
- Ema, M., Miyawaki, E. and Kawashima, K. (1998) Reproductive effects of butyl benzyl phthalate in pregnant and pseudopregnant rats. *Reprod. Toxicol.*, 12, 127-132.
- Ema, M., Miyawaki, E. and Kawashima, K. (1999a) Developmental toxicity of triphenyltin chloride after administration on three consecutive days during organogenesis in rats. *Bull. Environ. Contam. Toxicol.*, 62, 363-370.
- Ema, M., Miyawaki, E. and Kawashima, K. (1999b) Suppression of uterine decidualization as a cause of implantation failure induced by triphenyltin chloride in rats. *Arch. Toxicol.*, 73, 175-179.
- Ema, M., Miyawaki, E. and Kawashima, K. (1999c) Adverse effects of diphenyltin dichloride on initiation and maintenance of pregnancy in rats. *Toxicol. Lett.*, 108, 17-25.
- Fent, K. (1996) Ecotoxicology of organotin compounds. *Crit. Rev. Toxicol.*, 26, 1-

- Fent, K. and Hunn, J. (1991) Phenyltins in water, sediment, and biota of freshwater marinas. *Environ. Sci. Technol.*, 25, 956-963.
- Freitag, K. D. and Bock, R. (1974) Degradation of triphenyltin chloride on sugar beet plants and in rats. *Pestic. Sci.*, 5, 731-739.
- Horiguchi, T., Shiraishi, H., Shimizu, M. and Morita, M. (1997) Effects of triphenyltin chloride and five other organotin compounds on the development of imposex in the rock shell, *Thais clavigera*. *Environ. Poll.*, 95, 85-91.
- Ishizaka, T., Nemoto, S., Sasaki, K., Suzuki, T. and Saito, Y. (1989) Simultaneous determination of tri-*n*-butyltin, and triphenyltin compounds in marine products. *J. Agric. Food Chem.*, 37, 1523-1527.
- Kannan, K., Tanabe, S. and Tatsukawa, R. (1995) Phenyltin residues in hoseshoe crabs, *Tachypleus tridentatus* from Japanese coastal waters. *Chemosphere*, 30, 925-932.
- Kenaga, E. (1965) Triphenyl tin compounds as insect reproduction inhibitors. *J. Econ. Entomol.*, 58, 4-8.
- Ohhira, S. and Matsui, H. (1993) Metabolism of diphenyltin compound in rat liver after a single administration of diphenyltin dichloride. *J. Agric. Food Chem.*, 41, 607-609.
- Piver, W. T. (1973) Organotin compounds: Industrial applications and biological investigation. *Environ. Health Perspect.*, 4, 61-79.
- Stäb, J. A., Cofino, W. P., van Hattum, B. and Brikman, U. A. T. (1993) Comparison of GC/MSD and GC/AED for the determination of organotin compounds in the environment. *Fresenius J. Anal. Chem.*, 347, 247-255.
- Tsuda, T., Nakanishi, H., Aoki, S. and Takebayashi, J. (1987) Bioconcentration and metabolism of phenyltin chloride in carp. *Water Res.*, 21, 949-953.
- WHO. (1980) Environmental Health Criteria 15, Tin and Organotin Compounds: A Preliminary Review. World Health Organization, Geneva.

<第60回研究会（平成10年12月4日）>

特別講演

1. 臨床薬理学と非臨床試験データ評価
内田英二（昭和大学医学部第二薬理学）
2. ICH Common Technical Document (CTD) Guideline on Registration of
New Medical Products: Status of CTD Safety Section
河合睦文（リリーリサーチラボラトリーズジャパン）
3. JVS (juvenile visceral steatosis) マウスの原因遺伝子の探索
早川純一郎（金沢大学医学部附属動物実験施設）

会員の研究発表 13題

総説 医薬品開発の国際化における薬理学の役割

臨床薬理学と非臨床試験データ評価

内田 英二

1. はじめに

現在、我が国における医薬品開発に係わる諸問題については関係各方面で種々の議論がなされている(1)。戦後約半世紀を経た段階で、国際的ハーモナイゼーションの流れに貢献するために今までのシステム・考え方を見直す段階に来ていると、多くのヒトが感じているからと思う。本稿を依頼された時、正直に言うと「今更何故?」と感じた。医薬品の開発は動物及びヒトから得られた情報を評価・活用しながら段階的に進めていくことは自明の理であると思っていたからである。半年程前にある団体の単回投与毒性試験 Working Group と一般/安全性薬理試験 Working Group から講演依頼を受けた。課題は、Working Group の検討事項の一つの「臨床試験実施時における副作用の予知が基礎試験データからどの程度できるか」というものであった。課題自体は臨床及び非臨床試験に係わる者にとっては誰も関心のある事項であり、結論を出すのは難しい課題ではあるがどうということはない。問題はそこに至った状況・経緯ではないかと感じた。話をしていくと、非臨床の各部門間の情報共有のあり方・非臨床部門と臨床部門との意見交換の希薄さの問題が浮き彫りとなり、非臨床試験の質の問題とは異なる所から発生していると感じた。わかりやすく言うと、そこでの非臨床試験の各部門に係わっている方達の悩みは、「質の高い動物試験をどのように行うか」ではなく、「自分たちのデータがどのように活用されているか分からないために、医薬品開発の中での自分たちの仕事の位置づけ・評価に疑問を抱き自信を失いかけて」ように思えた。その時の依頼の理由のひとつとして、臨床試験に係わっている一医師が以前に言った「動物デー

タは全くあてにならず参考にもならないし、しない」という内容の発言がバックグラウンドに大きく存在していた様だった。臨床試験と違い、日本の非臨床試験の質は欧米に勝るとも劣らないと私は考えており、当事者の方々もそのように自負されていたのではないかと思う。その自信が、違った立場からのひとつの意見で脆くも崩れる理由こそ、現在の状況を反映していることではないかと考える。言い換えると、個々の部門の業務内容・質を問う段階から、各部門間の連携・情報・意見交換を通じ医薬品開発全体を総合的に捉える考え方・システムの構築が必要な時代に来ているのではないかと感じる。ICH (International Conference on Harmonization of Technical Requirements for Registration of Pharmaceuticals for Human Use) がもたらしたものは、意識改革はもちろんのことだがそれ以上に組織改革の必要性だと私は考える。本稿では、臨床薬理(臨床試験の立案・計画・実施)の立場から医薬品開発における非臨床試験データ(基礎薬理学のみではなく)をどう捉えているかについて論じたい。

2. 臨床試験の必要性

臨床試験が必要な理由は「開発医薬品が多くの患者さんに適用される前に、限られた集団を対象に当該医薬品のヒトにおける有効性と安全性を段階的に検討・評価していく」ことにある。特に安全性情報に関しては、「いかなる臨床試験も、その開始にあたっては、非臨床試験又は先行する臨床試験の結果から、予定されている臨床試験においてその治験薬が十分安全であることが示されていなければならない」(2)。臨床試験は開発の相から第 I 相～第 IV 相に逐次的に分けられるが、分類の基礎としては試験の目的による分類が望ましい。しかしながら、開発の進行に伴いヒトでの安全性情報が蓄積してくることを認識することは重要と考える。臨床試験により、適応、用法・用量、使用上の注意等(禁忌、副作用、特殊集団での使用法、等)を段階的に決定していくわけである。これらの項目の合理的な設定は、非臨床試験および臨床試験データをいかに活用

キーワード：非臨床試験データ、臨床試験、治験薬概要書、臨床薬理、安全性
 昭和大学医学部第二薬理学教室
 (〒142-8555 東京都品川区旗の台 1-5-8)
 原稿受領日：1998年9月16日
 編集委員会依頼原稿

表1 非臨床試験を実施する主な理由

非臨床試験が科学的根拠として臨床試験の実施をサポートするか？	
安全性	全ての毒性試験 一般薬理試験 トキシコキネティクス
有効性	薬効薬理試験 薬物動態試験

するにかかっている。

3. 臨床試験と非臨床試験との関係

医薬品開発における非臨床試験の意義は、「科学的根拠として臨床試験の実施を支持できるデータを提示する」ということにつくる(表1)。ここでいう「臨床試験」とは開発の第I相～第III相に行われる全ての臨床試験を指すもので、特に治験薬を初めてヒトに投与する第I相での臨床薬理試験に限ったことではない。もちろん、ヒトのデータが存在しない第I相の段階では、試験計画を立案する上で非臨床試験データが最も重要なデータであることは間違いない。非臨床安全性試験と臨床試験の実施時期に関しては、ICH-M3で日・米・欧の最終合意が得られ、本稿が出版される頃はガイドラインとして通知されていることと思うので参照されたい(3)。開発の第II相～第III相と治験が進むに連れてヒトのデータが蓄積されてくるため、非臨床データとの関係が徐々に明らかとなってくる。もしヒトで非臨床試験からは予想されなかった結果が出た場合には、動物の種を変えたりして追加検討する必要がある場合がある。臨床試験と非臨床試験は、常に双補的な状況にあるべきである。

また、臨床試験に携わる者が活用する非臨床試験データのソースは治験薬概要書である。後述するが、治験薬概要書の記載方法には改善する余地があると感じる。

4. 臨床薬理と非臨床試験データ評価

臨床試験の実施計画を立案する際に参考とする主な非臨床データの項目を表2に掲げる。ICH-M3により、非臨床試験と臨床試験の実施時期に関する基準が成立したことは評価に値する。臨床試験、特に初期の臨床薬理試験を立案・実施する際に非臨床試験をどのように参考(不満も含めて)にしているかを項目別に概略してみる。実際には、開発医薬品の種類により個々の項目の参考度は異なるものである。結論からいうと、個々の非臨床試験はまともであっても全体としてそれらの項目のつながりが見えてこないというこ

とが、非臨床試験データを参考にすることで障害になっている。このことは繰り返し述べることになるかもしれない。

(1) 薬効薬理試験

動物での薬効薬理試験の結果は臨床での有効性を推測する上で欠かせない。また、有効性のみならず、薬理作用に基づいた有害作用の推測にも参考となる。通常、薬効薬理試験は数種の動物で行われ、種差による薬理作用の違いも検討される。また、既存薬が存在する場合、薬効の比較も行われる。さらに、薬理作用発現の機序も検討される。薬効薬理試験での評価上の問題は、種差・系統差・性差が存在したときにそれらの違いが起こる原因が追及されているかということにある。薬物動態の相違によるものか、薬理作用発現機構の差によるものなのか、残念ながら現在の治験薬概要書ではそこまで踏み込んだ記載は多くの場合されていない。また、各種病態モデルを使用する場合があるが(4～6)、薬物の曝露(体内濃度、時間)と薬効との関係が明確でないことが多い。既存薬が存在する場合はその既存薬との比較で評価することは可能であるが、既存薬の用法・用量の設定が合理的なものかどうかとも問題となる。動物病態モデルとヒトの病態との関係はよく問題とされるところではあるが、それは個々の開発医薬品の臨床試験立案とはかけ離れた問題であるので言及は避ける。病態モデルが存在しない場合、既存薬が有効性を示す病態に対して比

表2 臨床試験の実施を支持する主な非臨床試験

- (1) 薬効薬理試験
- (2) 安全性薬理試験(一般薬理試験)
- (3) 単回投与毒性試験
- (4) 反復投与毒性試験
- (5) 薬物動態試験
- (6) 遺伝毒性試験
- (7) がん原性試験
- (8) 生殖・発生毒性試験
- (9) 局所刺激性試験

較を行うことが多い。この場合に、既存薬が有効性を示した病態と臨床の有効性との間の相関（言い換えればその病態を選んだ妥当性）を証明せずに、漫然と比較している場合があることは注意すべき問題ではないかと思われる。

(2) 安全性薬理試験（一般薬理試験）

“No drug has a single action.”とは薬理学の金言であるが、開発医薬品の薬効薬理作用（主作用）以外の作用を検討するのが一般薬理試験であり、ICH-M3では安全性薬理試験と呼ばれる。ここでは主に、心臓血管系、中枢神経系、呼吸器系のような生命維持に肝要な諸機能に対する作用の評価が含まれている。ここで用いられる用量は、臨床試験で使用される用量と比較してかなりの高用量であることが多い。ややもすると、出現している薬理作用を高用量のためであると誤解しがちである。一般的に小動物ほど薬物のクリアランスは大きいので、ヒトと比較した場合実際の体内濃度は用量の差ほどは大きくならない。従って、どの濃度で作用が発現しているかを知ることが重要であるのだが、体内濃度（血中でも良い）と作用発現を結びつけている治験薬概要書はほとんどない。

欧州のCPMP（Committee for Proprietary Medicinal Products）は1997年の12月に、全ての開発医薬品に対して、心電図上のQT間隔に及ぼす影響をin vitroおよびin vivo（特にイヌ）で検討することを義務づけた(7)。そして試験デザインには薬物動態のプロファイルを含めるとしている。結果としてQT延長の可能性（potential）を示さず、他の安全性試験でも問題のない開発医薬品が原則としてヒトでの臨床薬理試験に進むことができるとしている。さらに、ヒト試験でも薬物動態（未変化体、代謝物）を考慮した心電図検査を要求している。もし、ヒトで動物と代謝過程が異なり特有の代謝物が検出された場合には、その代謝物の影響を動物に戻って検討する必要があるとしている。このことは、イトラコナゾールとテルフェナジンの併用時にtorsades de pointesを起し死亡例がでたことと関連しているように思われる。日本での対応に関しては今のところ情報はないが、ハーモナイゼーションの動きを考慮すると無視できない問題であると考えられる。CPMPの提案を見ると、薬効薬理・薬物動態・毒性試験などとの関連で検討する必要が生じるのではないかと思う。

(3) 単回投与毒性試験

単回投与毒性試験は開発医薬品の急性の毒性を検討するものである。以前は50%致死量(LD₅₀)を求めていたが、現在は毒性変化と用量との関係を把握することに重点が置かれてきている。用量漸増法も認められてきており、また一部安全性薬理試験と重複する場合もある。通常2種以上の動物で行われるが、1種では雌雄両性の検討が必要である。種が違くと毒性変化を起こす用量は異なることがほと

んどであるが（通常、大動物の方が低い）、種差による毒性所見の違いがあった場合の評価や雌雄差が認められた場合の考察については記載がないことが多い。また、最大耐用量もしくは最小致死量等を表記している場合があるが濃度との関係は全く触れられていない。全てが結果の羅列に終わっている場合が多く、また記載容量も少ない。単回投与毒性試験はヒトでの単回投与の安全性を支持することができるとの報告もなされており(8)、またFDAは開発候補医薬品の選択（ヒトでの単回投与試験）に際して条件を厳しくした形（検査項目の拡大）で単回投与毒性試験を認めている(9)。そのような現状を考慮すると、いままでの記載よりさらに詳細な記述を要望したいと思う。

(4) 反復投与毒性試験

一般に医薬品は臨床で反復投与されることが多い。従って臨床試験を立案・実施する側は、反復投与毒性試験の結果に重きをおいて非臨床試験データを読む傾向がありそのこと自体は間違いではないと思う。通常、反復投与毒性試験の投与期間は臨床試験の期間と同じかそれを越えている。2種の哺乳動物（1種は非げっ歯類）で実施され無毒性量が決定される。無毒性量はヒトでの初回投与量を決定する1つの指標でもあるため非常に重要である。反復投与毒性試験の所見で、用量反応性が見られる項目、標的臓器、重篤度などについては特に慎重に読むことになり、薬理作用との関連についても検討する。また、種差を超えて見られる所見についてはさらに慎重になる。可逆性についての所見も重要である。

反復投与試験の結果を参考にするに当たっての問題点は、最近実施されるようにはなってきたが薬物濃度と毒性所見との関連性（トキシコキネティクス）の記述である。臨床試験での投与量は初回投与から徐々に増加していき、動物での無毒性量に近い量にまで到達することは現実にある。上述したが動物とヒトではクリアランスが異なり、多くの場合ヒトで小さい。このことはヒトでの薬物の蓄積が一般的に動物より大きいことを示唆しており、曝露量に関しては投与量ではなく血中濃度を指標とした方が安全性の面からは優れていると考えられる理由である。また、反復投与していくと自己の代謝に関して代謝酵素誘導や逆に代謝阻害が起こる可能性もあり、そのような場合もし代謝経路が異なる種（ヒトと動物）であれば、反復投与毒性試験の所見がどの物質の曝露によるものか判断できず安全性上極めて問題となる。残念ながら反復投与試験の項目に毒性所見と各物質（未変化体、代謝物）の濃度や代謝酵素誘導（あるいは阻害）との関連が記述されていることはほとんどない。かなり昔の個人的な経験で恐縮だが、第I相の臨床薬理試験を立案する際、反復投与毒性試験の中用量群と高用量群で死亡率が逆転していたものがあつた。確か高用量で

は0%だったと記憶している。理由を聞くと、実施施設が異なりどうも餌の相違によるものであるとのことだった。たまたま血液を保存してあったため濃度を測定すると、中用量群ではるかに高値を示していた。このような事例からも血中濃度と毒性所見との関連の重要性が伺われる。

(5) 薬物動態試験

開発医薬品の動物における吸収、分布、代謝、排泄についての情報は臨床試験を計画する際に重要なデータと考える。このことは別にこれから実施するヒトでの動態と類似しているか否かを問う意味で言っているのではない。種差が存在するのは当然のことであり、動物のデータがそのままヒトに適用できるのであればヒト試験は必要ないからである。薬物動態試験から得られる情報には、薬物動態学的パラメータ、吸収や消失の線形性の有無、生物学的利用率、消失経路、代謝経路の推測、薬物代謝酵素の同定、酵素誘導・阻害の有無、活性代謝物の存在、組織への分布状況、組織中濃度の測定、胎児移行性、血漿タンパク結合、雌雄差等、有効性および安全性の推測を可能にする多くの情報を含んでいる。これらのデータは、薬効薬理試験や毒性試験との組み合わせによりさらに貴重な情報源となりうると考える。フォーマルな薬物動態試験の情報を Drug Monitoring 的な考えで薬効薬理試験や毒性試験に反映できれば、各々の試験から得られる情報の精度・信頼性がかなり高まるのではないかと思う。そのことにより、臨床試験での有効性の予測や安全性への配慮がよりきめ細かなものにできると考える。現状では、各々の試験は分断された状態で記載されており「概要書を読む人間が勝手に判断しろ」といっているようなものである。情報を有効に活用するためには、利用者に配慮し理解しやすい記載方法を考えるということも大切なことと考える。

FDAは1997年4月に、開発医薬品について代謝経路・代謝酵素の同定と他の医薬品との相互作用に関して、第III相に入る前に *in vitro* で検討するように指示を出した(10)。キニジンによる CYP2D6 の阻害、ケトコナゾールやエリスロマイシンによる CYP3A4 の阻害、リファンピンや抗痙攣薬による CYP3A4 の誘導等が、臨床での薬物療法の有効性・安全性に極めて大きな影響を与えることが報告されてきたからである。米国ではヒトの肝臓が入手しやすい状況も関係していると思われる。方法論は異なるが、CPMPが全ての開発医薬品に関してQT延長の可能性について検討するよう義務づけたことと関連する。我が国ではこの種の規制は公にされていないが、何らかの対応が必要と考える。臨床試験を実施する上で併用可能薬・併用禁止薬の問題は重要なことであるからである。

(6) 遺伝毒性試験

ICH-S2Bの合意により遺伝毒性試験の標準的バッテリ

ーが提示された。従来の細菌を用いる遺伝子突然変異試験およびげっ歯類造血細胞を用いる染色体損傷のための *in vivo* 試験はそのまま、哺乳類の培養細胞(チャイニーズハムスター細胞株、ヒトリンパ球)を用いる染色体異常試験にマウスリンフォーマ(MLA)を使用する試験が追加容認された。MLA試験はマイクロウェル法で偽陽性率が低いことが報告されている(11)。遺伝毒性試験は開発第II相の前に完了しておくことになっている。臨床試験を立案する際に悩むのは、これら3つの試験の内少なくとも1つの試験に陽性所見が見られた場合にどの様に評価するかである。必要に応じて他の試験を追加することになってはいるが、追加試験した試験が標準バッテリーより信頼性が高いなら、初めからその試験を行えば良いと考えたと悩みは更に深くなる。追加試験で陽性所見が出た場合は結論を出しやすいと思うが、陰性の場合には更に深くなる。単純な結論は、治療薬がないような領域あるいは患者さんにとっての有用性が危険をはるかに上回ると考えられる場合を除いて、そういう開発医薬品については臨床試験を実施しなければ良いのだが、現在市販されている医薬品の中にも変異原性が陽性の薬物が存在し特に問題が起こっていない(これは確認されていないと思うが)ことも考慮すると、結論を容易に出せない。治験薬概要書でも結果は提示してあるが、評価までは踏み込んでいない場合が多い。最終的にはその開発医薬品の価値(企業にとってではなく医療にとって)が決定要因になると考える。また、このような場合、インフォームドコンセントの徹底と長期に渡る追跡を行うシステムを確立する必要があるのではないかと感じる。次世代にまで影響を及ぼしかねない問題だけに、特に慎重に対処しなければならないと考える。

(7) がん原性試験

通常、臨床試験を実施している段階ではがん原性試験の結果は手に入らない。特別の場合を除いて、承認申請時まで完了しておけばよいとされているからである(12)。問題はがん原性試験が陽性に出て開発を中止した場合である。臨床試験に参加してくれた被験者に対しどのようなフォローを行うかということである。遺伝毒性試験・反復投与試験での標的臓器等の所見が全て陰性で、がん原性だけが陽性ということは確率的には低いことだと思う。そう考えると、どこかでそのサインを見逃していたかあるいは無視していたということになる。臨床試験に参加していただいた被験者の方々に対しては、実施の際のインフォームドコンセントではがん原性については触れていないことがほとんどであり、また臨床試験終了からかなりの年月が経っている状況が多くどう対処すればよいか悩む。このようなケースは極めて希なことではあるが、現実存在する。毒性試験全体を注意深く評価して可能な限り避けなければならない

ことは自明の理である。開発企業、臨床試験に関係する医師、臨床試験の実施を許可する行政は対処についての何らかの見解を用意しておく必要があると思う。

(8) 生殖・発生毒性試験

生殖発生毒性試験(13)は対象とする被験者集団に応じて適切に実施されることが必要である。生殖発生毒性試験は3つの試験に分かれているが、これらの変化は次世代に影響を残すということを考えると、注意深く結果を評価しなければならない。3つの試験のうち雄受胎能試験は第III相を開始する前に完了しておくことになった。従って、第I相および第II相での試験で男性を対象とする場合、雄受胎能試験のデータは必須ではなくなった。代わりに、反復投与毒性試験での雄生殖器に関する病理組織学的検査が要求されることになったが、これは感度が高い理由による。臨床試験を実施する際に、組織病理所見に異常が見られた場合当然被験者にインフォームすることになるのだが、どの様に説明し臨床試験での安全性の配慮をどう計画しているかということが問題となってくる。ここで重要になってくるのは、異常所見の質(程度)と可逆性ではないかと考える。ただ、仮に可逆性が動物で見られたとしてもヒトで見られるかということは全く判らないわけで、そうすると最低でも精子の数・運動性の検討を臨床試験の中で実施しなければ被験者の安全性を保証できないし、またコンセンも得られないと考える。

妊娠可能な女性を臨床試験の対象とする場合、我が国では雌受胎能および胚/胎児発生への影響を完了していなければならない。もしこれらの試験で異常が見られている場合、ごく限られた状況を除いて(生命に関係し既存薬がない、等)妊娠可能な女性を臨床試験に組み入れようとは思わない。

出生前および出生後の発育への影響の評価は、承認申請時に提出すればよいことになっているため臨床試験期間中に参考とすることは少ない。しかし、小児を対象とする臨床試験の場合には必須項目である。

生殖発生毒性試験は雌雄、両親、子に係わることであるので、3つの試験中いずれかで異常所見が見られた場合、原則的には臨床試験の実施は難しいと考える。特別な状況(疾患が重篤で、既存薬がないあるいは極めて高い有効性が期待できる、等)があり開発する正当な理由が存在する場合は、慎重な安全性の配慮を実施計画書に反映させると同時にインフォームドコンセントは本人に加え配偶者からも取得する必要がある。従って、他の非臨床試験データとの関連も考慮し、被験者あるいはその子孫に対してどの程度の危険性があるかを概要書から読みとる必要性が出てくる。

(9) 局所刺激性試験

局所刺激性のデータに関しては、静注薬・筋注薬・貼付剤・点眼薬等の臨床試験の場合に参考することになる。刺激所見が得られた場合、まず媒体によるものか当該薬物によるものかを評価する。薬物によるものの場合、当該薬物の薬理作用に基づくものか、感作によるものかの評価をすることになる。日本の非臨床試験ガイドラインでは検討中とされており、どのような形で提示されるのか私には判らないが、ヒトデータと動物データを比較しやすい試験ではないかと考える。

5. 臨床薬理の立場から非臨床試験に望むこと

冒頭にも書いたが臨床試験を実施する際に「非臨床試験を参考にしない」ことなどない。特に臨床試験の初期の段階では、被験者の安全性を最優先するために、非臨床試験データを重要視するし逆に所見を過大に評価することが多い。もちろん開発の相が進みヒトのデータが蓄積されてくれば、より被験者に対する安全性の確保がしやすくなることは事実である。それでも非臨床試験データの価値が下がるわけではない。しかしながら、現在の非臨床データの情報伝達様式(治験薬概要書)は臨床試験に携わる者にとって利用しやすいものとは言えない。このことは上記の各項目で述べた。繰り返しになるが、結果の羅列・各非臨床試験データの孤立化が目立ち、開発医薬品の全体像が見えてこない。開発企業が個々の部門を細分化し専門性を高めることは結構だが、逆に各々の非臨床試験のつながりがなくなっている。極端に言う、我々は1つの薬物を1人のヒトに投与し有効性と安全性の関係を同時に検討していく立場にあり、有効性(薬効薬理)だけ、安全性だけ(安全性薬理、毒性試験)を検討するわけではない。もちろん1匹の動物で全てのデータを出してくれと言っているのではない。個々の非臨床試験のつながり(血中濃度、組織濃度などを介して)の情報が欲しいのである。それによって1個体に投与したときの有効性と安全性の関係を参考にすることができる。

動物データの外挿性に関して話題にされることがよくある。多くは有害作用との関係で話題にされる。予測性は確かに重要であると思うが、この論議の方向性に関して臨床薬理の立場からは疑問がある。我々(臨床薬理に携わる者)は被験者の安全性を最重視して試験を計画・実施する。臨床試験で有害作用が起こって欲しくないのである。仮に動物データからのある有害作用の外挿性が確実となり、10%発現するとする。10人に1人にその有害作用が発現することが明らかならば、我々はその薬物を被験者に投与したいとは思わない。我々が求める外挿性は、どの濃度の範囲なら安全であるかという外挿性であり、動物とヒ

トでの有害作用の種類・発現率の一致ではない。ヒトと動物間には厳然たる種差が存在し、動物データをそのまま外挿することは困難である。動物では見られなかった作用がヒトで見られることもあるし、逆に動物で見られた作用がヒトで全く見られないこともある。安全性の面でも同様なことが言える。しかしながら、このことは結果論であり、臨床試験を計画・実施しているときには全く判らないことである。どこかで述べたかも知れないが、仮に全ての項目の外挿性が100%ならヒト試験はいらない。ある項目の外挿性が100%だとしても他の項目の外挿性が100%でなければ、臨床試験の現実はほとんど変わらず、安全性確保を最重要視して試験を立案・実施することになる。もし、全ての項目の外挿性が判明していて、全て50%の確率で発現するとしても、それは臨床試験を実施する側にはほとんど意味のないことである。何故なら、実施する側にとってはその事象が起こるか起こらないかが問題であり、1人の被験者に対してその事象が起こるか起こらないかはその時点で全く判らないからである。有害事象に関する外挿性の議論は、開発企業が候補薬物の選択に用いるときには確かに有用であろう（サリドマイドの様な事例を避ける意味で）が、臨床試験の実施に関しては殆ど参考にならない。なぜなら、次元が違う問題だからである。

6. おわりに

臨床試験の実施側は治験薬概要書を情報源として非臨床試験データを入力し参考にする。細分化すればするほど個々のデータの信頼性は高まるであろう。しかし、それとは逆に当該開発候補医薬品の全体としての特徴が捉えにくくなり、情報の価値が低下する。各部門の結果を有機的に結びつける対策を開発企業にお願いしたい。また、結果の羅列だけではなく、結果の評価を記載していただきたい。その評価が妥当か否かの判断は読む側にも出来ることであるし、それにより科学的な対話が可能になり、非臨床試験データの価値が高くなると思う。また、評価を記載することで臨床試験の実施計画書を審議する審査委員会の理解も得やすくなることと思う。

医薬品の開発は非臨床・臨床を問わず総合的に検討すべきものであり、そうすることにより真に有用な医薬品を世の中に提供することができるのではないかと考える。

謝辞：毒性試験の関連を考慮する上で貴重な御助言をいただいた、藤沢薬品工業株式会社安全性研究所 橋本正晴氏にこの場を借りて感謝致します。

文 献

- 1) 中野重行, 秋山秀樹, 小林真一, 中島新一郎, 井部俊子, 大橋京一, 景山 茂, 江口研二, 内田英二, 石川征四郎, 他: 平成9年度厚生科学研究「新GCP普及定着総合研究班」最終報告書. 新GCPの普及定着に向けて, pp 20-235, 株式会社ミクス, 東京 (1998)
- 2) 厚生省医薬安全局審査管理課長: 臨床試験の一般指針について. 医薬審第380号, 東京 (1998)
- 3) 大野泰雄, 内田英二, 大森義仁, 加藤隆一, 久保康教, 紫芝良昌, 内藤周幸, 林 裕造, 馬屋原宏, 森 剛彦: 臨床試験に関連した非臨床試験の実施タイミングに関する研究. 厚生科学研究医薬品規制ハーモナイゼーション推進国際共同研究 平成九年度研究業績報告書, 前川 正(編), pp 101-105, 東京 (1998)
- 4) 川俣順一, 松下 宏(編): 疾患モデル動物ハンドブック. 医歯薬出版, 東京 (1979)
- 5) 川俣順一, 松下 宏(編): 疾患モデル動物ハンドブック No.2. 医歯薬出版, 東京 (1982)
- 6) 山村研一, 勝木元也, 相澤真一(編): マニュアル疾患モデルマウス. Molecular Medicine 増刊号, 中山書店, 東京 (1994)
- 7) Committee for Proprietary Medicinal Products: Points to consider: the assessment of the potential for QT interval prolongation by non-cardiovascular medicinal products. CPMP/986/96, London (1997)
- 8) Monro A and Mehta D: Are single-dose toxicological studies in animals adequate to support single doses of a new drug in humans? Clin Pharmacol Ther **59**, 258-264 (1996)
- 9) Choudary J, Contrera JF, DeFelice A, DeGeorge JJ, Farrelly JG, Fitzgerald G, Goheer MA, Jacobs A, Jordan A, Meyers L, et al: Response to Monro and Mehta proposal for use of single-dose toxicology studies to support single-dose studies of new drugs in humans. Clin Pharmacol Ther **59**, 265-267 (1996)
- 10) Center for Drug Evaluation Research U.S. Food and Drug Administration: Guidance for industry drug metabolism/drug interaction studies in the drug development process: studies in vitro. (1997)
- 11) 祖父尼俊雄, 林 真, 本間正充, 嶋田弘康, 田中憲徳, 若栗 忍, 青儀巧, 山本好一, 西 義介, 中館正弘, 他: 変異原性試験法の国際的標準化のためのデータベースを用いた試験法の解析. 厚生科学研究医薬品規制ハーモナイゼーション推進国際共同研究 平成九年度研究業績報告書, 前川 正(編), pp 70-78, 東京 (1998)
- 12) ICH-S1A: Safety carcinogenicity studies. In Proceedings of The Third International Conference on Harmonisation, Edited by D'Arcy PF and Harron DWG, pp 203-302, Greystone Books, Ltd, Antrim N, Ireland (1996)
- 13) 田中 悟, 大森義人, 谷村 孝, 塩田浩平, 川島邦夫, 高山 敏, 長谷川靖彦, 水谷正寛, 藤井孝朗, 三沢 肇: 生殖発生毒性試験法ガイドラインの国際的な枠組みによる策定に関する研究-医薬品の生殖発生毒性試験法ガイドライン-. 厚生科学研究医薬品規制ハーモナイゼーション推進国際共同研究 平成七年度研究業績報告書, 前川 正(編), pp 98-117, 東京 (1996)

Abstract - An evaluation of non-clinical animal data from the point of view of a clinical pharmacologist. Eiji UCHIDA (Second Department of Pharmacology, School of Medicine, Showa University, 1-5-8 Hatano-dai, Shinagawa-ku, Tokyo 142-8555, Japan).

Folia Pharmacol. Jpn. (Nippon Yakurigaku Zasshi) **113**, 47-53 (1999)

The development of a new chemical entity for human use is a stepwise process based on an assessment of both animal and human data on efficacy and safety of the drug. Clinical pharmacologists always refer to animal data through an Investigator's Brochure (IB) when planning and performing a clinical trial(s). The IB should provide the investigator(s) with useful information to select doses, dosing intervals, and safety monitoring procedures and also to support the clinical management of subjects during the trial(s). Non-clinical animal studies contained in the IB, however, lack a relationship to the pharmacological and toxicological findings of the investigated product(s). Most of the non-clinical animal studies address the methodology and the results obtained, but are lacking in a discussion of the relevance of the findings. The IB should include not only a summary of the findings in each field of animal study but also relationships of the findings through some indicator(s) such as blood and tissue concentrations of the parent drug and/or metabolites. I do hope Pharmaceutical Companies will provide much useful information about their product(s) through the improvement of their system of research and development.

Keywords: non-clinical data; clinical trials; Investigator's Brochure; clinical pharmacology; safety

著者プロフィール

内田 英二 (うちだ えいじ)

昭和大学医学部第二薬理学教室, 助教授, 医学博士.

◇1980年3月昭和大学医学部卒業, '81年12月米国ペンシルヴァニア大学医学部 Post Doctoral Fellow, '83年11月同帰国, '84年3月医学博士学位記授与, 同年4月昭和大学医学部助手(第二薬理), '87年4月同講師, '89年2月オランダ国ライデン大学 Visiting assistant professor, 臨床薬理学会海外研修員として, '90年7月同帰国, '93年4月昭和大学医学部助教授(第二薬理).

◇日本臨床薬理学会評議員・認定医・指導医, 日本薬理学会評議員, 日本老年医学会会員, 日本眼薬理学会会員, 日本薬物動態学会会員, 日本癌治療学会会員, ICH 有効性部門厚生省委員 (E5, M3) (1992~1998), 厚生省「適正使用のための有効性, 安全性の試験法に関する研究班」委員 (平成7年度~8年度), 厚生省「新GCP普及定着総合研究」平成9年度研究協力者, 医薬品調査機構「新薬のブリッジング試験のための国際的比較研究」平成10年度研究協力者, 厚生省「臨床試験基盤整備研究班」平成10年度研究協力者.

◇研究テーマ: 臨床薬理学 (薬物動態・薬力学の関係: 性差, 高齢者等), 臨床試験の科学と倫理, 臨床試験の質の改善.

◇趣味: 将棋, 旅行, コンピュータゲーム.

◇主な著書: 薬理作用・薬物動態の個性差, 「臨床薬理学」, 医学書院. 抗精神薬の使い方, 「臨床薬理学テキスト」, 南江堂. 新薬理学 (Q シリーズ, 総論・消化器・ホルモン・ビタミン), 日本醫事新報社.

第I相試験, 「臨床試験: 医薬品の適正評価と適正使用のために」, 薬事日報社ミクス.



第6回世界臨床薬理学会 (アルゼンチン, ブエノスアイレス) にて. トロント大学稲葉教授 (右) と筆者 (左)

本論文は、日本薬理学雑誌 113 巻 1 号 47-53 頁 (1999 年) に掲載されたもので、著者および日本薬理学会編集委員会から転載の許可を得て全文を掲載した。

コモン・テクニカル・ドキュメント
〈ICH における CTD の位置付け〉

ICH Common Technical Document (CTD) Guideline on Registration of New
Medical Products : Status of CTD Safety Section

Mutsufumi Kawai
Lilly Research Laboratories Japan

Harmonization of regulatory requirement was originally pioneered by the European Community, in the 1980's, as the EC (now the EU) moved towards the development of a single market for pharmaceuticals. Specific plans for action actually began to materialize the harmonization at the WHO International Conference of Drug Regulatory Authorities (ICDRA) in Paris, in 1989. The birth of ICH (International Conference on Harmonization of Technical Requirements for Registration of Pharmaceuticals for Human Use) took place at a meeting in April 1990, hosted by the European Federation of Pharmaceutical Industries Association in Brussels. Representatives of the regulatory agencies and industry associations of Europe, Japan and USA met, primarily, to plan an International Conference but the meeting also discussed the wider implications and terms of reference of ICH. The committee to ICH was set out in a Steering Committee Statement from the meeting in Tokyo, October 1990. Then, the first ICH was held in the following year, in 1991.

From an early stage, ICH process has focused its activities on eliminating the duplication of experimentation during the development of new medicinal products in the three regions (EU, Japan and USA). The ICH Expert Working Group (EWG) first addressed the need for a Common Technical Document (CTD) at the ICH Third Meeting held in Japan in 1995. Following this, the Pharmaceutical Research Manufacturers of America convened a group of experts from quality, safety and efficacy areas to meet as an ICH-EWG in Virginia, USA, in May 1996.

The CTD consists of three area; Quality (Chemistry), Safety (Non-clinical)

and Efficacy (Clinical) studies. In the non-clinical area, applicant submit identical study reports for New Drug Application (NDA) in all three regions, EU, Japan and U.S.A. Yet, they make different summary dossiers for the three regions in current practice. This practice is necessary to meet different regulatory requirements for each region in accordance with the following regulations:

EU: The Rules Governing Medicinal Products in the European Union; Notice to Applicants (1997);

Japan: The Guiding Principles for Preparing the 'Document Summary (Gaiyo)' of Applications for Approval of New Drugs (1992);

USA: Guideline for the Format and Content of the Non-clinical Pharmacology/Toxicology Section of Application (1987).

Since the three health authorities are all reviewing the same data, there is no reason why the data should not be presented to each in the same way. Having such background, the purpose in the Common Technical Document EWG was to establish a regulation common to the three regions. In the feasibility study, the EWG examined differences in format and content in the three regions. These differences are apparent in the summary dossiers. Although some similarities do exist in reproductive/teratogenic toxicology and carcinogenicity studies, dissimilarities have been addressed by the EWG. The EWG considered that it is feasible to define a global common summary dossier assuming applicants will use the same study reports for NDA documentation.

EWG has been discussing how to assemble the overall dossier of total CTD including all sections of Quality, Safety and Efficacy. The CTD-Safety EWG proposed an overall format for the dossier to illustrate how the safety data would be integrated by taking six modules, Module I to VI.

"Module I" would contain documents specific to each region. This would include, for example, application forms and the proposed label for use in the region. The content and format of this module could be specified by the regional regulatory authority.

Module II: This module and the next three modules (Modules III, IV and V) are intended to be identical for all regions. Module II will provide an Executive Summary of the Quality, Non-clinical and Clinical information in

the Dossier. This will be followed by a Written Summary and a Tabulated Summary. The Written Summary and the Tabulated Summary are key issues in the CTD. Written Summaries of the CTD-Safety consist of pharmacology, pharmacokinetics and toxicology.

Tabulated Summaries for study results have been categorized in four levels (Level A to D):

Level A table is an overview table to list study items throughout pharmacology, pharmacokinetics and toxicology.

Level B is a table for toxicology studies not requiring detailed individual tabulated summaries such as in acute toxicity, non-pivotal repeat dose studies or dose range-finding studies.

Level C deals with pivotal toxicology studies such as long term toxicity studies, carcinogenicity and reproductive/teratogenic toxicity studies.

Level D table is applied to pharmacology and pharmacokinetic studies tabulating cross-species and cross-studies data in a flexible manner.

Modules III, IV and V are technical study reports which would be presented in a prescribed order. Module VI is a section addressing regional requirements for additional information. For example, an environmental assessment as specified by a regional regulatory authority can be located in this module.

Within the Written Summaries, Tabulated Summaries and Study Reports, the data are presented in the following sequence:

1 Pharmacology

- 1.1 Primary Pharmacodynamics
- 1.2 Secondary Pharmacodynamics
- 1.3 Safety Pharmacology
- 1.4 Pharmacodynamic Drug Interactions

2 Pharmacokinetics

- 2.1 Analytical Methods
- 2.2 Absorption and Excretion Kinetics
- 2.3 Tissue Distribution
- 2.4 Metabolism
- 2.5 Pharmacokinetic Drug Interactions
- 2.6 Other Pharmacokinetic Studies

3 Toxicology

- 3.1 Single-Dose Toxicity
- 3.2 Repeat-Dose Toxicity
- 3.3 Genotoxicity
- 3.4 Carcinogenicity
- 3.5 Reproductive/Teratogenic Toxicity
- 3.6 Other Toxicity Studies

It should be reminded that the CTD-Safety is not a guideline for study design and does not specify what studies are required. The CTD provides a format for summary dossiers of the studies carried out in compliance with the various non-clinical guidelines. Technical guidelines and requirements for non-clinical studies to support product registration have been defined in the ICH-Safety Guidelines coded S1 to S7:

- S1: Carcinogenicity Studies
 - S1A: Need for Carcinogenicity Studies
 - S1B: Testing for Carcinogenicity
 - S1C: Dose Selection for Carcinogenicity Studies
 - S2: Genotoxicity Studies
 - S2A: Specific Aspects of Regulatory Genotoxicity Tests
 - S2B: A Standard Battery for Genotoxicity Testing
 - S3: Toxicokinetics and Pharmacokinetics
 - S3A: Toxicokinetics: Assessment of Systemic Exposure
 - S3B: Repeated Dose Tissue Distribution Studies
 - S4: Toxicity Testing
(Single-dose and Repeat-dose Toxicity Studies)
 - S5: Reproductive Toxicity
 - S5A: Detection of Toxicity to Reproduction
 - S5B: Male Fertility Studies
 - S6: Safety Evaluation of Biotechnology-Derived Pharmaceuticals
 - S7: Safety Pharmacology Studies
- (Refer to "<http://www.nihs.go.jp/dig/ich/ichindex.htm>")

EWG members are still continuously reviewing the CTD draft guidelines. Therefore, the proposals detailed in this article may be subject to change

depending on EWG's working progress. It is expected that CTD Guidelines as a whole combining Quality, Safety and Efficacy sections will be finalized by the end of this century.

99.03.31

JVS マウスの原因遺伝子の探索

金沢大学医学部附属動物実験施設 早川純一郎

十数年前に我々の施設で系統維持をしていた C3H.H-2o (C3H.OH)に肝など内臓に脂肪蓄積を認める異常個体を発見した。このマウスを JVS (juvenile visceral steatois, 若齢内臓脂肪症) マウスと命名した。家系調査と交配実験によって劣性突然変異遺伝子によることが確認されたので、この原因遺伝子を jvs 遺伝子と命名した。しかし、発症個体の多くは生後 30 日までに死亡し、jvs の染色体上の位置を正確にきめることは困難であった。一方、その病態については鹿児島大学医学部、大阪大学医学部で精力的に研究され、JVS マウスでは長鎖脂肪酸のミトコンドリアへの輸送に重要な役割を果たすカルニチンが欠乏しており、これがこのマウスの病態の原因であることが報告された(文献リスト参照)。

この発見によって JVS マウスにカルニチンを投与することで離乳前の死亡を減少させる事が可能となり、不完全ながら JVS マウスから仔をとることが可能となった。この治療法の発見とこの 10 年間でのマイクロサテライトの多型など、標識遺伝子が増加により、jvs 遺伝子を第 11 染色体にマップすることができ、その近傍に存在する機能的な遺伝子、IL-4 や IL-3 から、ヒトではこれと相同の遺伝子はヒト第 5 染色体長腕 (5q) に存在する可能性が高いことを報告した。今年 (1998 年) になって、ヒトの全身性カルニチン欠乏症の原因遺伝子が我々がマウスでのマッピング結果から予想したようにヒト第 5 染色体長腕に存在することが証明され (1)、JVS マウスはヒトの家族性カルニチン欠乏症の疾患モデルであることが明らかになった。われわれはマウスのマッピングの結果から、YAC クローンを選択してポジショナル・クローニングを目指してきた。

これとは独立に薬物動態の面から JVS マウスを用いて共同研究を行ってきた、金沢大学薬学部ではいろいろな物資の細胞内外への能動輸送を行うトランスポーターのクローニングを精力的に行っていたが、最近、玉井・辻らは新しくクローニングしたヒトの有機カチオン・トランスポーターの一つ、OCTN2 がカルニチンを特異的にトランスポートすることを発見した (2)。ヒトゲノムプロジェクトの成果が蓄積されているデータベースを検索すると、これと相同性の高い配列がすでに 5q にあることが報告されていた。この一連の情報から、JVS マウスの原因はマウスにおける OCTN2 と相同の遺伝子(mOCTN2)の異常によることが推測される。実際にマウスの mOCTN2 の cDNA がとられ、この遺伝子がポジショナル・クローニングを試みている過程で存在が推定された YAC クローンの一つに存在すること、JVS マウスではこの遺伝子のコドン 352 にチミンからグアニンへのポイント・ミューテーションがあり、その結果ロイシンからアルギニンへのアミノ酸置換が起こっていること、ヒト胎児腎細胞での発現実験から JVS マウスからの mOCTN2 を導入した細胞は正常遺伝子を導入した細胞に比べてカルニチンの取り込みが極めて悪いことが明らかになった。

ヒトの 3 家系の家族性カルニチン欠乏症でも OCTN2 遺伝子に変異があることが明ら

かになった。しかし、この3家系ではその変異のタイプはそれぞれ異なり、一つの家系の発端者（カルニチン欠乏患者）は異なる変異の複合型であることも明らかにされた。以上より、JVS マウスの原因遺伝子は mOCTN2 がポイント・ミューテーションによって変異したものであり、ヒトでの OCTN2 のミューテーションは同様に家族性カルニチン欠乏症を発症させることが明らかになった。なお、ヒト集団では OCTN2 の変異遺伝子をヘテロでもつ個体がかかなりの頻度で存在することが推定され、JVS マウスはヘテロ状態での病態の研究の有用なモデルとされている。

(1) Evidence for linkage of human primary systemic carnitine deficiency with D5S436: A novel gene locus on chromosome 5q. Yutaka Shoji, Akio Koizumi, Tsuyoshi Kayo, Tomoaki Ohata, Tsutomu Takahashi, Kenji Harada, and Goro Takada. *Am. J. Hum. Genet.* 63:101-108 (1998)

(2) Molecular and functional identification of sodium ion-dependent, high affinity human carnitine transporter OCTN2. Ikumi Tamai, Rikiya Ohashi, Jun-ichi Nezu, Hikaru Yabuuchi, Asuka Oku, Miyuki Shimane, Yoshimichi Sai and Akira Tsuji. *J. Biol. Chem.* 273:20378-20382 (1998)

JVS マウスについて発表された論文リスト

1. Infantile disease with microvesicular fatty infiltration of viscera spontaneously occurring in the C3H-H-2o strain of mouse with similarities to Reye's syndrome. T. Koizumi, H. Nikaido, J. Hayakawa, A. Nonomura, T. Yoneda. *Laboratory Animals*, 22: 83 - 87 (1988)

2. Urea cycle disorder in C3H-H-2o mice with juvenile steatosis of viscera. Yasushi Imamura, Takeyori Saheki, Hiroyuki Arakawa, Takashi Noda, Tsutomu Koizumi, Hiroko Nikaido, Jun-ichiro Hayakawa. *FEBS Letters*, 260: 119 - 121 (1990)

3. Inheritance of juvenile visceral steatosis (jvs) found in C3H-H-2o mice. Jun-ichiro Hayakawa, Tsutomu Koizumi, Hiroko Nikaido. *Mouse Genome (formerly Mouse News Letter)* 86 : 261 (1990)

4. Animal model of systemic carnitine deficiency: Analysis in C3H-H-2o strain of mouse associated with juvenile visceral steatosis. Masamichi Kuwajima, Norio Kono, Masahisa Horiuchi, Yasushi Imamura, Akira Ono, Yoshiaki Inui, Sumio Kawata, Tsutomu Koizumi, Jun-ichiro Hayakawa, Takeyori Saheki, Seiichiro Tarui. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 174: 1090 - 1094 (1991)

5. Abnormal gene expression of urea cycle enzyme genes in juvenile visceral steatosis (jvs) mice. Mineko Tomomura, Yasushi Imamura, Masahisa Horiuchi, Tsutomu Koizumi, Hiroko Nikaido, Jun-ichiro Hayakawa, Takeyori Saheki.

Biochimica et Biophysica Acta, 1138: 167 – 171 (1992)

6. Proto-oncogene c-jun and c-fos messenger RNAs increase in the liver of carnitine-deficient juvenile visceral steatosis (jvs) mice. M. Tomomura, K. Nakagawa, T. Saheki. *FEBS Letters*, 311: 63 – 66 (1992)
7. Carnitine administration to juvenile visceral steatosis mice corrects the suppressed expression of urea cycle enzymes by normalizing their transcription. Masahisa Horiuchi, Keiko Kobayashi, Mineko Tomomura, Masamichi Kuwajima, Yasushi Imamura, Tsutomu Koizumi, Hiroko Nikaido, Jun-ichiro Hayakawa, Takeyori Saheki. *The Journal of Biological Chemistry*, 267: 5032 – 5035 (1992)
8. Cardiac hypertrophy in juvenile visceral steatosis (jvs) mice with systemic carnitine deficiency. Masahisa Horiuchi, Hiroki Yoshida, Keiko Kobayashi, Kazumi Kuriwaki, Kosei Yoshimine, Mineko Tomomura, Tsutomu Koizumi, Hiroko Nikaido, Jun-ichiro Hayakawa, Masamichi Kuwajima, Takeyori Saheki. *FEBS Letters*, 326: 267 – 271 (1993)
9. Primary defect of juvenile visceral steatosis (jvs) mouse with systemic carnitine deficiency is probably in renal carnitine transport system. Masahisa Horiuchi, Keiko Kobayashi, Seiji Yamaguchi, Nobuo Shimizu, Tsutomu Koizumi, Hiroko Nikaido, Jun-ichiro Hayakawa, Masamichi Kuwajima, Takeyori Saheki. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1226: 25 – 30 (1994)
10. Abnormal gene expression and regulation in the liver of jvs mice with systemic carnitine deficiency. M. Tomomura, Y. Imamura, A. Tomomura, M. Horiuchi, T. Saheki. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1226: 307 – 314 (1994)
11. Mapping of jvs (juvenile visceral steatosis) gene, which causes systemic carnitine deficiency in mice, on Chromosome 11. H. Nikaido, M. Horiuchi, N. Hashimoto, T. Saheki, J. Hayakawa. *Mammalian Genome*, 6: 369 – 370 (1995)
12. Mitochondrial abnormalities of muscle tissue in mice with juvenile visceral steatosis associated with systemic carnitine deficiency. J. Miyagawa, M. Kuwajima, T. Hanafusa, K. Ozaki, H. Fujimura, A. Ono, R. Uenaka, I. Narama, T. Oue, K. Yamamoto, M. Kaidoh, H. Nikaido, J. Hayakawa, M. Horiuchi, T. Saheki, Y. Matsuzawa. *Virchows Archiv*, 426: 271 – 279 (1995)
13. Carnitine Transport Defect in Fibroblasts of Juvenile Visceral Steatosis (JVS) Mouse. M. Kuwajima, K-m. Lu, H. Harashima, A. Ono, I. Sato, A. Mizuno, T. Murakami, H. Nakajima, J. Miyagawa, M. Namba, T. Hanafusa, J. Hayakawa, Y. Matsuzawa, K. Shima. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 223: 283 – 287 (1996)
14. Altered expression of carnitine palmitoyltransferase II in liver, muscle, and heart of mouse strain with juvenile visceral steatosis. Kikuko Hotta, Masamichi Kuwajima, Akira Ono, Rikako Uenaka, Hiromu Nakajima, Junichiro

- Miyagawa, Mitsuyoshi Namba, Toshiaki Hanafusa, Masahisa Horiuchi, Hiroko Nikaido, Jun-ichiro Hayakawa, Norio Kono, Takeyori Saheki, Yuji Matasuzawa. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1289: 131 – 135 (1996)
15. Disordered expression of glycolytic and gluconeogenic liver enzymes of juvenile visceral steatosis mice with systemic carnitine deficiency. K. Hotta, M. Kuwajima, A. Ono, H. Nakajima, Y. Horikawa, J. Miyagawa, M. Namba, T. Hanafusa, M. Horiuchi, H. Nikaido, J. Hayakawa, T. Saheki, N. Kono, T. Oguchi, Y. Matsuzawa. *Diabetes Research and Clinical Practice*, 32: 117 – 123 (1996)
 16. Long-chain fatty acid suppress the induction of urea cycle enzyme genes by glucocorticoid action. M. Tomomura, A. Tomomura, D. A. A. Musa, T. Saheki. *FEBS Letters*, 399: 310 – 312 (1996)
 17. Definition of the locus responsible for systemic carnitine deficiency within a 1.6-cM region of Mouse chromosome 11 by detailed linkage analysis. K. Okita, T. Tokino, H. Nishimori, K. Miura, H. Nikaido, J. Hayakawa, A. Ono, M. Kuwajima, Y. Matsuzawa, Y. Nakamura. *Genomics*, 33 : 289 – 291 (1996)
 18. Increased expression of carnitine palmitoyltransferase I gene is repressed by administering L-carnitine in the hearts of carnitine-deficient juvenile visceral steatosis mice. Rikako Uenaka, Masamichi Kuwajima, Akira Ono, Yuji Matsuzawa, Jun-ichiro Hayakawa, Naohiro Inohara, Yasuo Kagawa, Shigeo Ohta. *Journal of Biochemistry*, 119: 533 – 540 (1996)
 19. Heterogeneity of histopathologic features in the congenitally carnitine-deficient juvenile visceral steatosis (JVS) mouse. Isao Narama, Kiyokazu Ozaki, Tetsuro Matsuura, Akira Ono, Masako Sei, Kenji Shima, Masamichi Kuwajima. *Biomedical Research*, 18: 247 – 255 (1997)
 20. A novel gene suppressed in the ventricle of carnitine-deficient juvenile visceral steatosis mice. M. Masuda, K. Kobayashi, M. Horiuchi, H. Terazono, N. Yoshimura, T. Saheki. *FEBS Letters*, 408: 221 – 224 (1997)
 21. Suppressed expression of the urea cycle enzyme genes in the liver of carnitine-deficient juvenile visceral steatosis (JVS) mice in the infancy and during starvation in adulthood. Mineko Tomomura, Akito Tomomura, Dewan Abdullah Abu Musa, Masahisa Horiuchi, Masaki Takiguchi, Masataka Mori, Takeyori Saheki. *Journal of Biochemistry*, 121: 172 – 177 (1997)
 22. Altered expression of atrial natriuretic peptide and contractile protein genes in hypertrophied ventricle of JVS mice with systemic carnitine deficiency. K. Yoshimine, M. horiuchi, S. Suzuki, K. Kobayashi, J. Abdul, M. Masuda, M. Tomomura, Y. Ogawa, H. Itoh, K. Nakao, M. Osame, T. Saheki. *Journal of Molecular and Cell Cardiology*, 29: 571 – 578 (1997)
 23. Secondary abnormality of carnitine biosynthesis results from carnitine

reabsorptional system defect in juvenile visceral steatosis mice. Masahisa Horiuchi, Keiko Kobayashi, Naomasa Asaka, Takeyori Saheki. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1362 : 263-268 (1998)

24. Gene-dose effect on carnitine transport activity in embryonic fibroblasts of JVS mice as a model of human carnitine transporter deficiency. N. Noriyoshi, F. Suzuki, I. Tamai, H. Nikaido, M. Kuwajima, J. Hayakawa, A. Tsuji. *Biochemical Pharmacology*, 55 :1729-1732 (1998)

25. Characteristics of cardiac hypertrophy in the juvenile visceral steatosis mouse with systemic carnitine deficiency. M. Kuwajima, K. Lu, M. Sei, A. Ono, M. Hayashi, K. Ishiguro, K. Ozaki, K. Hotta, K. Okita, T. Murakami, J. Miyagawa, I. Narama, H. Nikaido, J. Hayakawa, H. Nakjima, M. Namba, T. Hanafus, Y. Matsuzawa, K. Shima. *Journal of Molecular and Cell Cardiology*, 30 : 773-781 (1998)

26. A missense mutation of mouse OCTN2, a sodium-dependent carnitine cotransporter, in the juvenile visceral steatosis mouse. K. Lu, H. Nishimori, Y. Nakamura, K. Shima, M. Kuwajima. *Biochem Biophys Res Commun.*, 252 : 590-594 (1998)

27. Decreased tissue distribution of L-carnitine in juvenile visceral steatosis mice. K. Yokogawa, Y. Higashi, I. Tamai, M. Nomura, N. Hashimoto, H. Nikaido, J. Hayakawa, K. Miyamoto, A. Tsuji. *J. Pharmacology and Experimental Therapeutics* (in press)

28. Primary systemic carnitine deficiency is caused by mutations in a sodium ion-dependent carnitine transporter. J. Nezu, I. Tamai, A. Oku, R. Ohashi, H. Ybuuchi, N. Hashimoto, H. Nikaido, Y. Sai, A. Koisumi, Y. Shoji, G. Takada, T. Matsuiishi, M. Yoshino, H. Kato, T. Ohura, g. Tsujimoto, J. Hayakawa, M. Shimane, A. Tsuji. *Nature Genetics* 21 : 91-94 (1999)

総説

1. 新しい脂肪肝モデル動物 (2) カルニチン欠乏マウス. 堀内正久, 佐伯武頼 *臨床科学* 28 : 1470-1471, 1992年.
2. 全身性カルニチン欠乏マウス (JVSマウス) の病態生理学的分析. 桑島正道, 呂康模, 島健二. *日本臨床化学会, 四国支部会誌* 12 : 3-11, 1995年.
3. 代謝異常疾患の病態形成における遺伝子発現異常—全身性カルニチン欠乏マウスの知見から—. 堀内正久. *生化学* 68 : 1654-1657, 1996年.
4. 2種の疾患モデル動物における高アンモニア血症発症機構—尿素サイクル酵素欠損マウスとカルニチン欠損マウス—. 佐伯武頼. *病理と臨床* 15 : 800-805, 1997年.

第 60 回関西実験動物研究会研究発表抄録

1. Tg 動物飼育用ラック「ルフテンTG」の開発 (第1報)
2. LIG-1 ノックアウトマウス受精卵・精子の凍結保存
3. 腫瘍細胞株の微生物汚染に関する検討
4. サルおよびイヌからの *Helicobacter* 属菌の分離と生物学的性状
5. 定量的マイクロプレート DNA ハイブリダイゼーション法を用いた *Helicobacter* 属菌種の同定
6. FLS(Fatty Liver Shionogi)-*ob/ob* マウスの自然発生肝腫瘍
7. 尿管間質病変における尿管結紮モデルの意義
8. 2系統のヘアレスラット、Ico:OFA-hr/hr および
HWY:Slc ラットの皮膚の性状、形態に関する比較検討
9. LIG-1 ノックアウトマウスの皮膚病変
10. 大阪産野生マウスに発見された短尾突然変異遺伝子の染色体マッピング
11. ラット遺伝連鎖地図の統合
12. 老化と脳内サイトカインの発現
13. 哺乳動物のピューロマイシン感受性アミノペプチダーゼ

TG動物飼育用ラック「ルフテンTG」の開発（第1報）

斎藤正信（大気社）、大城匡豊（大気社）、銀 一之（白銀工業）、橋詰俊雄（白銀工業）

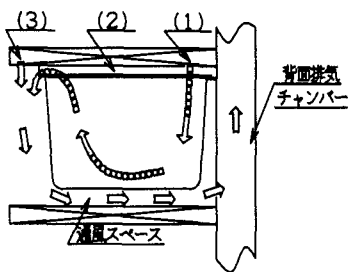
【経緯】近年遺伝子関連研究の発展に伴い、TG動物の飼育が急激に増加しており、ケージ・ラックシステムに対しても従来とは異なった機能・性能が求められるようになった。特に、動物相互および動物⇄人間の相互感染防止機能の一層の向上の要求が特徴的と思われる。

弊社はエアカーテンを利用した気流制御システム「ルフテン」を開発し、ご好評を得ているが、このシステムは動物⇒人間の感染防止に主眼がおかれ、必ずしも人間（飼育室空間）⇒動物の感染防止機能については十分ではない。今回このルフテンをベースに検討を加え、TGマウスの飼育にも適したエアカーテン・システムの開発に取り組んだ。

【開発のコンセプト】バスタブ型ケージを前提に、Micro Isolation System の感染防止機能に匹敵するエアカーテン・システムを実現することを狙いとしました。

【設計の考え方】棚板を給気ダクト、背面板を排気ダクトとした扉無しのラックにバスタブ型ケージを収納する構成とした。

- (1) 上方の棚板ダクトからケージ内にケージ60～70回/H換気相当量の給気を吹き込む。
- (2) 吊りレールでケージの左右上部を吊り、左右からの空気の巻き込みを阻止する。更にケージ上部と背面板間の隙間も塞ぐことにより、給気の出口を手前側上部のみにし、外気の侵入を防ぐ。
- (3) 給気出口上方の棚板にエアカーテン吹出し口を設け、ケージからの空気を下方に吹き降ろし、



背面の排気吸入口に導く。これにより、ケージからの汚染空気の室内への拡散を防止する。

【結果】汚染防止機能についての気流シミュレーションの結果

- (1) ケージ内⇒室内 及び、室内⇒ケージ内の汚染物質の拡散は阻止される。
- (2) ケージ内への外気の侵入は阻止されており、従ってケージ（動物）相互も隔離されている。

扉のない、エアカーテン式のラックで、Micro Isolation System にほぼ匹敵する汚染拡散防止機能を備えた飼育システムを開発することが出来た。

現在、実機による気流制御効果の確認を準備中である。今後可視化実験等の結果を引き続き報告していきたい。

LIG-1 ノックアウトマウス受精卵・精子の凍結保存

○新比惠啓志¹，浜崎雄二²，藤塚達也¹，小林欣滋¹，鈴木豊³

(¹田辺製薬・安全所，²マルゴ・リサーチ・サービス，³田辺製薬・創薬研)

【緒言】

LIG-1 ノックアウトマウスは大阪大学医学部・分子脳機構（田辺）寄附講座で作出されたマウスであり，そのホモ欠損型個体は雌雄とも乾癬類似の皮膚症状を呈する．今回，本マウスの系統保存および感染症等の事故対策を目的として，受精卵および精子の凍結保存を行った．

【材料および方法】

動物：LIG-1 ノックアウトマウスは 15～18 週齢の雄ホモ欠損型個体 4 匹および 6 週齢の雌ホモ欠損型個体 12 匹を用いた．一方，9 週齢の C57BL/6J 系雌マウス 12 匹から未受精卵を回収し凍結融解精子との体外受精を行った．

受精卵凍結保存：受精卵は体外受精によって得た．すなわち，雄マウス 1 匹の精巢上体尾部から精子を採取し，過排卵処理を施した 12 匹の LIG-1 ノックアウト雌マウスの卵管膨大部から回収した未受精卵と体外受精を行った．体外受精はミネラルオイル下の TYH 培養液中で行い，媒精 6 時間後に WM 培養液に卵子を移した．翌朝 2 細胞期に達した胚をプログラムフリーザーを用いて凍結し，-196℃の液体窒素中に保存した．

精子凍結保存：雄マウス 3 匹の左右精巢上体尾部を摘出し，個体別に 18%ラフィノース 3%スキムミルク凍結保存液 300 μ L 中で細切した．これら精子液は 20 μ L ずつ凍結保存用ストローに分配し両端を熱処理して封じた．ストローは 10 分間液体窒素の液面上に置き，その後ただちに液体窒素中に浸漬した．凍結 6 日目に精子ストロー 1 本を融解し，C57BL/6J 系雌マウス由来の未受精卵と体外受精を行った．翌日 2 細胞期胚を偽妊娠 0.5 日（＝精管切除雄マウスとの不妊交配における膈栓発見日）の ICR 系雌マウスの卵管に移植した．

【結果および考察】

受精卵凍結保存：12 匹の 6 週齢 LIG-1 ノックアウトマウスから回収した未受精卵は 84 個にとどまった．これら未受精卵と 1 匹の雄ホモ欠損型個体から得た新鮮精子との体外受精により 24 個（受精・発生率 29%）が 2 細胞期に発生した．これら 24 個の胚を 1 本の凍結保存用チューブに保存した．

精子凍結保存：LIG-1 ノックアウトマウス 3 匹からそれぞれ 14～16 本の精子液 20 μ L 入りストローを作製した．うち 1 本を凍結 6 日目に融解し，C57BL/6J 系マウス由来の未受精卵 110 個と体外受精を行った．その結果，55 個（受精・発生率 50%）が 2 細胞期に発生した．これら 55 個の胚を 3 匹の偽妊娠マウスの卵管に移植したところ，妊娠 19.5 日に 2 匹の母体から計 6 匹（雄 2 匹雌 4 匹）の出産仔（F1）を得た．これら産仔の成長を待って兄妹交配したところ，得られた仔（F2）の雌雄に乾癬類似の皮膚症状が発現した．すなわち，本病態モデルマウスの系統保存は良好であった．

腫瘍細胞株の微生物汚染に関する検討

中井伸子、河口千晴、名和孝二、小林忍、勝田義弘、宮崎安代、渡辺正孝(日本新薬、安全研)

1991年に腫瘍細胞株に由来するマウス肝炎事故を経験して以来、腫瘍細胞による微生物汚染防止を目的として腫瘍細胞株を対象とした検疫システムの確立を図った。現在までに105株について検疫を行い、現在ではすべての腫瘍細胞株についてMAP試験およびマイコプラズマ培養検査を行っている。また、この間に検出された微生物について腫瘍細胞株からの除去も試みたので報告する。

【材料と方法】ヒトまたは齧歯類由来の腫瘍細胞株を購入または分与により入手した。

MAP試験：1腫瘍細胞株につき5～6匹のマウスに腫瘍細胞懸濁液を腹腔、鼻腔、経口の3経路から投与し、投与後3～5日目および28日目に採血し、LDH測定および抗体検査を実施した。また、1腫瘍細胞株について3～4匹のホストマウスに腫瘍細胞を投与し、無処置のおとりマウス2～3匹と同居させ、おとりマウスは28日目に採血し抗体検査を行った。

マイコプラズマ培養検査：組織培養上清もしくは腫瘍細胞懸濁液を5%馬血清加PPL0液体培地に接種し、37℃、5%CO₂下で3～4日間培養したのち、5%馬血清加PPL0寒天培地2枚に継代し、1枚を37℃、5%CO₂下で、もう1枚を37℃嫌気条件下で10日間培養しマイコプラズマの有無を確認した。

【結果】96株中9株(9.4%)に乳酸脱水素酵素ウイルス(以下、LDV)が、74株中30株(40.5%)にマイコプラズマが、101株中1株(1.0%)に*P. pneumotropica*が検出された。更に、*in vivo*株と*in vitro*株によって汚染微生物の種類が異なり、*in vivo*株(すべてマウス由来)では、14株中9株(64.3%)がLDVに汚染されていたが、マイコプラズマ汚染は皆無であったのに対し、*in vitro*株では、ウイルス汚染は認められなかったものの、マウス由来10株中4株(40.0%)、ヒト由来53株中26株(49.1%)にマイコプラズマ汚染が確認された。また、LDV汚染のあったマウス由来の*in vivo*株1株においては*Pasteurella pneumotropica*汚染も認められた。

これら微生物汚染のあった腫瘍細胞株について、微生物除去を試みた結果、マイコプラズマはマイコプラズマ除去剤により21株すべて、LDVは*in vitro*継代により3株すべて、ヌードラット継代により5株中4株、*P. pneumotropica*も*in vivo*継代により除去できた。

【結論】動物実験に使用される腫瘍細胞株は高率に微生物汚染していることから、腫瘍細胞株に対する微生物コントロール(検疫)は今後も重要であると考えられる。また、微生物汚染が検出された場合、微生物の種類によっては方法を工夫することにより汚染微生物を除去できることを確認した。

サルおよびイヌからの *Helicobacter* 属菌の分離と生物学的性状

○高橋恵子・余野清香・根縫弘子・大原眞代子・千葉博喜・境 陽子・三日月勝見

(塩野義製薬・ACセンター)

我々は、第36回本研究会において種々実験用動物からの *Campylobacter* 属菌の分離結果を報告した。検査動物種の内、ビーグルから *Campylobacter jejuni* を、カニクイザルからは *Campylobacter fetus* subsp. *venerealis* を分離した。今回は、*Campylobacter* 属菌に近似の *Helicobacter* 属菌についてサルおよびイヌを対象に菌分離を試みた。ここではこれらの動物からの菌分離結果および分離菌の生物学的性状試験結果について述べる。

<材料および方法>

供試動物：我々の施設において通常環境下にて飼育されているカニクイザル、アカゲザルおよびビーグルを中心に菌検索を実施した。

菌分離法：サル、イヌともに噴門部、胃底部、幽門部、十二指腸部からの菌分離を試みた。培地はスキロー(日水)、バツラー(オキシド)、BHM(日研生物)、M-BHM(日研生物)、HP分離培地(栄研)を用い、微好気条件下で37°C、5~7日間培養した。培養に際してはBBL社製キャンピパックを用いた。

生物学的性状試験：アカゲザル、ビーグル由来株について種々生物学的性状を試験した。

<結果および考察>

サルおよびイヌからの *Helicobacter* 属菌の分離：サルからは9頭検索中1例から、ビーグルからは34頭検索中1例よりそれぞれ *Helicobacter* 属菌と推察される菌株が分離された。

分離菌株の種々培地上での発育性：両由来株ともにスキロー、BHM、M-BHM、HP分離培地、血液、血清などの寒天培地上で良好な発育が認められた。

分離菌株の形態：分離菌株のグラム染色結果では両由来株共にグラム陰性のらせん状桿菌の菌形態を示した。分離菌株の透過型電子顕微鏡での観察結果では、アカゲザル由来株の形態は一方の極に数本の有鞭毛が観察された。ビーグル由来株も同様に、極多毛の形態として観察された。

分離菌株の生化学的性状：分離菌株の生化学的性状は、両由来株共にオキシダーゼ、カタラーゼが陽性であった。また、尿素分解酵素の産生が認められた。アカゲザル由来株は *H. pylori* の基準株と性状が一致した。ビーグル由来株は *H. felis* の基準株とほぼ一致した性状が得られたが、亜硝酸塩の還元性は異なっていた。

以上の生物学的性状試験結果よりアカゲザル由来株は *H. pylori* と同定した。しかし、ビーグル由来株は *H. felis* に近似の菌種と考えられたが、正確に菌種を同定する事はできなかった。

定量的マイクロプレート DNA ハイブリダイゼーション法を用いた
Helicobacter 属菌種の同定

○根縫弘子・高橋恵子・余野清香・大原真代子・千葉博喜・境 陽子・三日月勝見

(塩野義製薬・ACセンター)

我々は、*Campylobacter* 属菌種の同定を目的とした定量的 DNA ハイブリダイゼーション法について、既に本研究会において報告した。今回は、アカゲザルおよびビーグルより分離した *Helicobacter* 属菌について菌種の同定に定量的 DNA ハイブリダイゼーション法が利用可能かどうかを検討したので報告する。

<材料および方法>

定量的 DNA ハイブリダイゼーション法: 供試菌株は *Helicobacter* 属菌を中心とした基準株およびアカゲザル、ビーグルからの分離菌株を用いた。定量的 DNA ハイブリダイゼーション法のプレートに固定するための DNA の抽出は、湿菌を saline-EDTA に懸濁し、SDS(ラウリル硫酸ナトリウム)溶液を加え溶菌させた後、フェール・クロム・イソアルコールにて除タンパクし、冷エタノールを加え DNA を抽出した。また、ハイブリダイゼーション用 DNA は、ピオチン標識し用いた。標識 DNA は一定時間ハイブリダイゼーション後、酵素溶液、発色液の順に加えて発色させ吸光度計(Lab science 社 EAR-340AT)にて 630nm の波長で測定した。

<結果および考察>

定量的 DNA ハイブリダイゼーション: アカゲザルおよびビーグル由来株より調整した DNA と *Helicobacter* 属菌種との DNA ハイブリダイゼーション結果は、アカゲザル由来株は *H. pylori* の基準株と高い相対類似度が得られ、アカゲザル由来株は遺伝子学的にも *H. pylori* であることが明らかとなった。ビーグル由来株では *H. felis* との間で高い相対類似度が得られたが、*C. concisus*、*H. pylori* 等との間においても比較的高い相対類似度が得られ、ビーグル由来株は *H. felis* 以外の菌種である可能性も推察された。そこで、ビーグル由来株について DNA を固定し交叉性を調べた。*H. felis* の基準株 DNA を固定したウエルとビーグル由来株の間では 20%程度の相同性を示した。一方、ビーグル由来株 DNA を固定したウエルと、*H. felis* の基準株の間では 35%程度の相同性であり、ヘテロの結果であった。ビーグル由来株は今回の DNA ハイブリダイゼーション法に用いた菌種の基準株と一致するものは皆無であり同定ができなかった。

今回、*Helicobacter* 属菌種の同定に DNA ハイブリダイゼーション法を適用したところ、アカゲザル由来株は *H. pylori* と同定されたが、ビーグル由来株は同定できなかった。現在、イヌからは *H. felis*、*H. canis* の他に *H. heilmannii* 等の菌種も報告されており、今後明らかにする必要があるものと考えられた。

FLS (Fatty Liver Shionogi)-ob/ob マウスの自然発生肝腫瘍

○曾我正彦¹、稲垣秀一郎²、佐治久江³、耕田知恵子³、大原忠雄³、
加藤研治²、平沢 勉¹、牧野 進³
(¹塩野義製薬(株)・医科研、²同・油日ラボ、³同・ACセンター)

【はじめに】脂肪肝はアルコール多飲、肥満、糖尿の多くに認められるが、可逆的な変化でもあり臨床的にそれほど注目されることはなかった。しかし近年、脂肪肝がしばしば肝炎、肝硬変を含む肝障害を発生させることが指摘され、脂肪肝対策も肝疾患の予防に重要となってきた。我々は昨年の本研究会において、脂肪肝を自然発症する FLS マウスに ob 遺伝子を移入した FLS-ob/ob コンジェニックマウスの作出を報告した。本マウスは肥満、糖尿、重症脂肪肝だけでなく肝腫瘍が多発する。本研究では FLS-ob/ob および FLS+/+マウス (wild-type)の肝腫瘍の特徴とその発生率、腫瘍発現遺伝子の探索を行い、若干の知見を得たので報告する。

【実験材料および方法】実験 1：FLS-ob/ob (雄 189 例、雌 186 例)、FLS+/+ (雄 178 例、雌 173 例)を用いて life-span 実験を行った。自然死個体は剖検して肝腫瘍の有無を確認し、主要臓器をホルマリン固定後、パラフィン包埋切片を作製して HE 染色で観察した。また、6、12、18 ヶ月齢の FLS-ob/ob、FLS+/+ (雌雄各群 14~30 例)を剖検し、腫瘍発生率を調べた。実験 2：18 ヶ月齢の FLS-ob/ob の肝腫瘍結節部と 2 ヶ月齢時の肝組織の間で cDNA サブトラクション法を用いて腫瘍組織に由来するサブトラクト cDNA を調製した。サブクローニング後、バクトプロット、ノーザンプロットにより腫瘍組織で発現している遺伝子をスクリーニングした。

【結果および考察】Life-span 実験から、FLS-ob/ob は雌雄とも 21 ヶ月齢までに全例が死亡した。一方、FLS+/+の 24 ヶ月齢における生存率は雄が 29%、雌が 42%であり、FLS-ob/ob は FLS+/+に比べて短命であった。FLS 系統に認められた結節病変は組織学的に肝細胞腺腫、肝細胞癌として診断される白色結節と血管腫、血管肉腫と診断される暗赤色の海綿状結節であった。6 ヶ月齢の剖検では FLS-ob/ob、FLS+/+とも腫瘍発生個体は認められなかった。12 ヶ月齢時の肝腫瘍 (腫瘍性結節、血管系腫瘍結節を含む) 発生率は FLS-ob/ob 雄が 60%、雌が 20%であり、FLS+/+の雄は 45%、雌は 0%であった。18 ヶ月齢の FLS-ob/ob では雌雄とも 100%の発生率を示した。FLS+/+では雄の 93%、雌の 20%に肝腫瘍が認められた。このことから、FLS+/+では雌に比べて雄の肝腫瘍発生率が高く、FLS-ob/ob では雌雄差のないことが明らかとなった。また、FLS 系統では血管由来の腫瘍が比較的多発する系統であると考えられた。cDNA サブトラクション法で得られた肝腫瘍で発現している 2 つのポジティブクローンのシーケンスを行ったところ Osteopontin (OPN)および Pancreatitis-associated protein (PAP)遺伝子であった。特に PAP は腫瘍組織においてのみその遺伝子発現が認められた。PAP は C 型レクチンファミリーに属し、膵炎回復期の膵臓と正常組織では小腸で発現が認められている。PAP は細胞増殖に関係していると考えられているが、詳細は未だ不明である。FLS-ob 肝腫瘍由来 PAP の全長 cDNA をクローニングしたところ翻訳領域は既報と同一であったが、非翻訳領域は大きく異なっていた。しかし、これが腫瘍特異的な alternative splicing によるのかは現段階では明らかでなかった。以上の結果から、より重篤な脂肪肝を発症する FLS-ob/ob マウスは FLS+/+マウスに比べて肝腫瘍がより早期に、また高率に発生することがわかり、本マウス系統は肝腫瘍を含む肝障害に対する慢性脂肪肝のリスク、脂肪肝と肝発癌の関係を調べるための有用なモデルになるかもしれない。

尿細管間質病変における尿管結紮モデルの意義

○堀川洋子・竹中やよい・卯野善弘・岡本宗裕・黒澤努

大阪大学医学部附属動物実験施設

<はじめに>

ネフローゼ自然発症ICGNマウスが慢性腎不全を発症することに着目し、病態解析を進めている。この系統は離乳直後より成長期にかけて糸球体硬化を、14週齢以降に尿細管間質線維症を発症する。しかし、尿細管間質線維症の発症様式が安定していないことがわかっている。今回我々は、ICGNマウスに尿管結紮を施し、早期に安定した尿細管間質線維症の作成を試みた。

<方法>

雌雄6-8週齢のICGNマウス（ホモ・ヘテロ）を使用した。ホモ群およびヘテロ群の両群に対し、ケタミン-キシラジン混合薬の腹腔内投与による全身麻酔下で腹部正中切開し、左側尿管を2箇所結紮後、切断した。結紮前(0日目)および結紮後の2日目および7日目に解剖し、尿・血清の生化学検査（BUN・アルブミン）および腎臓の免疫組織学的観察（ α -平滑筋アクチン、フィブロネクチン）を行った。

<結果>

- 1)ホモ群およびヘテロ群において尿管結紮後2日目には尿細管間質に筋線維芽細胞、フィブロネクチンが軽度で観察された。7日目には重度に観察された。
- 2)ホモ群とヘテロ群の比較では前者が間質領域の傷害程度はやや重度であったが、進行の仕方はほぼ同様であった。
- 3)実験前から実験期間中を通してホモ群において発育障害および尿中アルブミンの高値が観察された。また、BUN値は術後2日目に高い値を、血清アルブミン値は術後2日目に低い値を示した。
- 4)ホモ群において尿管結紮を施すと、糸球体硬化病変が著しく軽減した。

<考察>

尿細管間質線維症を自然発症するホモにおいて片側尿管結紮は間質病変を悪化をもたらす。従って、早期に安定し、かつ重篤な尿細管間質線維症の作成は可能ではあった。しかし、その進行速度にはホモ群およびヘテロ群の間で差が認められなかった。

<今後の課題>

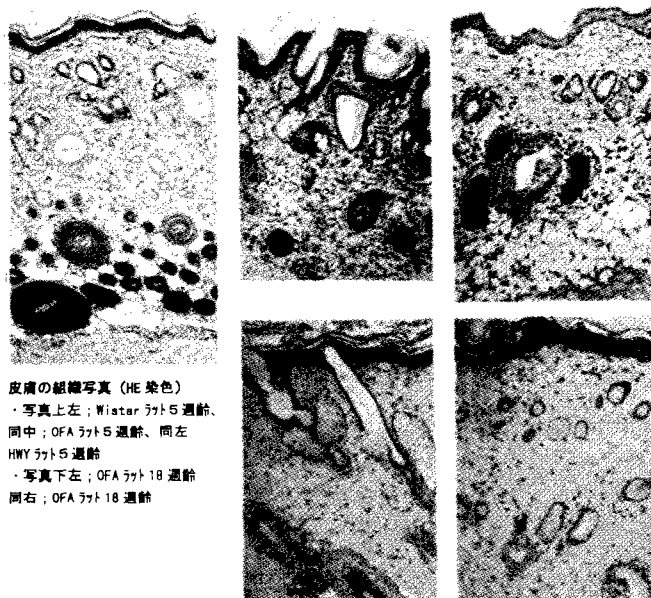
ホモ群において尿管結紮を施すと糸球体硬化病変の軽減が観察された。この反応について、他のモデルにおいても再現されるかどうかの検討が必要である。また、糸球体硬化症と尿細管間質線維症は同様の分子メカニズムではほぼ平行して進行することが今日のnephrologyの定説となっている。今回の観察では逆の現象が認められ、糸球体硬化症と尿細管間質線維症の病理発生の因果関係についての見直しの必要もあると考えられた。

2系統のヘアレスラット、lco:OFA-hr/hr および HWY:Slc ラットの皮膚の性状、形態に関する比較検討

大坂 要恵、川野 泰司、飯田 晶敏 (株) 資生堂 医薬品研究所

毛包低形成を示す Sprague-Dawley 系ラット由来の lco:OFA-hr/hr ラット (OFA ラット)、および Wistar 系ラット由来の HWY:Slc ラット (HWY ラット) の背部皮膚について肉眼的観察、皮脂量および皮膚厚の測定を経時的に実施し、さらに皮膚の組織学的検討を 5、11、18、38、および 57-85 週齢の時点で行って、これらヘアレスラットの皮膚の性状、および形態を比較検討した。同時に、これらラットの柯ジル系である lco:OFA-SD ラット (SD ラット) および Slc:Wistar ラット (Wistar ラット) の皮膚についても 5 および 18 週齢で同様の検討を行った。その他、全動物について経時的に体重を測定した。

OFA および HWY ラットでは、5 週齢の時点ですでに全身の被毛は脱落し、滑らかな状態の皮膚を示した。その後、およそ 11 週齢時には頸部を中心に皺が出現し、加齢とともに全身に広がりを示した。この皺は HWY ラットに比較して OFA ラットにより強く認められた。OFA ラットの背部皮膚は、これに加えて黄色調で、油ぎった外観を呈した。皮脂量については、HWY ラットは高い数値を示し、ヘアレスの OFA ラット、および有毛の SD および Wistar ラットに比べて 4-10 倍であった。また、HWY ラットの皮脂量は加齢とともに増加傾向を示した。皮膚厚については、ヘアレスラットを含む 4 系統のラット間における差、および加齢に伴う変化ともにみられなかった。体重については、HWY ラットに比較して OFA ラットがより大きい増加を示した。また、ヘアレスラットの体重はいずれも柯ジル系である有毛の SD あるいは Wistar ラットに比べて小さかった。皮膚の組織学的検査により、若齢 (5、11 週齢) のヘアレスラットでは表皮の肥厚、表皮から真皮に至る cyst の形成、未発達の毛嚢、皮脂腺の肥大と cyst 形成、および細胞浸潤がみられた。これらの変化はすべて HWY ラットに比較して OFA ラットにより強く認められた。その後、加齢とともにこれらの変化は次第に終息し、38 週齢以降のラットでは皮膚組織全層に高度の萎縮性変化がみられた。



LIG-1 ノックアウトマウスの皮膚病変

○小林欣滋、新比恵啓志、乾俊秀、鈴木豊*
(田辺製薬(株)安全性研究所、*田辺製薬(株)創薬研究所)

【緒言】新規遺伝子 LIG-1 は大阪大学医学部・分子脳機構 (田辺) 寄附講座において見いだされたロイシンリッチリピートと免疫グロブリン様ドメインを構造モチーフとして共有する新規膜貫通型蛋白質をコードしており、その遺伝子産物は細胞接着分子もしくはレセプターとして機能することが推測されている (Suzuki, Y. *et al.*, *J. Biol. Chem.* 271:22522-22527, 1996)。LIG-1 遺伝子の機能解析の一環として、LIG-1 ノックアウトマウスを作製したところ、ホモ欠損型マウスにおいて、3 週齢頃から尾部に分節状の白色隆起が見られた。今回、当該マウスの尾部皮膚病変を病理組織学的に検討したので報告する。

【材料および方法】5~11 週齢の野生型 (雄 3 例、雌 3 例)、ヘテロ欠損型 (雄 3 例、雌 2 例) およびホモ欠損型 (雄 4 例、雌 4 例) マウスをエーテル深麻酔下で放血致死し、尾部を採取した。10%中性緩衝ホルマリン液で浸漬固定した尾部を脱灰後、常法に従ってパラフィン切片とし、ヘマトキシリン・エオジン染色を施して鏡検した。

【結果および考察】ホモ欠損型個体に共通してみられた肉眼的変化は、尾部における分節状の白色隆起であった。尾部皮膚における病理組織学的検査では、表皮の肥厚、表皮細胞間への好中球侵入、角質層での微小膿瘍形成、真皮での好中球浸潤、錯角化が認められ、また、病変は毛包口周囲で好発する傾向がみられた。観察部位によって病期は様々であったが、病変の形成過程として、表皮の肥厚に始まり、続いて真皮 (特に表皮直下) や表皮細胞間へ好中球が侵入し、それが角質層へ達して角質層内微小膿瘍を形成すると推測された。なお、野生型およびヘテロ欠損型マウスにこのような皮膚病変は認められなかった。

上述の尾における皮膚病変は炎症性角化症の範疇に入るものと思われた。表皮細胞間への好中球侵入 (exocytosis) や角質層での好中球の集積、いわゆる Münro 微小膿瘍は乾癬初期によくみられ、また、細胞間小空隙に好中球が遊走している像、すなわち軽度の海綿状膿疱 (spongiform pustule of Kogoji) は、乾癬の各病型に共通する最も特徴的所見とする見解もある (森俊、柳原誠: 炎症性角化症. 現代病理学大系 19A 皮膚および付属器 I p.98-112、中山書店、東京、1991)。

【まとめ】LIG-1 ノックアウトマウスは乾癬に類似する炎症性角化症を尾部に発症することが明らかとなった。

大阪産野生マウスに発見された短尾突然変異遺伝子の 染色体マッピング

和田あづみ、中根良文、奥本正昭¹、都築政起²

(大阪府大・農、¹大阪府大・先端研、²広大・生物生産)

【目的】1991年11月、大阪府箕面市で捕獲した野生マウス (*Mus musculus molossinus*) に由来する近交系育成途中のラインに、通常より尾の短い個体が出現した。以来、短尾個体同士を兄妹交配することにより突然変異系統の育成を試み、現在、近交第16世代に達している。本短尾マウスは尾骨の欠損および融合を特徴とするが、まれに仙骨の欠損も認められた。しかし、尾・仙骨以外の骨格に異常は認められなかった。本短尾形質は70%程度の浸透度を持つ、常染色体性の単一遺伝子により支配されていることをすでに明らかにしている。本研究では、この短尾形質を支配する遺伝子座の染色体上の位置を明らかにすることを目的とした。

【材料と方法】本短尾マウスと近交系BALB/cA、C57BL/6N、およびDDK系統マウスより戻し交配世代を作出し、表現型が短尾である個体についてマイクロサテライトマーカーを用いて連鎖解析を行った。短尾形質を持つマウスのDNAを抽出し、リサーチジェネティクス社より購入したプライマーを用い、定法に従ってPCR法を行い、PCR産物を電気泳動する事によりマーカーの遺伝子型を検出し、各マーカーと短尾形質との連鎖を調査した。

【結果】プレリミナリーな連鎖解析の結果、本短尾遺伝子座には第6染色体上のマーカーとの連鎖が認められた。さらに詳細な連鎖地図を作製するため、第6染色体上の15種のマイクロサテライトマーカーを用いてマッピングを行った結果、本遺伝子座は動原体から33.5cMのD6Mit3と35cMのD6Mit6 (もしくはD6Mit8) の間に存在することが明らかになった。

ラット遺伝連鎖地図の統合

○北田一博、加地澄子、芹川忠夫

(京都大学大学院医学研究科附属動物実験施設)

[緒言] ラット遺伝連鎖地図は、遺伝多型マーカーの開発により高度に改善されてきた。このうち、Whitehead Institute for Biomedical Research/MIT Center for Genome Research (WIBR/MIT) グループの連鎖地図は、5000以上の anonymous microsatellite markers を基にした高密度連鎖地図であるが、マップされている遺伝子の数は少ない。また、The Wellcome Trust Centre for Human Genetics (Wellcome Trust Centre) の連鎖地図は、数多くの Gene-based microsatellite markers を含んでいるが、WIBR/MIT map と比較すると、収載されているマーカーの数は多くない。一方、われわれの連鎖地図 (Kyo map) は、収載されているマーカーの数は最も少ないものの、染色体バンド地図に対応づけがなされている (Ando et al. Mamm. Genome 9, 287-293, 1998)。しかしながら、現在までのところ、個々の研究グループにおいて公表されている遺伝連鎖地図間の直接的な対応づけはなされていない。そこで、今回、共通のマイクロサテライトマーカーを新たに Kyo map 上にマッピングすることにより、WIBR/MIT map、Wellcome Trust Centre map、Kyo map を統合したので報告する。

[材料と方法] WIBR/MIT グループが開発した D#Rat#シリーズのマーカーのうち、データベース <http://waldo.wi.mit.edu/rat/public/> から各染色体に散在するようにマーカーを選択した。これらのプライマーを用いて、Kyo map 作製の交配パネルをタイピングした。次いで、この新たにマッピングしたマーカーを含めた連鎖地図間を繋ぐアンカーマーカーを用いて、3つの独立した連鎖地図を統合して図化した。連鎖解析は、MAPMAKER/EXP ver 3.0b を用いた。

[結果と考察] この統合した遺伝連鎖地図を用いることによって、必要な遺伝多型マーカーおよび情報の選択利用が容易になった。すなわち、突然変異遺伝子のマッピングは WIBR/MIT map に収載されているマーカーを用いて行い、その近傍に位置する遺伝子を Wellcome Trust Centre map と Kyo map を利用して探索することができるようになった。さらに、マウスやヒトゲノム上の相同な領域を同定することも可能である。また、Kyo map を介して、他の2グループから報告されている連鎖地図についても、染色体バンド地図に対する方向性と範囲を明らかとすることができた。

老化と脳内サイトカインの発現

○喜多正和、魏 亜平*、伏木信次**、今西二郎*
(京都府立医大・実験動物室、微生物学教室*、老化研**)

【目的】近年、脳神経系においても各種サイトカインが重要な役割を果たしていることが明らかとなってきた。一方、感染などのない正常個体において生理的条件下で微量ながらサイトカインの産生が認められることが明らかになり、われわれも微量のサイトカイン mRNA が検出可能な RT-PCR 法を用いて、正常個体の各臓器において種々のサイトカイン mRNA が検出されることを報告している。しかし、加齢の進行過程における脳内サイトカインの動向についての報告はない。本研究は、加齢の進行過程における脳内サイトカインの発現の変化を mRNA レベルおよび蛋白レベルで解析することを目的とした。

【材料と方法】若齢（8週齢）および老化（20カ月齢以上）の BALB/c マウスから大脳、小脳および脾を摘出し、各種サイトカイン mRNA の発現およびインターフェロン関連遺伝子の発現を RT-PCR 法で比較検討した。また、灌流固定した組織を用いて、IL-6 および IFN- γ については免疫組織学的に蛋白レベルでの発現を検討した。

【結果】若齢マウス脳内においては、IL-1 β , IL-5, IL-7, TNF- α , IFN- α , IFN- β , IFN- α/β R, IFN- γ R, IRF-1, IRF-2 mRNA の発現が検出されたのに対し、老化マウス脳内では、上記サイトカインに加え新たに IL-3, IL-6, IL-12, IFN- γ mRNA の発現を認めた。一方、対照として用いた脾におけるサイトカイン mRNA の発現には、若齢マウスと老化マウスの間に有意な差は認められなかった。さらに、モノクローナル抗体を用いた免疫染色法により、老化マウス脳内で発現してくる IL-6 および IFN- γ の産生細胞は血管内皮細胞であることが示唆された。

【考察】今後、加齢に伴い発現してくるこれらのサイトカインの産生細胞を明確にするとともに、その役割を明らかにする必要があると考えられる。

哺乳動物のピューロマイシン感受性アミノペプチダーゼ

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

細胞質に存在するピューロマイシン感受性アミノペプチダーゼ (PSA) は、細胞周期、分化、アポトーシスなど細胞内の多様な機構の制御にかかわるとされているが、この酵素に関する研究は少ない。われわれは、ラットの肝臓細胞質内に存在するアラニルアミノペプチダーゼ (AAP-S) を精製し、精製酵素はその生化学諸性質などから PSA と同一酵素であることを本研究会で報告した。今回、この精製酵素の一次構造を明らかにすることおよび組織局在を明らかにすることを目的に検討を行った。

材料および方法

1) ラットおよびヒト肝臓から前報同様一連のカラムクロマトグラフィーを行い、AAP-S を精製した。2) 精製酵素の N 末端のアミノ酸配列および精製酵素をブロムシアン分解し、得られたフラグメントのアミノ酸配列を検討した。3) 抗ラット AAP-S および抗ヒト AAP-S 血清は、それぞれ精製酵素を抗原として家兎に免疫し、得られた血清を定法に従い、アフィニティー精製することによって得た。4) 組織局在の検討は、実験用動物および司法解剖例から組織を採取、ホルマリン固定後パラフィン切片標本 (4mm) を作製し、ストレプトアビジン-ビオチン法による免疫組織染色にて行った。

結果および考察

[1] 精製酵素の N 末端のアミノ酸配列およびブロムシアン分解により得られた部分アミノ酸配列は、既に報告されているマウスおよびヒト PSA (いずれも cDNA) と比較し、ラット AAP-S はそれぞれ 93.9%、91.2%、ヒト AAP-S はそれぞれ 91.3%、93.2% であり、非常に高い相同性が認められた。この結果は、本酵素のアミノ酸配列が進化の過程で非常によく保たれていることを意味していると考えられる。また、ピューロマイシンに対する感受性は、ラットおよびヒト AAP-S とともにピューロマイシン 0.1mM 添加では対照の活性の 80%、1.0mM では 35%、10mM では数% であり、100mM 以上では完全に活性が抑制され、感受性が非常に高い結果であった。これらの結果から、ラットおよびヒト AAP-S は PSA と同一酵素であると考えられた。

[2] ラットおよびヒトの AAP-S 抗原は、マウス、ラット、ハムスター、モルモット、家兎およびヒトの肝細胞細胞質をはじめ、肺胞、気管支、尿細管、腸管、尿管などの上皮の細胞質、舌下腺、下顎腺、腸腺、子宮腺などの腺細胞、心筋細胞、骨格筋などの細胞質に認められた。これらの結果から PSA は哺乳動物諸臓器の細胞質に広く分布することが示唆された。

結 語

精製酵素のアミノ酸配列と AAP-S 抗原の組織局在を検討した。N 末端のアミノ酸配列およびブロムシアン分解により得られた部分アミノ酸配列から精製酵素は PSA と同一酵素であること、および AAP-S 抗原は種々の動物諸臓器の細胞質に遍在していること、さらに本酵素のアミノ酸配列が進化の過程でよく保たれていることが明らかになった。

<第61回研究会(平成11年3月5日)>

テーマ:「実験動物:育種繁殖領域からの新たな展開」

1. リコンビナント・インブリード系マウスを用いた研究

西村正彦(名古屋大学医学部附属動物実験施設)

2. 医学・生物学分野における実験用動物としてのサル類の人工繁殖

和 秀雄(大阪大学人間科学部)

リコンビナント・インブレット系マウスを用いた研究

西村正彦

名古屋大学医学部附属動物実験施設

組換え近交系(Recombinant Inbred Strain, RI strain)とは Jackson 研究所の Bailey(1)によって理論構築され、最初実践された系統作出方法であり、2つの近交系間の F₂ 世代を出発点として兄妹交配を 20 代以上繰り返すことにより作出される近交系のセットを云う。このセットを構成する各近交系は、毎世代の減数分裂の過程でおこる遺伝的組換えが重責する結果、その染色体は両親系の染色体セグメントが組換えられると共に殆どすべての遺伝子座位がホモ接合体になっている。

RI strains は遺伝学的研究、とりわけ多因子遺伝の解析に有用であり、マウスではすでに多くの組み合わせが作成されており、各種の実験に利用されている。我が国でもマウスでは西村ら(2)により A/J 系と SM/J 系から 26 近交系よりなる SMXA RI 系が、ラットでは志佐ら(3)により F344 系と LE/Stm 系から 23 近交系よりなる LEXF RI 系がそれぞれ確立された。RI strains の有用性は特に近年マイクロサテライト遺伝マーカーが利用できるようになり、その数はマウス、ラットで数千に達したことから、更に高まった。両親系統の間でポリモルフィックな座位について各 RI 系統の遺伝子型を詳細に決定し、その系統間分布表(Strain Distribution Pattern table, SDP 表)を作成することができる。この表から各染色体の組換え位置を大まかに知ることができ、染色体の特定セグメントがどちらの親からきたのかを容易に推定することができる。表 1 は作成された SMXA RI 系の SDP 表のごく一部で第 7 染色体の部分を示す。RI strains の有用性は SDP 表の活用によるところが大きい。この表の優れた機能は第一に、両親系統間で多型となる遺伝子のマッピングに簡単に応用できる点である。たとえば両親系統 A/J (A) と SM/J (S) で、あるタンパクの電気泳動易動度が異なっていると仮定する。すべての RI 系についてそのタンパクの易動度を調べ A 型、S 型に分類し、その亜系分布と SDP 表の分布を比較して最もよい一致が得られる染色体セグメントを探し出せば、そこがこのタンパクの易動度を決める遺伝子(構造遺伝子とは限らない)のマップ位置と考えてよい。表 1 に示すように、この方法を用いて、我々はマウスの唾液タンパク Spe1-s を第 7 染色体のセントロメア近傍にマップできた。両親系で異なる表現型をもつ遺伝子座については、組み換え近交系はセットとなってい

る系統数が十分に大きければ、高い確率で遺伝子のマッピングが可能になるわけである。F2 交雑群や戻し交雑群において膨大な個体数の遺伝型を解析する手間に比べれば、30-50 件程度のタイピングですむ RI strains は効率的な手段といえよう。RI strains を構成している系統の数だけでなく、SDP 表を構成する遺伝的マーカーの密度が高いほど、精度の高いマッピングが可能になる。同じ手法はたとえばある病気の感受性を決める遺伝子座をマップすることなどにも利用できる。

第二の有利な点は多因子遺伝形質の解析に利用できることである。我々はウレタン誘発肺腫瘍の感受性（あるいは抵抗性）の遺伝支配を調べることを目的として、感受性の A/J 系と抵抗性の SM/J 系の間からできた SMXA RI 系を使用した。ウレタン誘発肺腫瘍の感受性はその時点で4つの感受性遺伝子座が知られていた複雑な形質である（表2）。これらの座位の染色体上のマップ位置はすでに報告されていたので、この情報から SMXA 系の SDP 表を利用して、SMXA 各亜系のアレルを推定することは直接遺伝型を解析しなくとも容易にできる。表2の左半分は SMXA の20 RI 系統のウレタン誘発肺腫瘍数とこれら4つの感受性座位の遺伝子型である。この表で SMXA24 系は既知の4つの感受性座位が全て A/J 由来の感受性アレルを持つにもかかわらず肺腫瘍発生数は極めて少なかった。このことはこの SMXA24 系はこれら4つの感受性遺伝子全体の効果をも抑える強力な抵抗性遺伝子を持っている可能性を示唆する。(A/J × SMXA24) F1 は腫瘍発生数はほぼ SMXA24 と同レベルであった。そこで、この F1 を A/J へ戻し交配した世代にウレタンで肺腫瘍を誘発し、その腫瘍数をもとに QTL (Quantitative Trait Loci) 法による遺伝解析を行った結果、第11、第12染色体上に優性抵抗性遺伝子 Par1, Par3 をマップする事が出来た(4)。現在 Par3 のコンジェニック系統を作成し、その機能を解析しているところである。マウスとヒトとはもとより異なるが疾病のステップには種を越えて共通である可能性があり、比較遺伝学的なアプローチはヒトでは容易に検出できない疾病の感受性・抵抗性の遺伝子について一つの手がかりを与える。このように、量的形質や多因子遺伝要因が働いている場合には関連遺伝子群の遺伝子型が同一の RI strains の表現型を比較して、既知の遺伝子型だけでその形質が説明できるかを考え、矛盾がある場合には他の遺伝子が更に分離している可能性を考えていけばよい。

SMXA RI strains の親系である A/J と SM/J の間には表3に例示するような多くの形質の違いがみられ、実際に遺伝的解析が着手されているのはこのうちでもわずかで

ある。組換え近交系を用いた研究では、まず、親系の間で表現形質の差異があることが望ましいが、量的形質など多因子遺伝様式をとるものでは、両親系の間で差が無くとも、RI strains の系統間では明瞭な差異が観察されることがある。これは形質表現について正・負の働きを持つ複数の遺伝子が組み合わさって最終的な表現型をきめているため、このような複雑な現象を明解に解きほぐすことが RI strains の有用性である。毎年 SMXA 研究会を開催して RI strain 利用者の情報交換の場を設けており、利用者への研究材料の安定供給と利用者からの遺伝情報の SDP 表への還元および膨大なデータの蓄積がなされているところである。

参考文献

- 1) Bailey DW. Recombinant inbred strains as an aid to finding identity, linkage and functions of histocompatibility and other genes. *Transplantation* 11: 325-327, 1971
- 2) Nishimura M, Hirayama N, Serikawa T et al. *Mamm Genome* 6: 850-857, 1995
- 3) Shisa H, Lu L-M, Katoh H et al. The LEXF: a new set of rat recombinant inbred strains between LE/Stm and F344. *Mamm Genome* 8: 324-327, 1997
- 4) Abujang P, Nishimura M, Kamoto T et al. Genetic resistance to urethan-induced pulmonary adenomas in SMXA recombinant inbred mouse strains. *Cancer Res.* 57: 2904-2908, 1997

表 1 SMXA RI strain の strain distribution pattern (7 番染色体)

遺伝子座	cM	SMXA strain																														遺伝子型
		1	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	14	15	16	17	18	19	21	22	23	24	25	26	27	29	30					
7 番染色体																																
Spe1-s	10	A	S	A	A	S	S	S	S	S	S	A	A	S	S	S	S	S	A	S	A	A	A	A	A	A	S	A	S=s;A=f			
Tpel	12	A	S	A	A	S	S	S	S	S	S	A	A	S	S	S	S	S	A	S	A	A	A	A	A	A	S	A	S=s;A=0			
D7Mit79	16	A	S	A	A	A	S	S	S	S	S	A	A	S	S	S	S	S	A	S	A	S	A	A	A	S	A	A<S				
D7Nds1	37	A	A	S	S	A	A	S	A	A	S	A	A	S	S	S	A	S	S	A	S	A	S	S	A	S	S	S<A				
c	44	S	S	S	S	S	A	S	A	S	A	S	A	S	S	A	S	S	A	S	A	S	S	A	S	S	S	S=C;A=c				
Mod2	46.2	S	A	S	S	S	A	S	A	S	A	S	S	S	A	S	A	S	S	A	A	A	S	S	A	S	S	S=a;A=b				
D7Mit17	50.5	S	A	S	S	S	A	S	A	S	A	S	S	A	A	S	A	A	A	S	A	A	S	S	A	S	S	S<A				
Hbb	50	S	A	S	S	S	A	S	S	S	A	S	S	A	S	A	S	A	S	A	A	S	S	A	S	S	S	S=s;A=d				
D7Mit7	53	S	A	A	S	S	A	A	S	S	A	S	S	A	S	S	A	S	S	A	A	A	S	S	A	S	S	A<S				
D7Mit10	66	S	A	A	S	S	A	S	S	S	A	A	S	S	S	S	A	S	A	S	A	S	S	S	S	S	S	S<A				
D7Mit12	66	S	A	A	S	S	A	S	S	S	A	A	S	S	S	S	A	S	A	S	A	S	S	S	S	S	S	A<S				
Fgt3	70.3	S	A	S	S	U	A	S	A	A	A	S	A	S	S	A	S	A	S	A	S	U	S	S	S	S	S	S<A				
D7Nds4	70.3	S	A	S	S	S	A	S	A	A	A	S	A	A	S	S	A	S	A	S	A	A	S	S	S	S	S	S<A				

A: A/J-derived allele, S: SM/J-derived allele, U: undetermined
 遺伝子型の不適合はマイクロサテライト座位のPCR産物のサイズの大小を示す。
 (Nishimura M et al: *Mammal Genome* 6, 850, 1995²⁾より)

表 2 SMXA RI strain の肺腫瘍感受性・抵抗性座位とその遺伝子型

系統	肺腫瘍数/個体	感受性座位(染色体)				抵抗性座位(染色体)		
		Pas1(6)	Pas2(17)	Pas3(9)	Pas4(19)	Par1(11)	Par2(18)	Par3(12)
A/J	37.07 ± 7.29	A	A	A	A	A	A	A
SMXA26	52.13 ± 7.88	A	S	U	A	A	A	S
SMXA9	36.42 ± 8.61	A	S	A	A	A	A	S
SMXA29	27.64 ± 7.61	A	S	A	A	U	A	A
SMXA12	23.17 ± 5.75	S	A	S	S	A	S	A
SMXA30	20.31 ± 5.88	A	A	A	A	U	U	A
SMXA8	18.82 ± 9.36	A	S	A	S	S	S	S
SMXA21	16.00 ± 4.24	A	A	U	A	U	A	A
SMXA15	14.33 ± 6.72	A	S	A	A	A	A	A
SMXA11	12.58 ± 7.28	S	A	S	A	A	A	A
SMXA16	11.79 ± 6.34	S	A	A	A	A	S	A
SMXA7	10.25 ± 3.82	A	U	U	A	U	U	S
SMXA1	9.30 ± 3.40	A	A	A	A	S	U	A
SMXA18	8.06 ± 2.86	A	S	S	S	A	S	U
SMXA27	7.45 ± 2.98	U	S	S	A	U	A	A
SMXA4	7.45 ± 2.98	S	S	A	S	S	S	S
SMXA5	6.73 ± 3.44	S	A	S	A	S	S	S
SMXA19	5.57 ± 1.27	S	S	S	A	A	S	S
SMXA17	5.18 ± 2.44	S	S	U	S	S	U	S
SMXA14	4.88 ± 2.66	S	A	A	S	S	S	A
SMXA3	4.37 ± 3.39	S	A	A	S	U	S	A
SMXA24	4.08 ± 2.81	A	A	A	A	S	A	S
SM/J	0.43 ± 0.51	S	S	S	S	S	S	S

A: A/J-derived allele, S: SM/J-derived allele, U: undetermined
 (Abujang P et al: *Cancer Res* 57, 2904, 1997⁴⁾より)

表 3 SMXA RI strain の親系 SM/J と A/J の間の形質の違い

形質	差異
体重	SM < A
脳重量、代謝率	SM > A
末梢血白血球数	SM < A
ヘマトクリット	SM < A
リンノ球 PHA 反応性	SM < A
抑制性 T 細胞誘導	SM > A
抗 T 細胞自己抗体産生	SM > A
腹水腫瘍に対する血清療法の効果	SM < A
B 細胞マイトジェン反応性	SM > A
胸腺摘出後自己免疫病発生頻度	SM < A
H-2 依存性抗甲状腺抗体産生	SM < A
BALB/c ミエロー IgA に対する抗体産生能	SM < A
NK 細胞活性	SM > A
副腎 X ゾーンの空洞化	SM < A
ダウノマイシン誘発腎症	SM < A
肺腫瘍発生率	SM < A
リンパ腫発生率	SM < A
攻撃的行動	SM > A

医学・生物学分野における実験用動物としてのサル類の人工繁殖

大阪大学人間科学部 和 秀雄

1. はじめに

実験用動物としてのサル類は、使用数の上ではマイナーであるが、ヒトに近いという点では重要な位置を占める動物である。しかしながら、日本では、その重要な実験用動物の繁殖体制の確立が著しく遅れており、国内で実験に使用されるサル類の大部分を、外国からの輸入にたよっているのが現状である。

マウス、ラット、ウサギ、イヌなどの主要な実験動物については、すでに多くの民間企業が人工繁殖の技術を確立し、産業としても成り立っているのに、サル類ではなぜできなかったのであろうか。その最大の原因は、サル類の人工繁殖には、他の動物とは比較にならないほど多額の経費や時間・労力を要するため、企業としての採算がとれないことにあるのではないかと思われる。しかし、過去において、政変や人獣共通伝染病の発生などの輸出国の事情によって、サル類の輸入が停止し、我が国のサル類を用いる実験・研究が著しく制限されたという事実がある。自国で必要なものを自国で生産することの重要性は自明のことである。

ここでは、まずサル類の生物学的位置や、国内で用いられてきたアカゲザル、カニクイザル、ニホンザル、マーモセット類について概括し、国内においてカニクイザルが最も多く使用されるに至った歴史的経過についても述べてみたい。その後、いくつかの実際の人工繁殖の方法について、それぞれの長所・短所を含めて解説するとともに、私自身が手がけた人工繁殖についても紹介したい。

2. サル類の生物学的位置

サル類は、動物界・脊索動物門（脊椎動物亜門）・哺乳綱・霊長目に属する動物群である。分類学者によって異なるが、表1は、Napier & Napier(1985) の分類を土台にした霊長目の分類の1例（和，1982）であり、現在170～200種程度に分類されている。ヒトは、もちろん霊長目の一員であり、表1に示す通り、かつては現代人が含まれるヒト科は、オランウータン属、チンパンジー属（チンパンジーおよびピグミーチンパンジー）、

ゴリラ属の3属を含むオランウータン科と分けられていて、ヒトという特別の存在として分類されていた。しかし、近年、類人猿の研究の進展にともなって、大型類人猿をオランウータン科とヒト科に分け、オランウータン科のオランウータンを除くチンパンジー、ピグミーチンパンジー、ゴリラをヒト科の中にも含める分類も行われるようになってきている。また、*Homo*はヒトだけの属名であったが、チンパンジー、ピグミーチンパンジー、ゴリラの3種を*Homo*属に含めることを提唱する分類学者もいるというように、分類は、研究者によっても、時代によっても変動する。

また、表1にはツパイ類が含まれているが、Napier & Napier(1985)の分類がそうになっているのではなく、さまざまな過去の経緯を考慮して、参考までに著者の判断によって入れたものであることをご了解願いたい。ツパイ類は、Napier & Napier(1985)の本来の分類の中では、「Van Valen(1965)が、ツパイがどんなに霊長類と近い関係にあったとしても霊長類ではないことを、十分な根拠をもって示した。」として、霊長目からは除外されている。

「分類学者の数だけ異なった分類がある」といわれるように、万人が認める定説的な分類法はないが、霊長目に含まれる動物たちが、他の目の動物たちよりヒトと近縁であることは確かである。

3. 国内で使われてきた主要なサル類

1) アカゲザル

マカカ (*Macaca*) 属の一種であり、カニクイザルとともに、'地球上で最も繁栄したサル種'といわれるほど、アジア地域に広く生息し個体数も多い。実験用動物として使われた歴史も古く、世界的にはすでに1800年代に医学実験に用いられた記録がある(谷岡, 1991)。

世界的にみると、1900年代後半からのポリオワクチン製造の原材料としての使用をはじめ、脳神経生理、精神薬理、生殖生理、行動、感染症など、広範な領域で使用され、バックグラウンドデータは、サル類の中では最も豊富である。その豊富なバックグラウンドデータのために、アカゲザルは、かつては日本においてもさまざまな分野で最も多く使われた。

しかし、生息環境の破壊や実験用動物としての乱獲などのために、野生の生息数が年々減少していることを危惧したインド、バングラデシュなどの原産国は、1970年から、

厳しい輸出制限策をとり始めた。以降、アカゲザルは、価格が高騰しただけではなく、入手そのものが困難になり、日本国内への輸入数は激減した。

このような国際的な自然保護運動の高まりの中で、アメリカは、いち早く国家プロジェクトによる自家繁殖体制をとって対応したが、日本の対応はいちじるしく遅れ、大規模な繁殖コロニーや供給体制がつくられないまま現在に至っている。こうして、安全性試験など多数の動物を用いる分野では、アカゲザルに代わってカニクイザルが中心になったが、「可能ならアカゲザルを使いたい」という声も多く、とくに脳神経科学や薬理薬効試験などの領域では、ニホンザルとともにアカゲザルが多く用いられている。それらの大部分は、外国からの輸入に頼っているのが現状であるが、研究者の需要を十分に満たしているとはいいがたく、もし、国内における人工繁殖・供給体制が確立されれば、アカゲザルの需要は増加すると思われる。

2) カニクイザル

東南アジアの広範な地域に分布するマカカ (*Macaca*) 属の一種である。実験用動物として使われた歴史は1800年代末に遡ることができ、バックグラウンドデータも多く、アカゲザルとならぶ代表的な実験用サル類の一種である(寺尾・本庄, 1991)。

日本におけるカニクイザルの使用数は、アカゲザルの輸入が困難になった1970年頃から急増した。1970年以降もしばらくの間、フィリピン、インドネシア、マレーシア、カンボジア、ベトナムなど、カニクイザルの原産国からの輸入にとくに制限がなかったこと、輸入困難になって高騰したアカゲザルの価格の十分の一程度の価格で購入できたこと、脳神経科学など特定の領域ではアカゲザルに一步をゆずるが、大部分の分野ではアカゲザルに遜色のないデータが得られることなどが、使用数急増のおもな理由と思われる。こうして、多くの研究機関が、アカゲザルで行っていた実験をカニクイザルにきりかえていき、カニクイザルは、日本における実験用サル類の大部分を占めるに至った。

しかし、無制限に近かったカニクイザルの輸入も、やがて困難になる。1975年に発効したCITES(通称ワシントン条約)を契機に、多くの原産国が野生個体の捕獲や輸出を制限し始めたことが、そのおもな理由である。また、野生生物保護だけでなく、実験用動物としての質を高めるという観点からも、「実験には、野生由来の動物ではなく人工繁殖された動物を用いるべきである」という方向が国際的な実験動物界の潮流になったことも、従来の安易な野生個体の輸入を困難にした。さらにまた、原産国における政変や人獣共通感染症の発生、航空輸送の禁止などが、日本のカニクイザル輸入を困難にしたこと

も、記憶に新しいところである。

人工繁殖については、国立予防衛生研究所（現国立感染症研究所）が、1960年代初頭からカニクイザルの室内繁殖と実験動物化に取り組み、つくば医学実験用霊長類センターの実績は世界的に高い評価を受けている。ただし、このセンターの繁殖方式には多額の経費を要し、かつ私企業を含めた一般的な利用が困難な面がある。安価で、利用が容易な繁殖コロニーの確立が望まれる所以である。

2) ニホンザル

ニホンザル (*Macaca fuscata*) は、日本にしか生息せず、また、日本に生息するヒト以外の唯一の霊長類であり、マカカ属の一種である。南は屋久島（鹿児島県）から北は下北半島（青森県）まで分布し、下北半島のニホンザルは、世界のサル類の分布の北限である。2亜種に分けられ、屋久島に生息するヤクニホンザル (*M. f. yakui*, ヤクザル、ヤクシマザルともいう) は、屋久島以外に生息するニホンザル (*M. f. fuscata*, ホンドザルということもある) と区別されている (和, 1991)。

1953年、東京大学を中心とする実験動物研究グループと京都大学を中心とする生態学・社会学の霊長類研究グループが協力して、京都大学構内に設立した第一次実験用サル類供給センターが、ニホンザルの実験動物化の試みの最初の組織的な動きである。ここでは、小規模ながら、ニホンザルの捕獲・収集・供給が行われた。この供給センターを経由したニホンザルの大部分はヤクニホンザルであり、それは、屋久島における生息数が他の地域より非常に多いと思われたことと、屋久島にサルを生け捕りにする技術が伝わっていたことによる。

その後、この事業は、1955年に設立された財団法人日本モンキーセンターに受けつがれ、毎年100頭前後のサルが屋久島で捕獲され、日本モンキーセンターで一定の健康管理を受けた後、さまざまな研究機関に供給された。しかし、屋久島のサルの生態学的な調査はほとんど行われておらず、捕獲圧による生息数の減少が危惧されたため、1969年をもって屋久島での捕獲は中止された。

一方、動物園の‘サル山’や、1952年の高崎山（大分県）および幸島（宮崎県）での餌づけを皮切りに各地に多数誕生した、餌づけしたニホンザルを一般公開する野猿公園においては、餌づけによる個体数の増加が問題になってきた。また、奥山の伐採などによって生息環境を破壊されて人里近くにあらわれるようになったニホンザルの、農作物にたいする‘猿害’が年々増加して深刻な問題になった。これらの‘余剰ザル’や‘猿害ザル’

は、すでに、実験用動物として多くの研究機関に供給されていると思われ、とくに脳神経科学の領域では、野生由来の動物がかなり利用されてきたようであるが、実態は不明瞭である。これらを、秘密裏に利用するのではなく、公的立場の機関が積極的に収集・ストックし、実験用サルとして活用することも検討された。しかし、これらのサルを直接実験用として使用することに関しては、実験動物学的観点からも、動物愛護の観点からも反対の声が高く、そのような体制は現在もつくられていない。

幸か不幸か、ニホンザルのBウィルス抗体保有率がかなり高いことが明らかになったのを契機に、安全で質のいいニホンザルの人工繁殖体制の確立を望む声が高まってきている。

4) マーモセット類

マーモセット属とタマリン属のマーモセット科に属する三十数種の動物を総称して、マーモセット類ということが多い。南米に分布する広鼻類の仲間で、いずれも400g前後の小型の動物である(谷岡, 1991)。

動物園などでは飼育・展示されていたが、実験用としての需要がふえたのはマカカ属のサル類よりはだいぶ遅く、1960年代になってからである。コモンマーモセット、シルバーマーモセット、クロクビタマリン、クチヒゲタマリン、ワタボウシタマリン(パンシェ)など、多くの種がさまざまな領域で使われているが、代表的な種はコモンマーモセットである。これらの動物は、小型であるために、飼育施設、飼料、人件費などの管理費や実験に用いる薬剂量などの点で経済的であるという有利な面を有する。また、サリドマイドなどによる催奇形性や各種のウイルスに対する感受性などの点において、マカカ属のサルに遜色のないデータが得られる点も、需要がふえた要因であろう。

さらにまた、繁殖効率が低い点も、実験用動物として注目された要因の一つである。マーモセット類は二卵性双生子の出産例が普通であり、かつ出産直後に次の受胎をすることが多いため、年二回の出産はけっして珍しくない。

人工繁殖については、すでにいくつかの施設が軌道にのせており、マカカ属のサルと比較すると、その生産・供給は民間企業としての採算もとれるものと思われる。

ビタミンD₃の要求量、性ホルモンの血中濃度、血糖値などがマカカよりいちじるしく高いことなど、マカカとは異なる面もあるが、それらの特性が明らかになるほど、特性を利用できる領域からの需要はさらに増加するものと思われる。

3. 人工繁殖の意義

かつては、実験に用いられたサル類の大部分が野生由来の動物であった。しかし、主として生息環境の破壊と大量捕獲によってさまざまな野生動物の生息数が激減する中で、野生由来のサル類を用いてきた実験動物界は、「自然破壊に加担するもの」として、きびしく批判されるようになった。このような社会的背景と実験動物科学の発展により、現在では「実験には実験用に繁殖された動物を使う」という方向が、世界的な実験動物学界の主流である。

未だに、「サルでさえあれば・・・」とか「安い方が・・・」とか「人の福祉に役立っているのだから多少の自然破壊はやむをえないのでは・・・」というような声があることは承知しているが、以下に述べるように、国内における人工繁殖体制の確立は重要な意義がある。

1) 自給自足体制の確立

すでに述べたように、政変や重大な人獣共通感染症の発生などによるサル原産国の輸出禁止措置、航空機の輸送拒否などによって、外国から輸入されるサル類がいちじるしく不足し、サル類を用いる日本の医学・生物学分野の実験・研究が、何度か重大な影響を受けたのは記憶に新しいところである。国内の研究が外的条件に左右されないようにするためには、実験用サル類の供給を外国に頼るのではなく、「日本で必要なものは日本国内で生産する」という体制を確立しなければならない。

2) 人獣共通感染症の防止

野生動物の疾病に関しては、十分に調べられていない未知の部分が数多く残されている。とくに、形態的にも生理的にもヒトに近いサル類は、ヒトに重大な影響を与える感染症をもっている可能性は、他の動物に比較していちじるしく高いと思われる。結核、赤痢、Bウイルスやマールブルグウイルスのようにすでに知られている感染症はもちろんのことであるが、未知の感染症を含めて人獣共通の感染症を防止するためには、野生由来個体の使用をやめて、人工繁殖によって生産され、重大な人獣共通感染症がチェックされた動物を用いるべきであろう。

3) 実験用動物としての質の向上

過去の経歴が明らかではない野生由来の動物においては、血液性状その他の生理値の個体によるバラツキが大きく、実験結果の解釈が困難になることがある。サル類のように少数の動物しか使えない実験においては、上記2)の人獣共通感染症の防止のためのみならず、できるだけ質の揃った動物を用いることによって実験精度を高めるためにも、また、

そのことによって使用頭数を減らすためにも、環境を一定にした繁殖施設での人工繁殖を行う必要がある。

4) 野生生物の保全

私たちは、かつて、さまざまな目的による無秩序といっても過言ではない利用によって、野生生物を圧迫し、多くの野生生物を絶滅の危機に陥れてきた。実験用に使われてきたサル類も例外ではなく、野生由来のサル類が実際に研究者の手もとに届くのは、捕獲個体数の10%にも満たないといわれた時代があった。いかに‘人類のために’という大義名分があるとしても、自然の荒廃に手を貸し続けることは許されない。私たちは、「実験用動物として人工繁殖された動物だけを実験に用いる」という方針を堅持することによって、野生生物および生態系の保全に務めるべきである。

5) 実験目的のための人工動物としての繁殖

最近までごくふつうに行われてきた自治体からの「払い下げ」のイヌやネコの実験利用は、現在ではほとんど見られない。その主な理由は、実験用動物としての質の問題もさることながら、「人間の伴侶として暮らしてきた動物を実験に用いるのは許せない」という主張によるところが大きいのは、周知の事実である。同様の意味で、動物園などで増えたサルについては「人間に親しまれてきた」という点で、また、畠荒らしなどによる有害鳥獣駆除で捕獲されたサルについては「自然の中で自由に暮らしてきた」という点で、彼らがたとえ‘余剰ザル’や‘有害ザル’であっても、その直接的な実験利用に対する批判の声があることも事実であり、私たちは、その批判を真摯に受け止めなければならないであろう。人類は、野生動物を飼い慣らし、作りかえることによって、食用のウシやブタ、伴侶動物としてのイヌやネコなどを人工的に作ってきた。実験用の動物においても、マウスやラットが実験動物としての人工動物であるように、実験に用いるサル類も、その目的を明確にして人工的に生産する体制をつくるべきである。

4. さまざまな繁殖方式

一口に人工繁殖といってもさまざまな方式があり、それぞれ長所と短所がある。以下、いくつかの繁殖方式について概説する。

1) 餌づけ放飼方式

もし、ニホンザルの餌づけ群を‘繁殖コロニー’と位置づけることが可能なら、各地にある‘野猿公園’がこれに該当することになる。餌づけによって、個体数はいちじるしく

増加するため、'余剰分'を間引いて実験用に利用したらどうか、という考え方である。しかし、野猿公園のあり方については議論中であり、繁殖コロニーという位置づけには反対する意見が多いと思われる。また、餌づけされているといっても、もともと野生動物であるニホンザルを実験用に直接利用することにたいして批判の声があることは、すでに述べた通りである。さらにまた、いずれの餌づけ群も、実験用サルの繁殖を第一義的な目的にはしていないため、譲渡を受けて実験に利用する側の性、年齢などの希望と、譲渡する側の管理者の意向が、必ずしも一致しないという問題点もある。野生であるために、遺伝的な統御はもちろんのこと、微生物学的なコントロールも非常に困難であるという点も、非常に大きな問題点の一つである。

2) 島を利用する繁殖方式

離れ島にサルを導入し、放飼形式で繁殖を図る方式である。海という自然を利用し、外界と遮断するためのフェンスやコンクリート壁をつくる必要がないという点では、経済的には有利である。しかし、島の植生その他の環境が破壊されること、島の大きさによっては複数の群れを導入することができず広さのわりに不経済になることもありえること、地形によっては十分な観察が困難になること、健康管理も容易ではないこと、上記1)に近い環境なので遺伝的・微生物学的コントロールが困難であること、島内に人工的な給餌施設や捕獲施設をつくり管理のための人が常駐するか通うかする必要のあること、寒さに弱いカニクイザルなどの島繁殖の場合は、国内の温暖な地域を選ぶとか島内に防寒のための暖房施設をつくるとかの配慮が必要になること、などの欠点もある。

3) オープンエンクロージャー方式

比較的広い面積を脱出できない壁によって囲い、グループで飼育する方式である。天井部分を囲わないという点で、次に述べるグループケージと区別しておく。通常、床部分はコンクリートの底板ではなく土のままであるが、土は、サルのストレスなどを軽減する効果が期待できる反面、いったん感染症が発生すると管理が困難になるという短所もある。施設内に収容する前に、感染症の十分なチェックを行う必要がある所以である。脱出されないような囲いとしては、(1)周囲をフェンスで囲い、上部を手がかりのない壁(たとえばトタン)にしてよじ登るのを防止する (2)フェンスと電気柵を併用する (3)コンクリートの壁で囲う などの方法がある。恒久的でかつ確実なのは(3)コンクリート壁であるが、経費は高くつく。(1)および(2)は、経費的には比較的安価であるが、強度や耐久性は十分ではない。

この方式は、広さや土・草などがあるという点で、健康上も福祉上も、サルの飼育下の環境としてはいいし、清掃その他の日常の管理コストが低いことなどの長所があるが（松林，1999）、逆に動物にとっていい環境をつくるためには広い場所を必要とすること、健康管理上やや問題があること、安定したグループにするための最初のグループづくりの苦労（出自が同じ群れの場合はあまり問題にならないが、出自が異なる場合、性、年齢などに配慮しても安定するのに時間がかかる場合がある）などの短所もある。

4) グループケージ方式

グループ飼育という点では上記3)と同じであるが、上記3)より狭い面積を天井部分も含めて囲った中で飼育する方式である。通常、数頭～10頭程度のグループで飼育することが多い。比較的狭い場所でも複数のグループケージをつくって複数のグループを飼育できること、健康管理が容易であること、個別ケージよりも管理コストが低い、などの長所がある。しかし、安定したグループをつくるのに時間がかかる（不安定なグループでは喧嘩によるケガやストレスによる下痢なども多く、とくにカニクイザルではその傾向がある）という短所がある。グループケージは、屋内・屋外の二つの方式があり、またオスの数によって以下の二つに分けられる。

(1) 単雄複雌群

オス1頭と複数のメスを同居させることによって、生まれるコモの遺伝的な由来を明らかにすることができる。しかし、メスの数が多すぎるとオスが対応しきれず、繁殖効率が低下することがある。この点に関しては、交尾期が比較的短いニホンザルにおいて、とくに留意する必要がある。また、同居中のオスとの‘相性’が悪いメスは妊娠しないことになる。

(2) 複雄複雌

上記の欠点を補うために、オスを複数にする方式である。この場合、父親がすぐには特定できないという欠点がある。また、複数のオスの優劣関係の調整も必要である。

5) 1対1交配

オス1、メス1の組み合わせによる交配方式であり、以下の二つに分けることができる。

(1) 常時同居方式

1頭のオスと1頭のメスを常時同居させておく方式である。管理のための労力は少ないが、多数のオスを保有しなければならないこと、同居期間が長すぎると繁殖効率が悪くなることが多い（和，1982）、などの欠点がある。

(2) 一時的な出会わせ方式

別々に飼育されているオスとメスを、短時間だけ一時的に同居させる交配方式である。オスの数はメスよりはるかに少なくてもいいこと、繁殖効率も常時同居より優れていること、遺伝学的・微生物学的コントロールが容易であること、必要な時に必要な数の妊娠個体を得られることなど、非常に優れた繁殖方式である。しかし、メスの交配適期を見極めて同居させなければならないという点では、そのための技術と労力が必要である。管理コストが非常に高くなることは、最大の短所であるといえる。

6) 人工受(授)精

自然交配によっては妊娠しない個体や、ニホンザルのような季節繁殖動物の周年繁殖への応用が期待できる。世界的にはいくつかの種の成功例が報告されており、我々(Torii & Nigi, 1998)もカニクイザルと交尾期のニホンザルにおいては、精子の経膈注入によって50%前後の成功例を得ているが、残念ながら、非交尾期のニホンザルにおいては成功例はまだ得られていない。時間的にも労力的にも経済的にも、負担が大きいのが難点である。

7) 体外受精-胚移植

上記6)と同様の応用が期待できる。我々(Torii et al., in press)は、カニクイザルおよびニホンザルにおいて、この技術による妊娠・出産例を得ており、世界的にもいくつかの種の成功例があるが、成功率は非常に低い段階であり、6)以上に負担は大きいといわざるを得ない。

8) 顕微受精-胚移植

世界的には、ごく少数例の成功例が報告されているが、我々は、未だ妊娠例を得ていない。時間的・労力的・経済的な負担は、上述の6)および7)よりもはるかに大きい。

5. 国内における人工繁殖の問題点

国内においても、いくつかの機関が人工繁殖に取り組んできたが、残念ながら、「日本で使うサルは日本で繁殖する」という体制は未だつくられていない。以下、筆者が感じる国内におけるサル類の人工繁殖の問題点について述べてみる。

1) 経済的な問題

すでに述べたように、サル類の人工繁殖は多額の経費を要する。需要があるにもかかわらず、国内における民間の繁殖施設がつかられないのは、サル類の繁殖・供給が企業レベルではペイしないからである。国立感染症研究所つくば医学実験用霊長類センター、京都

大学霊長類研究所など、人工繁殖体制を維持し続けているいくつかの機関は、すべて国立の機関として国からの援助によって運営されている機関である。民間企業の場合、繁殖したサル類を自社の受託試験に使うというような併用策を考えなければ、小型のマーモセット類を除いて、繁殖・供給のみで利益をあげることは不可能にちかい。

事実、私自身が、前任校の日本獣医畜産大学（私立）に在職中の10年ほど前、'実績作り'のために始め、現在約千頭のサル（カニクイザル、アカゲザル、ニホンザルなど）を保有している奄美大島（鹿児島県）の繁殖コロニーは、年々赤字を計上し続けて、現在の累積赤字は数億円にのぼっている。理屈の上では、必要経費をすべてサルの価格に上乗せすれば簡単に解決できる問題であるともいえるが、ユーザーが、すべての経費が含まれた100万円以上の価格のサルを購入するとは思えないし、生産したサルの販路がなければ、赤字はさらに増大することになる。奄美の亜熱帯の気候を利用した'金網ばりのエアコンなし'という、経費を可能なかぎり節減した施設においてさえ、借金返済の目標を数十年先に設定しないかぎり、採算はとれないのである。ましてや、冬期の暖房が必要なカニクイザルなどの繁殖を本土で行う場合、施設費や維持管理費はさらに大きくならざるを得ない。奄美のコロニーは、ここまできたらこのまま維持せざるを得ないと、設立者である筆者は考えているが、今後このような採算を度外視した民間の施設は出てきそうもない。

2) 繁殖方法の問題

さまざまな繁殖方法の長短についてはすでに述べたが、ここでも要約しておこう。

つくば医学実験用霊長類センターにおける、短期間の出会いによる繁殖方式は、すでに軌道にのり、生産されたサルの質的な点でも、世界的に高い評価を受けている。ただ、この方式の設備費および維持費には多額の経費がかかり、その必要経費をすべて含んだ価格でサルを購入して使用できるユーザーは、もし民間の研究者にも開放されるとしても、ごく少数にかぎられるであろう。

過去30年の京都大学霊長類研究所におけるニホンザルの飼育下繁殖の経験では、高いコンクリートなどで囲った放飼場形式が、サルの健康・福祉上よく、管理コストが低く、繁殖率が高いという（松林，1999）。しかし、すでに述べたように、この方式は比較的広い面積を要し、恒久的な施設をつくるためには経費が高くつく、などの短所がある。国費による自家用繁殖の場合は別として、全国のユーザーを視野においた方式としては、経済的な意味で不向きかもしれない。

財団法人日本モンキーセンターは、島繁殖、餌づけ放飼方式など、いくつかの方式の繁

殖を試みてきた（小寺，1999）。それらは、一定の役割りを果たしてはきたが、多くは、観光施設を兼ねるなど、実験用動物の繁殖を主たる目的にはしていなかったため、繁殖効率が高いとはいえなかったし、施設の多くは、現在では閉鎖されている。

筆者自身が、実験用サル繁殖施設として奄美大島につくった施設は、広大な土地を確保できなかったこともあって、オス1頭に対してメス数頭～10頭程度を同居させるグループケージ方式を主体にしている。グループ内の闘争が多い（とくにカニクイザルの場合）などの短所はあったものの、現在ではほぼ安定したグループが多い。筆者は、比較的狭い土地での繁殖は、この方式が最も効率的な繁殖が行えると思っており、この方式によって、現在では、フィラリア、マラリア、赤痢アメーバ、消化管内寄生虫、細菌性赤痢、サルモネラ、結核、Bウィルスなどの病原体（一）という1種のSPFサルが育成されている。ただ、収支のバランスがとれず、現在に至るも赤字が増え続けていることは、前述の通りである。

以上のような繁殖方式は、投資できる費用、確保できる土地、周囲の環境条件、期待されるサルの質、などを考慮して適宜選択されるべきであろう。筆者は、自然からの収奪をやめ、野生よりはるかに質の高いサル（たとえば、由来・生年月日が明らか、特定の病原体マイナス、一定の馴化など）を安価にかつ大量に人工的に作り出す体制を、まずは確立すべきであると考えている。

現在、国内のユーザーの大部分が求めている実験用サルの質としては、京大霊長類研究所や奄美方式のサルで十分満たせるであろう。これらの方式の規模を少し拡大できれば、自然からの収奪をやめることは可能である。価格が高くてももう少し質の高いサルを必要とするユーザーは、つくば方式のサルを利用することができる。さらに厳密な条件を必要とする場合は、人工受精、体外受精一胚移植、顕微受精一胚移植などの技術が応用できる。

これらの繁殖方式は、国内においても、すでに技術的には確立され、あるいは確立されかかっている方式である。国内の繁殖体制の確立に最も大きな障害になっているのは経済的な面だけであり、それは、実験用サル類の確保に関する国の姿勢を少し変えるだけで、容易に実現できるものである。繁殖体制の確立に要する費用は、個人レベルでみると莫大なものであるし、また、初めから‘儲からない’ことがわかっている事業に、私企業が手を出さずもないが、‘国家’のレベルでみると実に微々たるものである。

‘脳科学の時代’の研究に、20年間で2兆円という莫大な国家予算がつく一方で、脳研究を支える底辺の一部であるサル類の人工繁殖のための予算はまったく計上されていな

い。初年度1000億円の50分の1の20億円程度を繁殖コロニー設立のために投資するだけで、年間500頭前後のニホンザルおよびアカゲザル（ニホンザルの需要が約9割）の需要を満たせたはずであるにもかかわらず、そのような方針は未だにうちだされていない。脳研究を推進するという方針をうちだしながら、そのために必要なサルをどのようにして確保していくのであろうか。必要性に応じて国家レベルですばやく対処したアメリカに比較して、日本という国はなんとも不可思議な国である。

6. おわりに

結論的にいえば、国内においてサル類の人工繁殖を確立するための選択肢は、1) 国費によって、誰でも利用できる新たな繁殖・供給センターを設立する 2) 国費によって運営されている上記の既存の機関の繁殖数を増やし、民間を含めた広範なユーザーが利用できるようにする 3) 既存の機関以外の国・公・私立の大学や研究機関に対しても国費の援助を行い、それぞれの機関の自家使用のための繁殖体制をつくる（この点に関しては、すでに文部省の学術フロンティア事業によってスタートした私立大学がある） 4) 民間の繁殖機関の施設費や維持費に対して国家的な補助を行って、民間の繁殖企業を育成する 5) 「サルの繁殖には金がかかる」ということをユーザーが認識して、すべての必要経費および企業の利益を計上した高価なサルを購入する ということになろう。

最も望ましい姿は上記の1) であるが、本来国家が責任を負うべき既存のさまざまな機構さえ国の管轄から切り離していく昨今の国の姿勢を見ていると、1) の実現は非常に困難であると思われる。とすれば、上記の2) ~ 4) あたりを、できるところから実現していくということになろう。

[参考文献]

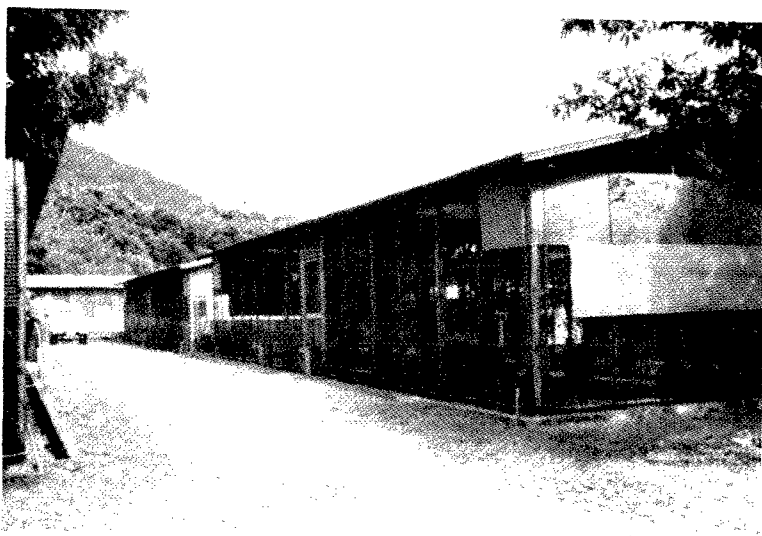
- 小寺重孝（1999） ニホンザルのコロニー作成 オベリスク, 4（1）：7-8
- 松林清明（1999） 実験用ニホンザルの供給システム確立を オベリスク, 4（1）
：4-6
- Napier, J. R. & Napier, P. H. (1985) The Natural History of Primates. British Museum(Natural History), London
- 和 秀雄（1982） 「ニホンザル 性の生理」 どうぶつ社

- 和 秀雄 (1991) ニホンザル *In*:田嶋嘉雄監修「実験動物学」(朝倉書店)407-413
- 谷岡功邦 (1991) アカゲザル 同上 426-437
- 谷岡功邦 (1991) マーモセットおよびタマリン 同上 389-398
- 寺尾恵治・本庄重男 (1991) カニクイザル 同上 413-426
- Torii, R. & Nigi, H. (1998) Successful artificial insemination for indoor breeding in the Japanese monkey (*Macaca fuscata*) and the Cynomolgus monkey (*Macaca fascicularis*). *Primates*, 39(4):399-406
- Torii, R., Hosoi, Y., Masuda, Y., Iritani, Akira, & Nigi, H. (in press) Successful method of in-vitro fertilization and embryo transfer in the Japanese monkey (*Macaca fuscata*).
- Van Valen, L. (1965) Treeshrews, primates and fossils. *Evolution*, Pa 19:137-151

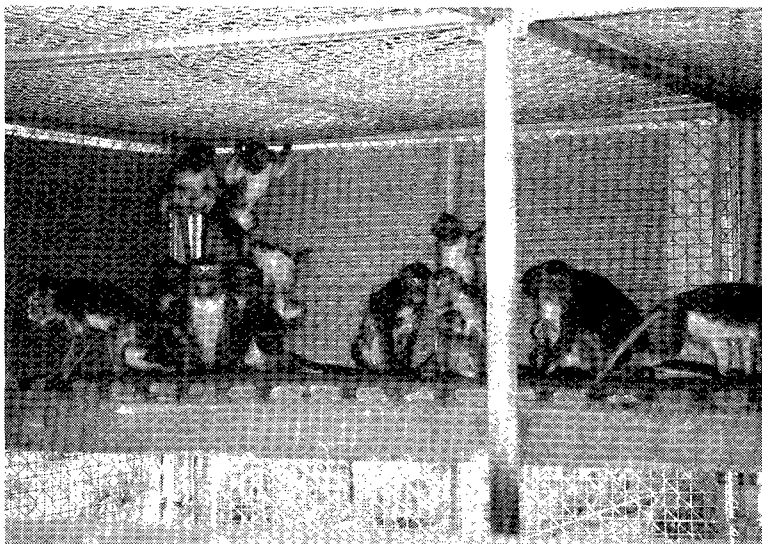
目	亜目	下目	上科	科	属および種
霊長目	原猿類	ツバイ類	ツバイ上科	ツバイ科	コモントツバイ、ハネオツバイなど4属30種
		キツネザル類	キツネザル上科	キツネザル科 インドリ科	ワオキツネザル、マングースキツネザルなど4属16種 インドリ、シファカ、アバヒなど3属4種
			アイアイ上科	アイアイ科	アイアイ1属1種
			ロリス類	ロリス上科	ロリス科 ガラゴ科
		メガネザル類	メガネザル上科	メガネザル科	フィリッピンメガネザルなど1属3種
		真猿類	広鼻類	オマキザル上科	マーモセット科 オマキザル科
	オナガザル上科			オナガザル科	グエノン類、マカカ属のサル、ヒヒ類など13属58種
	狭鼻類			テナガザル科	シロテナガザル、クロテナガザルなど2属7種
			ヒト上科	オランウータン科 ヒト科	チンパンジー、ゴリラ、オランウータン3属4種 ヒト1属1種

表1：霊長類の分類(和秀雄「ニホンザル 性の生理」(1982)から)

(現在は、ツバイ類を霊長目からはずしたり、上表のオランウータン科に属しているチンパンジー、ゴリラをヒト科に含めたりする分類が多く、また、チンパンジー、ゴリラをヒト属に含める分類学者もいる)



奄美における繁殖施設の外観



奄美における繁殖施設の内部
(カニクイザル)

<第62回研究会（平成11年6月11日）>

テーマ：「生殖発生毒性試験を考える」

1. 毒性試験における精子検査の意義と方法

川島邦夫（国立医薬品食品衛生研究所大阪支所）

2. ヒトの先天異常研究における動物実験の意義

谷村 孝（近畿大学ライフサイエンス研究所）

毒性試験における精子検査の意義と方法

国立医薬品食品衛生研究所

大阪支所 生物試験部

川島 邦夫

I. はじめに

近年ヨーロッパにおいては、成人男性の精子数が減少していることが報告されている。Carlsen 等は 1992 年にデータベースとして Cumulated Index Medicus, Current List(1930-1965), MEDLINE(1966-August 1991)を用いて、1938 年から 1990 年に発表された 61 の論文に記載されている 14,947 人の男性について、精液量と精子数を調べ、過去 50 年間に精子数が $113 \times 10^6/ml$ から $66 \times 10^6/ml$ に、精液量も 3.40 ml から 2.75 ml に減少したことを報告した¹⁾。この報告を契機に同様な報告が各国でなされたが、フィンランドでは低下は見られず、精液の質の低下傾向は世界的ではないかもしれない²⁾。これらの精子数減少の想定される要因として感受性の遺伝的变化、精巣の癌・停留精巣・尿道下裂などの発現増加、エストロゲン作用を持つ化学物質への曝露などが考えられている³⁻⁸⁾。

日本においても人口動態はヨーロッパ型に移行し⁹⁾、産児数が減少している現在、男性生殖能に対する環境汚染物質を初めとする各種化学物質の影響が危惧されるようになって来ており、男性生殖能を正常に維持し、あるいは回復することは重要な課題である。今回は、精子検査の意義と方法について述べる。

II. 精子試験の意義

精子試験の意義として次のことが考えられる。

A. 毒性試験

雄性生殖器の組織学的検査では検出されない機能的影響の検索。

B. 薬効の確認

男性不妊症治療薬（例：Kallidinogenaze）、殺精子剤（例：Polyoxyethylen(n) nonylphenol ether）などの開発における薬効の確認。

C. 治療効果の確認

男性不妊症（乏精子症，精子無力症）の治療効果の確認。

III. 精子検査法（目視法）

A. 精子検査指標

精子の運動性，数，形態が検査の指標として ICH, EPA, FDA, OECD の各ガイドラインで求められている¹⁰⁻¹⁴⁾。これらの指標のうち精子運動性は，精巣以降の精子輸送路での障害を反映している。精子数と形態は，造成機能・精子成熟の程度を表しており，精子数は精巣内の精細胞数を表し，形態変化は成熟の障害度を反映している¹⁵⁾。

雄性生殖能試験における精子検査指標の選択は，試験対象化合物の特性を考慮して選択する必要がある。先に述べた各ガイドラインには精子数，精子運動性，精子形態しか記載されていないが，試験対象化合物の特性によっては，これら以外の指標の選択が必要になることも考えられる。また，最初からある指標のみに的を絞った試験を実施することは好ましくないと考えられる。

他の指標（例えば精漿中の生化学的指標など）を採用したり，一部の指標を用いない場合には，採用した試験指標について選択の根拠を述べる必要がある。

B. 精子検査法

1. 安楽死（目視法・精子運動能解析装置）

エーテルあるいはペントバルビタールナトリウムによる深麻酔，炭酸ガスによる窒息死，断頭などが使用されている。精子活力に影響しない手法を用いることが寛容であり，ここにあげた方法は何れも精子活力に影響しないと言われている¹⁶⁾。

2. 精子採取部位（用手法・精子運動能解析装置）

精巣（FDA ガイドライン），精巣上体尾部（ICH, FDA, EPA ガイドライン），精管（ICH, EPA ガイドライン）から採取される¹⁰⁻¹⁴⁾。ラットでは，運動性がよいとされている精巣上体尾部を使用するケースが多い。ICH ガイドラインでは，精子はより成熟したステージから採取する

こととされている。

3. 精子採取法（用手法・精子運動能解析装置）

1) 精巢上体細切法

精巢上体を希釈液中で、鉗またはピンセットで細切し、精子を泳出させる方法で、ラットまたはマウスで汎用されている¹⁷⁾。組織片が混入するので濾過する場合があるが、精子数が減ることがある。運動率は50~60%と低くなる。

2) ガラス毛細管による吸引

精巢上体管にガラス毛細管を挿入し精子を吸引する¹⁸⁾。ラットマウスに利用でき、組織片の混入が少ない精子液が採取できるが、運動率が低下することがある。

3) スイムアップ法

精巢上体細切法と同様ラット、マウスで汎用されており、次の方法がある。

i. 吸引法

精巢上体尾部を鉗などで切開し、もりあがるように漏出した精子をガラス毛細管等で採取する^{19, 20)}。

細い管を通して採取するので、運動性が低下することがある。

ii. 拡散法

a. 鉗などで精巢上体尾部を切開し、精巢上体管を突出させ、先を丸めたガラス棒で精巢上体管を掬いとり、培養液中に拡散させる²¹⁾。

b. 一定量の培養液に入れた精巢上体を18ゲージの注射針で数回突き刺し精子を拡散させる。

吸引法より運動率の高い精子が得られる。

4) 人工射精

ウサギ、イヌ、サルなどに用いられる。人工膣法、電気刺激法などがある。

i. ウサギ

内筒と外筒の間に37~38℃の温水を入れ、一定の圧力を与えるよ

うに調整した人工腔を用いる。成熟した雄ウサギを雌ウサギ、あるいは雌ウサギの毛皮を張った乗駕台に乗駕したとき、陰茎を人工腔内に誘導して射精させる²²⁾。

ii. イヌ

イヌの精液採取には人工腔法または陰茎圧迫法が用いられるが、精液の分画採取には陰茎圧迫法が簡便である。陰茎の圧迫は陰茎亀頭球後方を背腹両側から実験者の手指で行い、射精を開始させ、精子を含む白色の第2分画をロートを用いてチューブに採取する²³⁾。

iii. サル

精液の採取は電気刺激により行われている。電極を陰茎の基部と亀頭に装着し、直流電流 (15~40V, 15~40mA) を断続的に通電 (2~3 秒間) して射精させる²⁴⁾。

C. 精子希釈 (培養) 液 (用手法・精子運動能解析装置)

1. 運動性

Hanks (+BSA), PBS (+BSA), Medium-199 (+BSA)などが使用されている^{19, 20)}。

2. 数, 形態

通常 1/8 Mol の燐酸緩衝液 (Na_2HPO_4 80.4ml + KH_2HPO_4 19.6ml)が使用される¹⁷⁾。

D. 希釈率 (用手法・精子運動能解析装置)

運動性, 数, 形態とも精子の重なりを避けるため, 可能な限り希釈することが望ましい。

用手法では希釈率を高くした場合, 精子活力と前進性の成績が一致しなくなる。

E. 精子検査法 (目視法)

1. 精子活力

1) 精子活力

運動している精子を対象に実施する。

希釈精子液をスライドグラスに滴下して直ちに鏡検し, 最も活発な運動 (精子液全体が渦を巻くように見える) に対して 4 点を与え, 運

動の減弱に従って減点し、活発な前進運動を3、弱い前進運動を2、円運動あるいは振子運動を1、運動性が認められない場合を0とする5段階の採点により評価する^{25, 26)}。

評価は主観的で運動精子を対象としており、精子の運動率と一致しない場合がある。

2) 精子前進性

ホールスライドグラスに滴下した希釈精子液中に、約 20° の角度で立てたガラス毛細管内の移動距離を計測して評価する。評価は客観的であるが、運動精子を対象としており、生存精子の少ないサンプルあるいは運動性の低いサンプルでは、精子が毛細管内に進入しないことがある^{25, 26)}。

3) 運動精子率

運動精子数と、非運動精子数を数えその比を求める。次の方法が用いられている。

i. スライドグラス法

スライドグラスに希釈精子液を一定量滴下し、カバーグラスをかぶせて検査する簡便な方法である^{27, 28)}。

カバーグラスの重さで精子の運動が制約され、活力の乏しい精子が非運動精子として評価される場合がある。

ii. 西川式精液性状検査盤

検査室に希釈精子液を滴下し、カバーグラスをかぶせて鏡検する。

検査室が 50 μ の深さに保たれるため、スライドグラス法の欠点は解消されているが、計算室が深く運動精子の算定は困難である^{17, 28)}。

iii. マクラー精子分析カウントチャンバー

ヒトの精子検査に開発されたもので、深さは 10m で 1mm² に 0.1mm×0.1mm の格子が 100 個刻まれており、中央の 9 格子画または 19 格子画内の運動精子数、および非運動精子数を数える²⁹⁻³²⁾。

深さが 10 μ と浅く観察しやすいが、ラットの精子は大きいため運動が制約され、活力の乏しい精子が非運動精子として評価される場合が考えられる。

iv. 光川法

トーマ血球計算盤を用い、その小四分画の1辺上を1分間に通過する精子数を測定し、最小区画80個内の精子数で除した値を100倍して精子運動率を算出する³³⁾。

2. 精子生存率

生体染色をした精子の塗末標本により、生死を判別して生存率を算出する。エオシン単染色、エオシン-アニリンブルー重染色、エオシン-ニグロシン重染色、Calcein AM-Ethidium Homodimer 蛍光染色等が行われている^{17, 27, 34)}。

ウサギ、イヌなどは死滅精子がエオジンで染色されるが、ラット精子はエオジンで染色されないため、Calcein AM-Ethidium Homodimer 蛍光染色が行われている。

塗末標本が厚いと精子が重なり観察しにくいというえ、過染して生死の判別がしにくくなる。

3. 精子数

血球計算盤、マクラー精子分析カウントチャンバー、ディスポーザブル精子数測定チャンバーなどを用いて算定する^{27-32, 35)}。

4. 精子形態（奇形精子率）

エオシン単染色、エオシン-アニリンブルー重染色、エオシン-ニグロシン重染色、オパール・ブルー染色、カルボールフクシン、Williams 氏染色、Fontana 氏鍍銀染色などで染色した精子を、スライドガラスに塗沫して400倍で観察し、精子奇形率を算出する^{17, 27, 35)}。

エオシン-アニリンブルー重染色、エオシン-ニグロシン重染色が汎用されている。

塗末標本が厚いと精子が重なり観察しにくく、薄いとき精子が伸ばされるので評価を誤る場合がある。

5. 異常精子の分類

no hook, excessive hook, blunt hook, banana-head, amorphous, pin-head, small head, two heads/two tails, bent tail 等に分類されている^{20, 36)}。

IV. 精子検査法（用手法・精子運動能解析装置）

A. 機種

現在日本では米国の CellSoft (CRYO), HTM-IVOS (Hamilton Thorn) の2機種が使用されている。

いずれも録画した画像を用いて精子の運動性の計測, 数の算出を行うもので, 精子の採取部位, 採取法, 希釈液は目視法と同様である。

B. サンプルチャンバー

Makler chamber, Micro Cell, Cell Vu, Cannula 等が使用可能である。

出来るだけ他の細胞が混入していないサンプルと, 汚れの少ないチャンバーを使用する必要がある。

C. 指標

%motile sperm (運動精子率), %progressive sperm (前進精子率), Path Verocity (VAP, mm/s; 精子遊泳速度〔経路速度〕), Straight Line Verocity (VSL, mm/s; 精子遊泳速度〔進行速度〕), Curvilinear Verocity (VCL, mm/s; 精子遊泳速度〔トラック速度〕), Amplitude of Lateral Head Displacement (ALH, mm; 精子頭部の振幅), Beat Cross Frequency (BCF, Hz; 精子頭部の振動数), Straightness (STR, %; 直進性-1), Linearity (LIN, %; 直進性-2) 等がある。

これらの指標は男性不妊の臨床検査指標として設定されているので, 毒性的に意義のある指標の選定, 或いは設定が必要と考えられる。

V. 結果の評価に対して考慮すべき事項

精子に対する毒性影響の検索において, ある指標に影響がみられた場合, その化合物の毒性の本質, 範囲, 起源を明らかにすべきであり, 結果の評価は病理学の支援を受け一般毒性の影響, 他の生殖指標の変化および精子指標相互の関連を考慮して行う必要がある。また, 反復投与試験で回復性試験を行う場合, 病理組織学的に精巣毒性が回復しているか否かを調べるだけでなく, 産生された精子の機能が回復しているか否かを調べるべきであり, 最終的には交尾・受胎が成立し, 正常な分娩が行われ, 児が正常な発育を遂げ, 受胎能が正常に維持されているかを確認する必要がある。

VI. まとめ

精子に対する何らかの影響を明らかにするため、被験化学物質の特性を考慮して、最新の技術水準に関する情報を基に指標・試験法の選択、あるいは試験法を工夫しなければならない。そのためには多くの試験法を熟知した上で、客観的で再現性のある方法を選択する心算があり、結果の評価に際しては、最新の毒性学的情報あるいは関連化学物質の毒性情報を考慮して総合的に判断する必要がある。しかし、先に述べたように目視法では1つの指標に対して多数の手法があり、CASAにおいても多くの運動性の指標が設定されており、どの手法あるいは指標が毒性評価に有用であるか明らかではない。

雄性生殖能への影響が見られた場合、精子への影響があるか、精子の何が影響されたかを明らかにすることは重要であり、男性生殖能に及ぼす化学物質の影響をより適切に評価するため、精子に対する影響を適切に検出する手法・指標の確立と、得られた成績を評価する手法、およびその判定基準などを確立する必要がある。

VII. 参考文献

1. Carlsen, E., Giwercman, A., Keiding, N. and Skakkebaek, N. E. (1992) : Evidence for decreasing quality of semen during past 50 years. *BMJ*, 305, 609-613.
2. Suominen, J. and Vierula, M. (1993) : Semen quality of Finnish men. *BMJ*, 306, 1579.
3. Giwercman, A. and Skakkebaek, N. E. (1992) : The human testis—an organ at risk? *J. Androl.*, 15, 373-375.
4. Skakkebaek, N. E. (1987) : Carcinoma-in-situ and cancer of the testis. *J. Androl.*, 10, 1-40.
5. Prener, A., Hsieh, C. C., Engholm, G., Trichopoulos, D., Jensen, O. M. (1992) : Birth order and risk of testicular cancer. *Cancer Causes Control*, 3, 265-272.
6. Depue R. H. (1984) : Maternal and gestational factors affecting the risk of cryptorchidism and inguinal hernia. *J. Epidemiol.*, 13, 311-318.
7. Stillman, R. L. (1982) : In utero exposure to diethylstilbestrol ; adverse effects on the reproductive tract and reproductive performance in male and female offspring. *Am. J. Obstet. Gynecol.*, 142, 905-921.
8. Field, B., Selub, M., Hughes, C. L. (1990) : Reproductive effects of environmental agents. *Semin. Reprod. Endocrinol.*, 8, 44-54.
9. 村松 稔 (1987) : 人口問題と家族計画. *周産期医学*, 17, 163-166.
10. 生殖発生毒性試験 (1997) : 医薬品非臨床試験ガイドライン解説, 厚生省薬務局審査課監修, pp.23-34, 薬事日報社, 東京.
11. U.S. Environmental Protection Agency (1996) : Reproductive Toxicity Risk Assessment Guidelines. *Federal Register*, 61, FR 56274-56322.
12. Organization for Economic Cooperation and Development (1983) : Guidelines for Testing of Chemicals No. 416 ; Two Generation Reproduction Toxicity Study.
13. U.S. Environmental Protection Agency (Aug., 1998) : Health Effects Test

- Guidelines, OPPTS 870. 3800 Reproduction and Fertility Effects, EPA 712-C-96-208.
14. Organization for Economic Cooperation and Development (March, 1999) : Draft Document The Test Guideline 416 “Two-Generation Reproduction Toxicity Study”.
 15. Schrader, S. M. and Kesner, J. S. (1995) : 男性生殖系の毒物学. 性と生殖の障害一境的・職業的影響とそのアセスメント, 鈴木秋悦監訳, pp.3-15, 医学書院 MYW, 東京.
 16. Slott, V. L., Linder, R. E. and Dyer, C. J. (1994) : Method of euthanasia does not affect sperm motility In the laboratory rat. *Reprod. Toxicol.*, 8, 371-374.
 17. 上松嘉男, 竹島 勉, 入谷 明, 丹羽皓二 (1981) : 体外受精法. 哺乳動物の初期発生 基礎理論と実験法, 末尾左知丸, 加藤淑裕, 入谷 明, 鈴木秋悦, 舘 鄰編集, pp.169-213, 理工学社, 東京.
 18. Howards, S. S., Johnson, A. and Jessee, S. (1979) : Micropuncture and microanalytic studies of the rat testis and epididymis. *Fertility and Sterility*, 21, 13-19.
 19. Chapin, R. E., Filler, R. S., Gulati, D., Heindel, J. J., Katz, D. F., Mebus, C. A., Obasaju, F., Perreault, S. D., Russell, S. R., Schrader, S., Slott, V., Sokol, R. Z. and Toth, G. (1992) : Methods for assessing rat sperm motility. *Reprod. Toxicol.*, 6, 267-273.
 20. Seed, J., Chapin, R. E., Clegg, E. D., Dostal, L. A., Foote, R. H., Hurtt, M. E., Klinefelter, G. R., Makris, S. L., Perreault, S. D., Schrader, S., Seyler, D., Sprando, R., Treinen, K. A., Veeramachaneni, D. N. R. and Wise, L. D. (1996) : Methods for assessing sperm motility, morphology, and counts in the rat, rabbit, and dog : A consensus report. *Reprod. Toxicol.*, 10, 237-244.
 21. 丹羽皓二 (1993) : ラット. 生殖機能細胞の培養法, 菅原七郎, 尾川昭三編, pp. 49-59, 学会出版センター, 東京.

22. 尾川昭三 (1993) : ラット. 生殖機能細胞の培養法, 菅原七郎, 尾川昭三編, pp. 66-77, 学会出版センター, 東京.
23. 下村和裕 (1999) : イヌにおける精液検査について. 第 19 回 In vitro 発生毒性研究会 精子試験技術シンポジウム 精子毒性試験における基礎技術と評価法Ⅳ 講演要旨.
24. 山本 隆 (1999) : イヌにおける精液検査について. 第 19 回 In vitro 発生毒性研究会 精子試験技術シンポジウム 精子毒性試験における基礎技術と評価法Ⅳ 講演要旨.
25. Turner, T. T. and Giles, R. D. (1981) The effects of carnitine, glycerylphosphorylcholine, caffeine, and egg yolk on the motility of rat epididymal spermatozoa. *Gamete research*, 4: 283-295.
26. Kawashima, K., Usami, M., Sakemi, K., Ohno, Y. (1995) Studies on the establishment of appropriate spermatogenic endpoints for male fertility disturbance In rodent Induced by drugs and chemicals, I. Nitrobenzene. *J. Toxicol. Sci.* 20: 15-22.
27. 星 修三, 山内 亮 (1987) : 新版家畜臨床繁殖学増補版, pp. 104-132, 朝倉書店, 東京.
28. 川路成穂, 大橋正和 (1991) : 専用チャンバーを用いた精子濃度, 精子運動率の同時測定. *医療*, 45, 1041-1044.
29. Makler, A. (1978) : A new multiple exposure photography method for objective human spermatozoal motility determination. *Fertil. Steril.*, 30, 192-199.
30. Makler, A. (1978) : A new chamber for rapid sperm count and motility estimation. *Fertil. Steril.*, 30, 313-318.
31. Makler, A. (1980) : Use of the elaborated multiple exposure photography (MEP) method in routine sperm motility analyses and for research purposes. *Fertil. Steril.*, 33, 160-166.

32. Makler, A. (1980) : The improved ten-micrometer chamber for rapid sperm count and motility evaluation. *Fertil. Steril.*, 33, 337-338.
33. 光川史郎 (1979) 精子運動の新測定法 精子運動能の臨床的検討. *日泌尿会誌*, 70 : 1221-1231
34. 加藤真之, 林晴美, 野村幸子, 木村均 (1996) : 第 13 回 In vitro 発生毒性研究会 精子試験技術シンポジウム 精子毒性試験における基礎技術と評価法 講演要旨.
35. 鈴木 稔 (1992) : 精巣及び精子の検査. 毒性試験講座 11, 発生毒性, 谷村 孝責任編集, pp. 299-315, 地人書館, 東京
36. Somkuti, S. G., Lapadula, D. M., Chapin, R. C., Lamb, J. C., iv, and Abou -Donia, M. B. (1987) : Reproductive tract lesions resulting from subchronic administration (63 days) of tri-o-cresyl phosphate In male rats. *Toxicol. Appl. Pharmacol.*, 89, 49-63.

ヒトの先天異常研究における動物実験の意義

谷村 孝

近畿大学ライフサイエンス研究所

はじめに

先天異常 congenital anomalies とは、正常の範囲の変異を超えた発生のひずみで、出生前にその出現が方向づけられているものと定義される¹。より具体的には、胎生期の死亡や発育遅滞、先天奇形、機能・知能の障害、不妊等の生殖障害、免疫低下等による罹病性、腫瘍発生、短命など、受精以後その個体の死に至るまでの全経過中に示される不可逆ないし継続的な発生異常を広く指す。そのうち、先天奇形 congenital malformations は通常、出生時に存在する（認められるか、または潜在する）肉眼形態的発生異常を指し、先天異常のうち最も重視されており、その研究の歴史も長い。

Teratology（奇形学、現在では広く先天異常学）という語は、1832年にフランスの Isidore Geoffroy Saint-Hillaire により提唱された。19世紀後半にはニワトリで催奇形実験がなされ、20世紀初頭から哺乳動物を用いる実験がなされるようになった。1961年のサリドマイド事件を契機として、化学物質の次世代の発生に及ぼす影響に関する試験（生殖発生毒性試験）が行政的に要求されるようになった。

1. ヒトの先天異常研究に何故動物実験が必要か

先天異常の研究材料はヒトが最も豊富であり、またわれわれの究極の目的はヒトの先天異常の予防にある。それにもかかわらず、先天異常の研究における動物実験の意義は大きい。

先天異常研究における動物実験の必要性を表1に示す。第一に、倫理上の問題などによりヒトにおける調査には限界があることがあげられる。第二には、ヒトは異質な集団であり、またヒトの環境は多様であり多くの制御しにくい因子が存在しており、詳細な分析的研究が困難である。第三には、ヒトの寿命は長く、子孫の数もきわめて少ない。これに対し、実験動物では、実験条件を制御して単純化し、また種々の実験条件下で試験を行ないうること、また妊娠期間の短い、世代交代の早い、一腹児数の大きい、しかも飼育が簡単な動物種を選ぶことができ、先天異常の発生の原理を広く深く探求することができる。ただし、近年は動物福祉や動物権利など生命倫理の立場から、動物実験の制限や代替が論議されている。

動物における先天異常研究の領域は、先天異常の頻度の調査、成因とくに発生毒性因子の判定、発生過程と作用機序の研究などに大分される（表1）。

2. 先天異常の頻度の研究

野生動物では、繁殖数の減少という面で環境因子の関与の疑いを提起することがあるが、母数の把握が困難である。家畜は、広く野外で飼育され種々の環境因子に暴露されるとともに、一方、実験室内で発生毒性実験を行うという、野生動物と実験動物の2面性、中間的な意義がある。ただし、最近、家畜も工場内生産に近い繁殖がなされ、先天異常は早く人工淘汰され、調査が困難になっている。実験動物は、人為的によく制御された条件下で飼育され、外からの環境要因により先天異常の頻度があまり変化しないように管理されている。また、無処置あるいは溶媒対照群でのいわゆる自然発生の先天異常の頻度が常に調査され、発生毒性試験の評価の際の背景データとして極めて重要視されている。なお、野生動物を餌付けすることがかなりなされるようになったが、これら半野生動物においては、人間と関連の深い環境下に生存して、また観察がより綿密になされうるなどの点が注目される。これら動物での先天異常の頻度の上昇の観察から、それにかかわる環境因子の検索が行われた例について考察する。

a. ヒツジの単眼とサイクロパミン

1950年代に米国アイダホ州のヒツジの放牧で、単眼が数%にも見出され、種々の調査の結果、牧草の *Veratrum californicum*（ユリ科シュロソウ属、ぼけいそうの仲間）が疑われた。そこでその草を妊娠ヒツジに投与する試験が行なわれ、単眼の誘発が確認された。ついで、その草からサイクロパミン（cyclopamine, 単眼をきたすアミンの意味）というコレステロール類似のアルカロイドが分離され、これはヒツジ、ウサギなどで催奇形性が確認された。なお、最近この *veratrum* アルカロイドが中軸形成に重要な sonic hedgehog (Shh) のシグナル導入を阻害することが報告され^{2, 3}、またヒトでもこの Shh 遺伝子の突然変異が単眼を含む全前脳症候群をきたすことが知られている⁴。このことは、ヒツジの単眼がヒトの先天異常解明に直結していることを示している。

b. ニホンザルの四肢奇形

ニホンザル（*Macaca fuscata*）は、わが国のみにも生息する旧世界ザルマカク属のサルである。1955年頃よりいわゆる餌付け群で四肢奇形が注目され始め、1970年には観察した餌付け19群での出生総数466例中42例9.0%にも児に奇形が認められた。その後奇形児の頻度は減少しているが、

群によってはなおかなりの高率の異常を示している。とくに淡路島では、1990-95年でも出生児の奇形率が6-26%にも及んでいる⁵。このことが社会的にも大きく注目されているのは、ヒトと近縁の動物であること、野生群や動物園飼育群には少ないこと、すなわちヒトとの接触の多い餌付け群に多発すること、また裂手、短指など減形成異常を主徴とするものであることによる。

この奇形の実体調査と原因究明については、文部省科学研究費補助金総合研究（班長：四手井綱英）の調査⁶がある。環境要因としては、農薬、金属、ウイルス抗体の調査、さらに生大豆を用いた催奇形実験を行なっているが、特定の原因を指摘するには到っていない。現在のところ、いわゆる多因子遺伝のみが残されており、高い遺伝素因に若干の環境因子がかなり密接に関与している可能性が考えられる。いずれにしても、本問題はヒトの先天異常のモニタリングで警報後の調査方法について大きな示唆を与えるものであろう。

c. 内分泌攪乱物質などと野生動物における生殖発生障害

近年内分泌攪乱物質の野生動物に対する影響、とくに生殖発生障害が注目されている。無脊椎動物（例えば海産巻貝のトリブチルスズによる雄性化）から、脊椎動物哺乳類まで多くの動物種で異常が観察されている⁷。そのなかには旧く1940年代始め、オーストラリアにおけるヒツジの死産の増加が、牧草として導入したクローバ中の植物性エストロゲンフォルモノネティンによるとされたことも含まれている⁸。1995年8月、米国ミネソタ州の生徒が多肢のカエルを見付けたことから、北部大平原で四肢奇形を主徴とする野生カエルの多発が注目された。国立環境保健研究所で討論され、原因として寄生虫、紫外線や化学物質（レチノイドや農薬）が疑われたが、決定的とはならなかった⁹。これら野生動物における所見は、常にヒトとの関連について注意深く検討されなければならない。

3. ヒトの先天異常成因探求のための動物実験

遺伝による先天異常の研究には、動物では特にマウスについて多くのミュタントが知られている¹⁰。染色体異常モデルの開発はヒトより遅れているが、マウスではトリソミー19など注目すべき系も見出されている¹¹。近年トランスジェニックマウスが先天異常研究に有用な手段となってきた^{12, 13}。例えば、目の奇形¹⁴や肺奇形¹⁵モデルの作成や、Ah受容体を欠くマウスを作成してその系ではTCDDの催奇形性が示されない¹⁶などの報告がある。多因子遺伝によるものも、例えば唇裂を比較的高頻度で生じるCL/Frマウスなど有用なモデルが若干存在する。

しかしながら、動物実験が最も多くなされるのは環境因子の発生毒性検索の目的である。これには、未検査の環境因子（その大部分は新規に作成された化学物質）の安全性を検索するための試験で、もし動物で陽性であり、その成績のヒトへの外挿の妥当性が強い場合には、環境への放出あるいは市場への流入を禁止あるいは阻止しようとするものである（表1）。すなわちスクリーニング的意義を持つ。一方、ヒトで発生毒性が疑われた環境因子について、綿密な動物試験を行い、ヒトでの情報を是認あるいは否定しようとすることにも多く用いられる。

4. ヒトと動物実験における催奇形性の相関

環境因子のヒトに対する発生毒性を動物で試験する基本的根拠は、ヒトで発生毒性が確立された環境因子はすべて、何らかの動物種で発生毒性が示されていることである（表2）。X線、アルコール、フェニトインなどのように、因子によってはすべての実験動物で陽性のものもあり、また、サリドマイドのように動物種差の著しいものもある。一方、いかなる化学物質も適切な量を適切な時期にある動物種に与えるとその発生を阻害しようというKarnofskyの法則¹⁷が提唱されている。Schardein¹⁸の莫大な資料によると、3301の因子についての催奇形実験公表文献の分析で、236（7.1%）は明らかに催奇形性があり、693（21.0%）は恐らく催奇形性があり、294（8.9%）は催奇形性がある可能性があり、2078（63.0%）は催奇形性はないと判定されている。しかし、催奇形性以外の発生毒性を呈しうる可能性もあり、現在では母体毒性が顕著に出現するような高用量は通常用いられない、また器官形成期全体を通じて投与する実験では催奇形性が覆い隠されてしまう可能性が高いことなどを考慮すると、公表文献で催奇形性物質が30%近くあることは、ヒトへの外挿を検討する上で大きな問題となる。

アメリカのFDA¹⁹の調査では、ヒトで先天異常をおこしたと報告された（確証あるいは疑われた）化合物（物質名は述べられていない）の文献調査で、1つを除いてすべてが少なくとも一種の動物で陽性であった（表3）。例外とはヒトにおいて耳毒性を示すもので、動物の末期観察では検索できないものである。しかも、80%以上に複数の動物種で陽性であったとしている。これを動物種別に見ると、マウスで85%、ラットで80%、ウサギで60%で、サルではわずかに30%であった。この調査の結論は、あらゆる化学物質の発生毒性検索に常に適用する普遍的な1つの動物種はない、つまりある1動物種、例えばマウスだけでは偽陰性を生じうるということである。しかし動物の催奇形性試験で陽性の場合、少なくともヒトでも陽性の可能性の

あることを示唆するものとして受け入れられるべきである。一方、ヒトでは催奇形性はないとされている165の環境要因で、動物でも陽性の反応を示さない、すなわち正しく陰性であった頻度を見てみると、マウスは極めて低く35%、サルでは80%であった。すなわち、マウスは、ヒトと同様に感受性は高く、ヒトで陽性の場合の相関の程度も強いが、ヒトで陰性の場合にも言い過ぎ（偽陽性）が多いこと、一方、サルはヒトの催奇形因子で1/3位しか陽性を示さず、感受性は低い、サルで陰性であればヒトでの安全性は高いとみなしうる。さらに、この38の化合物はヒトで疑われているが実証されていないものを多く含んでいるためと考えられる。これら感受性と特異性の2つの面でよくバランスがとれているのがウサギである。催奇形試験の非げっ歯類としてウサギの位置付けを再確認する一資料となろう。しかし、表3で最も重要なことは、ヒトで非催奇形因子とされているものがすべての動物種で陰性のものは28%しかないことである。すなわち動物試験で陽性の場合ヒトでどうであるかは、即断するのではなく、後述の機序の検討、薬物動態学的考察など慎重な考察が必要である。また、この調査は現在の試験法とヒトでの調査では、少数の動物種では偽陰性（ヒトでの発生障害の予測の見過ごし）も、反対に偽陽性（ヒトでは発生障害を来さないものを見誤る）も起こりうることを示唆している。ここでより問題なので偽陽性であるが、疑わしいものはなるべく多種の動物種で試験を行うこととヒトでの綿密な調査が肝要であろう。

5. 動物とヒトでの発生毒性試験報告の時間的關係

現在ヒトでの発生毒性が確かとされたものは、ほとんどすべて鋭い観察眼を持った臨床家の研究が端緒になったもので、動物実験が先に出されたものはむしろ少数である。そのうち、X線、男性ホルモン、黄体ホルモンやアルコールは、ヒトでの報告よりもずっと以前に動物で発生毒性を示す報告がなされたが、久しく埋もれたままでヒトとの関連の可能性は全く考慮されず、動物実験とは事実上無関係にヒトにおける調査がなされた。例えば男性ホルモンと女性偽半陰陽との関連は、1936年にモルモットで報告され、ついでラット、マウスで1937年に、さらにアカゲザルで1943年に報告されていたにもかかわらず、臨床家の注意を引かず、ヒトで発見されたのは1953年のことである。近年ビタミンA類似薬（レチノイド）のイソトレチノインは、動物で強い催奇形性を呈することから妊婦には禁忌として、重症にきびの薬として米国で販売が許可されたが、適応症がにきびのため若い女性の使用が多く、水頭、小耳などの奇形が相当数認められた。さらに、同様

なレチノイドのエトレチナートが乾癬症などを適用として、厳重な管理のもとにドイツについてわが国でも許可された。本薬も動物で強い催奇形性が証明されているが、妊婦に使用されて奇形児の出産報告がドイツでなされている。わが国では未だヒトにおける奇形の報告はないが、十分な監視が必要である。

動物で催奇形性が陽性であったため、ヒトでより綿密な調査がなされ、ヒトで奇形を示唆する成績が得られている例として、炭酸リチウムがある。本薬は、両生類に奇形をきたすことが旧くから知られていたが、哺乳動物でも催奇形性が示されることおよびその病に用いられ患者の把握が容易なことから、リチウム児登録という妊婦登録がなされた。その結果、心奇形とくにEbstein 奇形という稀な型の異常が多いのではないかとされている。ただし、その危険性は極めて低い。このように、動物実験で陽性の場合、それがヒトにあてはまる可能性が高いと考えられた時は、綿密なヒトでの調査がされるべきであろう。

抗けいれん薬のバルプロ酸は、開発時の動物試験で催奇形性が認められた。また、フェニトインやトリメタジオンのような抗けいれん剤を妊娠中に服用して妊婦からは、正常妊婦や抗けいれん剤を服用していない妊婦にくらべて、奇形児を出産する頻度が2～3倍高いことが知られている。これらのことから、わが国でもてんかん女性について疫学調査がなされたが、バルプロ酸が発売後間もないこともあって、同剤と奇形との相関を示す成績は得られなかった。その後、先天異常国際モニタリングの分担国であるフランスにおいて、二分脊椎とバルプロ酸との相関を示す成績が得られた。

6. ヒトで発生毒性が一時疑われた場合の動物実験の役割

ヒトの症例報告あるいは疫学的研究で催奇形性が最初疑われ、最終的にはヒトの疫学調査ないし資料の検討で否定された事件が若干ある。そのうち興味ある事例を表4に示した。このような場合動物実験はどれほど参照されたか、またどのような役割を演じたかについて考察する。

抗ヒスタミン剤メクリジンおよび類似化合物は、1961年のサリドマイド事件の後で、同じようにつわりにも用いられることから、奇形との相関を示唆する症例報告や警告がなされた。これに続いてなされた動物実験では、ラットで（後にマウスやフェレットでも）口蓋裂をきたすことが知られ、慎重な討議がなされたが、その後のヒトの調査はすべて陰性であった。この場合、動物試験は極めて科学的に施行され、代謝や用量などが検討されたが、ヒトにおける多くの信頼しうる成績があり、全体として冷静に科学的討議が

なされたために、誤った社会的問題とはならなかった。

これに対し次の腐敗バレイショは、社会的な問題を惹起した。英国の Renwick²⁰が1972年に、各地域の無脳の発生頻度と冬越しの古いバレイショの消費量との相関から、神経管奇形（無脳と二分脊椎）の95%は腐敗バレイショを食べなければ予防するという大胆な仮説を発表した。同じ年に、新世界サルのマーモセットを用い、サリドマイドで典型的な奇形が、また腐敗バレイショでも児の頭蓋欠損を生じせしめたとの発表があり、大きな話題となった。その後マーモセットの追試では決定的な陽性所見は見られず、他の動物種での試験も凡ね陰性であった。この事件は、神経管奇形児を生んだ母親が次回の妊娠開始前よりバレイショを摂取しないようにした介入実験で、神経管奇形児出産の再現率が、バレイショを自由に摂取した群のそれと同様であったことから、最終的な幕を閉じた。この事件は、ヒトでの問題提起の方法と、それに引き続いた不完全な動物試験とがからみ合って、混乱を招いたものと言えよう。

第3のイミプラミンは、サリドマイドの催奇形性を初めて指摘した学者の一人であるオーストラリアの McBride が、イミプラミンによるとする四肢奇形の症例報告を行い、これがマスコミを通じて1日以内に世界中に広がった。本薬はウサギでは母体毒性をきたすような高用量で陽性の成績が示されていたが、マウスやラットでは陰性であることが知られていた。この事件は、奇形児出産のサーベイランスデータでイミプラミン服用との相関を支持する所見が見られないなど、世界各国のデータ分析から、極めて短日数の間に陰性の判定がなされた。

スプレー接着剤のエピソードには、動物実験は関与していない。これは医薬品と違って問題の生じたときには動物試験のデータがなかったためである。その後ハムスターで陽性の成績が発表された。

黄体ホルモンは、男性化作用以外に、心・四肢奇形と相関するという疫学的調査が報告された。ほとんどの動物実験は否定的であり、その後の疫学調査も否定的報告が多かった。一方、黄体ホルモンは流産阻止には無効とされ、妊娠中の使用がなくなって、この問題は自然消滅した形となった。

ベンデクチン Bendectin[®]は米国 Merrell-Daw 社発売の妊娠悪阻を適応とする配合剤で、1956年に販売されたときは、鎮痙薬ジシクロミン dicyclomine、抗ヒスタミン薬ドキシラミン doxylamine、ビタミンB₆ pyridoxine を含有していたが、米国では1976年より後2者の合剤となっている。英国ではなお3剤の合剤でデベンドックス Debendox[®]として発売されている。わが国ではドキシラミンは販売されていない。ベンデクチンと四肢減形成な

どの奇形との相関を示唆する症例報告は1969年頃より数例見られ、またそれを否定する疫学調査も発表されていた。しかし、1980年に米国で四肢減形成奇形児の両親が1,200万ドルの賠償を求めた訴訟を開始し、相手会社が米国でサリドマイドを販売しようとした Merrell-Dow 社であったことから大きな反響を呼んだ。

ジシクロミン、ドキシラミンおよびドキシラミンとピリドキシンの配合薬はラットとウサギで催奇形性を示していない。ところが1981年西ドイツでのラットの試験においてベンデクチン投与で横隔膜ヘルニアが見られたこと、また、カリフォルニアでカニクイザルの少数例での実験で心室中隔欠損がみられたとする報告や、さらに米国共同研究などヒトの調査の再分析でも横隔膜ヘルニアの頻度が高いことを示唆する資料もあることなどが1982年6月25日報道され、また米国市民団体からベンデクチンを市場から排除せよとの請願が同日なされたこともあり、社会問題となり、100以上の訴訟がなされた。疫学調査はほとんどすべて否定的であった。コホート研究は13報あり、服用者16,345名で比較危険率は0.95 (0.62-1.45) であり、症例対照研究は14報で、3報のみ部分的に有意差を認めた²¹。しかしながら、会社は経済的理由で1983年6月販売を中止した。なお、サルの実験は追試で心奇形やその他の奇形は認められなかった。

膾炙精子剤はノノキシノール9などの界面活性剤を主成分とするものであるが、1981年に米国で受精前の使用と児の先天異常（四肢減形成、尿道下裂、先天腫瘍、染色体異常症候群）との相関が示唆された。染色体異常に関連して、受精前に1年以上使用した婦人から致死的トリソミー流産が多いという報告もなされた。しかし、より綿密な調査では相関を否定する報告が多い。このように受精前ないし妊娠直後に使用されたとき、その作用は精子、卵子、受精卵、胚子などに変異原性、催奇形性を含む種々の異なる作用を呈する可能性があり、ヒトの調査はもちろん、機序解明のための動物試験も極めて困難が伴うであろう。通常の器官形成期投与試験では陰性である。

なお、表4には示していないが、近年におけるヒトの催奇形性の疑いのエピソードとして農薬ベノミルと眼奇形の相関がある。これはカーバメイト系の殺菌剤で、わが国でも使用されている。また、環境庁の67の内分泌攪乱物質候補の1つでもある。1993年1月17日英国の新聞に無眼児の多発が報告され、この際1991年ラットでベノミルが眼異常を誘発した動物実験の報告が参照された。筆者の調査では、1975-98年に発生毒性試験は9報あり、うち5報は同一研究者グループで無（小）眼球の誘発を主張している。しかし、一般に不十分な報告である。1994-96年に行われた

大規模な疫学調査は否定的で、無小眼の判定基準が問題にされた。それにもかかわらず、1996年6月に米国で400万ドル賠償の判決がなされた。数年前オーストラリアで使用禁止になっており、同国での無小眼の頻度の変化が注目される²²。

これらを総括してみると、全体として、動物実験は問題提起時に十分な資料が集積していなかったこともあり、大きな役割を演じていない。反対に不十分な動物実験の成績が、綿密な考察なしに参照され、かえって混乱を招いた例が少なくないことは反省する必要がある。また、ヒトで問題とされた以後になされた試験は、大部分が陰性であり、ヒトにおける否定的な結論を引き出すのにかなり参考にされたものと考えられる。しかしながら、動物実験が決定的な役割を演じたものはない。

7. 発生機序と発生過程の研究

発生機序と発生過程の研究は、動物実験のヒトへの適用を定性的なものから定量的考察に導くものとして重要であり、今後益々発展することが期待されている。ヒトへの外挿には、ヒトの動物の作用部位組織の感受性および作用部位での用量（医薬品のような化学物質にあっては最終作用物質の濃度の時間的経緯：薬物動態学的研究）である。そして、動物での作用機序がヒトでも同じであるかという検索であろう。これらの研究には、ヒト胚細胞由来の細胞を *in vitro* で利用しうる比較研究の可能性もある。ヒトで疑われた発生毒性因子が、動物で強い発生毒性を示すとき、以上のような考察が極めて重要である。その他、先天異常成立の予防や子宮内治療の研究の基礎資料ともなる。

近年遺伝学の進歩とともに、正常発生および先天異常の発現に関与する遺伝子の同定が急速に発展している。遺伝子の形質発現に及ぼす環境因子の役割についての発生生物学的研究が先天異常学で最重要の課題になりつつある。また、先天異常の発生過程におけるアポトーシスの重要性が益々認識されつつある。

8. ヒトの先天異常とそれに関する動物実験に関する最近の話題

a. サリドマイド *thalidomide* の復活

サリドマイドは1961年暮にアザラシ肢症など四肢減形成を主徴とするサリドマイド症候群をきたすことが報告され、1962年までに世界の市場から回収された。ところが、米国FDAは1998年7月16日ハンセン病結節性紅斑の適応で、Celgene社に販売を承認した（商品名 *Thalomid*）。こ

れにはイソトレチノイン以上の厳重な管理、すなわち医師・薬剤師登録、患者教育、インフォームドコンセントと登録が要求され、投与前と投与中の妊娠テストと2種の避妊法が強制される。管理のなされていない南米では、ハンセン病治療で1965年以後34名のサリドマイド児が出生している。一方、サリドマイドは種々の疾患（AIDS、骨髄移植など）に免疫抑制剤として試用され、今後適応の拡大が予想される。

サリドマイドはヒト、原猿類を除くサル類およびウサギには感受性があるが、ラットやマウスでは殆どない。そのため、機序について色々の仮説がなされているが、決定的なものはない^{23, 24}。サリドマイド胎芽病発見者の一人 McBride が1994年にサリドマイドは変異原である²⁵、また、1997年にDNAに作用するという論文²⁶を発表して論議をかもしたが、サリドマイドの変異原性はないものとされている。近年、サイトカイン合成阻害によりTNF- α を介して作用する²⁷、肢芽間葉の増殖阻害による進行帯の変化²⁸、活性酸素種（ROS）を生じ酸化的DNAに損傷する^{29, 30}、*TBX5*の突然変異³¹などが提唱されているが、反論も強い^{32, 33}。感受性の高い霊長類での綿密な検討が期待される。

b. 葉酸添加による神経管奇形の予防

1980-81年に受精前後に葉酸を投与する小規模な初期介入試験で、神経管奇形予防について有効性が示唆された^{34, 35}。この試みの根拠は、低社会階層の女性は神経管奇形の頻度が高く、血中葉酸値が低いこと、神経管奇形児を出産した褥婦は葉酸代謝異常が多いこと、および強力な葉酸拮抗薬アミノプテリンは催奇形性が強いことであり、直接仮説を支持する動物実験はなかった。その後、1991-95年に発表されたよくコントロールされた比較実験で、神経管奇形の50-75%が予防できると報告され³⁶⁻³⁸、各国で葉酸強化の行政指導がなされた。例えば、米国では1992年に、葉酸0.4mg/日を妊娠前1ヶ月から妊娠12週まで強化することが薦められた。また、神経管奇形以外でも予防効果が発表されている。例えば、先天性心疾患、尿路奇形、口唇口蓋裂、四肢奇形、小児脳腫瘍などで、さらに成人疾患（心疾患、末梢血管障害、大腸がん、子宮頸がんなど）の予防にも有効であるとの主張もある。

神経管奇形予防の機序は不明であるが、神経管奇形は5,10-methylenetetrahydrofolate reductase の突然変異による二次的homocysteine増加によるもので、葉酸はそれを阻害するとの説がある³⁹。葉酸を添加して神経管奇形を予防ないし軽減しようとする動物実験は否定的なものが多かったが、最近注目すべき報告がある（表5）。すなわち、ビタミン類を投与してコーチゾンによ

る口蓋裂などの発生を減少しようとする報告は1950年代に既にあったが、あまり注目されなかった。著者も thio-TEPA による種々の奇形が複合ビタミン剤（ただし葉酸は含有されていない）の投与によって軽減されることを報告した。葉酸添加によるヒトの神経管奇形予防の成績が発表されてからあわてて追試の形で動物実験がなされた。催奇形物質で誘発した神経管奇形ではまだ成功していないが、最近あるマウスミュータントの神経管奇形で葉酸の予防効果が証明された。神経管奇形のマウスミュータントは多く知られており⁵⁰、神経管奇形を誘発する催奇形因子も多いことから、葉酸などの添加による神経管奇形の予防効果の動物実験が機序解明に貢献することが期待される。

9. 化学物質の生殖発生毒性検索関門としての動物試験

化学物質の生殖発生毒性を検索するチェックポイントとしては4つの関門がある。まず第一には、その化学構造あるいはその薬理学的な特性である。例えば、サリドマイドの催奇形性に関し、基本的にはフタルイミド部分が催奇形性の主要部分であり、グルタルイミド部分はその増強要素である。また、ビタミンA関連物質レチノイドの3つの分子構造部分はそれぞれが催奇形性の強弱に関連する。このような構造活性相関は今後急速に発展することが期待される⁵¹⁻⁵⁶。その次は *in vitro* の試験⁵⁷⁻⁶⁰で、これには哺乳類の細胞、組織、器官または全胚培養 *whole embryo culture* など、ほかに非哺乳類を含む様々な *in vitro* 系でのスクリーニングでチェックする段階がある（表6）。非哺乳類の中では、年間生殖が可能なアフリカツメガエルを用いる系 FETA X (frog embryo teratogenesis assay-Xenopus) が有望である⁶¹。また、*in vitro* 系は機序検索にも有用である。1と2の関門は、近年動物実験代替法として注目されている。三番目に、現在市販以前の最終チェックポイントである *in vivo* の哺乳類の試験がある。しかし第四として、最終的なチェックポイントはあくまでヒトにおける調査である。

1961年のサリドマイド事件以後、化学物質の生殖発生毒性を哺乳類で検索する行政的規制がなされている。各国それぞれの基準で出されていたが、国際調和の気運が高まり、医薬品については、1993年のICH会議で同意され、さらに雄の受胎能評価に関する追加が1995年に同意され、わが国でも1997年4月14日薬審第316号「医薬品の生殖発生毒性試験に係るガイドラインの改定について」として通知された。化学物質については、OECDのガイドラインがある（出生前発生毒性試験と二世帯生殖毒性試験は現在改定中）。しかし、ガイドラインはあくまで指針であり、試験の計画、

施行と評価は、対象化学物質の特性を十分に配慮して、研究者自身が工夫し、考案をなすべきである。評価に関する参考試験も多い⁶²⁻⁶⁴が、ここではヒトへの外挿を最終目標とする評価の基本¹を表7に示した。Brent⁶⁵は、ヒトの催奇形因子に関する動物モデルは、薬物動態的にヒトと同様なレベルの暴露で同様な異常をきたし、ヒトの暴露量の範囲で発生毒性の頻度と強度に用量-効果関係が示されること、またその効果は発生学と先天異常学の基本原理に合致し、生物学の原則や常識に矛盾しないことが重要であると述べている。

近年動物福祉や権利の面から、実験動物とくに哺乳類での試験を制限しようとする動きがある。生殖発生を含む毒性学の領域でも動物の負荷とヒトの利益の比をどう生命倫理の立場から判断するかは難しい問題である^{66, 67}。不必要な試験を行うことはもちろんすべきでない。しかし、動物試験を行うべきだと判断したときは、十分に計画された試験を注意深く施行し、綿密な考察をなすべきである。不十分で曖昧な試験結果は、それを肯定、否定するにも倍以上の無駄な努力が必要であるからである。

まとめ

1. 動物における先天異常の頻度の検索は、常にヒトとの関連性を考慮してなされるべきである。
2. 動物試験で発生毒性が強く、かつヒトへの外挿の妥当性が高いと判断された環境要因は、環境への導入を排除または制限されるべきである。
3. 動物試験は十分に計画され、慎重に施行され、また綿密に考慮して報告されるべきである。質の低い試験はかえって評価に有害である。
4. 哺乳動物の *in vivo* 生殖発生毒性試験に加えて、*in vitro* 試験系の発展が望まれる。
5. 動物実験はあくまで参考資料であり、最終的決定権はない。ヒトの先天異常とくに環境因子による発生毒性をより早くかつ正しく判定するには、ヒトにおける調査とくに系統的な疫学調査が必要である。

謝辞

1984年3月の第1回研究会で behavioral teratology について特別講演をさせて頂いた。2000年3月近畿大学定年を迎えるに当たり、第62回研究会で再び特別講演の機会を与えて頂いた芹川会長に深謝すると共に、関西実験動物研究会の益々の発展を祈念する。

文献

1. 谷村孝 (1992) 発生毒性. 地人書館, 東京.
2. Cooper, M.K., Porter, J.A., Young, K.E. and Beachy, P.A. (1998) Teratogen-mediated inhibition of target tissue response to *Shh* signaling. *Science*, 280 : 1603-1607.
3. Incardona, J.P., Gaffield, W., Kapur, R.P. and Roelink, H. (1998) The teratogenic *Veratrum* alkaloid cyclopropane inhibits sonic hedgehog signal transduction. *Development*, 125 : 3553-3562.
4. Roessler, E., Belloni, E., Gaudenz, K., Jay, P., Berta, P., Scherer, S.W., Tsui, L.-C. and Muenke, M. (1996) Mutations in the human *Sonic Hedgehog* gene cause holoprosencephaly. *Nat. Genet.*, 14 : 357-360.
5. Nakamichi, M., Nobuhara, H., Nobuhara, T., Nakahashi, M. and Nigi, H. (1997) Birth rate and mortality rate of infants with congenital malformations of the limbs in the Awajishima free-ranging group of Japanese monkeys (*Macaca fuscata*). *Am. J. Primatol.*, 42 : 225-234.
6. 四手井綱英 (1984) ニホンザルの奇形に関する総合的研究—奇形の実態調査と原因究明—. 昭和56—58年度科学研究費補助金(総合研究A)研究成果報告書.
7. 井口泰泉 (1998) 野生動物の生殖異常. 第112回日本医学界シンポジウム集 内分泌攪乱物質(環境ホルモン)と健康障害, 日本医学会, 東京, 6-11.
8. シーア・コルボーン, ダイアン・ダマノスキ, ジョン・ピーターソン・マイヤーズ (長尾力訳) (1997) 奪われし未来. 翔泳社, 東京.
9. Kaiser, J. (1997) Deformed frogs leap into spotlight at health workshop. *Science*, 278 : 2051- 2052.

10. Darling, S. (1996) Mice as models of human developmental disorders: natural and artificial mutants. *Curr. Opin. Genet. Dev.*, 6 : 289-294.
11. Lorke, D.E. (1994) Developmental characteristics of trisomy 19 mice. *Acta Anat.*, 150 : 159-169.
12. Otani, H. and Tanaka, O. (1992) Transgenic mice in the search for development-related genes: application for the studies of congenital anomalies. *Cong. Anom.*, 32 : 279-291.
13. Iannaccone, P.M. and Scarpelli, D.G. (1993) Exploring pathogenetic mechanisms using transgenic animals. *Ann. Med.*, 25 : 131-138.
14. Götz, W. (1995) Transgenic models for eye malformations. *Ophthalmic Genet.*, 16 : 85-104.
15. Simonet, W.S., DeRose, M.L., Bucay, N., Nguyen, H.Q., Wert, S.E., Zhou, L., Ulich, T.R., Thomason, A., Danilenko, D.M. and Whitsett, J.A. (1995) Pulmonary malformation in transgenic mice expressing human keratinocyte growth factor in the lung. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.*, 92 : 12461-12465.
16. Peters, J.M., Narotsky, M.G., Elizondo, G., Fernandez-Salguero, P M., Gonzalez, F.J. and Abbott, B.D. (1999) Amelioration of TCDD-induced teratogenesis in aryl hydrocarbon receptor (AhR)-null mice. *Toxicol. Sci.*, 47 : 86-92.
17. Karnofsky, D.A. (1963) Mechanisms of action of certain growth-inhibiting drugs. *Teratology*, (Wilson, J.G. and Warkany, J. eds.), The University of Chicago Press, Chicago and London, 185-213.
18. Schardein, J.L. (1993) Chemically induced birth defects. 2nd ed. Marcel Dekker, Inc., New York.
19. Food and Drug Administration (1980) Caffeine. Delection of GRAS status, proposed declaration that no prior sanction exists, and use on an interim basis

- pending additional study. Federal Register., 45 : 69817-69838.
20. Renwick, J.H. (1972) Spina bifida, anencephaly, and potato blight. *Lancet*, 2 : 967-968.
 21. Brent, R.L. (1995) Bendectin: review of the medical literature of a comprehensively studied human nonteratogen and the most prevalent tortogen-litigen. *Reprod. Toxicol.*, 9 : 337-349.
 22. Willshaw, H.E. (1998) How dangerous a world is it? *Br. J. Ophthalmol.*, 52 : 6-7.
 23. Neubert, R. and Neubert, D. (1997) Peculiarities and possible mode of action of thalidomide. *Handbook Exp. Pharmacol.*, 124 : 41-119.
 24. Juchau, M.R. (1997) Chemical teratogenesis in humans: biochemical and molecular mechanisms. *Prog. Drug. Res.*, 49 : 25-91.
 25. McBride, W.G. (1994) Thalidomide may be a mutagen. *BMJ.*, 308 : 1635-1636.
 26. Huang, P.H.T. and McBride W.G. (1997) Interaction of [glutarimide-2-¹⁴C] -thalidomide with rat embryonic DNA in vivo. *Teratog. Carcinog. Mutagen.*, 17 : 1-5.
 27. Argilés, J.M., Carbó, N. and López-Soriano, F.J. (1998) Was tumour necrosis factor- α responsible for the fetal malformations associated with thalidomide in the early 1960s? *Med. Hypotheses*, 50 : 313-318.
 28. Tabin, C.J. (1998) A developmental model for thalidomide defects. *Nature*, 396 : 322-323.
 29. Wells, P.G., Kim, P.M., Laposa, R.R., Nicol, C.J., Parman T. and Winn L.M. (1997) Oxidative damage in chemical teratogenesis. *Mutat. Res.*, 396 : 65-78.

30. Parman, T., Wiley, M.J. and Wells, P.G. (1999) Free radical-mediated oxidative DNA damage in the mechanism of thalidomide teratogenicity. *Nat. Med.*, 5 : 582-585.
31. Guenzler, V. (1999) Mechanisms of thalidomide teratogenicity. *Nat. Med.*, 5 : 853.
32. Neubert, D. (1997) Never-ending tales of the mode of the teratogenic action of thalidomide. *Teratog. Carcinog. Mutagen.*, 17 : i - ii .
33. Neubert, R., Merker, H.-J. and Neubert, D. (1999) Developmental model for thalidomide action. *Nature*, 400 : 419-420.
34. Smithells, R.W. (1980) Possible prevention of neural-tube defects by periconceptional vitamin supplementation. *Lancet*, 1 : 339-340.
35. Laurence, K.M., James, N., Miller, M.H., Tennant, G.B. and Campbell, H. (1981) Double-blind randomised controlled trial of folate treatment before conception to prevent recurrence of neural-tube defects. *BMJ.*, 282 : 1509-1511.
36. MRC Vitamin Study Research Group. (1991) Prevention of neural tube defects: results of the MRC vitamin study. *Lancet*, 338 : 132-137.
37. Czeizel, A.E. and Dudás, I. (1992) Prevention of the first occurrence of neural tube defects by periconceptional vitamin supplementation. *N. Engl. J. Med.*, 327 : 1832-1835.
38. Crandall, B.F., Corson, V.L., Goldberg, J.D., Knight, G. and Salafsky, I.S. (1995) Folic acid and pregnancy. *Am. J. Med. Genet.*, 55 : 134-135.
39. Eskes, T.K.A.B. (1998) Open or closed. *Eur. J. Obstet. Gynecol. Reprod. Biol.*, 78 : 169-177.
40. Strean, L.P. and Peer, L.A. (1956) Stress as an ethiologic factor in the

development of cleft palate. *Plast. Reconstr. Surg.*, 18 : 1-8.

41. Peer, L.A., Bryan, W.H., Streat, L.P., Walker, J. C., Jr., Bernhard, W.G. and Peck, G.C. (1958) Induction of cleft palate in mice by cortisone and its reduction by vitamins. *J. Int. Coll. Surg.*, 30 : 249-254.
42. Tanimura, T. (1968) Modification of the teratogenic effects of certain antineoplastic agents by combined treatment with vitamins. *Okajimas Folia Anat. Jpn.*, 44 : 373-382.
43. Seller, M.J. and Adinolfi, M. (1981) The curly-tail mouse: an experimental model for human neural tube defects. *Life Sci.*, 29 : 1607-1615.
44. Greene, N.D.E. and Copp, A.J. (1997) Inositol prevents folate-resistant neural tube defects in the mouse. *Nat. Med.*, 3 : 60-66.
45. Essien, F.B. and Wannberg, S.L. (1993) Methionine but not folinic acid or vitamin B-12 alters the frequency of neural tube defects in *Axd* mutant mice. *J. Nutr.*, 123 : 27-34.
46. Zhao, Q., Behringer, R.R., and de Crombrughe, B. (1996) Prenatal folic acid treatment suppresses acrania and meroanencephaly in mice mutant for the *Cart1* homeobox gene. *Nat. Genet.*, 13 : 275-283.
47. Fleming, A. and Copp, A.J. (1998) Embryonic folate metabolism and mouse neural tube defects. *Science*, 280 : 2107-2109.
48. Graham, J.M. and Ferm, V.H. (1985) Heat- and alcohol-induced neural tube defects; interactions with folate in a golden hamster model. *Pediatr. Res.*, 19 : 247-251.
49. Hansen, D.K. and Grafton, T.F. (1991) Lack of attenuation of valproic acid-induced effects by folinic acid in rat embryos *in vitro*. *Teratology*, 43 : 575-582.

50. Harris, M.J. and Juriloff, D.M. (1997) Genetic landmarks for defects in mouse neural tube closure. *Teratology*, 56 : 177-187.
51. Brown, L.P., Lewis, D.F.V., Flint, O.P., Orton, T.C. and Gibson, G.G. (1989) Teratogenicity of phenylhydantoins in an in vitro systems: molecular orbital-generated quantitative structure-toxicity relationships. *Xenobiotica*, 19 : 1471-1481.
52. Di Carlo, F.J. (1990) Structure-activity relationships (SAR) and structure-metabolism relationships (SMR) affecting the teratogenicity of carboxylic acids. *Drug. Metab. Rev.*, 22 : 411-449.
53. Frierson, M.R., Mielach, F.A. and Kochhar, D.M. (1990) Computer-automated structure evaluation (CASE) of retinoids in teratogenesis bioassays. *Fundam. Appl. Toxicol.*, 14 : 408-428.
54. Klopman, G. and Dimayuga, M.L. (1990) Computer automated structure evaluation (CASE) of the teratogenicity of retinoids with the aid of a novel geometry index. *J. Comput. Aided Mol. Des.*, 4 : 117-130.
55. Willhite, C.C., Jurek, A., Sharma, R.P. and Dawson, M.I. (1992) Structure-affinity relationships of retinoids with embryonic cellular retionic acid-binding protein. *Toxicol. Appl. Pharmacol.*, 112 : 144-153.
56. Ghanooni, M., Mattison, D.R., Zhang, Y.P., Macina, O.T., Rosenkranz, H.S., Klopman, G. (1997) Structural determinants associated with risk of human developmental toxicity. *Am. J. Obstet. Gynecol.*, 176 : 799-806.
57. Tanimura, T. and Sakamoto, M.K. (1995) Alternatives to animal experiments in developmental toxicity studies. *Acta Med. Kinki Univ.*, 20 : 135-148.
58. Brown, N.A., Spielmann, H., Bechter, R., Flint, O. P., Freeman, S. J., Jelínek, R. J., Koch, E., Nau, H., Newall, D.R., Palmer, A.K., Renault, J.-Y., Repetto, M.F., Vogel, R. and Wiger, R. (1995) Screening chemicals for reproductive toxicity: the current alternatives. *ATLA*, 23 : 868-882.

59. Webster, W.S., Brown-Woodman, P.D.C. and Ritchie, H.E. (1997) A review of the contribution of whole embryo culture to the determination of hazard and risk in teratogenicity testing. *Int. J. Dev. Biol.*, 41 : 329-335.
60. Harris, C. (1997) In vitro methods for the study of mechanisms of developmental toxicity. *Handbook of developmental toxicology*, (Hood, R.D. ed.), CRC Press, Boca Raton, 465-509.
61. Bantle, J.A. (1995) FETAX - a developmental toxicity assay using frog embryos. *Fundamentals of aquatic toxicology*, 2nd ed., (Rand, G.M. ed.) Taylor and Francis, Washington, DC, 207-230.
62. Moore, J.A., Daston, G.P., Faustman, E., Golub, M.S., Hart, W.L., Hughes, C., Jr., Kimmel, C.A., Lamb, J.C., IV, Schwetz, B.A. and Scialli, A.R. (1995) An evaluative process for assessing human reproductive and developmental toxicity of agents. *Reprod. Toxicol.*, 9 : 61-95.
63. Kimmel, C.A. (1996) Developmental toxicity risk assessment: consensus building, hypothesis formation, and focused research. *Drug Metab. Rev.*, 28 : 85-103.
64. Dellarco, V.L., Kimmel, C.A. (1997) Risk assessment of environmental agents for developmental toxicity: current and emerging approaches. *Mutat. Res.*, 396 : 205-218.
65. Brent, R.L. (1995) The application of the principles of toxicology and teratology in evaluating the risks of new drugs for treatment of drug addiction in women of reproductive age. *NIDA. Res. Monogr.*, 149 : 130-184.
66. 仲間一雅 (1997) 動物実験における動物福祉の倫理. *日医大誌*, 64 : 287-291.
67. Sandøe, P. and Svendsen, O. (1998) Animal burdens versus human benefits - how should the ethical limits be drawn for use of animals as models in toxicology? *Arch. Toxicol. Suppl* 20 : 31-40.

表1 ヒトの先天異常に関する動物実験

何故動物実験か？

倫理、異質集団、長い寿命と少ない子

どの領域で？

頻度：野生、家畜および実験動物

成因：遺伝 ミュータント、染色体異常

多因子遺伝 自然発生奇形

環境 新規因子・・・防止

ヒトで疑われたもの・・・肯定、否定

機序：生殖発生毒性の同定、予防、治療のための

比較実験、比較薬物動態

表2 ヒトで確立された発生毒性因子と動物試験

因	子	サル	ラット	マウス	ウサギ
アルコール		+	+	+	+
アミノ配糖体			+	+	-
男性ホルモン・黄体ホルモン（男性化作用）		+	+	+	+
フェニトイン		+	+	+	+
アミノプテリン		-	+	-	+
抗甲状腺薬			+	+	+
ジエチルスチルベストロール		+	+	+	+
鉛		+	+	+	+
メチル水銀		+	+	+	+
ポリ塩化ビフェニル		+	+	-	-
レチノイド（イソレチノイン, エトレチナート）		+	+	+	-
サリドマイド		+	±	±	+
煙草		-	+	+	+
ワーファリン			+	±	±

X線		+	+	+	+
高温			+	+	+
風疹		+	+	-	-

表3 ヒトと動物の催奇形性成績の一致率（米国FDA，1980より作表）¹⁹

	ヒトの催奇形因子 (38)	ヒトの非催奇形因子 (165)
	陽性反応% (正しい陽性)	非陽性反応% (正しい陰性)
マウス	85%	35%
ラット	80%	50%
ウサギ	60%	70%
ハムスター	45%	35%
サル	30%	80%
2以上の動物腫	80%	51%
すべての動物腫	21%	28%
いずれかの動物腫	97%	79%

表4 ヒトで最初催奇形性が疑われ最終的に否定された例

因子	異常の型	年	発端	動物試験	その後の疫学調査	備考
メクリジン	種々	1972	症例	ラット(+), サル, マウス ウサギなど(-)	すべて否定的	発売中
腐敗バレイ ショ	神経管奇形	1972	疫学 (仮説)	最初マモセット(+), 多くの実験(-), 少数の実験(+)	すべて否定的 介入実験失敗	
イミブラミン	四肢減形成 異常	1972	症例	ウサギ(+)	蒐集した資料 は否定的	発売中
スプレー 接着剤	複合奇形	1972	症例	ハムスター(-)	すべて否定的	禁止は 6カ月後解除
黄体ホルモン	心・四肢 奇形など	1973	疫学 (症例対照)	ほとんどの実験 (-)	否定的報告 多し	流産防止には 無効
ベンデクチン	四肢減形成 異常	1980	症例	ほとんどの実験 (-)	殆んど否定的	経済的理由で 発売中止
膣殺精子剤	種々, 染色体 異常	1981	疫学 (コホート)	少数の実験(-)	否定的報告 多し	発売中

表5 ビタミン類による先天奇形予防の動物実験

初期の試験			
コーチゾン口蓋裂	マウス	B ₆ , B ₁₂ , C など	(Streamら 1956) ⁴⁰
コーチゾン口蓋裂	マウス	B ₆ または 葉酸	(Peerら 1958) ⁴¹
Thio-TEPA 奇形	マウス	複合ビタミン	(Tanimura 1968) ⁴²
葉酸と神経管奇形			
ミュータント	curly tail mouse	—	(Sellerら 1981) ⁴³ (Greeneら 1997) ⁴⁴
	axial defects mouse	—	(Essienら 1993) ⁴⁵
	Cart 1 homozygous mouse	+	(Zhaoら 1996) ⁴⁶
	splotch mutant mouse	+	(Flemingら 1998) ⁴⁷
催奇形因子	エタノール, 高温	—	(Grahamら 1985) ⁴⁸
	バルプロ酸	—	(Hansenら 1991) ⁴⁹

表6 試験管内先天異常学の利用

-
- 催奇形因子の迅速スクリーニング
 催奇形因子に対する感受性の比較
 催奇形性の機序および発生過程の比較
 代謝物の催奇形性検索
- A. 哺乳類組織, 器官, 全胚を用いる方法
1. 組織培養
 - 細胞間連絡の遮断, 細胞間接着の阻害
 - 細胞分化の阻止 (Flintの小塊培養—中脳と肢芽)
 - 細胞増殖の抑制, 細胞認識の阻害
 2. 器官培養 肢芽, 口蓋など
 3. 全胚培養 (New)
 - 通常の方法の他, *in vivo* 投与後の培養, ヒトの血清の利用, 代謝活性化, 羊膜内投与
- B. 非哺乳類を用いる方法
-

表7 生殖発生毒性試験の評価（谷村、1992¹⁾）

試験の科学的真実性

良質の動物種で、発生学と先天異常に関する情報が豊富で、かつヒトの生殖発生毒性に感受性のあるもの

用量-反応性 (NOEL/LOEL, NOAEL/LOAEL)

時期特異性

母体毒性

背景対照データとの対比

誤りの原因の検討

追加試験

母児間移行などの薬物動態、最終的発生毒性物質の確認
作用機序

他の動物種での検討

ヒトへの外挿

異常の型と重症度

用量

臨床量との比

動物の母体毒性、LD₅₀、薬効量、胎児LD₅₀との比
母体および胎児組織（作用部位）における最終的発生毒性物質の濃度

薬物動態学、他の毒性学および薬理学的類似性

動物で示唆される作用機序のヒトへの適用の可能性

多種の動物種（薬物代謝の類似性）

類縁化合物における情報

ヒトにおける情報

暴露集団の特性（危険集団の大きさ、暴露量）

有益性と危険性の比

<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>

<会員の異動>

<個人会員名簿>

<維持会員名簿>

<評議員名簿>

<会長、幹事、監事名簿>

＜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 19 号に掲載した第 58 回研究会以後、以下の研究会が開催された。

- 1) 第 59 回研究会（平成 10 年 9 月 11 日 於大阪大学医学部学友会館「銀杏会館」）
＜講演会＞ テーマ 受精機構の新たな研究展開と内分泌攪乱物質の生殖系への影響
 1. 緑色蛍光蛋白質を組み込んだ遺伝子改変動物とその応用
岡部 勝（大阪大学遺伝情報実験施設遺伝子組換え研究分野）
 2. 内分泌攪乱化学物質（環境ホルモン）が生殖へ及ぼす影響；特に、ヒト精子形成への影響について
森 千里（京都大学大学院医学研究科生体構造医学講座）
 3. トリフェニルスズのラットにおける生殖毒性
江馬 眞（国立医薬品食品衛生研究所大阪支所生物試験部）＜維持会員ニュース＞ 日本クレア（株）「動物施設および飼育器材の滅菌消毒薬」
- 2) 第 60 回研究会（平成 10 年 12 月 4 日 於京都市勧業館「みやこめっせ」）
会員による研究発表（13題）
＜特別講演＞
 1. 臨床試験実施に関する非臨床試験データの意義
内田英二（昭和大学医学部第二薬理学）
 2. ICH Common Technical Document (CTD) Guideline on Registration of New Medical Products: Status of CTD Safety Section
河合睦文（リリーリサーチ ラボラトリーズ ジャパン）
 3. JVS (juvenile visceral steatosis) マウスの原因遺伝子の探索
早川純一郎（金沢大・医・動物実験施設）
- 3) 第 61 回研究会（平成 11 年 3 月 5 日 於京大会館）
＜講演会＞ テーマ 実験動物：育種繁殖領域からの新たな展開
 1. リコンビナント・インブレット系マウスを用いた研究
西村正彦（名古屋大学医学部付属動物実験施設）
 2. サル類の医学生物学分野における利用のための人工繁殖
和 秀雄（大阪大学人間科学部）＜維持会員ニュース＞ 日本チャールズ・リバー（株）「CD(SD)IGSラットの紹介」
- 4) 第 62 回研究会（平成 11 年 6 月 11 日 於大阪大学医学部学友会館「銀杏会館」）
＜講演会＞ テーマ 生殖発生毒性試験を考える
 1. 毒性試験における精子検査の意義と方法

川島邦夫（国立医薬品食品衛生研究所・大阪支所）

2. ヒトの先天異常研究における動物実験の意義

谷村 孝（近畿大学・ライフサイエンス研究所）

<維持会員ニュース>

日本エスエルシー（株）「トランスジェニック・ノックアウト技術サービス」

5) 第 63 回研究会（平成 11 年 9 月 10 日 於大阪大学医学部学友会館「银杏会館」）

<講演会> テーマ 疾患モデル：ヒトとマウスの種差を越えて

1. Genetic Engineered Mice と動脈硬化研究」

平野賢一（大阪大・院・医・分子制御内科）

2. 糖尿病血管症へのトランスジェニックアプローチ」

山本 博（金沢大・医・生化学第二）

<維持会員ニュース>

（株）イナリサーチ「Transmission Pattern of B-virus Infection in Group-caged Juvenile Cynomolgus Monkeys」

幹事会、評議員会、総会の議事録

1) 幹事会の概要 - 1 (平成 11 年 2 月 19 日 於京大・院・医・附属動物実験施設)

1. 出席：浅野、阿部、飯田、岡本、喜多、北田、芹川、三日月、森岡、森本、山本、
(事務局、山口)

2. 議事

- (1) 平成 10 年度の事業報告について話し合わせ、平成 10 年度事業報告が作成された。
- (2) 関西実験動物研究会会報第 19 号が発行されたことが報告された。
- (3) 平成 10 年度の決算報告について話し合わせ、平成 10 年度決算報告が作成された。
- (4) 平成 11 年度の事業計画について話し合わせ、平成 11 年度事業計画案が作成された。
- (5) 平成 11 年度の機関紙発行計画について話し合わせ、関西実験動物研究会会報第 20 号の発行予定を決定した。
- (6) 平成 11 年度の予算について話し合わせ、平成 11 年度予算計画案が作成された。なお、平成 10 年度の収入に組み入れたケー・エー・シーからの寄付金を、事務局で使用するコンピューターの購入に充当させることが提案され了承された。
- (7) 新評議員として、稲垣氏(塩野義)、江馬氏(国立医薬品食品衛生研)、中井氏(日本新薬)、平川氏(新日本科学)、山添氏(住友化学)の選出を評議員会に諮ることが決定された。
- (8) 会長として、芹川氏(京大)の再任を評議員会に諮ることが決定された。
- (9) 幹事として、浅野氏(田辺)、阿部氏(武田)、飯田氏(日本SLC)、海野氏(日本シエーリング)、岡本氏(阪大)、喜多氏(京府医大)、北田氏(京大)、黒澤氏(阪大)、鳥居氏(滋賀医大)、新谷氏(循環器病七)、三日月氏(塩野義)、宮脇氏(日本新薬)、森岡氏(大府大)、森本氏(大阪医大)、山中氏(イナリサーチ)、山本氏(滋賀医大)の再任を評議員会に諮ることが決定された。新幹事として、池田氏(バイエル)、江馬氏(国立医薬品食品衛生研)、久保氏(奈良医大)、塩見氏(神戸大)、前田氏(大日本製薬)の選出を評議員会に諮ることが決定された。
- (10) 監事として、清水氏(清水実験材料)、高木氏(日本SLC)の再任を評議員会に諮ることが決定された。
- (11) 第 62 回研究会を 6 月に大阪で、第 63 回研究会を 9 月もしくは 10 月に大阪で、第 64 回研究会を 12 月 3 日に京都で開催する予定が決定された。

2) 幹事会の概要 - 2 (平成 11 年 3 月 5 日 於京大会館)

1. 出席：阿部、飯田、岡本、喜多、北田、芹川、鳥居、新谷、三日月、宮脇、森岡、森本、
山中、山本(14名)

2. 議事

- (1) 第 62 回研究会は、平成 11 年 6 月 11 日に、大阪にて、谷村孝氏(近大医学部ライフサイエンス研究所)の企画による講演会が行われることが決定された。
- (2) 第 63 回研究会は、平成 11 年 9 月 10 日に、大阪にて行われることが決定された。

- (3) 第 64 回研究会は、平成 11 年 12 月 3 日に、京都にて、会員による発表と家森幸男氏（京大人間環境）の企画による講演会が行われることが決定された。

3) 第 17 回評議員会の概要（平成 11 年 3 月 5 日 於京大会館）

- 1.出席：阿部、飯田、池田、内海、岡本、喜多、北田、久保、黒澤、塩見、芹川、高島、谷村、鳥居、中井、新谷、橋本、原田、平川、前田、牧野、増岡、三日月、宮瀧、宮脇、森岡、森本、山添、山中、山本、家森、吉田（32 名）

2.議事

- (1) 平成 10 年度事業報告：阿部幹事（集会）より平成 10 年度事業報告が行われ、承認された。
- (2) 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 号が発行されたことが報告され、承認された。
- (3) 平成 10 年度決算報告：喜多幹事（庶務）より平成 10 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) 旧評議員（退会者を除く）49 名の再任（平成 11 年度～平成 13 年度）が決定された。新評議員として、稲垣氏、江馬氏、中井氏、平川氏、山添氏が推薦され、選出された。
- (5) 会長として、芹川氏の再任が決定された。
- (6) 旧幹事 17 名の再任（平成 11 年度～平成 13 年度）が決定された。新幹事（集会）として、池田氏、江馬氏、久保氏、塩見氏、前田氏が推薦され、選出された。
- (7) 平成 11 年度事業計画案：阿部幹事（集会）より平成 11 年度事業計画案が説明され、承認された。
- (8) 平成 11 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 20 号の発行を予定している旨説明され、承認された。
- (9) 平成 11 年度予算案：喜多幹事（庶務）より平成 11 年度の予算案が説明され、承認された。
- (10) 芹川会長から、関西実験動物研究会のホームページとメールアドレスの紹介がなされた。また、評議員各位から研究会でのテーマを募集している旨説明された。

4) 第 16 回総会の概要（平成 11 年 3 月 5 日 於京大会館）

- (1) 平成 10 年度事業報告が行われ、承認された。
- (2) 平成 10 年度においては、関西実験動物研究会会報第 19 号が発行された旨報告され、承認された。
- (3) 平成 10 年度収支決算報告が行われ、承認された。
- (4) 旧評議員（退会者を除く）49 名の再任（平成 11 年度～平成 13 年度）が承認された。また、新評議員として、稲垣氏、江馬氏、中井氏、平川氏、山添氏が選出されたことが報告され、承認された。
- (5) 会長として、芹川氏の再任が承認された。
- (6) 旧幹事 17 名の再任（平成 11 年度～平成 13 年度）が承認された。新幹事（集会）として、池田氏、江馬氏、久保氏、塩見氏、前田氏が選出されたことが報告され、承認された。

- (7) 平成 11 年度事業計画案が説明され、承認された。
- (8) 平成 11 年において、関西実験動物研究会会報第 20 号の発行を予定していることが説明され、承認された。
- (9) 平成 11 年度の予算案が説明され、承認された。
- (10) 芹川会長から、関西実験動物研究会のホームページとメールアドレスの紹介がなされた。

《会員の異動》

(平成10年10月～平成11年9月)

入会者

高橋 恵子	塩野義製薬 (株) 油日ラボラトリーズ
根縫 弘子	塩野義製薬 (株) 油日ラボラトリーズ
小林 欣滋	田辺製薬 (株) 安全性研究所
根本 良夫	塩野義製薬 (株) 新薬研究所
原口 心雄	塩野義製薬 (株) 新薬研究所
中村 正典	日本オルガノン (株) 医薬研究所
浅沼 武敏	国立循環器病センター研究所
今林 潤一	化合物安全性研究所 営業部
鈴木 昇	三重大学医学部附属動物実験施設

退会者

竹村 公延	マルホ (株) 研究所彦根分室
武下 政一	田辺製薬(株)マルゴリサーチ サービス
山村 道夫	マルゴ・リサーチサービス
相馬 正志	(株)新薬開発研究所 関西支所
庫本 高志	国立がんセンター 発がん研究部
志村 圭志郎	
中川 洋子	田辺製薬 (株) 安全性研究所
有行 史男	田辺製薬 (株) 製品開発センター
市田 州	(財)たばこ産業弘済会 高槻事業所
大神 弘	大日本除虫菊 (株) 中央研究所
加藤 雅門	(株) トーメンケミカル大阪 ファインケミカル部
高橋 明之	(財)たばこ産業弘済会 高槻事業所
藪中 淳	マルホ (株) 研究所彦根分室
近藤 正熙	
松代 創一郎	日清食品 (株) 中央研 食品安全センター

関西実験動物研究会（個人会員名簿） 1999年9月現在

（五十音順）★は会長、☆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	543-0055 大阪市天王寺区恵田院町 8-26-903	アニマルケア
	青野 啓基	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
	浅沼 武敏	565-8565 大阪府吹田市藤白台5丁目7-1	国立循環器病センター研究所
	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
い	◎◎ 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 大阪市城東区森ノ宮 2-3-3	扶桑薬品工業(株)研究開発センター
	有富 博之	561-0825 大阪府豊中市三葉町 3-1-1	シオノギ製薬 新薬研 実験動物管理室
	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	433-8114 浜松市葵東 3-5-1	日本エスエルシー（株）
	飯塚 三喜	666-0131 川西市矢間字高田 103	日本ベアリンガー・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
う	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	三協ラボサービズ（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 埼玉県蓮田市未広 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）
	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
え	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
	今林 潤一	631-0806 奈良市朱雀6-17-3-7B	化合物安全性研究所 営業部
	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 草津市西泷川 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 横浜市の西区みなとみらい 2-2-1ランドマカワ-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	国立医薬品食品衛生研究所
	お○ 及川 弘	525-0028 滋賀県草津市上笠 2-1-8-1	
お	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)ポゾリサーチセンター
か	◎◎ 岡本 宗裕	680-8553 鳥取市湖山町南 4-101	鳥取大学農学部獣医学科実験動物機能学講座
	沖本 一夫	564-0053 吹田市江の木町 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 大阪府茨木市藤垣内 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	599-8570 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・光文所
	か 鍵山 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） 1999年9月現在

	氏名	〒	住所	所属
	加藤 毅二	564-0053	大阪府吹田市江の木町 6-5	日本クレア（株）大阪事業所
	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
	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	埼玉県甲府市川岸 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	569-1029	高槻市安岡寺町 3-3-10	
	川西 和夫	520-2152	大津市月輪 3 丁目 5-25	科研製薬（株）製剤研究部
	神田 政典	561-0825	大阪府豊中市二菜町 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	602-8566	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 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 一樹	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	634-8521	橿原市四条町 840	奈良県立医科大学 動物実験施設
	倉林 謙	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
◎◎	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	
	小泉 勤	910-1104	福井県吉田郡松岡町下合月 23-3	福井医科大学動物実験施設
	甲田 彰	554-0022	大阪市此花区春日出中 3 丁目1-98	住友製薬（株）開発研究所
○	小嶋 明廣	532-8505	大阪市淀川区加島 3-16-89	（株）田辺 R&D サービス 大阪飼育管理部
	小谷 猛夫	599-8531	堺市学園町 1-1	大阪府立大学農学部獣医学科獣医病理
	小林 嘉代	589-0014	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
	小林 忍	605-8550	京都市南区西大路八条下ル	日本新薬（株）
	小林 欣滋	532-8505	大阪市淀川区加島 3-16-89	田辺製薬（株）安全性研究所
	小松 正美	586-0094	河内長野市小山田町 345	日本農薬（株）安全性研究所
	小森 彰	607-8042	京都市山科区四宮南河原町14	科研製薬（株）中央研究所薬理研究部
	近藤 靖	532-8505	大阪市淀川区加島 3-16-89	田辺製薬（株）先端医学研究部
さ○	西条 武俊	532-0024	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
	境 陽子	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
	坂田 太二	532-8505	大阪市淀川区加島 3-16-89 田辺製薬内	田辺 R&D サービス
	藤藤 公道	606-8501	京都市左京区吉田下阿達町	京都大学薬学部薬理学教室
	佐藤 貞夫	565-0871	吹田市山田丘 1-8	大阪大学歯学部中央研究室
	蛟島 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 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
	寿田 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
	下西 功	534-0016	大阪市都島区友楽町 1-5-90	日本オルガノン（株）医薬研究所
	銀一之	547-0001	大阪市平野区加美北 3-9-21	白銀工業（株）
す	菅原 努	606-8225	京都市左京区田中門前町 103	バストゥールビル京都イメリタスクラ
	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 昇	514-8507	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
	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★◎◎	菅川 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
	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	出雲市塩治町 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	530-6035	大阪市北区天満橋1-8-30 OAP タワー35F	（株）三菱化学安全科学研究所
	高橋 明男	554-0922	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 恵子	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
	竹下 崇	305-0003	つくば市桜 3-14-1	日本新薬(株)
	武田 篤彦	606-8225	京都市左京区田中門前町 103-5	バストゥールビル 5F (財) 体質研究会
	竹之下 美恵	648-0003	橋本市岡田町山内 514	

関西実験動物研究会（個人会員名簿） 1999年9月現在

	氏名	〒	住所	所属
○	竹之下 洋司	648-0003	和歌山県橋本市鵜田町山内 514	
	田島 優	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	藤沢テクニクス（株）業務 4 部 RI 施設
	谷村 孝	589-8511	大阪狭山市大野東 377-2	近畿大学ライフサイエンス研究所
○	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
ち○	玉田 寺通	599-8231	堺市学園町 1-1	大阪府立大学農学部獣医学科
	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
つ	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
	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畜種学教室
	蝶良 愛郎	570-0074	守口市文園町10-15	関西医大・第2病棟
○	蝶良 義彦	661-0002	尼崎市塚田町 1-33-21	
	津村 秀樹	514-0001	三重県津市江口橋 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 G.L.P 室
	堂前 幸代子	565-0871	吹田市山田丘 3-1	大阪大学微生物病研究所
と	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	520-2192	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	601-8550	京都市南区西大路八条下ル	日本新薬（株）安全性研究部
○	中井 洋一	503-0628	岐阜県海津郡海津町福江290	（株）日本生物化学センター
	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	大鷲薬品（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 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
○	中村 正典	534-0016	大阪市都島区友楽町1-5-90	日本オルガノン（株）医薬研究所
	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 聡	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）環境バイリス研究所
○	西村 正彦	466-0065	名古屋市長和区鶴舞町65	名古屋大学医学部附属動物実験施設
	西村 弘道	597-0061	貝塚市浦田 172-12	（株）ケーエーシー
ぬ	西山 秀志	532-8686	淀川区十三本町 2-17-85	（株）武田ラビックス
	沼沢 拓生	673-1461	兵庫県加東郡社町木梨	日本臓器製薬（株）
ね	根本 良夫	561-0825	豊中市二葉町3-1-1	塩野義製薬（株）新薬研究所
	根継 弘子	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
の	野村 彰	573-0005	枚方市池之宮3-4-20 703号	
	野澤 謙	467-0035	名古屋市瑞穂区弥富町月見ヶ丘 21-2	
は○	橋本 正晴	532-8514	大阪市淀川区加島 2-1-6	藤沢薬品工業（株）安全性研究所
	橋詰 俊雄	547-0001	大阪市平野区加美北 4-6-19	白銀工業
○	長谷川 治子	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
	浜田 祐二	871-0801	福岡県築上郡吉富町小祝 955	セアック吉富
○	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	
○	原口 心雄	561-0825	豊中市二葉町3-1-1	塩野義製薬（株）新薬研究所
	原田 正史	545-0051	大阪市阿倍野区旭町	大阪府立大学医学部
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）

関西実験動物研究会（個人会員名簿） 1999年9月現在

	氏名	〒	住所	所属
	足田 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	鐘淵化学工業（株）高砂研究所
○	平川 公昭	590-0422	泉南郡熊取町希望が丘 1-4-21	（株）新日本科学 薬物代謝分析センター
	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	大阪府枚方市長尾崎 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	大阪市都島区友潤町 1-5-90	日本オルガノン（株）医薬研究所
	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
○	占河 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実験動物室
ほ	下場 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	出雲市塩治町 89-1	島根医科大学第2病理解剖学教室
	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）研究管理部飼育室
	真壁 恭子	641-0012	和歌山市紀三井寺 811-1	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	枚方市長尾崎町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（村松 功也）腫瘍生化学講座
	三原 隆子	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	福島県福島市 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	椋本 未男	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	京都大学医学部附属動物実験施設
	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30坪 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	大阪市生野区箕野 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	大阪府西区西本町 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
	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12-35	
	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
◎◎	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

関西実験動物研究会（個人会員名簿） 1999年9月現在

	氏名	〒	住所	所属
	山本 孝史	598-0061	大阪府泉佐野市住吉町一丁目	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
○	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
○◎	山本 好男	520-2192	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
○	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
○	吉田 元信	563-0011	池田市伏見町103	大日本製薬（株）アミノ酸部研究所
	吉船 伸一	567-0806	茨木市庄丁 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75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：075-753-4439, 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 維持会員名簿

(五十音順) (平成11年9月現在)

No.	社名	〒	住所
1	(株) アズウエル	567-0806	茨木市庄 2-24-3
2	(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
3	(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
6	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
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	531-0071	大阪市北区中津 1-6-28 ホークビル4F
14	白銀工業(株)	547-0001	大阪市平野区加美北 3-9-21
15	(株) 新日本科学	892-0871	鹿児島県鹿児島郡吉田宮之浦2438
16	セアック吉富(株)	871-0801	福岡県築上郡吉富町大字小祝 955
17	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
18	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
19	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
20	(株) 夏目製作所	113-0034	東京都文京区湯島 2-18-6
21	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
22	日本オルガノン(株)	534-0016	大阪市都島区友淵町 1-5-90
23	日本クレア(株) 大阪事業所	564-0053	大阪府吹田市江の木町 6-5
24	日本新薬(株) 創薬研究本部	601-8550	京都市南区吉祥院西ノ庄門口町 14
25	日本チャールスリバー(株)	550-0005	大阪市西区西本町 1-11-7
26	日本ベーリンガーインゲルハイム(株)	666-0113	川西市矢間字高田 103
27	(株) ハイゲン	349-0124	埼玉県蓮田市末広 1-2-7
28	藤沢薬品工業(株) 企画部 研究開発	532-8514	大阪市淀川区加島 2-1-6
29	扶桑薬品工業(株) 研究開発 センター	536-0025	大阪市城東区森の宮 2-3-30
30	丸石製薬(株) 中央研究所	538-0042	大阪市鶴見区今津中 2-2-18
31	(株) 三菱化学安全科学研究所大阪支店	530-6035	大阪市北区天満橋 1-8-30 OAPタワー35F
32	(株) 美濃ラボ	503-0321	岐阜県海津郡平田町今尾 1195-1
33	吉富製薬(株) 安全性研究所 福崎安全研	679-2211	兵庫県神崎郡福崎町山崎 214-1
34	(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 : cyamachi@ip.media.kyoto-u.ac.jp)

関西実験動物研究会 評議員名簿

(平成11年度～13年度)

氏名	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	日本エスエルシー(株)
池田 卓也	バイエル薬品(株) 中央研究所
稲垣 晴久	塩野義製薬(株)
内海 健二郎	(株) ケーエーシー
海野 隆	日本シェーリング(株) 研究開発本部
江馬 眞	国立医薬品食品衛生研究所大阪支所
及川 弘	
岡庭 梓	(株) ボゾリサーチ
岡本 宗裕	鳥取大学農学部獣医学科実験動物機能学講座
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	奈良県立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	田辺 R&D サービス
西条 武俊	武田薬品工業(株) 薬安研
塩見 雅志	神戸大学医学部附属動物実験施設
芹川 忠夫	京都大学大学院医学研究科附属動物実験施設
高折 修二	島根医科大学
高島 俊行	(株) 三菱化学安全科学研究所
竹之下 洋司	(株) ケアリー
谷村 孝	近畿大学ライフサイエンス研究所
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
鳥居 隆三	滋賀医科大学医学部附属動物実験施設
中井 伸子	日本新薬(株) 中央研究所
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
平川 公昭	(株) 新日本科学
古河 恵一	近畿大学医学部共同研実験動物室
前田 敏宏	大日本製薬(株) 研究管理部動飼室
牧野 進	塩野義製薬(株) 実験動物研究センター

氏名	所属
増岡通夫	(株) ケーエーシー生物科学センター
三日月 勝見	塩野義製薬(株) 実験動物研究センター
宮 篤 宏彰	(株) 新日本科学
宮 嶋 正康	和歌山県立医科大学実験動物施設
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学
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
山添 裕之	住友化学工業(株) 生物環境科学研究所
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	京都大学大学院人間環境学研究科
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 : cyamachi@ip.media.kyoto-u.ac.jp) にご連絡下さい

関西実験動物研究会 会長・幹事・監事名簿

(平成 11 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：	阿部 敏男	(株) 武田ラビックス系統管理部
	浅野 裕三	田辺製薬(株) 安全性研究所
	池田 卓也	バイエル薬品(株) 中央研究所
	海野 隆	日本シェーリング(株) 研究開発本部
	江馬 真	国立医薬品食品衛生研究所
	黒澤 努	大阪大学医学部附属動物実験施設
	久保 薫	奈良県立医科大学 動物実験施設
	塩見 雅志	神戸大学医学部附属動物実験施設
	前田 敏宏	大日本製薬(株) 研究管理部動飼室
	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：	山本 好男	滋賀医科大学法医学教室
(京都 G)	鳥居 隆三	滋賀医科大学医学部附属動物実験施設
	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
編集：	新谷 聰	国立循環器病センター研究所
(大阪 G)	飯田 晶敏	日本エスエルシー(株)
	岡本 宗裕	鳥取大学農学部獣医学科実験動物機能学講座
	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)

平成11年12月10日 印刷

平成11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20号
Kansai Journal of Laboratory Animals

第57回研究会：マウスの新たな利用法を求めて

押村 光雄：ヒト染色体導入マウスの作製とその応用 3

第59回研究会：受精機構の新たな研究展開と内分泌攪乱物質の生殖系への影響」

岡部 勝：遺伝子改変動物と受精の研究 15

森 千里：内分泌攪乱化学物質（環境ホルモン）が男性生殖能へ及ぼす影響：
特に、ヒト精子形成への影響について 23

江馬 眞：トリフェニルスズのラットにおける生殖毒性 28

第60回研究会：特別講演

内田 英二：臨床薬理学と非臨床試験データ評価 37

河合 睦文：ICH Common Technical Document (CTD) Guideline on Registration of
New Medical Products: Status of CTD Safety Section 44

早川純一郎：JVS (juvenile visceral steatosis) マウスの原因遺伝子の探索 49

抄録：会員による研究発表 (13題) 57

第61回研究会：実験動物：育種繁殖領域からの新たな展開

西村 正彦：リコンビナント・インブレッッド系マウスを用いた研究 73

和 秀雄：医学・生物学分野における実験用動物としてのサル類の人工繁殖 77

第62回研究会：生殖発生毒性試験を考える

川島 邦夫：毒性試験における精子検査の意義と方法 95

谷村 孝：ヒトの先天異常研究における動物実験の意義 107

<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 135 会員の異動 138 個人会員名簿 139
維持会員名簿 144 評議員名簿 145 会長、幹事、監事名簿 147