

関西実験動物研究会会報

Kansai Journal of Laboratory Animals

平成13年12月 22号

関西実験動物研究会

Kansai Laboratory Animal Research Association

目 次

〈第64回研究会（平成11年12月3日）〉

特別講演

疾患モデルからヒトへ予知・予防医学への貢献

家森 幸男（WHO循環器疾患予防国際共同研究センター）----- 3

〈第65回研究会（平成12年3月3日）〉

テーマ：「実験動物の国際化を巡って」

1. Informatics in Laboratory Animal Science—International Standards

Ken Boschert（Comparative Medicine, Washington Univ.）----- 25

〈第66回研究会（平成12年6月2日）〉

テーマ：「医薬品開発の前臨床試験における新しい動向と国際戦略を考える」

1. 医薬品の創薬・開発研究における毒性試験の新しい動向

堀井 郁夫（日本ロッシュ(株)研究所）----- 31

〈第67回研究会（平成12年9月22日）〉

テーマ：「高次神経機能を動物実験により解明する」

1. プログラム細胞死の人為的操作による神経疾患治療の試み

三浦 正幸（理化学研究所脳科学総合研究センター細胞修復機構）----- 35

〈第68回研究会（平成12年12月3日）〉

特別講演

「SL/Kh マウスの Pre-B リンパ腫発生の遺伝機構」

日合 弘（京都大院・医・病態生物医学）----- 45

特別講演

「サル（ニホンザル、カニクイザル）ES細胞株の樹立とこれからの展開」

鳥居 隆三（滋賀医大・医・動物実験施設）----- 55

会員による研究発表（14題）----- 65

〈第69回研究会（平成13年3月3日）〉

テーマ：実験動物の微生物モニタリング項目に関する最近の動向

1. 遺伝子改変動物の授受に伴う微生物感染の増加と実験への影響

八神 健一（筑波大・生命科学動物資源センター）----- 81

2. 実験動物を取り巻く環境の変化と ICLAS モニタリングセンターの微生物 検査項目の見直し	
高倉 彰 (財実験動物中央研究所 ICLAS モニタリングセンター) ----	89
3. 実験動物品質の国際標準化 AALAS Health Monitoring Committee の動向	
黒澤 努 (大阪大・医・動物実験施設) -----	95
〈第70回研究会 (平成13年6月15日)〉	
テーマ：バイオメディカルサイエンスにおける遺伝子改変動物等を用いた 新規アプローチの紹介	
1. 小脳プルキンエ層及び網膜に遺伝子組換え酵素Creを発現する動物の作製	
鈴木 昇 (三重大医・動物実験施設) -----	101
2. 糖転移酵素遺伝子ノックアウトマウスを用いた糖鎖機能の解析	
浅野 雅秀 (金沢大医・動物実験施設) -----	112
3. 遺伝子から見た哺乳動物精子形成の特徴	
野崎 正美 (大阪大・微生物病研究所) -----	116
〈関西実験動物研究会だより〉 -----	123
〈幹事会、評議員会、総会の議事概要〉 -----	124
〈会員の異動〉 -----	126
〈個人会員名簿〉 -----	127
〈維持会員名簿〉 -----	132
〈評議員名簿〉 -----	133
〈会長、幹事、監事名簿〉 -----	135

〈第64回研究会（平成11年12月3日）〉

特別講演

疾患モデルからヒトへー予知・予防医学への貢献

家森 幸男（WHO循環器疾患予防国際共同研究センター）

疾患モデルからヒトへ-予知・予防医学への貢献

家森 幸男 WHO 循環器疾患予防国際共同研究センター長
京都大学名誉教授
(財) 兵庫県健康財団会長

はじめに- 実験動物が開く新しい医学

座長の芹川先生には私どもの大学院生はじめ研究生がお世話になっております。私がこうした実験動物の研究会でお話させていただきますのは久しぶりで故郷に帰ったような気がいたします。

私どもの人間・環境学というのは、一般の方からは何をやっているのか、新しい学問ですので、よく専門は何ですかと聞かれます。「病理学です」と答えますと、「先生はお料理をやっておられるのですか。」言われます。病理学者が料理学者になったようで食べ物の重要性を説いております。それは実験動物を用いた研究でわかってきたのです。私どもがこのような研究に入ったきっかけは「脳卒中を100%発症するラットでさえ栄養をかえてやればその遺伝子の支配を克服して天寿を全うすることができる」という、事実です。この事実をなんとか人間にも応用したいと思い、脳卒中ラットではなく何とか人間で予防したいという気持ちで世界中60地域にわたる研究を15年間かけてやってきました。モデル動物の研究は医学の流れを変えていくと期待されます。これからは病気になってからの医学ではなくて、予知をして予防をする医学です。実験動物によってこそ、この新しい医学が開けると確信します。

1. ヒトの生活習慣病とそのモデル

現在、日本人の三大死因は、癌、脳卒中、心筋梗塞です。問題は、脳卒中に1兆8千億円もの医療費を使っています。癌が支出第2位、高血圧にはほぼ同じくらい1兆7千億円も使っています。高血圧を治療しないと脳卒中、心筋梗塞になるからです。このように多額の医療費を使いながら結局寿命は延びましたが寝たきりや痴呆の方がますます多くなっているのが現状です。2000年の4月からいよいよ介護保険が始まり在宅介護で介護を要する方々、主

に寝たきりや痴呆で介護を要する方が全国に140万にもなります。その方々を皆集めたらほぼ京都市の人口で、市民が皆痴呆や寝たきりになっているという状態が現実日本にあるのです。しかし、実験モデルの研究成果では高血圧にかんする脳卒中はじめ血管系の病気は食べ物で予防できるということがわかってきました。これは、まさに実験動物のおかげだと言えます。

私の恩師の故岡本耕造京大名誉教授（病理学）は、高血圧自然炎症ラット、(SHR)を開発され、私どもは岡本先生と一緒に脳卒中を100%おこすラット、脳卒中易発症 SHR(SHR SP)を確立しました。今では特色ある亜型も作ってきており、高脂肪食を与えると脂肪が血管に累々とつくような高脂血症を起こしやすい系統、さらに心不全を起こしやすいラット、あるいは、多発性に散在する脳梗塞巣を起こす系統、その他、Koletzky によって開発された肥満を来す SHR(SHRCP)、降圧剤で治療しながら継代した SHRSP の子孫で悪性高血圧を発症する MSHRSP など、いろいろな病態にあった高血圧モデルが実験に使えるようになってきております。

これらのモデル動物は遺伝的に人間の疾患を発症するが、病理学的にも病態が人間の疾患のモデルとしてふさわしく、SHRSP の脳卒中は、人間の脳出血や脳梗塞と病理学的にも近く、病変が生じる脳内の場所も似ています。

2. 脳卒中モデル SHRSP による遺伝子分析

脳卒中の原因は遺伝が関与しており、その遺伝的原因を解析する研究が世界中で進行中です。SHRSP のコントロールとなるのはウィスターキョート系(WKY)の正常血圧ラットで、この系統から SHR、さらに脳卒中の SHRSP が分離確立されました。この WKY と SHRSP の生後5週、7週、10週、13週の血圧を比較すると SHRSP は13週になれば250 mmHg の高血圧になります。一方、WKY は130 mmHg 程度です。この SHRSP と WKY を交配して F1 を作ると、中間の血圧になり、その F1 同士の交配でできる F2 が遺伝子の分析には重要で、連鎖分析にはこれを用います。連鎖分析では F2 の様々な程度の血圧とその個体の遺伝子型の関連を調べ、染色体のどの位置に高血圧に関与する遺伝子の座位があるか、さらにその高血圧の遺伝子はどのような作用で高血圧を発症するのかを研究している。

脳卒中の遺伝子座位の同定はむずかしく、研究が遅れました。私どものデータですが、F2の生後12週の時の血圧と、その生後48週の年を取ったからの血圧を調べ、どの個体がその後、脳卒中を発症したかを調べますと、脳卒中になった個体は必ずしも血圧の高い個体だけではないことがわかり、したがって脳卒中になり易さは、血圧だけで決まるわけではないといえます。脳卒中を発症した個体を集め、どこに脳卒中の遺伝子座があるか、これらの個体の共通の脳卒中になりやすさを規定する遺伝子を調べてきました。これまで、私どもの研究を含め色々な研究ではラット染色体の一番目に最も有力な高血圧の遺伝子があります。どこのグループの結果もこの点では一致しています。そのほか三番目、四番目、十番目の染色体をはじめ、殆どすべての染色体に多少とも高血圧に関連する遺伝子があるといえます。一番最初に1991年にLathrop,Lindpainterや私どもが別々に分析して、食塩感受性の高血圧に関係した遺伝子がアンギオテンシン転換酵素の遺伝子の座位にあることと明らかにしました。これはその後の研究でも少なくとも食塩感受性の遺伝子の一つがこの座位にあること、一方、あまり食塩とは関係なしに血圧を上げているいくつかの遺伝子が存在することがわかってきました。

3. 高血圧遺伝子の発現時期

このような様々な遺伝子が働いて高血圧を発症しますが、SHRSPでどの遺伝子がどの年代の高血圧に関係しているかも分析できました。第一染色体上の高血圧の遺伝子は、比較的早い生後5週とか10週の血圧上昇に働いているようです。これまでのSHRの研究では交換神経がまず働いて血圧を上げる時期に大きな役割をします。それと対称的なのがなのが、10番目の染色体の遺伝子ですが、環境因子の影響を受けて血圧が上昇する機序に関係しているようです。食塩を負荷すると血圧を上げる機序やさまざまな環境因子に反応して血圧を上昇する遺伝子など高血圧は、まさに多因子性の疾患であり、高血圧の様々なステージによって関係している遺伝子も異なっているのです。そうなりますと高血圧の治療とか、予防とかを考える上でも、対応の仕方がかわってきます。すなわち、治療にしても染色体一番目の遺伝子が高血圧の発症に関与している若い時には、おそらく神経因子に対して高血圧の治療をすべきで、一方

年をとってきたらその遺伝子があまり働いていないが、食塩など環境に応じて血圧を上げる遺伝子が働いているので、むしろ環境因子のコントロールが大事になります。高齢者では、たとえば食塩の制限が比較的によく効いてくることも人間でもわかっています。人間での場合にはこの SHRSP のように高血圧に関する多くの遺伝子をそろえて持っているわけではないので、それぞれ別の遺伝子で本能的な高血圧とわれている血圧の上昇がおこっている可能性があります。今後は、それぞれの遺伝子に対応した高血圧の治療を考えていかなければならないことを示唆するデータです。

4. 食塩感受性遺伝子への対応

したがって、食塩感受性を決定する遺伝子を有していてもあきらめることが全くないといえます。SHRSP に普通食をやりますと脳卒中は生後25週までに発症しますが、このラットは生後7週から1%の食塩水で飼育しますと急速に血圧が上がります。生後15週では100%脳卒中を起こしてきます。ところが、高繊維食、例えば褐藻類、昆布の繊維を混ぜた餌で飼育すると食物繊維がナトリウムを吸着し、血圧の上昇は抑制されますし、そして脳卒中の発症も遅れ、予防も可能です。これは食塩に対する遺伝子があってもあきらめることはなく、もっと効率よくナトリウムを吸着する食材で餌を作れば脳卒中の予防は出来るのです。非常に効率よくナトリウムを吸着する食物、おおばこの繊維サイリウムがあり、これはセルロースと比べても血圧の上昇をしっかり抑えて脳卒中を予防します。このような食物繊維で糞便に出てくるナトリウムはサイリウムの方が多く、それだけ食塩の害を防ぎます。そんなわけで、脳卒中に関しましても非常に効果が得られます。1%の食塩水で飼育すると生後100日くらいで全滅するのが SHRSP では、サイリウムを十分にやっていると300日まで生かすことができます。これは実際、もう人間に既に役に立っております。皆様方が食べられるある種類のラーメンの中に入れていて、ラーメンの塩分が少しでも腸管から吸収されるのを少なくするのに利用されています。疾患モデル動物で判ってきたことがヒトの脳卒中予防にも関係する食塩感受性のコントロールに使える様になって役立っているという一つの成功例です。

5. 脳卒中の発症機序

脳卒中と言えば、病理組織学的には SHRSP の脳卒中は人間のそれと似ており、脳内小動脈の壊死が本態です。高血圧症の場合、脳の血管の病変は特殊で、脳以外の血管はむしろ中膜の平滑筋が増えたり、内膜下に平滑筋が増殖したりしてきます。特に心臓の血管などは人間の場合もっと複雑で、動脈の内膜にコレステロールがたまって粥状動脈硬化となりますが、ふつうラットの場合はコレステロールが低く、SHRSP はさらにこれが低く、粥状動脈硬化ではなく血管壊死による脳卒中で死亡します。このメカニズムは人間でもコレステロールが低い場合に起こる脳卒中と同じで、人間とラットの脳の断面でみると脳卒中病変が生じやすいのは大脳基底核で起こっている場所が共通です。SHRSP ではこのほか大脳皮質下に起こってきますが、血管の走行からみると非常によく似た部位に脳卒中病変が起こっております。脳血管は、脳の中に入っていくとき、直角から鋭角をもって分岐しています。これはむしろ、血圧が急に上がった時に脳の実質が保護されるような効果を持っているとも考えられますが、慢性的に血圧が上がった状態ですと、このような分岐内には血液が流れにくく、特に赤血球のような比重の重たいものは分岐には入らず直進しやすく、酸素を運ぶ重要な赤血球は入りにくくなるので、栄養が不足します。しかも、脳内の血管は皮質の表面を走っている血管と違い、栄養血管、すなわち栄養を外側から運ぶ毛細血管はありません。ですから中を流れている血液からしか栄養が血管壁に入ってこないのです。高血圧の状態では脳内小動脈の血流量が落ちてくるのが実験モデルでは早くから証明できました。そういうことでこの脳卒中を起こす血管病変、すなわち血管壊死は局所の血流障害によって起きやすいわけです。

電顕的に SHRSP の脳内の血管を観察しますと内皮細胞は障壁が少ないのに、その周囲の平滑筋ではむしろ外側から壊死が始まってくることがわかりました。すなわち、栄養が供給されにくい内脳からいちばん遠いところから障害が始まることがわかりました。

6. ヒトの脳血管障害の本態

ここまで SHRSP でわかりますと人間ではどうかということになります。

全国の病理学教室においてお願いして、死後時間の短い剖検例で、脳卒中で亡くなられた症例を集めました。例えば脳出血の症例では、脳内の血管は一見、壁が厚いように見えますが、この平滑筋の特有の成分アラクチンを免疫組織化学的に染めますと内側の平滑筋では残っていましたが厚くなった中膜の外層にはアラクチンは失われ結合組織となっており、硬いもろい血管になっております。この状態ですので、高血圧のため破れて、出血してもおかしくないということになります。

ですから、脳卒中の時の血管障壁は血管の外側にコラーゲンや結合組織が増えてきており平滑筋は外側からやられ、これは処理してくれるのは、貪食細胞、マクロファージですが、このマクロファージは繊維芽細胞の増殖をも刺激し、コラーゲンが産生され、ますます硬く厚いがもろい血管になります。更に内側の平滑筋まで傷害されてくると、マクロファージが傷害された平滑筋を処理するため内皮細胞を食い破るように内皮下に入ってきます。ラットでは電顕でそれを証明することが出来ました。内皮のバリアーが破れ分子量の大きい血液成分が沈着し、フィブリンが内皮下の折出し類繊維素変性（血管壊死）の典型的な状態となります。これは脳の細小ないし小動脈硬化の本態で脳の実質内の細い動脈では基本的にコレステロールは関係しない血管障害で、栄養障害が基本だと証明されたのです。

7. 栄養による脳卒中の予防

結局、局所的に栄養状態が悪いと脳卒中になるので、逆にこれは栄養により予防できるわけです。低栄養、低蛋白の状態では SHRSP は食塩を与えると重症の高血圧を発症し100%短期間で脳卒中を発症し死亡します。食塩を過剰に摂取させても高蛋白食では10%しか脳卒中にはなりませんし、低蛋白食で飼育すると、食塩は過剰に与えないようにしても80%は脳卒中になり、高蛋白食、とりわけ魚の蛋白を多く与えると血圧が下がり、食塩を過剰に与えないと脳卒中にはならないのですから、高蛋白食は血圧を下げ、食塩の害を打ち消してくれるということがわかります。そんなわけで SHRSP は様々な栄養実験に役立ったわけです。1%の食塩水を飲ませると SHRSP は100日以内に全滅します。しかし大豆蛋白を与えると寿命が倍くらいにのびます。これは

タンパク質が代謝され尿素となると、ナトリウムを尿として追い出し食塩の害が防げるからです。カルシウムを加えて飼育しても、寿命が倍くらいに延びます。これも、カルシウムも同じくナトリウムを尿へ排出しやすくするため、マグネシウムを与えても倍くらいに平均寿命が延びます。マグネシウムの場合は、細胞内にナトリウムが貯まるとそれをナトリウムポンプを活性化して細胞外に汲み出しやすくするため、食塩の害が減らすと考えられます。一般的に SHRSP でも加齢と共に細胞内のマグネシウムの量が減ってきます。タンパク質とカルシウム、マグネシウムを共に与えると、500日も生きる SHRSP もおり、栄養の状況を変えるを、かなり強い遺伝子の支配を受けていても脳卒中を予防出来ることが次々分かってきました。

8. ヒトの疫学研究への展開

そこで、人間で実験できませんので、様々な栄養条件で生活している地球上の諸民族で栄養と循環器疾患との関係と疫学的に研究することにしました。WHO の協力を得て1983年からパイロット研究を実施し、1985年から世界各地25カ国60地域で研究を実施し大変貴重な成果が得られました。例えば、コーカサス、黒海の近くのコーカサス地方の長寿地域、シルクロードのある中国北西部、中国の南方貴州省、さらに沖縄などは長寿地域で、更に沖縄からハワイに移住したハワイのヒロの日本人などは世界一の長寿ですが、実はハワイの沖縄出身者です。1980年代には現在の日本人の世界一の平均年齢に到達しています。しかしながら、同じ沖縄出身ですが、ブラジルの日本人では、サンパウロはまだしもそこから800キロも奥地のカンボグランデ在住の沖縄県出身者は心筋梗塞のため亡くられる人も多く17年も寿命は短くなっています。そんなわけで沖縄の方の長寿も、これは、遺伝によって決まっているわけではなくて、環境によって著しく影響されると言えます。丁度、SHRSPでも脳卒中が遺伝子によって完全に支配されているのではなく栄養の影響が大きいと同じで、遺伝よりも環境が重要であることを移民研究は証明しています。

9. 栄養疫学の方法の確立

疫学研究は客観的にデータを集められるよう同一の自動血圧計で血圧の測定法も一工夫し、世界中で使うことにしました。1986年の最初のマサイ族の調査では高血圧が殆どないことを確かめました。50代の前半の人々を中心に調べており、世界中のデータでは50代の前半で5人に1人が高血圧なのが平均的な状況です。マサイ族では、高血圧がないとは信じられず、アフリカは道が悪いので血圧計が壊れ高い血圧が測定不能になったのかと思い、試しに自分の血圧を測って見たら、えらく高いので驚きました。血圧の測定が私どもにとっては大変なストレスだったのです。腰に短刀を下げ、槍を持っていますし、槍も持った戦士に囲まれて採血したときにはいつ槍が飛んでくるかなと心配でした。マサイ族にとっては、血が魂だからです。マサイの人たちは主にミルクを瓢箪に入れて持ち歩いていますが、発酵して独特のヨーグルトになっていました。測定しますとカリウムがナトリウムより多く、マグネシウム、カルシウムも入っているので、SHRSPの実験食のように血圧を上げない脳卒中予防食といえます。その上、当時は食塩を全く使わず、時々ミルクに牛の生き血を入れて、ビタミンCや鉄分を補っており、特に子供や女性がこれを優先的に飲む習慣がありました。しかしながら、12年後の1998年、丁度タンザニアで米国大使館が爆破された時に、再調査のため、ダレスサラムにありました。その直後、マサイの検診に行きましたが、マサイ族も焼き肉を食べる時に塩を使っていました。そうしたら、そのような集落では、高血圧の人が12%、塩を使う習慣のない集落では高血圧の人は3%か4%位で12年前の状況が保たれていました。マサイ族とは対称的に塩をたくさん使っている民族もあります。チベット族はお茶にバターを入れ、バターには塩が入っていますが、あるいは塩を削ってお茶にも入れ飲んでいます。保存食はヤクの肉で塩漬けにしてあり、塩の分の摂取量も聞き取り調査ではなくて、まる一日、24時間の尿を採取してナトリウムを測定し、食塩摂取量を推定しました。もちろん聞き取り調査も参考にするのですが、これだけでは食塩摂取量の国際比較は出来ません。24時間尿の採取にはビールのジョッキ大の二重底のカップを特別に製作してこの研究に用いました。このカップの上の部分に毎回排尿し、カップの中の細い管の中に尿の入ったことを確かめ、これをワンタッチでボタンを押すと40分の1の量が下の部分に落ちます。残りは捨ててよく、このカップを持ち歩い

て毎日同じ操作をしますと、24時間尿の40分の1が貯まり、これを凍らして、ナトリウム、カリウム、マグネシウムを測定し、さらにアミノ酸を測ると摂取しているタンパク質の量や種類を推定できます。

10. 食塩と高血圧

24時間尿を世界中で集め、ナトリウムの摂取量を調べたところ、日本の8地域で調べた日本人の24時間の食塩排泄量、すなわち1日食塩摂取量の平均は12gでした。WHOは1日の食塩摂取を6gとし、日本の政府は10gも減塩の目標としています。1日、6gまで食塩摂取量を下げてきますと、収縮期血圧が6mmHg、拡張期血圧が4mmHgは下がります。これは、たいしたことないと思われるかも知れませんが、これだけ下がると脳卒中が激減する計算になります。マサイ族は塩を使わずミルクの中のナトリウムを食塩に換算して1日2.5gだけ塩分を摂り自然の味を楽しんでいます。「食は広州にあり」という広州市の近郊の方は1985年の調査では高血圧の人は殆どなく、1日の食塩摂取量はたった5.7gで美味しく自然の味で食生活を楽しんでいました。1日の食塩摂取6g以下のそんな味気ない食事はできないと考えるのは間違っています。実際、日本人でいち早く6gの減塩食になれたのが沖縄からハワイに移住した人々で、脳卒中も比較的少なく寝たきり、痴呆も少ない事を確かめております。しかし、世界中のデータを詳しく見ますと都会のダレスサラムに住む黒人の血圧は高いが、塩分はせいぜい1日7gと少なく、塩分を倍近く摂っている日本人やブラジルの白人の血圧と変わらない位高いこともわかります。このようなことから食塩と高血圧の関係は民族により人種によって異なる可能性があり、SHRSPなどモデル動物の研究によっても、遺伝子が関係することが分かってきました。

SHRSPは食塩感受性を有しており、食塩負荷時の血圧の上昇は普通のSHRとは違うことが確かめられています。ヒトでもその通りで食塩を負荷した際の血圧の上昇には確かに差があります。医学部の学生にボランティアになってもらい1日3gの低塩食を1週間食べ、25gの高塩食に切り替えると1週間で血圧は上昇します。再び減塩食にすると血圧は下がり、その反応は祖父母4人のうち3人以上が高血圧であるような医学生の方が、祖父母4人が全く正常血圧

の医学生に比べ血圧の上昇が大きく遺伝が食塩感受性に関係していると言えます。タンザニアの黒人、ブラジルの白人の医学生で1日の食塩摂取量を、3gから21gにして1週間、血圧がはっきりと上がったのは黒人で、ブラジルの白人も日本人も血圧は動揺して上がりますが、5日目には前値に戻っていました。ブラジルの白人も食塩に対して抵抗性があり、これは高食塩食を歴史的に摂りつづけていたヨーロッパからの移住者ですが、食塩に対して強い人が脳卒中にもならず生き延び、子孫を残せるからとも言えます。それに対し20世紀になるまで食塩を持たなかったアフリカの人々は食塩が無くても生きられる人々が生き延びたため、わずかの食塩でも血圧は上昇し感受性がかなりあるといえます。日本人ではせいぜい40%ぐらいが食塩に反応して血圧が上昇しますが、あらゆる人が食塩を食べると血圧が上がるのがアフリカの状態です。そんなわけで食塩感受性についてはヒトもラットも基礎的な研究する事がますます大事で、特に食塩感受性の遺伝子を見つけることがとりわけ高血圧の予防に大事だと言えます。

さて、SHRSPでは高血圧はマグネシウムを食餌に加えることで少し抑制され脳卒中も予防されております。

マグネシウムについて世界中で、24時間尿中にでてくるマグネシウムが増えると収縮期血圧も拡張期血圧も下げるように働くことがわかりました。血圧を上げる要因としてのナトリウムに対して、下げる要因としてはマグネシウム、そしてタンパク質が大切で脳卒中の予防にもマグネシウムやタンパク質をより多く摂って、血圧を下げるのが有効と考えられます。

1 1. 脳卒中のリスクファクターとその利用

脳卒中には食塩の摂取がリスクファクターとして関係します。この点ではヒトも脳卒中ラットと同じであります。食塩摂取が多いほど、とにかく脳卒中の年令調整死亡率が高く、日本国内でも東北の青森、北陸の富山など食塩の接摂取が多いところは脳卒中も多い。それに比べて、食塩摂取の少ない沖縄は脳卒中の死亡率も国内では最低で、京都は薄味で脳卒中は少ない方から11番目で比較的少ないといえます。世界中のデータから食塩を減らすと脳卒中の死亡率がゼロになると考えられる1日の摂取量は6.3gです。1日6gまで

減塩すれば、脳卒中がかなり防げる、脳卒中による寝たきりや痴呆も激減すると予想されます。脳卒中に関しましては、食塩摂取ともう一つ大事なことは、カリウムの摂取量です。SHRSP の実験でもそうですが、ナトリウムを与えると血圧はすぐ上がりますが、カリウムを与えますと、2 %位の塩化カリウムを含む水は飲みますのでこれで血圧は下がります。ナトリウムとカリウムのバランスが大事だと確かめられたわけです。

特に脳卒中の死亡率は尿中のナトリウムとカリウムの比率と有意の正相関し、例えば、世界で一番低い値はマサイ族で、0.9～1でした。マサイ族は、脳卒中の死亡率は分かりませんので、死亡率が調べられている集団では日本では静岡県が低く、ナトリウムのカリウムに対する割合は分子量で2倍となり見事な成績でした。日本では普通は3、4倍、そして中国になるとカリウムに対してナトリウムの摂取の多い内陸部では7、8倍で、カリウムの積極的摂取が必要です。ところが静岡県の人々はよくお茶を飲み、特産のみかんもおいしく、野菜も気候がよいのでたくさん食べカリウムの摂取が多く、ナトリウム摂取は全国平均とあまりに変わりませんが、ナトリウム対カリウム比が小さく、その分脳卒中の死亡率が低いといえます。このようなわけで、どのような食生活で脳卒中が減らせるのか、分かってきました。

次に血清コレステロールですが、脳卒中になる SHRSP では普通食で飼育するとコレステロールは低いのですが、コレステロールを負荷すると血圧の上がり方が抑えられ、脳卒中も減ることがわかりました。1970年代の後半ようやく日本人でも脳卒中はむしろコレステロールが低すぎるところで多い事がみとめられてきました。

世界中の調査でも血清コレステロール値がむしろ高い地域では脳卒中の死亡率も低く、しかし、コレステロールが高いと心筋梗塞が明らかに増加します。ここから言えることは、脳卒中を減らし、しかも心筋梗塞を増やさないちょうど良いコレステロール値が180と200mg/dlの間です。これがまさに日本では脳卒中も心筋梗塞も少ない沖縄の方々のコレステロールの平均値に相当します。このことから血清コレステロール値を中庸に保つような栄養条件は心筋梗塞、脳卒中とも少なくするといえます。それから、タンパク質の効果ですが、タンパク質の中のアミノ酸を色々調べてきますと、SHRSP ではタウリンなど含

流アミノ酸が血圧を下げることが分かりました。このときに交感神経がおさえられ、神経的に、とりわけ中枢神経にタウリンが働き交感神経の抑制から血圧が下降します。

また、タウリンは血清コレステロールに対して、降下作用があり胆汁酸としてコレステロールの排泄を高めるのが高脂血症の抑制機序です。血圧を下げて高脂血症を抑えるので、これは非常によい効果が期待できます。

實際上、タウリンの摂取量は、世界中の24時間尿中の排泄量でわかりますが、日本人は世界一多く摂っており、これはお魚を一番よく食べているからと申せます。世界のいろんな地域で24時間尿中タウリンを測定すると日本の地域のほとんどがトップに来て、ついで日本人からの移住者（ハワイ・サンパウロ）、それから地中海地方のギリシア・イタリアなどがつづきます。中国の海鮮料理を食べる地方すなわち、広州や上海が多く、この尿中のタウリン量は魚の摂取に由来することがわかります。魚介類の摂取が一番少ないのはチベットのラサで、ここは魚を食べたらいけない所です。これには宗教上の理由があり、先祖を水葬にしていますので魚は先祖の肉を食べ先祖の魂を宿していると信じており、絶対に魚は口にいたしません。そこでは高血圧は塩分を摂りすぎもあり、蛋白源がないので重症で、しかも多発し、脳卒中も多いのです。そこでチベットの人々に先祖の魂と関係のない養殖できる魚を日本から持っていくことを考えました。淡水魚で寒冷地にも適したイワナを養殖して、栄養源として食べてもらえれば脳卒中が予防できると考えたのですが、当時チベットでは反中国支配の暴動が起こり我々は入国できませんでした。そこでネパールのヒマラヤの麓にナンチェーバザールという、チベット人の難民が多く移住してきている所へ検診に参りました。ここでもやはり、高血圧の人が大変多く、海拔 3200m の高地ですからあまり野菜はとれず、しかもナトリウムは塩茶やヤクの塩漬けの肉を食べるので摂取過剰でした。そこでたった 3g のタウリンを 2 ヶ月間毎日摂ってもらったところ、拡張期血圧、収縮期血圧ともに下がりました。このような人間での臨床実験は動物実験と同じでバックグラウンドのデータがはっきりしているところ、すなわちもともとタウリンの摂取量が非常に少ないところでは大変効果が出やすいのです。これを日本人でテストしても、日頃から魚をたくさん食べていますからこれほど効果が出ないのです。

12. 心筋梗塞のリスクファクターとその制御

タウリンが血圧とコレステロールを下げるので、心筋梗塞に対して、予防効果があるといえます。実際、魚介類をよく食べる日本人のタウリンの摂取量が世界一多く、心筋梗塞が先進工業国の中では一番少ない。それについて、地中海地方の人々がタウリンの摂取量も多く心臓死が少ない。だいたいどれだけ魚を食べたらよいかは、尿中タウリンの量から換算すると一日魚 100g です。100g だと魚一切で日本人なら誰でも毎日食べれる量です。これで日本人は心筋梗塞が世界一低く、心筋梗塞が世界一低いからこそ、日本人の寿命は世界一長いといえます。平均寿命と心筋梗塞の死亡率は、強い逆相関があり、まさに心筋梗塞の少ないことが日本人の長寿を支えているのです。すなわち魚を日常食べている事が日本の長寿を支えているといえます。さて、魚には n-3、オメガ 3 という多価不飽和脂肪酸が多く、これを多く摂っている日本人では血液の磷脂質中に、DHA、EPA など n-3 系脂肪酸が 6%以上入っています。世界中を調べこのパーセントが 6%以上の集団はみな日本人です。一番多い所は、やっぱり静岡と富山県でいずれも漁港で有名な県で魚をたくさん食べ、心筋梗塞は非常に少ないと言えます。今年の夏も、スコットランドで日本食を食べていただく臨床実験をやってきました。スコットランドは、魚をほとんど食べません。北海に浮かんでいるルイス島という離島でこの調査研究をしましたが、ここの人たちは昔はバイキングであった伝統をすっかり忘れてしまい、魚を捕りに海に出ません。なぜ海で魚を捕らないのかと聞きますと、海は危険だからといっておりました。そんな危険なことをしなくても、羊を放牧して草を食べさせて育て、その羊の肉を食べていけば羊毛もお金になりますので豊かな生活が出来ます。しかも、羊を放牧していると、畑を作れず、葉野菜は植えても羊が全部食べてしまうから新鮮な葉野菜は手に入らず肉とパンとじゃが芋が主な食生活です。したがって、肉を食べて心筋梗塞になりやすいわけです。

心筋梗塞の予防に何を食べるのがよいかも一つヒントがありました。世界中で調べて、心筋梗塞に関しては、男女は極めて不平等です。世界各地の心筋梗塞の男女比をとりますと、女性の死亡率を男性のそれで割ると、0.3 とか 0.4 になります。女性は男性の 3、4 割しか心筋梗塞で死んでいない、女性ホルモ

ンは心筋梗塞から女性を守ってくれていると確かめられました。

実は女性も女性ホルモンがなくなる閉経期が問題です。血圧が上がり世界中で調べてみると、閉経期における血圧の上昇に有意差のあるところは欧米で、日本や中国は閉経期に有意の上昇はみられません。これらは大豆を常食している地域です。どうも閉経期に、女性ホルモンが欠乏したときに大豆がなにか良いことをしてくれているのではないかと、閉経期のコレステロールの上昇についても全く同じで、大豆を食べている地域では有意の上昇がみられません。そこで大豆の中に含まれる女性ホルモン、エストロジェンと構造の似ているイソフラボンに注目しました。24 時間尿を世界各地で集めているので、この中のイソフラボンの多い地域、すなわち大豆を食べているところでは更年期の血圧やコレステロールの上昇があまりないことがわかりました。そこで、更年期の血圧上昇に対するイソフラボンの効果を見るために卵巣を摘出した SHRSP で実験をしました。卵巣を摘出すると血圧が上がりますが、このときに大豆を食べさせておくと、イソフラボンがエストロジェンの代わりをするためか卵巣を摘出したときも血圧上昇が抑えられ、体重の増加も抑えられました。更年期障害でみられる血圧上昇や肥満の傾向が大豆イソフラボンで抑えられることがわかりました。そこでどうして血圧が抑えられるか、さらに実験的に調べました。これには血管を摘出しアセチルコリンで刺激して内皮由来の一酸化窒素 (NO) による血管拡張反応を観察しますと、卵巣を摘出したラットではこの反応が少なく、一方イソフラボンと大豆を与えておいたラットではこの反応がよいことが確かめられました。NO は血管平滑筋に働き血管を直接拡張させ血圧を下げ、また血管内皮細胞に血球や血小板が附着しないようにし血栓形成を防ぎます。心臓を養う冠動脈では特に NO が重要で、狭心症のときによく動くニトログリセリンは体内に NO を産生し、血管を拡張させるから即効性があるわけです。女性ホルモン、エストロジェンはこの NO を産生する酵素、NOS の活性を高めるため、女性は自前で血管拡張物質を作れるから心筋梗塞にはなりにくいと言えます。大豆イソフラボンはまさにこのエストロジェンの代わりをするため心筋梗塞の予防効果があると考えられます。実際、SHRSP の実験でも NO の代謝産物を測りましたが大豆イソフラボンを与えたグループではこの NO の代謝産物が増加していました。さらに最近、NOS の遺伝子がイソフラボンにより確かに

よく働き NOS の産生を高めていることも証明できました。

人間でもラットと同じで、ブラジルに移住された日系の方々と、とりわけ更年期の女性は常日頃全く大豆は食わず、大豆はブラジルでは牛の餌になっておりますので、イソフラボン 50mg を胚軸のふりかけにして食べていただいたところ、3 週間で血圧が下がりコレステロールも低下しました。

さらに世界中から集めた 24 時間尿中のイソフラボンを測定しその尿中排泄量が心筋梗塞の年齢調整死亡率と見事な逆相関を示すことを確かめました。イソフラボンの尿中排泄量からしてだいたい 50mg 摂取していると、心筋梗塞に日本並に抑えられると結論できます。この 50mg は豆腐にしたら 100g、半丁程度、納豆にしたら 1 パックで 50~60g、きな粉でしたら 20g で、日本人でしたらごく簡単に摂れる量で、そんなわけで日本人の心筋梗塞が少ないのは、実は、魚と大豆食の摂取によると考えられます。ですから、世界の人々が日本人のこのような食事をすれば、かなり心臓死は予防出来ると言えます。そこで世界一と言えるほど心筋梗塞の死亡率が高いスコットランドの人たちに 2 ヶ月にわたってイソフラボン 50mg をジェリーに入れて摂取してもらったところ血圧が下がることが確かめられました。この時、プラシボとしてイソフラボンを含まぬジェリーを食べたグループの人々と比較して NO の代謝産物の血中レベル量が多かったので、イソフラボンにより NO 産生が高まり血圧が下がったと考えられます。

1 3. 大豆イソフラボンと骨粗鬆症

高齢社会で問題になる寝たきりの第一の原因は脳卒中、第二の原因は骨粗鬆症による骨折ですが、骨粗鬆症の研究にも実は SHRSP は非常に役に立っております。WKY や SHR に比べても SHRSP は骨の Ca が少なく骨粗鬆症の病態が見られます。これは SHRSP を開発してくるときに毎日沢山のラットを解剖をしておりましたが、脳卒中病変を確かめるため頭蓋骨は、必ず、丁寧にあげないといけなかったのですが、これがあげやすい時に脳出血や脳軟化とかが多かったもので、骨のもろさと脳卒中は関係あるかと思ったのが最初です。この後、ラットの骨強度を測定する機械が開発され、さらにカルシウムを測りますと、SHRSP は生後 4 ヶ月ぐらいで骨塩量がピークになり、あと他の系統と違いこれが低下

することが分かりました。これで SHRSP は骨粗鬆症のよりよいモデルということになり、すでに NASA の骨粗鬆症の研究プロジェクトに取り上げられ、スペースシャトルにも乗せていただいて 18 日間、微小重力状態においてもらって地球上の対照群との比較研究が行われています。

さて、SHRSP で卵巣を摘出するとより早く骨粗鬆症となりますが、女性ホルモン作用のあるイソフラボンや大豆そのものを餌として与えますとこの変化が抑制されることが分かりました。本来、女性ホルモンは破骨細胞の働きを抑制しますが、大豆イソフラボンはこれに代わって破骨細胞の活性を抑えて、骨からのカルシウムの放出を抑制するからです。そこでブラジルに移住している日系の方々は常日頃は大豆を食べず、イソフラボンがあまりとれていないのでイソフラボン 50mg を毎日摂っていただいたところ、3～10 週間で尿中のイソフラボンが沖縄の人並みに高くなり、この時骨のマトリックスが分解されカルシウムが放出されたときに出てくる、ピリジノリンやデオキシピリジノリンがはっきり減少しました。すなわち、大豆イソフラボンが女性ホルモンの代わりをして骨からのカルシウムの放出を抑制することが分かりました。さらに、実際にこれが骨密度に影響するかどうかをハワイに移住して世界一の長生きになった 70 歳以上の日系の方々に骨密度を測定し証明できました。骨密度の高い人々は、低い人々に比べて 24 時間尿中のイソフラボン量が有意に高かったのです。すなわち、日系の沖縄出身のお年寄りなので聞き取り調査でもお豆腐を沢山使った沖縄式の味噌汁を毎日食べている人は尿中イソフラボンも高く骨密度が高く、逆に食習慣を聞いてみても豆腐が手に入りやすくトーストとコーヒーの朝食をしている人ではイソフラボンの尿中排泄量も少なく骨密度も低く骨粗鬆症の傾向がみられたのです。

14. 寝たきり、痴呆は予防できる

高齢社会の現状は深刻で、寝たきりの方も増え続けています。寝たきりがいかに大変な病気であるかは厚生省の統計でも寝たきりになった時に、1 年ですむ人が 20%、3 年未満ですむ人が半分、半分以上は 3 年以上、5 年を越す人は 1/3、10 年覚悟しなければならない人は 12.3%、すなわち寝たきりになったら、10 年寝ていなければならない人が 8 人に 1 人はおられるわけです。せっかく長生

きしても、これでは単なる長生きで、本当の長寿とは言えない、この日本の現状は何とかしなければなりません。脳卒中をおこす SHRSP が教えてくれますように、またこれまでの WHO-CARDIAC 研究でも分かったように寝たきりの原因の 40%は脳卒中ですが、これは食塩の摂取を 1 日 6g 以下に減らしますと激減し、ハワイの日系人のように寝たきりも痴呆も少ない長寿が可能です。寝たきりの第二の原因が骨粗鬆症でおこる骨折です。脳卒中とあわせて 54%、半分以上の寝たきりの原因は食事で予防できるのです。まさに、寝たきり、痴呆という高齢者の QOL を障害する最大の原因は脳卒中、骨粗鬆症などの生活習慣病で栄養で予防が可能であるといえます。中国語では栄養の“栄”は営むという字を書くのですが、最初、中国の人は字を間違えているのかと思いましたが、これが本来の“營養”の意味、すなわち食を営み、生を養う“營食養生”を短くし、“營養”となったわけです。食をコントロールして、命を養うというのが元々の言葉で非常に意味が深く、正にその通りだと思います。寝たきりや痴呆の原因となる生活習慣病の発症には遺伝が関与し環境が影響します。環境の中でも食環境は最も大きく影響するのでこれをコントロールすることが生活習慣病を予防し真の長寿の実現につながります。生活習慣病はたとえその遺伝子を有していても栄養で遺伝子の発現をコントロール出来ます。栄養によってコントロール出来るとなれば、脳卒中、あるいは骨粗鬆症など生活習慣病の遺伝子は早く見つけて痴呆の発症を予知し積極的に栄養によってコントロールする。すなわち、発症前に生活習慣病を予防する、予知・予防医学が 21 世紀にはこれまでの診断・治療医学にとってかわると期待されます。

14. モデル動物の貢献

実験動物で研究をなされる方々に、実験動物こそ新しい予知・予防医学に貢献する、その重要性を最後に申し上げたいと思います。SHRSP や SHR など、私どもは多くの関連した亜系を苦勞して維持してきました。ヒトでも様々な病態があるようにこれらの亜系は様々な特色を有しています。WKY はこれらの高血圧、脳卒中の対照系ですが、この WKY は今世界中で問題になっております。同じ WKY といっても私どもの系統と NIH からチャールスリバーに渡されて世界中に広がった系統とでは違うのです。そのことが、世界中の研究に大き

な影響を与えています。例えば、染色体の一番の上の SA という遺伝子は高血圧と関連して大変注目されました。SHR とチャールスリバーの WKY との間では SA に大きな差がありますが、私どもの WKY と比べると全く差がありませんので SHR の高血圧の本質にかかわる遺伝子ではないことはすぐわかります。SHRSP や SHR で注目される遺伝子は必ず日本のオリジナルの WKY(WKY/Izm) と比較検討してみる必要があります。最近も SHR のインシュリン抵抗性に関係する遺伝子が注目されましたがこれも WKY/Izm と比べると差は全くなく SHR や SHRSP の本質的なインシュリン抵抗性との関係がないと申せます。これらのモデル動物については遺伝的に均質の系統を用いないと誤った結論に至ることも多いわけです。そこで私どもの京大で分離し、その後島根医大で 16 年以上継代し均質な遺伝子を有するモデルを SHRSP/Izm、SHR/Izm、WKY/Izm として「SHR 等疾患モデル共同研究会」で提供できるようにしております。さらに 10 年近くかけて SHRSP の高血圧に関与する遺伝子座位を WKY に入れたり、SHRSP の高血圧関連遺伝子座位を WKY のそれと入れ替えたコンシュニク系の開発に努めて来ましたが、これらの高血圧遺伝子がどのような機能で高血圧を発症するかを追求するにあたってやはり前述の共同研究会で均質のコンシュニクの系統を提供し、この方面のこれからの研究の推進をはかりたいと考えております。

おわりに、現在、生活習慣病は、診断して治療している分けですから患者になってからはじめて役に立つのが医学です。しかし、SHRSP などの実験動物でも分かってきてますように生活習慣病の発症に関与する遺伝子は確かにあります。まだ、これらの遺伝子がどのような生理・病態機序を有し、疾患の発症に関係しているかは不明です。いずれ、それがはっきり分かってきますと、これは食環境などにより予防できると先に証明されていますので、積極的にこれを検出し疾患を予知し一次予防をすすめるべきです。食塩感受性の遺伝子があれば食塩をただ単に減らすのではなく、食塩を減らしながらも食塩の害を打ち消すような食材をうまく活用して楽しく暮らせるような食習慣、ハワイとか広州とかの食習慣を身につけるようにすればよいわけです。まさに薬に頼らずに、栄養によって病気にならない、とりわけ、生活習慣病に関しては、病気になる

前に、発症の根本で抑えてしまうことが出来るわけです。毎日毎日の食生活でそれが可能なのです。すなわち医者が主役である治療医学ではなく、薬ではなく、毎日の食生活を自分でコントロールし生活習慣病を予防する、みんなが主役となれる、まさに医食同源を基礎とするのが予知・予防医学なのです。例えば遺伝子を有していても栄養によって遺伝子の支配を克服できる時代になってきました。これが名言出来るようになったのも実験動物の研究で、脳卒中の遺伝子があっても、栄養で脳卒中にならない、脳卒中は確実に予防できることが分かったからです。そんなわけで疾患モデル動物の開発とそれを用いた疾患の予知・予防の研究は未来医学の基礎だと思います。秀でたモデル動物の開発とそれによる新しい世紀の医学研究が今後ますます発展することを期待したいと思います。

〈第65回研究会（平成12年3月3日）〉

テーマ：「実験動物の国際化を巡って」

1. Informatics in Laboratory Animal Science —International Standards

Ken Boschert (Comparative Medicine, Washington Univ.)

Informatics in Laboratory Animal Science – International Standards
Kansai Laboratory Animal Science Association - February 29, 2000

Kenneth Boschert, DVM
Washington University
Division of Comparative Medicine
Box 8061, 660 S. Euclid Avenue
St. Louis, MO USA 63110
Phone: (314) 362-3700
Fax: (314) 362-6480
Email: ken@dcm.wustl.edu

Abstract

In human and veterinary medicine today, there are numerous efforts ongoing efforts to establish international standards, many of which have significant implications for laboratory animal science. Worldwide cooperation in developing animal-related standards has had some previous success. Efforts such as those of the International Standards Organization (ISO) and the Council for International Organizations of Medical Sciences (CIOMS) have established relatively successful programs that had broad and cooperative input from many sources.

Some of the major topics of concern currently involved in standards setting and the organizations behind them include: 1.) Animal care and use principles - the Association for Assessment and Accreditation of Animal Care (AAALAC International); 2.) Medical nomenclature, SNOMED, HL-7, DICOM – the American Veterinary Medical Association (AVMA); 3.) Professional certification – joint efforts of the American, European and Japanese Colleges of Laboratory Animal Medicine (ACLAM/ECLAM/JCLAM); 4.) Animal models and lab animal genetic nomenclature – Institute for Laboratory Animal Research – US National Academy of Science (ILAR), and 5.) Animal care and use committees, online investigator training, network communications and rodent microbiologic and genetic monitoring - the American Association for Laboratory Animal Science (AALAS). Other projects worthy of mention that are not necessarily standards, but are nonetheless important from an international perspective include the NORINA Audiovisual Repository and the Johns Hopkins AltWeb database, a central source for animal alternatives resources.

The principle reason standards are used in human medicine today is based on economics. This is not always the motivating factor in veterinary medicine and animal research standardization, however, there are several active areas which veterinarians and laboratory animal scientists should be aware of and monitor. Other influences affecting standardization include the roles of government, science, computer programs, medical records, genomics, professional qualifications, and communications. Not only should laboratory animal scientists track these developments, they should be active participants in helping discuss and create the standards. Otherwise, the result may be that the standards are imposed without their input and could be more difficult to achieve or comply.

実験動物科学に関する情報科学—国際的標準

関西実験動物研究会

2000年2月29日

ケネス ボシャート DVM

ワシントン大学比較医学教室

Box 8061、660 S.Euclid 通り

セントルイス(MO)

アメリカの 63110

電話:(314)362-3700

ファックス:(314)362-6480

電子メール:ken@dcm.wustl.edu

(翻訳:黒澤努)

アブストラクト:今日のヒト医学および獣医学では、多くの努力がなされました。国際的標準(それらの多くは実験動物科学にとって重要な意味合いを持つ)を確立するための努力が進展し、動物に関連する標準策定の世界的な協力はある程度の成功を収めました。国際標準化機構(ISO)、および医学(CIOMS)の国際機構のための委員会が行った努力により、多くの出所からの情報を広く協同して収集を行い、計画されたプログラムは比較的成功しました。標準策定に現在関与する主なトピックおよびそれらの背景の組織のうちのいくつかは、次のものを含んでいます:

1. 動物愛護および使用の原則-動物愛護(AAALAC インターナショナル)の評価および認可のための協会
2. 医学用語の命名法、SNOMED、HL-7、DICOM、アメリカの獣医学会(AVMA)
3. 実験動物医学(ACLAM/ECLAM/JCLAM)のアメリカの専門医協会、ヨーロッパの専門医協会および日本の専門医協会の認定における協調努力
4. 動物モデルと遺伝命名法: 米国実験動物研究所 (ILAR)、米国国立アカデミー、
5. 動物実験委員会、-米国実験動物学会(AALAS)、オンライン研究者向けトレーニング、ネットワーク・コミュニケーション、およびげっ歯動物の微生物学および遺伝学的モニタリング。必ずしも標準でないが、国際的な観点からそれにもかかわらず重要な言及にふさわしい他のプロジェクトは、NORINA の視聴覚のデータベースおよびジョンズ・ホプキンス大学の AltWeb データ・ベース(動

物実験代替法のための中央的資源)を含んでいます。原則的な基準は今日の人間の医学の中で使用されている、経済学に基づきます。これは必ずしも獣医学および動物研究標準化の動機づける要因だけとは限りません。獣医師および実験動物科学者が知っているべきであってモニターするべき、いくつかの活発な分野があります。標準化に影響する他の影響は、政府、科学、コンピュータ・プログラム、カルテ、genomics、専門の資格および communication の役割を含んでいます。実験動物科学者はこれらの開発を追求するだけでなく、標準について議論し、作成することを支援する活動的な参加者であるべきです。そうでなければ、結果は、標準がこうした科学者の情報なしで作られ、達成するか応じることが困難になりえるということになりかねません。

本翻訳は excite : <http://www.excite.co.jp/world/text/>を用いて仮翻訳を行い一部を改訂しております。

〈第66回研究会（平成12年6月2日）〉

テーマ：「医薬品開発の前臨床試験における新しい動向と国際戦略を
考える」

1. 医薬品の創薬・開発研究における毒性試験の新しい動向

堀井 郁夫（日本ロッシュ(株)研究所）

1. 医薬品の創薬・開発研究における毒性試験の新しい動向

堀井郁夫 (日本ロシュ研究所・前臨床科学研究部)

近年、創薬における Molecular targeting が Genomics を基とし積極的に取り入れられ、それに加えて Combinatorial chemistry 等の新技術の導入により、短期間で多くのスクリーニングすべき化合物が合成できるようになり、少量で多種類の化合物について毒性を調べる必要性が出てきた。それを High Throughput Toxicology と呼んでいる。それに対応する為に新しい in vitro / in vivo screening system の開発・導入の必要性が生じるとともに Toxicogenomics 面での毒作用評価がクローズアップされて来ている。即ち、「生体に対する毒作用が関連遺伝子の異なる遺伝子発現の変化によるものである」という概念から (1) その遺伝子変化を検知する事は、それから続発する毒作用の早期予測・警告につながる。(2) 遺伝子発現解析の簡便化・自動化の導入は、毒作用機序解明のために細胞の分子レベルでの働きの総合的・複合的検索を可能にする。更に、Toxicogenomics は、創薬面での必要性のみでなく副作用・毒作用の作用機序を考究する上で重要であり、臨床開発・市販前後の副作用情報との関わりなど広範囲な有用性も期待されている。

このような背景からの毒性評価を考慮した場合、創薬に関しては (1) 創薬の早期における毒性評価 (2) 人への外挿を考慮した毒性試験実施・評価 (3) 得られた Know-how や新しい Technology をどうするか? (4) どのように効率よく Reporting していくか? にどう取り組んで行くかが重要となる。創薬の初期に実施される In vivo HTP-Tox 試験としては、少量の薬物を用いて、短期間の内に答えを出すことが必要なことから、小動物を用い (必要であればサルを使用)、少ない動物数 (2~3 匹)、少ない群 (1~2 group)、短期間 (3~5 日)、比較的高用量で実施することになる。この実験の条件は、供給される化合物量により決まり、毒性を検出するための感度の高い特異的なパラメーター、早い病理標本作成方法、テレメトリーシステムの導入等により、標的部位やその機能について、適切にまた素早く評価を下していかなければならない。これらの評価にあたっては、主要臓器およびその薬物の標的臓器を用いた細胞による In vitro cell culture system や Gene chip system を利用することにより、より有意義な結果が得られると考えられる。In vitro cell culture system や Gene chip system はそれ自体、一つの Lead compound のスクリーニングシステムとして有用である。

いずれにしても毒性試験法・評価そのものが各開発段階 (Lead selection から Candidate selection, Entry-into-human, 臨床研究時、申請時、市販後) で変遷しながら薬の安全性が評価されて行く時代になって来ている。

〈第67回研究会（平成12年9月22日）〉

テーマ：「高次神経機能を動物実験により解明する」

1. プログラム細胞死の人為的操作による神経疾患治療の試み
三浦 正幸（理化学研究所脳科学総合研究センター）

プログラム細胞死の人為的操作による神経疾患治療の試み

三浦正幸

理化学研究所脳科学総合研究センター細胞修復機構

【要約】

中枢神経系 (CNS) の神経軸索を包むミエリン鞘が自己免疫異常により脱落する疾患として多発性硬化症 (MS) とその動物モデルの一つである実験的自己免疫性脳脊髄炎 (EAE) が知られている。この疾患治療では中枢神経内に浸潤するT細胞やマクロファージなどの炎症細胞とそれらが放出しミエリンを障害するサイトカインの制御が重要である。CNSでミエリン形成を行うオリゴデンドロサイト (OLG) は以前から培養系において腫瘍壊死因子 (TNF- α) やインターフェロン (IFN- γ) などのサイトカイン投与でカスパーゼを介した細胞死を起こすことが知られていた。そこで我々は実際の病態においても OLGが標的となり細胞死により脱落することで脱髄が起こることを想定し、cre-loxPシステムを応用した2種類のトランスジェニックマウスを作製して交配することで成熟OLGに広範なカスパーゼの阻害分子であるバキュロウイルス由来p35を発現するマウスを得た。p35発現マウスにEAEの誘導刺激を加えたところ、有意に発病が抑えられ脊髄OLGの脱落も抑制された。Caspase-1系の分子はサイトカイン産生に関与することも知られており、caspase-11ノックアウトマウスにEAEを誘導すると発病の著明な抑制とIFN- γ 及びIL-1 β の有意な減少が観察された。Caspase-11はCaspase-1の活性化のみならず、直接Caspase-3を活性化することが示されているが、我々の解析によって、Caspase-11が細胞自律的、細胞非自律的両方のメカニズムによってEAEにおけるオリゴデンドロサイト細胞死および疾患の進行に関与していることが明らかになった。

【1.脱髄疾患】

CNSにおけるグリア細胞の役割は単に神経細胞の支持や酸素、栄養分子の供給だけでなく、神経発生、シナプス形成の制御、あるいは神経シグナル伝達の機構にも関与している。グリア細胞の一つであるOLGは神経軸索に髄鞘を形成し、そのinternodeに相当するランビエ絞輪は跳躍伝導に必須な形態である。成体ラットの視神経には約30万個のOLGがあり、一個のOLGは平均15個の髄鞘を形成すると考えられている。OLGに限らずグリア細胞のCNSにおける比率は哺

乳類でも高等になるほど高くなり、複雑に交差する神経シグナルをより高速で正確かつ効率的に伝達するためにグリア細胞の果たす役割は極めて重要である。OLG細胞死は概して次の3つのケースで観察される。(I) 正常な発生段階 (II) 遺伝的なミエリン形成不全 (III) 完成されたCNSにおいて成熟OLGが何らかの外的原因で脱落する脱髄疾患の3つである。(II) ではCNSミエリン構成蛋白質のうち最も含有量の多いproteolipid protein (PLP) 遺伝子の異常であるjimpy (第5エキソンのスプライシングアクセプター部の変異) とmsd (PLP(A242V)のミスセンス変異) マウスが著明な脱髄をきたすことが知られ、ヒトの先天的遺伝性脱髄疾患Pelizaeus- Merzbacher病のモデルと考えられている。この疾患モデルにおいては組織学的にOLGのアポトーシスが認められている¹⁾。本稿では (III) について成熟OLGに細胞死をもたらす分子機構を特にアポトーシス実行遺伝子caspaseファミリーの関与を中心に我々の知見を合わせて論じたい。

【2.脱髄疾患におけるOLG細胞死】

【2-1 多発性硬化症、実験的自己免疫性脳脊髄炎の発症機序】

脱髄が生じる代表的なCNS自己免疫性疾患として多発性硬化症(Multiple Sclerosis=MS)が挙げられ、病因は不明な神経難病の一つに数えられている。MSの動物モデルとしてミエリン構成蛋白質であるミエリン塩基性蛋白質(MBP)やmyelin oligodendrocyte glycoprotein(MOG)を脳脊髄炎起炎性ペプチドとして投与する実験的自己免疫性脳脊髄炎(Experimental Autoimmune Encephalomyelitis=EAE)、タイラー脳脊髄炎ウイルス(TMEV)を感受性マウスに投与する免疫性脱髄疾患(TMEV-IDD)の2つが最も研究されている。現在のところ発症機序として概ね認められている概念は次のような機序である。末梢においてEAEの場合はミエリン構成蛋白質の一部、MSの場合はミエリン蛋白質と何らかの形で交差する抗原に感作された特異的反応性を有するCD4陽性Th1細胞が増殖を開始する。炎症により血液-脳関門(Blood Brain Barrier=BBB)が破壊され透過性が上昇した結果、T細胞やマクロファージといった免疫担当細胞がCNSに浸潤しさらに増殖する。これらがtumor necrosis factor (TNF)- α , interferon (IFN)- γ , lymphotoxin (LT)などの細胞障害性サイトカインを分泌する。これらが髄鞘部位あるいはオリゴデンドロサイト細胞本体を攻撃した結果、髄鞘がaxonから脱落し脱髄が成立する(図1)。脳炎起炎性T細胞など浸潤細胞はアポトーシスを起こすことが知られており、それによって疾患活動性が低下する可能性が指摘されている。

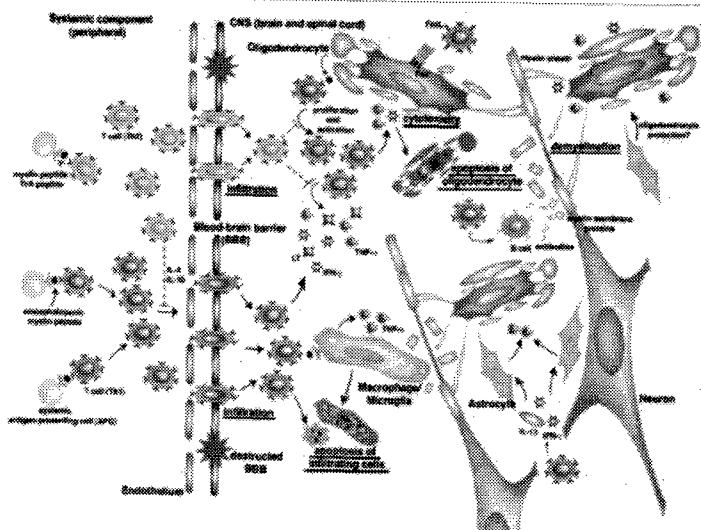


図1 自己免疫性脱髄疾患の発症機序

抗原に感作された脳脊髄炎起炎性Th1細胞がBBBを越えCNSに浸潤する。TNF- α , IFN- γ , LTなどの細胞障害性サイトカインを分泌し、OLGに障害を与え脱髄が生じると考えられる。アストロサイトやマクロファージ・ミクログリア系細胞も炎症を増悪させる動きをされると考えられる。Th2細胞はinterleukin-4, 10などでTh1細胞の働きを抑制する効果がある。

【2-2 脱髄疾患におけるOLG細胞死】

我々の他にもD'Souzaら(1)は難治性てんかん患者を手術したりヒト胎児から直接得た脳組織からOLGを取り出し培養し、TNF- α を添加したところTUNEL陽性細胞が増加していることを観察している。またD'Souzaら(2)は同様な実験方法で培養OLGにFasが発現しており、Fas ligand(FasL)を投与すると24時間後に膜溶解を示唆するLDHの放出が生じることも明らかにしている。但しこの報告においてTUNEL法ではFasL刺激96時間後でも陽性になったOLGは少ないと報告しており、他の培養細胞系で観察される急速に進行するアポトーシスとは異なる現象であることも示唆されている。またLTも培養OLGにアポトーシスを誘導することが報告されている(3)。OLGのサイトカインの受容体としてはTNF受容体ファミリーとして総称される一群が存在しており少なくともTNF, IFN, FasLに対する受容体が確認されている。Dowlingら(4)はMS患者の剖検脳を用いて白質に散在する脱髄巣(plaque)中の細胞を各種細胞のマーカーの免疫染色とTUNEL染色を併用してアポトーシス細胞の構成を明らかにしている。それによると15%程度がOLGマーカー陽性であった(60%強がマクロファージ・ミクログリア、20%程度がアスト

ロサイト、数%がT細胞)。これは急性期のplaqueの結果であり、慢性期のplaqueでは細胞死を起こすOLGの比率は30%強へ増加している。Akassoglouら(5)はCNSに特異的にTNFを発現させたトランスジェニックマウスを作製した。このマウスは成長に伴って強い脱髄を自然発症する。このマウスのCNSの組織所見ではOLGが生後1週齢からアポトーシスを起こしていた。このマウスをTNF受容体1(TNFRp55)のノックアウトマウスと交配させると脱髄所見の軽減を認めた。この報告は自己免疫性脱髄疾患におけるOLGの細胞死を直接証明するものではないが、TNFが*in vivo*においてもOLGに対して細胞障害性を有することを示しており興味深い。しかしながら一方でMSにおけるOLGの細胞死に関して否定的な見解を示す報告もある。Bonettiら(6)は慢性期MS患者の剖検脳の免疫組織染色において脱髄巣端や白質に隣接した部位に存在するOLGにはTNF受容体やFasは発現しているにもかかわらず、TUNEL陽性だったものはないと報告している。Raineは(7)この報告を含めた過去の報告からMSの病理組織像にOLGの細胞死は観察されないと結論づけたreviewを報告している。またEAEにおいては元来脱髄所見がややMSと比較して軽度な傾向であることもあり、OLG細胞死に関して論じた報告はほとんどない。浸潤細胞の細胞死についてはGoldら(8)の総説に詳しく、LewisラットのEAEではアポトーシス細胞の64%がT細胞であったと報告がある。EAEの死細胞の検討ではマクロファージ系の比率は低いとされており、Dowlingら(4)のMS plaqueの所見とは異なっている。いずれにしろ現状ではMSやEAEにおいてOLGに対する細胞障害性がアポトーシスを含むのか、またそれが病態に有意な影響を及ぼすのか必ずしも明確ではない。この原因の一つとしてOLG細胞体を特的に認識する優れた抗体が少ないことがあげられる。OLGマーカーとして使われているものはほとんどがミエリンを認識するものであり、OLG細胞死の検定に正確な判断を下すのが難しいのが現状である。この点を改善するために、我々はPLP mRNAを*in situ hybridization*によって検出しOLG数の変化を調べている。

【2-3 OLG細胞死とカスパーゼファミリー】

アポトーシス実行分子カスパーゼファミリーは現在では哺乳類で14個が同定されこれら分子は役割により主に3つのサブファミリーに分類される。最終的に細胞核を崩壊させる経路に関しての知見も蓄積され2つのCaspase活性化経路が明らかにされている。一つはTNF, Fas リガンドなどのサイトカインを細胞死シグナルとしてこれらの受容体が受け取った後、シグナル伝達の機能を持つCaspase-8がはじめに活性化され、引き続いてCaspase-3が活性化されるものである。もう一つは細胞死刺激によって、細胞内ミトコンドリア膜の透過性が崩れミトコン

ドリア膜間に存在するチトクロームcが細胞質に放出されこれがApaf-1とともにCaspase-9を活性化し、最終的にCaspase-3が活性化される経路である。*in vitro*の実験において我々はTNF- α によるOLG細胞死にはCaspaseが関与することを示した(9)。さらにオリゴデンドロサイト細胞死実行機序をカスパーゼとの関わりを中心に明らかにしていくために、オリゴデンドロサイトで特異的にカスパーゼ阻害遺伝子を発現するモデルマウスを作製することに成功した(10)。具体的にはcreリコンビナーゼをオリゴデンドロサイトで特異的に発現させるために発現特異性の高いミエリン塩基性蛋白質(MBP)遺伝子プロモーターの下流にcre遺伝子を連結した発現ベクターを構築し、トランスジェニックマウスを作製した(MBP-cre)。また、様々な組織で強い転写活性を持つCAGプロモーターの下流にloxP stufferを持ち、さらにその下流に目的の遺伝子を組み込むことが出来る発現ベクターにカスパーゼ阻害遺伝子p35を組み込んだloxP- p35 トランスジェニックマウスも作製した。MBP- cre トランスジェニックマウスとloxP- p35 トランスジェニックマウスの交配によって得られたF1でp35がオリゴデンドロサイトで発現していることを確認した。F1 マウス由来のOLGはTNFによる細胞死に耐性を示した。このF1でのEAE感受性を検討したところ、病態の進行及び脊髄でのOLG細胞死が抑制された(図2)。病態像で予期しなかったのはOLG細胞死が抑制されるのみならず、免疫担当細胞の浸潤も減少していたことである。OLG細胞死の抑制によって二次的な炎症反応が抑えられ、その結果細胞浸潤が抑制されたものと考えられる。これらの結果から、EAEの発症と進行にはCaspaseを介したOLG細胞死が重要な役割を果たすことが強く示唆された(10)。

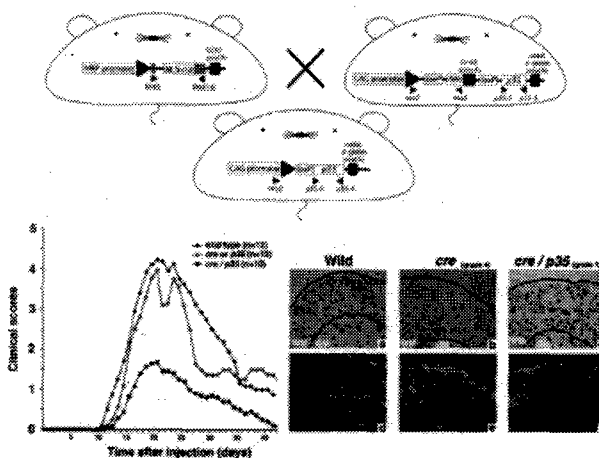


図2 OLGでのp35発現によるEAE病態の改善

OLGで特異的にCreリコンビナーゼを発現するマウスと、loxP- p35マウスを交配させることによって、OLGでp35を発現させた。p35発現マウスではEAE発症と脱髓の抑制が観察された。

【2-4 Caspase-11のEAE発症への関与】

Caspase-1, -11を含むCaspase-1サブファミリーは炎症の制御あるいは炎症に伴って見られる細胞死において関与が大きいと考えられる分子群である。Caspase-11はCaspase-1とCaspase-3の活性化を正に制御することが知られている。炎症と細胞死を特徴とするEAEにおいてCaspase-1サブファミリーが重要な役割をしていることが予想される。合成MOGペプチドをC57BL/6マウスに投与しEAEを誘導し、病状がピークに達した時点で脊髄のライセートをCaspase-1, -11抗体でウエスタンブロットするといずれもが強く発現上昇していた(11)。さらに脊髄の免疫組織染色でOLGにはCaspase-1, -11に加えて活性型Caspase-3が強く発現していた。組織所見ではOLG以外にもT細胞やマクロファージ・ミクログリアにもこれらが強く発現していた。また白質においてミエリン構成蛋白質の一つであるPLPのin situ hybridizationを行ったところEAEではPLP陽性のOLGが明らかに減少しており、残存しているPLP陽性OLGの約10%が核が濃縮化あるいは断片化といったアポトーシスに特徴的な形態を示していた。このような細胞死が決定されたOLGのほぼ全てに活性型Caspase-3が発現していた。さらにcaspase-11のノックアウトマウスからOLGを取り出しサイトカインに対する感受性をコントロールと比較したところTNF- α , IFN- γ , 抗Fas抗体のいずれにも有意な低下を認め細胞死が生じにくくなっていた。従ってこれらの結果からEAEのある時期においてはOLGがCaspase-11やCaspase-3の関与によりアポトーシスによって脱落すると考えられる(11)。実際にcaspase-11ノックアウトマウスはEAEの感受性が著しく低下し、OLG細胞死と免疫担当細胞の浸潤が抑制されていた。EAEでは浸潤したT細胞などの免疫細胞内で活性化されたCaspase-1はinterferon- γ inducing factor (IGF) やinterleukin-1 β (IL-1 β) を活性化することが可能であろう。これらのサイトカインは他の浸潤細胞に働きかけて細胞障害性サイトカインの分泌を亢進させると考えられる。EAE刺激をほどこした脊髄のサイトカインレベルを調べるとcaspase-11ノックアウトマウスでは脊髄でのIL-1 β やIFN- γ レベルが野生型に比べて顕著に低下していた(11)。これらの実験結果から、EAEにおいてCaspaseファミリーのOLGに対する障害はOLG内部の分子が直接細胞死を誘導するcell-autonomous effect (Caspase-11からCaspase-3の活性化を伴う経路)と浸潤細胞の分子がサイトカイン産生を正にコントロールし、間接的にOLGの障害を促すnon cell-autonomous effect (Caspase-11からCaspase-1の活性化を伴う経路)の2つがあると考えられる(図3)。

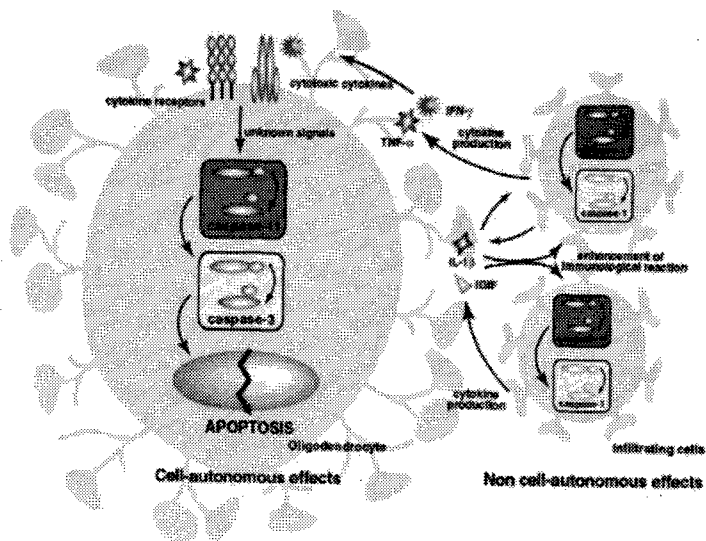


図3 カスパーゼファミリーから見たEAEにおけるOLG細胞死

OLGに内在するCaspase-11やCaspase-1がサイトカイン刺激により何らかの経路で活性化され、最終的に最下流に位置するCaspase-3の活性化でOLGはアポトーシスを起こす。一方T細胞などに内在するCaspase-1サブファミリーも活性化されIGF, IL-1bといった浸潤細胞からのサイトカイン分泌を正に制御する分子を産生すると考えられる。すなわちCaspaseファミリーには直接OLGの細胞死に関与するcell- autonomous effectとサイトカインの産生の制御で間接的に関与するnon cell-autonomous effectがあると考えられる。

【3. おわりに】

今回の実験によって生体でのカスパーゼ活性を人為的に操作することにより、EAE発症にOLG細胞死が重要な役割を果たしていることが初めて示された。さらに、Caspase-11ノックアウトマウスを用いることによってこのCaspaseが細胞自立的及び非自立的な作用によってOLG細胞死に関与することが明らかになった。さらに我々は本稿で扱ったEAEに加え、虚血脳でのOLG細胞死にもCaspase-11が関与していることを明らかにしている(12)。個体レベルでの細胞死操作によって、それぞれの神経変性における細胞死の役割を明らかにし、治療への応用を考察することが重要であろう。

【参考文献】

1. D'Souza S, Alinauskas K, McCrea E, et al. Differential susceptibility of human

CNS-derived cell populations to TNF-dependent and independent immune-mediated injury. *J. Neurosci.* 1995; 11:7293-7300

2. D'Souza S.D, Bonetti B, Balasingam V, et al. Multiple sclerosis: Fas signaling in oligodendrocyte cell death. *J. Exp. Med.* 1996; 184: 2361-2370

3. Selmaj K., Raine C.S, Farooq M, et al. Cytokine cytotoxicity against oligodendrocytes. Apoptosis induced by lymphotoxin. *J. Immunol.* 1991; 147: 1522-1529

4. Dowling, P, Husar W, Menonna J, et al. Cell death and birth in multiple sclerosis brain. *J. Neurol. Sci.* 1997; 149: 1-11

5. Akassoglou, K., Bauer J, Kassiotis G, et al. Oligodendrocyte apoptosis and primary demyelination induced by local TNF/ p55TNF receptor signaling in the central nervous system of transgenic mice: models for multiple sclerosis with primary oligodendroglialopathy. *Am. J. Pathol.* 1998; 153: 801-813

6. Bonetti B, Raine C.S. Multiple sclerosis: oligodendrocytes display cell death-related molecules in situ but do not undergo apoptosis. *Ann. Neurol.* 1997; 42: 74-84

7. Raine, C.S. The Norton Lecture: a review of the oligodendrocyte in the multiple sclerosis lesion. *J. Neuroimmunol.* 1997; 77: 135-52

8. Gold R., Hartung H-P, and Lassmann H. T-cell apoptosis in autoimmune disease: termination of inflammation in the nervous system and other sites with specialized immune-defense mechanisms. *Trends Neurosci.* 1997; 20: 399-404

9. Hisahara S, Shoji S, Okano H, et al. ICE/ CED-3 family executes oligodendrocyte apoptosis by tumor necrosis factor. *J. Neurochem.* 1997; 69: 10-20

10. Hisahara S, Araki T, Sugiyama F, et al. Targeted expression of baculovirus p35 caspase inhibitor in oligodendrocytes protects mice against autoimmune-mediated demyelination. *EMBO J.* 2000; 19: 341-348

11. Hisahara S, Yuan J, Momoi T, et al. Caspase-11 mediates oligodendrocyte cell death and pathogenesis of autoimmune-mediated demyelination. *J. Exp. Med.* 2001; 193: 111-122

12. Shibata M, Hisahara S, Hara H, et al. Caspase determine the vulnerability of oligodendrocytes in the ischemic brain. *J. Clin. Invest.* 2000; 106: 643-653

〈第68回研究会（平成12年12月3日）〉

特別講演

「SL/Kh マウスの Pre-B リンパ腫発生の遺伝機構」

日合 弘（京都大院・医・病態生物医学）

特別講演

「サル（ニホンザル、カニクイザル）ES 細胞株の樹立とこれからの展開」

鳥居 隆三（滋賀医大・医・動物実験施設）

SL/Kh マウスの Pre-B リンパ腫発生の遺伝機構

日合 弘

京都大学大学院医学研究科基礎病態学講座病態生物医学

序：どうしてまだマウスのリンパ腫を研究しているのか

マウスの自然発生リンパ腫の多くは内在性レトロウイルスによるものである。その発病機構の基本戦略はおおむね解明されたとはいえ、発病過程は宿主の遺伝的環境との複雑な相互作用の元にあり、十分理解されていない。一方、最近開発された Inverse PCR 法はウイルス挿入箇所の塩基配列のクローニングを容易にし、ホットスポットで活性化されている宿主遺伝子はこれまで発癌とのつながりが考えもつかなかった細胞内シグナル伝達因子である場合が少なくない。しかも、そのうちのあるものはヒトの造血器腫瘍で染色体組み換えのホットスポットに関連している。このような点は、マウスのリンパ腫の研究は皮相な意味での疾患モデルではなく、細胞内シグナル伝達の解明に新しい光をあて、ヒトのリンパ腫の分子生物学的な理解にも貢献出来るモデルとして可能性が出てきた。これが自分たちで開発した近交系 SL/Kh マウスを用いてフォワードゲネティックスの手法で未だに研究を続けている理由である。

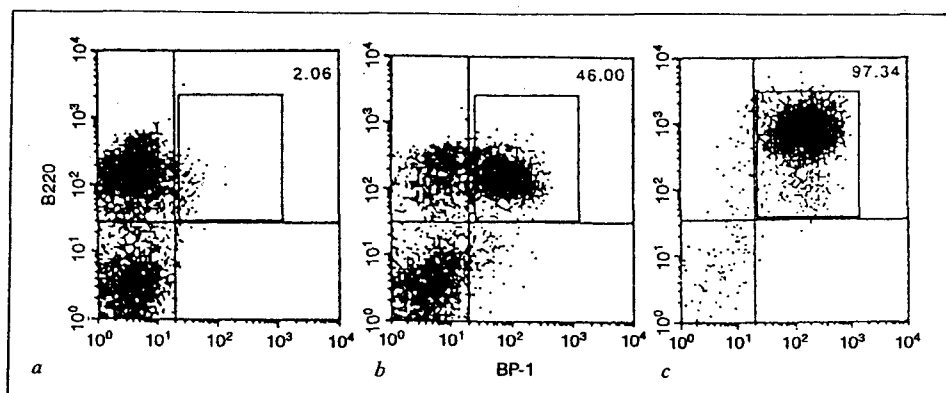
SL/Kh マウスのリンパ腫と内在性ウイルス

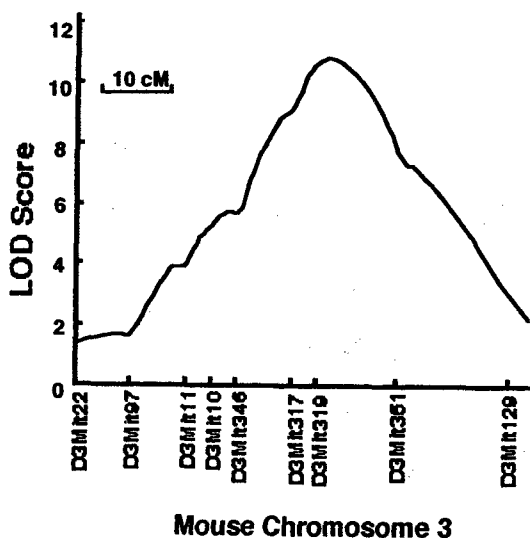
SL/Kh マウスは 1940 年代に輸入された Swiss albino 系に由来する Proto-SL マウスから、我々が開発したリンパ腫好発系近交系マウスで SL ファミリーの一員である(1)。リンパ腫の発生は 12 週齢以降に始まり、6ヶ月齢でほぼ 90%を越える(2)。リンパ腫は細胞表面の形質や免疫グロブリン遺伝子の組み換えからみて Pre-B 細胞にあたる(3)。末梢リンパ節の腫大を主とする major type(84%)と、骨髄内のみで増殖しやがて脊髄圧迫による対麻痺をおこす minor type (16%)がある(2)。この2型のリンパ腫は正常の Pre-B 細胞と異なり、ICAM2 や LFA といった接着分子を発現しているが、両者を区別する細胞表面マーカーは今のところ明らかでない(4)。内在性レトロウイルスの著明に

高い発現があり、ecotropic, xenotropic 両ウイルスが高いレベルで発現しているが、MCF タイプの dual tropic virus は検出されていない(2)。Ecotropic virus がリンパ腫発生に必須であることは、抗ウイルス Gp70 抗体を含む母系抵抗因子を SL/Kh 新生児に注射し、ecotropic virus の発現を選択的に抑制するとリンパ腫の発生は抑制されることから明らかである(5)。SL/Kh germline DNA を *Nco*I あるいは *Eco*R1 で消化し ecotropic virus プロブでサザンハイブリダイゼーションを行うと、7 コピーのウイルスゲノムがみられる(6,7)。このうち、*Eco*R1 消化でみられる 27 kb のフラグメントは、SL/Kh と NFS 系の間の交配世代でのウイルス発現・リンパ腫発生と共分離し、第7染色体セントロメアの遺伝マーカーと強い連鎖を示すことから(6)、このプロウイルスは近交系 SL/Kh の成立の初期に AKR から遺伝的に獲得された *Emv11* と考えられた(1)。このプロウイルスは SL/Kh で発現している 2 コピーの内のひとつであり、NFS との交配系ではリンパ腫の発生とも強く連鎖していた。しかし、培養でクローン化した ecotropic virus を大量に NFS 新生児に摂取したがリンパ腫は1年以内には発生しなかった。このウイルスによるリンパ腫発生には宿主の遺伝的組み立てが極めて重要であり、NFS はこの必要要件を満たしていないと考えられる。

骨髄 Pre-B リンパ球の異常増生

SL/Kh のリンパ腫に内在性レトロウイルスが関与していることは大いに考えられたが、その発生には宿主遺伝的要因が深く関係している。SL/Kh では生後 4~6 週齢の骨髄で、BP-1/B220 陽性の Pre-B 細胞が一過性のポリクローナル増殖を示し(8)、やがてこのうちからモノクローナル Pre-B リンパ腫が出現する二段階発癌の過程をとる (図 1)。(SL/Kh x NFS)F2 の骨髄 Pre-B 細

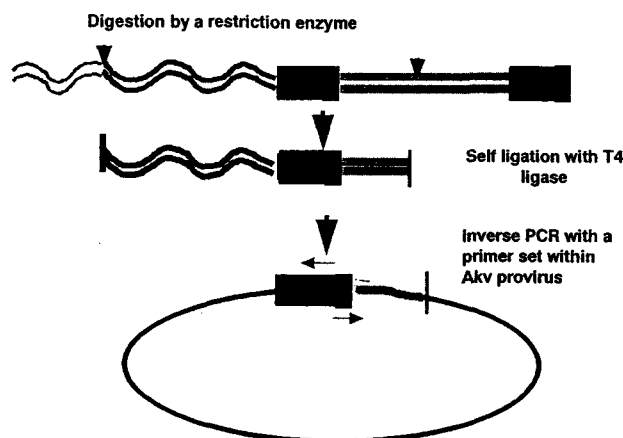




胞を定量的パラメーターとして QTL 解析を行った結果、第 3 染色体上に高度に有意な *Bomb1* をマップした (図 2) (9)。*Bomb1* の有力な候補遺伝子は *Wnt* 系の transcription factor, *Lef1* である。同遺伝子は Pre-B 細胞および T リンパ球に発現している。SL/Kh では骨髄 Pre-B 細胞のみならず、胸腺 T リンパ球の ConA 反応性がないことが知られている (Ogawa, unpublished)。現在 Pre-B 細胞、T 細胞の分化異常が *Bomb1* とどのように関連しているか、それに *Lef1* は本当に関与しているかについて研究を進めている。基本的な仮説として SL/Kh 系では B cell lineage の分化について遺伝的な異常があり、そのために増殖した標的細胞にウイルスのインテグレーションがおこってモノクローナルな増殖に進むと考えている。同様の集団の出現は Abelson virus 接種動物、Em-myc transgenic mice でも報告がある。

ウイルス挿入ホットスポット

SL/Kh のリンパ腫 DNA には内在性 Ecotropic virus のほかに体細胞レベルで獲得されたウイルスゲノムがしばしば見つかる(7)。オンコジンを持たないレトロウイルスの発癌機構はプロウイルスの挿入により細胞の増殖関連遺伝子が活性化されることによる。このようなウイルスの挿入は標的遺伝子近傍の CpG island におこることが多いため、鶴山らはリンパ腫 DNA を CpG island に特異的な制限酵素で消化した後、inverse PCR 法を用いてウイルス挿入部位のウイルスー宿主ジャンクションをクローニングした(図 3)。これまで少なくとも 8 つの hot spot が見つかっており、詳細な解析は開始されたばかりであるが、このような hot spot を *Svi1*~*Svi8* と命名した。このうち *Svi1* は *stat5a* の第 2



イントロン内の約 20 bp の間に 60 例中 3 例 (5%) に挿入をみた。いずれもトランスクリプションの方向と同順であった。この挿入を来したリンパ腫では *stat5a* の発現が mRNA ならびに蛋白レベルで著明に増加していた。*stat5a* はリン酸化し核内に移行し、多様な標的遺伝子と結合してその翻訳を促進した。*stat5a* によるリンパ腫発生は *stat5a* 活性化そのものにより、細胞内シグナル伝達経路の下流が活性化される可能性と、トランスクリプション活性を通じて多様な標的遺伝子の読み取りによるものの両方が考えられる。いずれが直接的な機能を果たしているのかは不明である。このほか多くの hot spot の解析が進行中であり、リンパ腫発生に関わるシグナル伝達系の詳細な実体が解明されることが期待される。

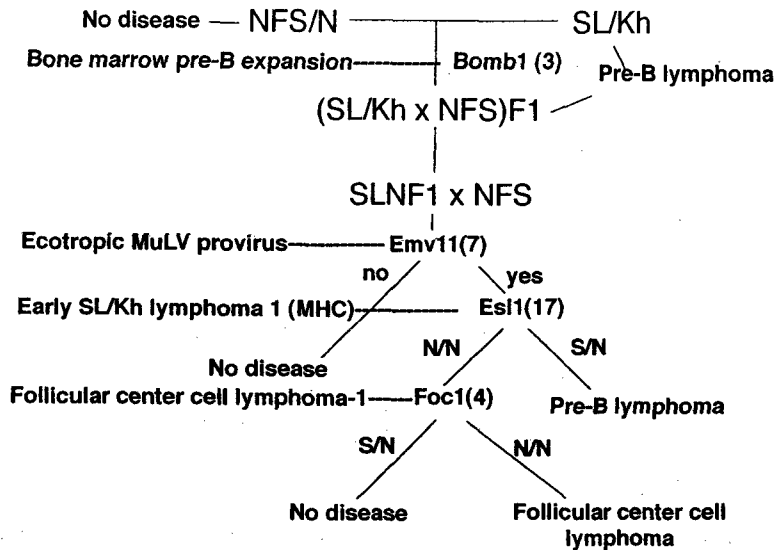
リンパ腫病型決定の遺伝機構：NFS との交配

SL/Kh のリンパ腫の発生は *Emv11* によっていることは明瞭であるが、リンパ腫の感受性・病型は遺伝的にもエピゲネティックにも宿主の影響を受ける。内在性 ecotropic virus genome をもたない NFS 系と SL/Kh との交配系では F1 では率は下がるが pre-B lymphoma のみが発生するのに対し、NFS への戻し交配系では Pre-B lymphoma のほかに、濾胞中心型のリンパ腫もほぼ同数発生する(6)。マイクロサテライト遺伝子マーカーを用いて戻し交配世代の遺伝解析をおこなったところ *Emv11* ゲノムを持ち、第 17 染色体の *Esl1* が SL/Kh 由来の優性アレルを持てば pre-B リンパ腫に、第 4 染色体の *Foc1* が NFS 由来劣性アレルのホモの場合には濾胞中心型のリンパ腫となることが示された(表 1)。*Esl1* は MHC の class II 分子、*Foc1* は B リンパ球の分化抗原のクラスター中にマップされている。それぞれの機能的な意義については今後の研究が必要

表1. リンパ腫病型と宿主遺伝子Esl1、Foc1遺伝型との関係

マーカー座位 遺伝型	Pre-B リンパ腫	骨髄性白血病	濾胞中心細胞 リンパ腫	非発病
<i>D17Mit21 (Esl1)</i>				
S/N	20/20	2/2	10/23	43/86
N/N	0/20	0/2	13/23	43/86
<i>D4Mit17 (Foc1)</i>				
S/N	6/20	0/2	1/23	28/78
N/N	14/20	2/2	22/23	50/78

である。NFS/N 系との交配系の遺伝解析から、リンパ腫の発生、病型の決定には図4で示すようなアルゴリズムが成り立つことが明らかになった。SL/Khの近縁系統であるSL/Ni, SL/AmはFoc1座位ではNFS 徒同じアレルをもつため(10)、これらの系統で発生する腫瘍は濾胞中心型リンパ腫または骨髄性白血病が多い。



リンパ腫病型決定の遺伝機構：AKR との交配

一方、SL/Kh と AKR を交配すると F1 マウスの大部分は T リンパ腫を発生した。F1 を SL/Kh に戻し交配した場合のリンパ腫の病型は T, B リンパ腫がほぼ 1:1 の割合で発生した(11)。このことは AKR 由来の単一優性遺伝子が T

リンパ腫への病型を決定していることを示唆している。病型について遺伝解析を行った結果、第7染色体に *Tlsm1* 座位(Thymic lymphoma susceptible mouse 1)をマップした(表2)。*Tlsm1* の近傍のマイクロサテライト座位の遺伝型を AKXD 組み換え近交系について調べ、Tリンパ腫発生率と対比したところ、Tリンパ腫好発系では全て AKR 由来アレルをもっていた(10)。この2つのモデルの遺伝解析の結果から、第7染色体遠位端にはリンパ腫の病型をT細胞由来にふりわけると宿主遺伝子があると考えられる。このほかリンパ腫の発生を促進する量的形質遺伝子が MHC 中にマップされた(12)。

表2. リンパ腫病型と*Tlsm1*関連遺伝子座の遺伝型との関係

マーカー座位	マップ位置	リンパ腫病型と遺伝型				χ^2
		<u>Tリンパ腫</u>		<u>Bリンパ腫</u>		
		AKR/SL	SL/SL	AKR/SL	SL/SL	
D7Mit32	43	25	5	8	16	14.0
D7Mit40	51	28	3	7	17	24.1
D7Mit 8	54	30	1	7	17	28.1
D7Mit13	70	27	3	9	15	16.5

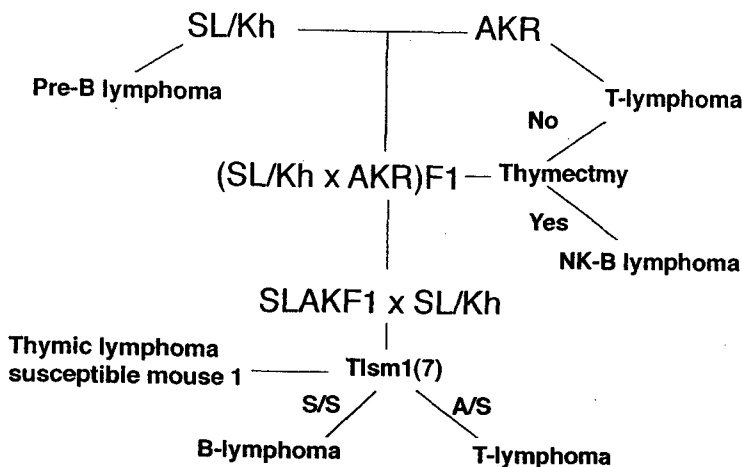
Tリンパ腫の発生に不可欠な要因のひとつは、内在性レトロウイルス間の組み換えにより MCF ウイルスが形成されることである。この過程が宿主遺伝子の影響を受ける例としては HRS/J hairless mice で胸腺における xenotropic virus 発現が *hr/hr* では *hr/+*に比べきわめて高く、組み換えウイルスの成立を促進している現象が挙げられる(13)。*Tlsm1* の近傍にはリンパ腫関連のウイルスゲノムは報告されていない。一方、私はTリンパ腫の発生の過程では初期のリンパ腫細胞は胸腺上皮細胞と共生複合体を形成し、後者の支持のもとに増殖・進展すると考えてきた(14-16)。*Tlsm1* の周辺には *LFA1*, *CD43*, *IL4R* などの候補遺伝子が存在し、いずれもTリンパ球と胸腺上皮細胞の間の細胞間相

相互作用に関係している。これらの候補遺伝子の機能的な役割は今後の研究で明らかにされなければならない。

リンパ腫病型決定のエピゲネチック機構

一方、(AKR x SL/Kh)F1 の胸腺を生後1週間で摘出すると、リンパ腫の発生率は変わらないが、発生時期はやや遅れ、かつ異常な表現型をもつリンパ腫が発生することを発見した(17)。このリンパ腫は電顕的に NK 細胞類似の細胞質顆粒と、NK1 CD5 B 細胞に相当する分化抗原を持ち、NK-B1 lymphoma と診断された。胸腺摘出 AKR マウスの CD5 B lymphoma とは異なる生物学的性質を示した。1ヶ月齢の胸腺摘出 F1 マウスに AKR, SL/Kh, F1 の新生児胸腺を移植しても、NK B1 lymphoma の発生を抑制する事は出来なかった。これらの観察から、生後1週間から1ヶ月までの間、胸腺がないことはリンパ腫の標的細胞の分化に何らかの決定的な影響を与えるらしい。胸腺摘出 AKR の場合は適当な胸腺移植をおこなうと、移植胸腺を微少環境としてドナー由来のリンパ腫が発生する。これに対し、(AKR x SL/Kh)F1 では移植胸腺は微少環境を提供する能力がなく、Tリンパ腫への分化誘導ができないか、あるいは骨髓で発生した前リンパ腫細胞は胸腺に対する依存度を全く失い直ちに自律的な増殖への道筋にはいるのであろう。このように胸腺はリンパ腫の発生についてエピゲネチックな決定要因としても働いている。

SL/Kh と AKR の間の交配系でのリンパ腫発生を要約すると図5のシエマとなる。



野生由来マウスとの交配から

日本産の野生マウス由来近交系 MSM/Ms は面白いことに強力な癌抵抗性の宝庫である。レトロウイルス感染を支配する遺伝子 Fv1, Fv4 がそれぞれ感受性アレルをもつことを確認してから、F1 および SL/Kh への戻し交配系を作成しリンパ腫の発生を観察し、遺伝解析をおこなったところ、MSM 由来の2つの優性抵抗性遺伝子が第 17、18 染色体にそれぞれマップされた(18)。このほか多くのリンパ腫非感受性マウスと体系的に F1 を作成しリンパ腫の発生を観察している。この場合は Fv1 の影響が強く表面に出るため (18)、実験のデザインが重要である。

結び

私が SL/Kh マウスの研究を始めてから 20 年あまりになるが、この系統には汲めども尽きない興味を感じられる。ウイルス学、免疫細胞学、遺伝学、腫瘍学にわたる重要な課題が次々と出現し、ほかのモデルとは一味異なる解決が待ち受けていた。病型を決定する遺伝子群はまだ最終的には同定されておらず、これらの解決にはまだ多くの努力が必要である。自然発生のリンパ腫好発系としては比類のない高率、早期発生のモデルでありながら、繁殖率が高く、産仔数も多く、おとなしくて飼育は極めて容易である。共同研究をベースに分与も可能であるので希望者はご連絡いただきたい。

引用文献

1. Abujiang, P., Yamada, Y., Haller, O., Kobayashi, K., Kamoto, T., Lu, L.M., Ogawa, M., Ishimoto, A., Katoh, H., Kanehira, K., Ikegami, S., Fukumoto, M., Hiai, H.: The origin of the SL family mice. *Lab. Anim. Sci.* 46: 410-417, 1996.
2. Hiai, H., Kaneshima, H., Nakamura, H., Oguro, B.Y., Moriwaki, K., Nishizuka, Y.: Unusually early and high rate of spontaneous occurrence of non-thymic leukemias in SL/Kh mice, a subline of SL strain. *Jpn. J. Cancer Res.* 73: 704-712, 1982.
3. Shimada, M.O., Yamada, Y., Nakakuki, Y., Okamoto, K., Fukumoto, M., Honjo, T., Hiai, H.: SL/Kh strain mice: A novel animal model of pre B lymphomas. *Leuk. Res.* 17: 573-578, 1993.
4. Lu, L-M., Ogawa, M., Kamoto, T., Yamada, Y., Abujiang, P., Hiai, H.: Expression of LECAM-1 and LFA-1 on pre-B lymphoma cells but not on preneoplastic pre-B cells in SL/Kh mice. *Leuk Res.* 21: 337-342, 1997.
5. Hiai, H., Buma, Y.O., Ikeda, H., Moriwaki, K., Nishizuka, Y.: Epigenetic control of endogenous ecotropic virus expression in SL/Ni strain mice. *J. Natl. Cancer Inst.* 79: 781-787, 1987.
6. Yamada, Y., Shimada, M.O., Toyokuni, S., Okamoto, K., Fukumoto, M., Hiai, H.: Genetic susceptibility to pre-B lymphoma in SL/Kh strain mice. *Cancer Res.* 54: 403-407, 1994.
7. Hiai, H., Yamada, Y., Abujiang, P., Lu, L-M., Kamoto, T., Tsuruyama, T. Genetic and epigenetic susceptibility to endogenous retrovirus-induced lymphomas in SL mice. *Progr. Exp. Tumor Res.* 35: 64-77, 1998.
8. Okamoto, K., Yamada, Y., Shimada, M.O., Nakakuki, Y., Nomura, H., Hiai, H.: Abnormal bone marrow B-cell differentiation in pre-B lymphoma-prone SL/Kh mice. *Cancer Res.* 54: 399-402, 1994.
9. Lu, L-M., Shimada, M., Higashi, S., Zeng, Z-Z, Hiai, H. Bone marrow pre-B-1 (Bomb1): a quantitative trait locus inducing bone marrow pre-B cell expansion in lymphoma-prone SL/Kh mice. *Cancer Res.* 59:

2593-2595, 1999.

10. Shisa, H., Yamada, Y., Kawarai, A., Terada, N., Kawai, M., Matsushiro, H., Hiai, H.: Genetic and epigenetic resistance of SL/Ni mice to lymphomas. Jpn. J. Cancer Res. 87: 258-262, 1996.

11. Yamada, Y., Shisa, H., Matsushiro, H., Kamoto, T., Kobayashi, Y., Kawarai, A., Hiai, H.: T-lymphomagenesis is determined by a dominant host gene Thymic Lymphoma Susceptible Mouse-1 (Tlsm-1) in murine models. J. Exp. Med. 180: 2155-2162, 1994.

12. Kamoto, T., Shisa, H., Abujiang, P., Lu, L-M., Yoshida, O., Yamada, Y., Hiai, H.: A quantitative trait locus in major histocompatibility complex determining latent period of mouse lymphomas. Jpn. J. Cancer Res. 87: 401-404, 1996.

13. Hiai, H., Morrissey, P., Khiroya, R., Schwartz, R.S. Selective expression of xenotropic virus in congenic HRS/J (hairless) mice. Nature 270: 247-249, 1977.

14. Hiai, H., Nishi, Y., Miyazawa, T., Matsudaira, Y., Nishizuka, Y. Mouse lymphoid leukemias: Symbiotic complexes of neoplastic lymphocytes and their microenvironments. J. Natl. Cancer Inst. 66: 703-722, 1981.

15. Hiai, H. Sato, C., Buma, Y.O., Nishizuka, Y. Differentiation-associated cellular complex formation of murine thymocytes with thymic stromal cells. Cancer Res. 44: 5771-5775, 1984.

16. Kaneshima, H., Ito, M., Asai, J., Taguchi, O., Hiai, H. Reorganization of thymic microenvironment during development and lymphomagenesis. Jpn. J. Cancer Res. 78: 799-787, 1987.

17. Lu, LM., Hiai, H. Mixed phenotype lymphomas in thymectomized (AKR x SL/Kh) F1 mice. Jpn. J. Cancer Res. 90: 1218-1223, 1999.

18. Abujiang, P., Kamoto, T., Lu, L.M., Yamada, Y., Hiai, H. Two dominant resistance genes to pre-B lymphoma in a wild-derived inbred mouse strain MSM/Ms. Cancer Res. 56: 3716-3720, 1996.

サル（ニホンザル、カニクイザル）ES細胞株の樹立とこれからの展開

滋賀医科大学医学部附属動物実験施設 鳥居 隆三

ニホンザルの計画的な室内での人工繁殖を行うために、自然交配、人工授精法等を試み、より高い繁殖効率を目指して体外受精、顕微授精などの発生工学的手法を導入してきた。その中で、体外受精法、顕微授精法に加えて胚盤胞期胚を高率に得ることが出来る体外培養法をも確立できた結果、今回 ES 細胞株の樹立に成功したので、その経緯等を紹介する。

1. ES 細胞とは

ES 細胞 (Embryonic Stem Cell、胚性幹細胞) とは、培養下において未分化状態で正常な核型を維持しながら増殖継代が可能であり、あらゆる細胞に分化できる全能性、分化能を有する胚盤胞期胚の内部細胞塊より分離・樹立された細胞をいう。マウスでは、ES 細胞を胚盤胞期胚に注入してキメラ個体を作成できるキメラ形成能、キメラ個体を交配させて ES 細胞由来の個体を作成できる生殖系列への寄与能も確認されている。

2. ES 細胞の分離 (図-1)

ES 細胞の分離は、通常は受精後子宮内で胚の分割が進んだ胚盤胞期胚の中の内部細胞塊(ICM: Inner cell mass)から分離することになる。

3. ES 細胞株樹立の歴史 (図-2)

ES 細胞株は、マウスでは、1981年に Evans らと、Martin によって樹立が報告されたが、サルでは Thomson らが1995年にアカゲザルで、また1998年にはヒトで、それぞれ樹立したと報告している。この Thomson らは、通常月経周期中のサルをもちいて交配を行った後、子宮から胚盤胞期胚を洗浄法によって回収している。今回、我々はニホンザルとカニクイザルを用いて、卵巣刺激により成熟卵子を採取した後、凍結精子を用いて体外受精法、顕微授精法という発生工学的手法を用いて受精を行った。その後、7～10日間の体外培養法によって胚盤胞期胚を得た。これによって、Thomson らに比べておよそ10～20倍もの高率で胚盤胞期胚を作出出来、その結果、短期間のうちに ES

細胞株の樹立に成功した。

4. 卵巣刺激、採卵法などのプロトコール (図-3)

徐放型の GnRH を前投与後、eCG あるいは hMG、FSH を連日投与することにより卵巣を刺激し、多数の卵胞の発育を行った後、hCG 投与後、卵巣から腹腔鏡観察下で成熟卵子を採取した。一方、電気刺激あるいは精巣上体から採取し液体窒素中で凍結保存していた精子を融解後、活性化し、体外受精および顕微授精を行った。受精を確認した後は、38℃、5% O₂、5% CO₂、90% N₂の培養条件下で7～10日間培養を行い、胚盤胞期胚を得た。胚盤胞期胚は、プロナーゼ処理により透明体を除去した後、ウサギ抗サルリンパ球抗体を用いた immuno surgery 法により ICM を分離し、フィーダー細胞層上にて解離・培養を繰り返し、ES 細胞の分離を行った。

5. ES 細胞の確認と評価 (図-5)

分離した ES 細胞様コロニーについて、ES 細胞である確認と評価を行った。

- ① 形態は、細胞核が大きくマウス ES 細胞に比べて扁平であり、アカゲザルの ES 細胞に酷似していた。
- ② 培養を継代している中、核型(Karyotype)は、ニホンザル、アカゲザルともに 2n=42 のオスあるいはメス型を示し、正常核型を維持していた。
- ③ ES 細胞様コロニーには ALP 活性を示し、未分化状態が維持されていた。
- ④ 細胞表面抗原では、マウスで活性が見られる SSEA(Stage Specific Embryonic Antigen)-1 には染色性は見られず、サルとヒト ES 細胞で活性を示す SSEA-3 と SSEA-4 では明らかな活性を認めた。
- ⑤ ES 細胞を SCID マウス皮下に移植した結果、テラトーマの形成が見られ、神経細胞、アポクリン線、毛包、筋細胞、骨芽細胞、軟骨細胞、血管内皮細胞、気管上皮細胞、アストロサイト、等の細胞が確認できた。
- ⑥ ES 細胞のコロニーを、フィーダー細胞を除いた状態で培養することによって胚様体(Embryoid body)の形成を確認できた。
- ⑦ すでに、ニホンザルおよびカニクイザルにおいて未分化状態で1年以上の継代を重ねている。

今後、キメラ個体の作出による確認も行う予定である。

6. サル ES 細胞樹立の意義

今回のサル ES 細胞の樹立は以下のような意義があると考えられる。

- ① ES細胞の研究は主にマウスで行なわれてきたが、マウスとヒトでは胚発生過程で異なる面があることから、ヒトと近縁なサルのES細胞は、ヒトの発生や疾患を研究するための有力なモデルとなる。
- ② ヒトとマウスではES細胞の作り方、扱い方が異なるが、ヒトとサルではほとんど同じである。
- ③ 国内でヒトES細胞が分離され各研究機関に分譲されるまでには、あと1～2年かかることが予想される。それまでに、今までマウスES細胞でしかできなかった機能細胞への分化機構等の研究をサルのES細胞を用いて行なうことができる。
- ④ ヒトES細胞の研究が認められても細胞レベルの研究に限定され、ヒトへの移植や治療実験解禁される見通しはたっていないが、サルでは移植等の*in vivo*実験が可能である。

7. 再生医学とES細胞 (図-4)

生体の恒常性機構 (ホメオスターシス) は、自己制御(Regulation) : 神経系、内分泌系等と自己認識 (Recognition) : 免疫系そして再生修復機構 (Regeneration)から成る。この中の再生修復機構を担っているのは、肝細胞、内皮細胞などにみられるSimple duplication系と神経系や造血系にみられる幹細胞系である。一方、ES細胞は、その名が示すように幹細胞であると同時に、あらゆる細胞に分化できることから、再生修復システムを担うことが出来る。すなわち生体に備わった再生・治癒能力を最大限に引き出し、積極的に利用し、組織・器官の再生修復をはかり、疾病によって失われた形態的・機能的損傷を代償するとする再生医学のなかの、細胞移植治療法に大きく貢献することが出来るものである。いいかえれば、ES細胞は現在行われている過渡的治療法としての臓器移植法を根本的に変え、21世紀の新しい研究、治療の分野として期待される再生医学を支える重要な材料である。

今後は、このES細胞を各種の機能細胞に分化させ、目的とする細胞を選別することが重要となる。分化誘導方法としては、細胞の維持に必要なフィーダー細胞の除去、レチノイン酸の添加、LIF(Leukemia inhibitory factor)の除去、胚様体やテラトーマの作製などが考えられる。そこから得られる、例えばドーパミ

ン産生細胞はパーキンソン病の治療として、心筋細胞は心筋症や心筋梗塞症、
膵β細胞は糖尿病等々、ES細胞の再生医学への応用は限りが無い。

8. 実験物学的分野におけるES細胞の有用性

現時点で最も可能性があり有用性の高いものの一つとして、ES細胞を用いた
クローン個体の作出が考えられる。すでにマウスで行われているが、我々のグ
ループはすでに、体外培養法や胚移植法については確立しており、現在核移植
や細胞融合法などについて検討を進めている。さらにES細胞に遺伝子改変を加
えることにより、ES細胞由来のサルの作出とともに遺伝子改変サルの作出も可
能である。

9. クローン動物の作出方法

クローン動物を作出する利点は、遺伝形質が同じなので、

- ① 同じ実験個体数で実験精度を上げることができる。
- ② 要求される精度が同じであれば、実験個体数を削減できる。
- ③ 個体のサイズが一定化するので、飼育系が斉一化できる。
- ④ 疾患の発症、経過が斉一化できる。
- ⑤ 移植免疫研究に適している。
- ⑥ 遺伝子組み換えを*in vitro* で確認できるため、遺伝子組み換え個体作出が
容易。
- ⑦ 遺伝子治療実験などの検証が可能である
等の利点がある。

10. クローン動物作出とES細胞

このクローン個体作出にES細胞は以下のような利点がある。

- ① ES細胞株由来の個体作出が、無限に可能（割球クローンでは数に限りあ
り）
- ② ES細胞に遺伝子操作を加えてTg動物作出ができる。（マイクロマニピュ
レータによる前核への遺伝子注入に比べて、高率な遺伝子導入が可能）
- ③ ES細胞では相同遺伝子組み換えを起こし易いことから、KO動物が作出
できる。
- ④ 細胞の保存が容易である。

1 1. Tg動物作製におけるマウスの利点とサルの今後

現在、実験動物学なのなどで、Tg、Koなど遺伝子改変動物としてはマウスがもてはやされている。これには幾つかの理由がある。すなわち、

- ① 遺伝学的統御がなされている
- ② 微生物学的統御がなされている
- ③ 過排卵処置が容易
- ④ 体外受精が容易
- ⑤ 凍結保存法が確立（受精卵）
- ⑥ 各種実験が容易
- ⑦ 飼育スペースが小さくてすむ
- ⑧ 繁殖効率が高い
- ⑨ Life spanが短い
- ⑩ ES細胞株が樹立されている

等の特性を有している。

今回我々がサルのES細胞を樹立したことによって、マウスでの特性の中の⑦と⑨を除き、サル類が遺伝子改変動物作製の分野でマウスと肩を並べることが可能になったと考えられる。これはサルの実験動物化が可能になったと同時に、今までは実験動物といえばマウスが主体であったところに、サル類をマウスと対等に近い位置にまで引き上げることが出来ることをも意味している。しかしこれに止まるのではなく、サルはヒトに最も近縁であり、高度な知能と共に形態、生理、代謝などがヒトに似ていることから、そこから得られるデータは、マウス等とは比べものにならない多くのかつ貴重なデータを提供してくれることは容易に考えられる。

ただ我々研究者は、「技術があれば何をしてもよい」ということではない。そこでは、我々の研究が科学的であるのみではなく、人類社会にとって本当に必要か否か十分議論することは必要である。

（謝辞）

本研究は、近畿大学・生物理工学研究所、入谷明教授、細井美彦助教授、京都大学・再生医科学研究所、中辻憲夫教授、田辺製薬（株）の共同研究であり、ここに明記する。また本実験には、大阪大学・人間科学部、和秀雄教授、ケア

リー（株）、竹之下洋司氏には数々ご協力いただいたことに感謝します。

（参考文献）

1. Martin, G.(1981) Isolation of a pluripotent cell line from early mouse embryos cultured in medium conditioned by teratocarcinoma stem cells. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A., 78,7634-7638.
2. Evans, M. & Kaufman, M. (1981) Establishment in culture of pluripotential cells from mouse embryos. Nature, 292, 154-156.
3. Thomson, J. A., Itskovits, E. J., Sapiro, S. S., Waknitz, M. A., Swiergiel, J. J. Marshall, V. S., Jones, J. M. (1998) Embryonic stem cell lines derived from human blastocysts, Science, 6;282, 1061-1062.
4. Thomson, J. A. & Marshall, V. S. (1998) Primate embryonic stem cells, Curr. Top. Dev. Biol., 39, 133-165.
5. Thomson, J. A., Kalishman, J., Golos, T. G., Durning, M., Harris, C. P., Becker, A. & Hearn, J. P. (1995) Isolation of a primate embryonic stem cell line, Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A., 92,7844-7848.
6. Thomson, J. A., Kalishman, J., Golos, T. G., Durning, M., Harris, C. P. & Hearn, J. P. (1996) Pluripotent cell lines derived from common marmoset (*Callithrix jacchus*) blastocysts, Biol.Reprod. 55, 254-259.
7. Torii, R., Hosoi, Y., Fujinami, N., Tada, T., Suemori, H., Kondo, Y., Imahie, H., Kobayashi, K., Nakatsuji, N. & Iritani, A.(2001) Establishment of the primate embryonic stem cell lines from blastocysts produced by intracytoplasmic sperm injection (ICSI) or in vitro fertilization (IVF) using the Japanese monkey and the Cynomolgus monkey, Theriogenology, 55, 374.

図-1 胚の発生からES細胞の樹立

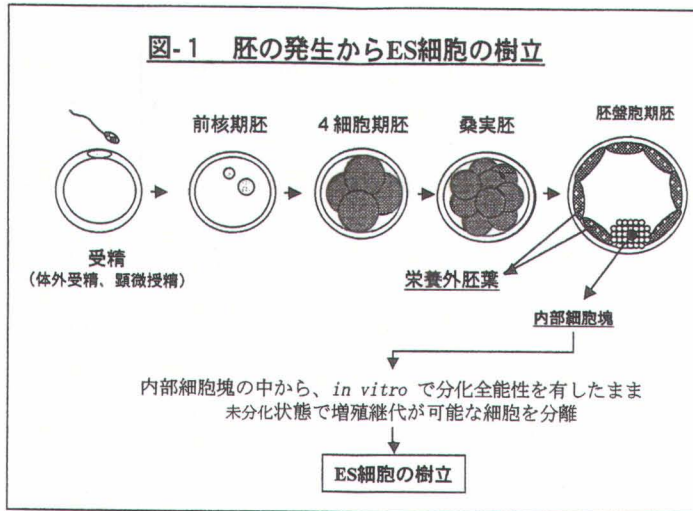


図-2 ES細胞株の樹立

マウス：Evans,M.J.et al. (1981), Martin,G.R.(1981)

ヒト：Thomson,J.A.et al. (1998)

サル：アカゲザル：Thomson,J.A.et al. (1995)

胚盤胞期胚：子宮から回収

作出率：0.25個/頭

ニホンザル：鳥居、細井、入谷、中辻他(2000)

カニクイザル：鳥居、細井、入谷、中辻他(2000)

胚盤胞期胚：IVF & ICSI

作出率：2~4個/頭

図-3 ニホンザル、カニクイザルの卵巢刺激、採卵および体外受精、顕微授精法

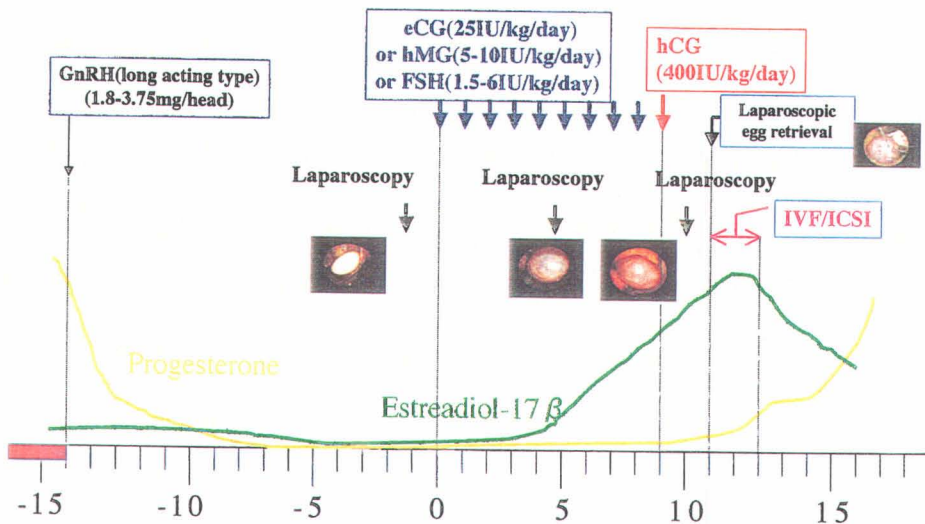


図-4 ヒトES細胞の医療への可能性

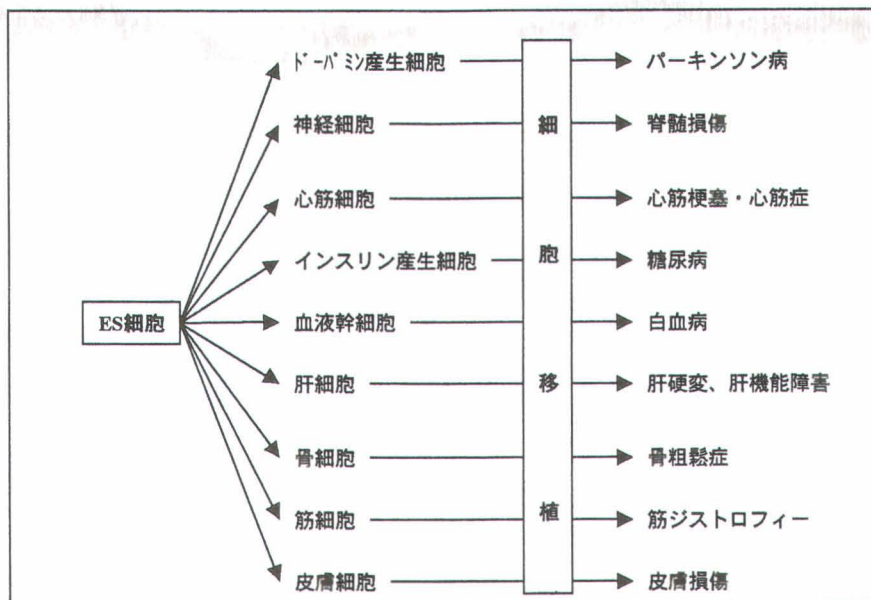
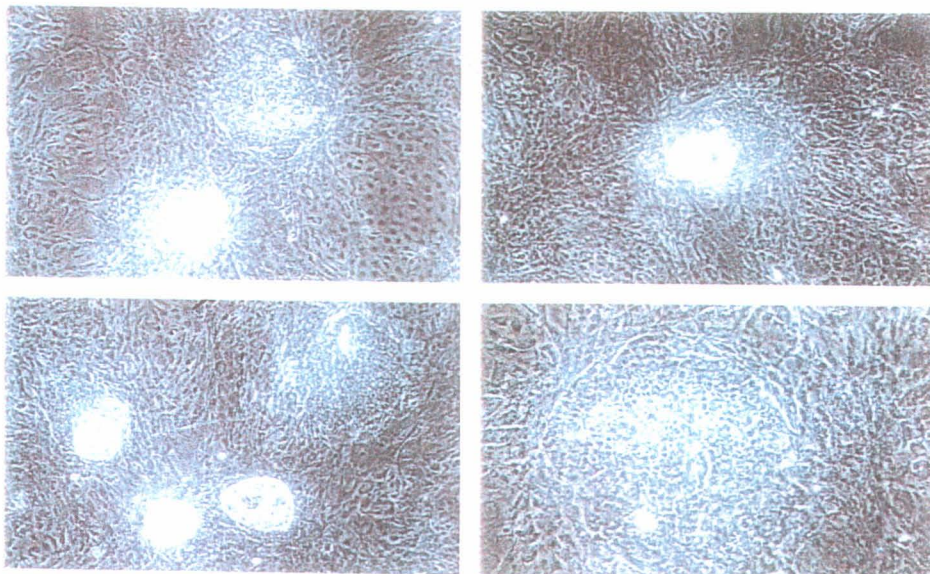


図-5 カニクイザルのES細胞のコロニー



〈第68回研究会（平成12年12月3日）〉

会員による研究発表（14題）

〈第68回研究会（平成12年12月3日）〉

第68回関西実験動物研究会研究発表抄録

1. ACI/N 系統に出現した新たな淡毛色ラットの解析
2. 新たなミュータント mv (myelin vacuolation) ラットの病態解析
3. 大阪産野生マウス由来近交系 MMNG 系統の特性解析
4. マホガニーマウスの聴性脳幹反応における特徴
5. 実験動物施設における二酸化塩素系滅菌剤 Exspor による滅菌効果の検討
6. ヘリコバクター汚染マウスからの細菌分離
7. HSV-1 感染におけるサイトカインの役割
8. ラットを用いた小核試験法の検討
9. カニクイザルを用いた全身オートラジオグラフィの実践
10. 臓器特異的な遺伝子機能の人為的操作に必要な動物の開発
11. 高率にリンパ節転移を起こすマウス乳癌組織ならびに細胞株
12. HGF による慢性腎症の進展阻止効果：ネフローゼ症候群と糖尿病性腎症のモデルから浮きぼりとなった2つの作用点
13. オリーブオイル負荷による WHHL ウサギの外因性脂質吸収能の評価
14. ラット脳からのピューロマイシン感受性アミノペプチターゼの単離・精製と諸性質の検討

ACI/N 系統に出現した新たな淡毛色ラットの解析

○山崎賢一¹、中西 聡¹、北田一博¹、芹川忠夫¹、西川 哲²、並木千晶³、浜田修一^{1,3}
橋本 敦³

(¹京都大・院・医・動物実験施設、²浜松医大・動物実験施設、³エスエス製薬
(株)・中央研究所)

【緒言】1999 年 12 月、京都大学大学院医学研究科附属動物実験施設で維持されている Germ Free の ACI/N 系統にページュ様淡毛色を有する個体が出現した。今回、このミュータントラットに対して、血液学的、病理学および遺伝学的解析を行ったので報告する。

【方法と結果】淡毛色ラットにおける家系分析の結果、この毛色は単一の常染色体上劣性遺伝子に支配されていると推定された。実際に淡毛色個体を兄妹交配することにより、この表現型を固定することができた。続いて、このミュータントラット系統について止血時間を測定したところ、正常対照の ACI/N 系統と比較し有意に止血時間の延長が認められた。さらに、病理組織学的検査を行ったところ、各種臓器に巨大顆粒を伴う球状白血球、好酸球、肥満細胞が認められ、特に腎臓の近位尿細管、顎下腺の線状部上皮細胞、眼球の毛様体、気管および消化器粘膜において顕著に認められた。これらの所見は *Lyst* (Lysosomal trafficking regulator) 遺伝子ミュータントであるページュラット DA/Ham-bg/bg における異常表型と全て一致するものであった。そこで、両者を交配したところ、得られた産仔は全て親系統と区別されない淡毛色を示し、両変異の同座性が証明された。

【結語】以上の結果、淡毛色ミュータント系は、*Lyst* 遺伝子に新たな遺伝子変異を保有していると考えられた。

新たなミュータントmv (myelin vacuolation) ラットの病態解析

○前田昌也¹、桑村 充¹、金原稔子¹、山手丈至¹、小谷猛夫¹、森山光章²、
北田一博³、芹川忠夫³

(¹大阪府大院・獣医病理、²同・獣医生理、³京都大院・医・動物実験施設)

<緒言>

mv ラットは、市販のSD ラットで新たに見いだされた振戦を特徴とするミュータントである。今回、このミュータントの表現型を明らかにするための病理学的解析と遺伝性を確認するための交配試験を行った。

<材料と方法>

動物：振戦発症個体と非発症個体を検索した。これらは、キャリアー個体（ミュータント遺伝子をヘテロにもつと推定される個体）間、および振戦発症雄とキャリアー雌間の交配によって得られた。病理組織学：脳・脊髄・視神経・坐骨神経を採材し、HE、LFB、Bielschowsky染色を施して光顕観察した。免疫組織化学：MBP、GFAPに対する抗体を用いて免疫組織化学的に解析した。電顕観察：延髄、脊髄より常法に従ってエポン包埋サンプルを作製し、電顕観察した。

<結果>

交配成績：振戦発症雄とキャリアー雌間1ペアの交配により8匹中4匹（雄2匹、雌2匹）の、キャリアー個体間8ペアの交配により84匹中20匹（23.8%、雄13匹、雌7匹）の振戦発症個体を得た。臨床症状：振戦発症個体は、3週齢前後より刺激に対して振戦症状を示した。触毛の屈曲が見られる動物があったが、被毛は正常であった。20週齢を超える週齢を重ねた個体においては、時折跳躍発作が見られた。同腹の振戦非発症個体に著変はなかった。病理所見：振戦発症個体は、脳幹、小脳、延髄、脊髄のニューロピルにおいて空胞形成が見られた。重篤な例においては、しばしば空胞内に顆粒状の崩壊物が確認された。また、空胞形成部に一致してGFAP陽性の腫大・増生したアストロサイトが認められた。電顕においては、発症例ではミエリンの菲薄化とミエリン層の離解が確認された。光顕で見られた病変はミエリンの空胞形成によると考えられた。

<考察>

病理学的な特徴から、本ミュータントをmv (myelin vacuolation) ラットと名づけた。交配成績から、mvラットの振戦形質は、単一の常染色体劣性遺伝により支配されている可能性が示唆された。今後、さらに詳細な病態解析や遺伝解析を行い、この原因遺伝子を同定したい。

大阪産野生マウス由来近交系MMNG系統の特性解析

○和田あづみ、加藤秀樹¹、六車香里²、江袋美知²、西村正彦³、
都築政起⁴（大阪府大・農学生命科学、¹浜松医科大・動物実験施設、
²(財)実験動物中央研究所、³名古屋大・医、⁴広島大・生物生産）

【目的】MMNG系統は、1991年2月に大阪府箕面市で捕獲された野生マウス(*Mus musculus molossinus*)を起源に育成した系統である。本系統は1996年3月に全兄妹交配20世代に達し、近交系として成立した。そこで本研究では、このMMNG系統の基礎特性を明らかにすることを目的とした。

【材料と方法】MMNGマウスの形態学的および遺伝学的基礎特性の調査を行った。各調査では、適宜他の近交系を用いて比較検討を行った。

【結果と結論】MMNG系統雌個体の体重は、生後30日齢時点で 7.97 ± 0.13 g、生後60日齢時点で 11.67 ± 0.57 gであり、もっとも広く用いられている日本産野生マウス由来近交系MSMの生後30日齢体重 7.13 ± 0.12 g、生後60日齢体重 11.10 ± 0.65 gと比較すると大柄な傾向が認められた（30日齢において $P < 0.01$ ）。遺伝学的プロファイルを明らかにするために実施した生化学的標識遺伝子28マーカー、および免疫遺伝学的標識遺伝子9マーカーの検索では、調査したマーカーすべてが既報のタイプと一致した。PCR-SSLP法を用いて調査した40マイクロサテライトマーカーでは、一般的な近交系C57BL/6N、静岡県三島市で捕獲された野生マウスに由来する近交系MSM、愛知県名古屋市で捕獲された野生マウスに由来する近交系MOM、大阪府堺市で捕獲された野生マウスに由来するMSKA、MSKD、ならびにMSKR系統とのあいだにはそれぞれ92.5%、50.0%、60.0%、55.0%、45.0%、および50.0%のマーカーに多型が存在した。

マホガニーマウスの聴性脳幹反応における特徴

○谷本 憲昭¹、佐々木 義文¹、浅野 裕三¹、奥村 知恵実²、
北田 一博²、芹川 忠夫²

(¹田辺製薬・安全研、²京都大・院・医・附属動物実験施設)

【緒言】Mahogany マウスは、Atractin 遺伝子座に変異の存在するミュータント動物であり、アグーチ蛋白に対する抑制効果による毛色の変化が報告されている。現在までに複数の対立遺伝子 (mg、mg^L、mg^{3J}) が報告されており、特に mg^{3J} マウスでは、脂肪蓄積量の減少が観察される。さらに最近、庫本らによって、中枢神経系における空胞形成および振戦症状の伴うことが報告された。Mahogany マウスにおける中枢神経系病変から、このミュータントの聴覚機能に異常があることが推定される。そこで、本ミュータントにおける聴性脳幹反応 (Auditory Brainstem Response、ABR) について、検討を加えた。

【材料と方法】使用動物は、mg/mg、mg^L/mg^L、mg^{3J}/mg^{3J} の Mahogany ミュータントマウス 雌雄各 5 匹 (9～10 週齢)、および正常対照動物として用いた C3H/HeJ マウスの雌 5 匹 (10 週齢) である。動物は麻酔下で 39 度の恒温ベッドに静置し、刺激音は 120 dB SPL、6 kHz の tone burst 音をイヤフォンより出力した。

【結果と考察】ABR は音刺激により発生する内耳から脳幹に至る聴覚伝導路由来の誘発電位であり、臨床および前臨床の場において、聴覚あるいは脳幹の機能を客観的に評価するうえで有用とされている。今回、ABR により Mahogany マウスの聴覚機能を検索したところ、ABR 波形の I～V 波の分離不鮮明、V 波の平低あるいは識別困難な個体が観察された。以上の結果は、Mahogany マウスに聴覚機能異常があることを示唆している。現在、Mahogany マウスの 3 系統間において、聴覚機能異常と内耳の組織学的変化に差異があるか否かについて検索中である。

実験動物施設における二酸化塩素系滅菌剤 Exspor による滅菌効果の検討

○中井伸子、渡辺正孝（日本新薬(株)安全研）

【緒言】実験動物施設の滅菌にはホルマリン燻蒸が繁用されているが、その強い毒性と刺激性のため環境や作業者の安全衛生面で問題がある。今回、二酸化塩素系滅菌剤 Exspor をホルマリン燻蒸の代用として使用できるか否かを細菌汚染モデルを用いた効力試験により検討したので報告する。

【材料と方法】試験管内における殺菌時間の測定：試験管内で Exspor 10ml に対して、菌液 (*S. aureus*、*P. aeruginosa* もしくは *B. subtilis* 芽胞) 1ml を混和し、15、30 秒、1、3、5、10、30、60 分後にその 0.1ml を採取し、25ml の SCDLP 培地内で 37℃、48 時間培養後菌の発育の有無を判定した。また、最終濃度 0.5% になるように酵母エキスを Exspor に混合した群についても同様に殺菌時間を測定した。

噴霧もしくは燻蒸による殺菌効果の比較：顕微鏡用カバーガラスに菌（上記 3 種）を固定した汚染モデルを用いて Exspor の噴霧もしくはホルマリン燻蒸（容積 10L の麻醉瓶内ミニモデル）を行った。燻蒸もしくは噴霧 5、30 分、1、3、20 時間後に汚染モデルを回収し、SCDLP 培地内で 37℃、48 時間培養後菌の生育の有無を判定した。

飼育室内における Exspor の殺菌効果の確認：研究所内の飼育室において、予め菌 (*S. aureus* もしくは *B. subtilis* 芽胞) を固定した汚染モデル（飼育室床材、濾紙およびステンレス板）を室内に設置し、Exspor 噴霧を行い、噴霧 5、30 分、1、3、20 時間後に、汚染モデルを回収し SCDLP 培地内で 37℃で 48～72 時間培養し菌の生育の有無を判定した。

【結果および考察】試験管内で Exspor を細菌に直接作用させた場合、*S. aureus* および *P. aeruginosa* に対する殺菌時間は有機物の有無に関わらず 15 秒以内、*B. subtilis* 芽胞に対しては有機物非存在下では 5 分以内、有機物存在下では 30 分以内であった。

ホルマリン燻蒸もしくは Exspor 噴霧による *S. aureus* および *P. aeruginosa* の殺菌時間は両者とも 5 分以内であった。しかし、*B. subtilis* 芽胞は、Exspor 噴霧では 3 時間でほぼ死滅していたが、ホルマリン燻蒸では 3 時間で 9/10 検体に菌が生存しており 20 時間ですべて死滅した。

飼育室内において、*S. aureus* もしくは *B. subtilis* 芽胞により汚染した床材、濾紙およびステンレスを汚染モデルとして、Exspor 噴霧効果を確認した結果、床材で 5 分後に 3/10、ステンレスで 1 時間後に 1/10 検体から菌が検出された以外は、5、30 分、1、3、20 時間後のいずれにおいても菌は検出されなかった。

以上より、Exspor は微生物の中で最も抵抗性の強いものの 1 つである芽胞に対しても噴霧により短時間で十分な殺菌効力を発揮し、有機物の存在下においても効力は保たれることから、ホルマリン燻蒸の代用として飼育室の滅菌に使用できることが確認された。

ヘリコバクター汚染マウスからの細菌分離

鍵山壮一郎、田島優、竹中やよい、吉川理香、黒澤 努（大阪大学医学部附属動物実験施設）

はじめに

ヘリコバクターはマウスに腸炎や肝炎を引き起こすことが知られており、マウスの重要な病原菌となりつつある。

大阪大学医学部附属動物実験施設では SPF 環境下で免疫不全を伴う多くのトランスジェニックマウスを収容している。近年、他の研究施設から多くのマウスが導入されているが、この病原菌に関する微生物モニタリングを行っていない。免疫不全動物にとって重要な病原菌である可能性があることから、この病原菌による汚染動物の検出法を確立することは重要である。我々は第 130 回日本獣医学会で糞便からの PCR 法を用いた菌の検出法を報告した。今回、その方法で陽性と判定された個体から菌の検出を試み、分離株を得ることができたので報告する。

材料と方法

- ・動物：A 社から導入したマウス 2 系統、各 3 匹を用いた。
- ・液体培地：5 %ウシ胎児血清加ブルセラブローズ。
- ・寒天培地：5 %ウシ胎児血清加 1%バクトアガー加ブルセラブローズ。
- ・材料採取：滅菌したビーカーに動物を 1 匹ずつ収容し、30 分後に動物を取りだし、排泄された糞を無菌的に個体別にチューブに採取し、分離まで 4℃に保存した。
- ・分離：採取した糞 1 個を滅菌チューブに取り 0.5ml の液体培地を加えホモジナイザーで懸濁後、さらに 0.5ml の液体培地を加え攪拌し、0.45um のフィルターで濾過後、その濾液 20ul を寒天培地に滴下し微嫌気培容器で培養した。各材料から平均三個のコロニーを三角に裁断した滅菌ろ紙を使って釣菌し、新たな寒天培地に画線し培養した。コロニーが観察できる培養 4 から 5 日後に、ろ紙を使って同様に釣菌し、この操作を 3 回行なって菌の株化を行なった。株化した菌をろ紙で釣菌し、このろ紙を液体培地 0.5ml を入れたチューブに入れ、増菌培養した。
- ・培養条件：培養時のガス濃度はそれぞれ N₂ 85%、CO₂ : 10%、O₂ : 5%とした。培養温度は 37℃とし、培養期間は 4 から 5 日とした。培容器内の湿度を保持するため、キムタオルに蒸留水を含ませたものを容器内に用意した。
- ・菌染色：増菌培養した菌液をスライドガラスに取り火炎固定後ギムザ染色した。
- ・PCR：*H.hepaticus* 用プライマーとして、417bp の産物を得る Shames ら（1995）による B38,B39 を用い、*Helicobacter* 属用プライマーとして、374bp の産物を得る Riley ら（1996）H276f,H676 rを用いた。PCR産物をアガロースゲルにより電気泳動した。

結果

H.hepaticus 用プライマを用いPCR法で検索したところ、分離株は全て陰性であったが、*Helicobacter* 属用プライマーですべて陽性となった。

以上により、今回分離した 15 菌株は *H.hepaticus* ではないが、*Helicobacter* 属であると考えられた。

今後 *H.hepaticus* の分離株を得るために、今回の採取方法や培養条件を検討する必要がある。

HSV-1 感染におけるサイトカインの役割

喜多正和、南 雅人*、今西二郎*
(京都府立医大・実験動物、微生物*)

【目的】単純ヘルペスウイルス 1 型 (HSV-1) は急性感染、潜伏感染および再活性化 (回帰発症) の特徴を有し、それぞれの過程でサイトカインが重要な役割を果たしていることが報告されている。本研究では、HSV-1 感染モデルを用いて、IFN- γ と TNF- α の役割について検討した。

【材料と方法】4 週齢雌 C57BL/6 (B6) マウス、IFN- γ 欠損 (gKO) マウス、TNF- α 欠損 (aKO) マウスを使用した。マウスの角膜に HSV-1 天方株 (1.5×10^6 PFU) を感染させ、生存率を比較検討した。また、再活性化モデルとして HSV-1 感染後 2 ヶ月以上経過したマウスに紫外線照射を行い、照射後 2 日目に眼球 (EB)、三叉神経節 (TG) を採取し、DNA を抽出し PCR 法による HSV-1 DNA の検出を行った。

【結果】1) 急性感染実験の結果、感染 1 ヶ月後の生存率は、対照である B6 マウスが 96% (48/50)、gKO マウスは 58% (25/43)、aKO マウスは 82% (53/65) であり、正常マウスに比べ、gKO マウス、aKO マウスともに生存率は有意に低かった。また、gKO マウスの生存率は aKO マウスに比べ有意に低かった。2) 感染 2 ヶ月後、全例のマウス TG から PCR 法により HSV-1 DNA が検出され、潜伏感染の成立と維持が示唆された。3) 紫外線照射による再活性化の割合を比較検討した結果、B6 マウスで 16% (4/25)、gKO マウスで 47% (9/19)、aKO マウスで 48% (10/21) であり、正常マウスに比べ、gKO マウス、aKO マウスともに再活性化率は有意に高かった。

【考察】1) IFN- γ と TNF- α は HSV-1 の中枢神経への進展の防御に重要な役割をもつことが明らかとなった。2) IFN- γ と TNF- α は HSV-1 の潜伏感染の成立と維持に必要なではないことが示唆された。3) IFN- γ と TNF- α は HSV-1 の再活性化の抑制に重要であることが示唆された。

ラットを用いた小核試験法の検討

○浜田修一 1、2、並木千晶 1、荃田憲一 1、山崎賢一 2、中西 聡 2、中島一男 2、芹川忠夫 2、林 真 3
(1 エスエス製薬(株)・中研、2 京都大・院・医・動物実験施設、3 国立衛研・変異遺伝)

I. 目的

ラットとマウス、短期と長期試験の検出力を比較し、一般毒性試験の動物を利用した小核試験の可能性について検討した。また、小核試験に影響を及ぼす可能性のある要因として系統差および加齢の影響について調査した。

II. 材料および方法

1. 短期小核試験(マウス小核試験との比較)

化合物: ラットがん原性陽性マウス小核陽性物質: 30 化合物, マウス小核陽性物質: 5 化合物,

ラットがん原性陽性マウス小核陰性物質: 2 化合物, 小核試験に種差報告のある化合物: 3 化合物

投与回数、経路及び最高用量: 1~2回(連続、1日1回)、強制経口もしくは腹腔内、最大耐量

2. 28 日間反復投与小核試験

化合物: マウス小核陽性物質: 15 化合物

投与回数、経路及び最高用量: 28回(連続、1日1回)、強制経口、短期小核試験で小核が誘発される最小用量

3. 系統差についての検討

系統: ACI, BN, BUF, COP, DRH, F344, IS, LEW, RCS, SER, SHR, WAG, WKYO, WTC, ZIMY, SD

化合物、投与回数、経路及び用量: CP, 2回(連続、1日1回)、強制経口、0, 5, 10, 20 mg/kg

4. 加齢の影響についての検討

系統及び週齢: F344, SD, 3, 5, 7, 9, 11, 13 週齢

化合物、投与回数、経路及び用量: CP, 2回(連続、1日1回)、強制経口、0, 5, 10, 20 mg/kg

III. 結果

1. 短期小核試験(マウス小核試験との比較)

マウス小核誘発物質の多くはラットでも小核を誘発した。試験結果の一致率はマウス、ラット間で 87.5%、ラットにおける骨髓と末梢血間で 91.9%となり、ラット小核試験は骨髓、末梢血ともにマウスとほぼ同等に小核誘発性を評価できた。

2. 28 日間反復投与小核試験

短期試験で小核を誘発するほとんどの化合物はラット4週間反復投与試験でも小核を誘発した。また、化合物により小核誘発時期のピークが異なるが、4日目の末梢血および4週間反復投与後の骨髓または末梢血を調べることで、15 化合物中 14 化合物で 4 週間の一般毒性試験で想定される用量でも、小核誘発性を確認することが出来た。

3. 系統差についての検討

骨髓を用いた小核試験では 16 系統全てで CP 5 mg/kg 投与を陽性として検出し、末梢血を用いた小核試験でもほぼ同様の結果を得た。一方、骨髓、末梢血いずれを用いても NCE での小核誘発性の評価の出来る系はなかった。

4. 加齢の影響についての検討

F344, SD 共に 7 週齢までは CP 投与による小核誘発率が低下した。この傾向は骨髓、末梢血共にみられたが、7 週齢以降 CP 投与に対する小核誘発率は安定し、加齢による影響はみられなくなった。

IV. 考察

ラット小核試験は暴露証明や一般毒性試験への統合を考えるとマウスより有用な試験系である。今回、短期投与においても 28 日間反復投与においてもマウスと同等の検出力が示された。また、系統、週齢などは最終的な化合物の小核誘発性評価には大きな影響を及ぼさないことから、一般毒性試験の動物を用いた小核試験の実施も可能であると考えた。

カニクイザルを用いた全身オートラジオグラフィの実践

○佐藤雅樹, 中俣忠博, 棚山薫晴, 宮嶋宏彰, 永田良一 (株新日本科学)

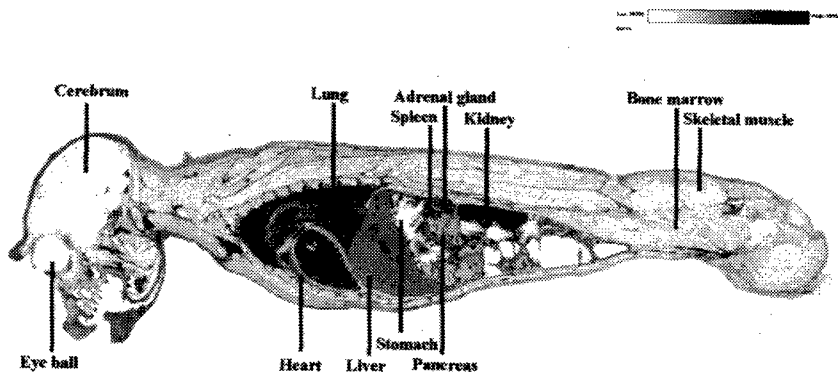
ラット等の小動物を用いた全身オートラジオグラフィ(WARG)は一般的に実施され, 薬物動態試験において放射性標識化合物の全身分布に関する有益な情報を提供している. 一方, 代謝種差, アニマルスケールアップの観点から, 大動物, 特にサルを用いた薬物動態試験の必要性が高くなってきているが, 大動物では, 特別な場合を除き, 血中濃度及び尿糞中排泄試験を実施するにとどまっている. これは, 組織内濃度測定試験では, 時点毎に数例の動物を使用する必要があり, コストが高くなることが主な原因である.

しかし, WARG では, 1 時点 1 匹で評価が可能であり, 放射能濃度の定量的評価も可能であることから, サルを用いた WARG を実施することが有益である. そこで, 今回, カニクイザルに標準標識化合物として ^{14}C 標識 Sucrose を静脈内投与したときの WARG の作成を試みた.

カニクイザル(Cynomolgus, 雄, 3.5 歳, 2.6kg)に ^{14}C -Sucrose を 1 MBq/匹となるように静脈内投与し, 投与後 5 分にドライアイスヘキサン浴にてサルを急速凍結した. バンドソーを用いて尾及び四肢を切断した後, 5%カルボキシメチルセルロースに包埋し, 凍結ブロックを作成し, クライオマクロカットを用いて厚さ $50\mu\text{m}$ の凍結切片を作成した. 切片の表面をマイラー膜で保護した後, イメージングプレートに密着させて露出した.

BAS2500 を用いて画像解析した結果, 肺, 腎に高い放射能が検出され, 脳, 脊髄, 消化管内容物にはほとんど検出されなかった.

今回, サルでも良好な WARG 像が得られ, サル WARG 法が組織内分布試験で実用可能であり, 薬物動態試験で有用な試験方法として期待される.



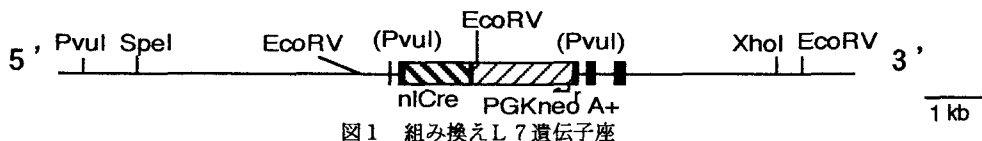
臓器特異的な遺伝子機能の人為的操作に必要な動物の開発

鈴木 昇（三重大学・医・附属動物実験施設）

「要旨」臓器特異的な遺伝子機能の人為的操作に必要な動物の1例として、神経細胞のうち小脳のプルキンエ細胞と網膜の双極細胞に限定してCre組み換え酵素を発現するマウスを作製した。この動物を用いることによって、任意の遺伝子の機能をこれらの細胞においてのみ、欠損または亢進させることが可能となった。

「方法と結果」ノックイン用の遺伝子ターゲティングベクターの作製：まず、小脳プルキンエ細胞と網膜双極細胞特異的に発現するL7遺伝子の翻訳開始部位を含む染色体DNAをクローン化した。次に、この翻訳開始部位のすぐ上流に位置する制限酵素切断部位に、L7遺伝子と順向きに核移行シグナルを付加した組換え酵素をコードするCre遺伝子、及び任意にその下流にプロモーターを逆向きに連結した薬剤耐性遺伝子を挿入し、遺伝子ターゲティングベクターを作製した（図1に組み換えL7遺伝子座）。

胚性幹細胞（ES細胞）を用いた動物ゲノムの操作：ターゲティングベクターを制限酵素によって切断して線状化した後、ES細胞に電気穿孔法等により導入して、組み換えES細胞を得た。



動物個体の作製：この組み換えES細胞を用いて、凝集法または胚盤胞注入法等により、キメラ動物を作製した。このキメラ動物とC57BL/6を交配して、からだを構成するすべての細胞に改変L7遺伝子座をホモまたはヘテロに持つ動物を作製した。いずれの遺伝子型の動物にも異常は認められなかった。これは、L7ノックアウトマウスが正常であるとの報告どおりであった。

機能解析：ヘテロまたはホモマウスとLacZテストーマウス（注）を交配し、Cre遺伝子とLacZ遺伝子の双方を有する個体について組織化学的解析を行った。小脳プルキンエ細胞層（図2）と網膜双極細胞層（図3）の細胞質においてのみ、LacZ酵素活性を検出した。

（注）「LacZテストーマウス」

すべてのタイプの細胞で機能するプロモーター、1つめのLoxP配列、クロラムフェニコールアセチルトランスフェラーゼ遺伝子、二つめのLoxP配列、大腸菌ベータガラクトシダーゼ遺伝子、ポリA付加シグナルの順に連結したトランスジーンを有するトランスジェニックマウスである。

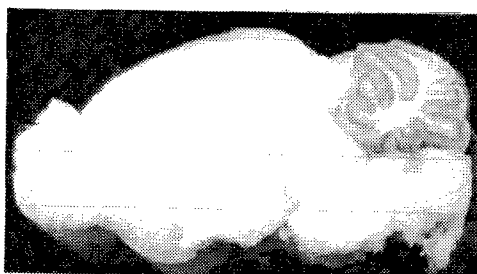


図2 脳矢状断面。

小脳プルキンエ細胞層のみLacZ活性を示す。

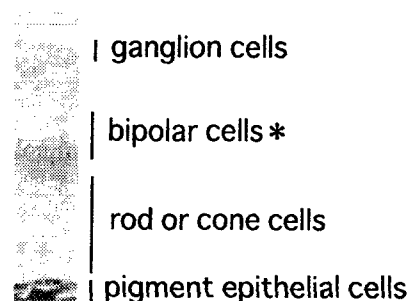


図3 網膜断面。

高率にリンパ節転移を起こすマウス乳癌組織ならびに細胞株

○森本純司¹、広石伸互²、谷口雄三³、前田 環⁴、森 浩志⁵

(¹大阪医大・実験動物センター、²同・2病理、³福井県立大・生物資源、⁴日本精化(株)、⁵神戸常盤短大)

制癌研究においては、癌転移の克服が最重要課題であり、癌転移の機構を解明し、転移抑制物質を検索するためには適切な転移実験モデルが必要である。一般に、ヒトの乳癌はリンパ節や骨転移が多いと言われているが、マウス乳癌においては転移が見られても肺がほとんどであり、リンパ節転移は極めて少ない。我々は今までにいくつかの乳癌培養細胞株や乳癌高発・高転移マウスを作製したが、転移臓器は肺がほとんどであった。よって、厳密な意味で今までのマウスモデルではヒトのよいモデルとはいいがたいところがあった。しかし、我々が先に樹立したマウス乳癌細胞株(BJMC338)をBALB/cマウスに皮下移植した中に肺転移、さらなる移植でリンパ節に転移するものが見出された。そこで、この組織片から新たにリンパ節転移実験モデル作製を試みた。即ち、リンパ節・胸腺・肺等の転移巣を細切して移植針を用いて皮下移植し、そのリンパ節等転移巣からさらに皮下移植を繰り返すことによって、リンパ組織に強い親和性を示す乳癌組織を得た。また、これら乳癌組織から新たな培養細胞株の樹立を試みた。

結果：1) 組織片皮下移植3代目、移植2ヶ月でリンパ節に59% (13/22)、肺に91% (20/22)、移植4代目でリンパ節に80% (16/20)、肺に80% (16/20)、胸腺に60% (12/20)、肋骨/肋間筋に60% (12/20)、移植11~14代においては、右腋窩部リンパ節に41~77%、左腋窩部リンパ節に23~57%、左鼠径部リンパ節に7~18%、肺に93~100%、胸腺に73~89%、肋骨/肋間筋に66~84%、その他、脾、肝、腎、卵巣、副腎、膵、心筋にも転移巣が肉眼的に散見された。移植宿主(BALB/c)における癌の生着・増殖および転移率に雌雄差は認められなかった。

2) リンパ節転移をもつ担癌マウスの乳癌組織を培養して、新たな乳癌細胞株(BJMC3879)を得た。5×10⁶個の細胞をBALB/cマウス右鼠径部皮下に移植することにより、移植10週で左右腋窩部リンパ節に60~80%、左鼠径部リンパ節に40~50%、肺に100%と高率に転移巣を認め、低率ながら胸腺、卵巣、副腎、腎、脳にも転移が確認された。この細胞株は、先に樹立したBJMC338と形態的には似ているが、皮下移植からの転移が高頻度に見られるという点で大きく異なっていた。

従って、この組織片ならびに培養細胞株(BJMC3879)は自然転移実験モデルとして、また、ヒト乳癌に近いモデルとして有用である。

HGFによる慢性腎症の進展阻止効果：ネフローゼ症候群と糖尿病性腎症のモデルから浮きぼりとなった2つの作用点

○ 水野信哉^{1), 2)}、水野洋子²⁾、中村敏一¹⁾、黒澤 努²⁾

[大阪大学大学院医学研究科、バイオ腫瘍生化学¹⁾、動物実験施設²⁾]

慢性腎症は臓器移植以外に根本的治療がない難治性疾患である。現在我が国では血液透析を余儀なくされている患者だけでも20万人を超え、透析待機症例も合わせると、100万人もの人々がこの病気に苦しんでいると言われている。とりわけ糖尿病性腎症とネフローゼ症候群の占める割合が多く、1998年の統計では上位1、2位を独占している。慢性腎症の病態に根ざした分子医学療法の開拓が待ち望まれている。

HGF (肝細胞増殖因子) は私達の研究室で肝再生因子として発見、遺伝子クローニングされた新しいサイトカインである。最近の私達の研究を皮切りにHGFは肝臓を始めとする多くの実質臓器の器官形成、組織修復を司るmulti-organotropic factorであることがわかってきた。さらにHGFは抗アポトーシス効果を発揮して組織破壊を抑制する。HGFは血管新生を促進するとともに細胞外基質の融解を促進する機能も有する。このように組織再生/ 保護に必要な生物活性を備えあわせるHGFは慢性腎症の進展においても重要な役割を担うことが予想された。

実際、私達はネフローゼを自然発症するICGNマウスを用いてHGFの中和抗体が尿細管萎縮、間質線維形成の促進とともに腎機能不全を増悪することを見出し、内因性HGFの腎再生/ 保護因子としての重要性を明らかにした (Mizuno S et al, Kidney Intl 2000)。さらにリコンビナントHGFが尿細管に代償性増殖を誘起して組織線維化を抑制するとともに腎機能を改善することを示してきた (Mizuno S et al, J Clin Invest 1998)。

一方、糖尿病性腎症は高血糖状態により糸球体内皮細胞に傷害がおこり、その結果、糸球体硬化に陥ると言われている。私達はHGFが高血糖下での血管内皮細胞死を抑制することを報告している (Morishita R et al, Diabetes 1997)。そこでストレプトゾトシンで誘発した糖尿病マウスの腎傷害を調べたところ、腎組織中のHGFレベルの低下に一致して糸球体硬化が進行することが分かった。この因果関係を明らかにすべくHGFに特異的な中和抗体を糖尿病マウスに投与したところ、内皮細胞の脱落、細胞外基質の過剰沈着とともにBUN値でみた腎機能が増悪していた。一方、リコンビナントHGFは糸球体内皮細胞を維持するとともに糸球体硬化の進展を抑制した。その結果、糖尿病マウスに見られた腎機能不全はHGFによって改善されることが判明した。

今回、原因がまったく異なる慢性腎不全の2種類のモデルを用いてHGFの治療効果を解析した結果、HGFが腎臓ネフロン構成成分である糸球体と尿細管の両方に作用するdouble-functional renotropic factorであることが浮きぼりとなった。すなわち、高度のネフローゼを伴う腎症では尿細管代償性増殖の誘導が重要な治療標的であり、さらに糖尿病性腎症では糸球体内皮細胞の維持が進展遅延に重要と考えられた。HGFは糸球体と尿細管を含む腎再生/ 保護因子の本体であり、このような生理活性物質の体外的補充は慢性腎症の病態に基づく合理的な治療戦略となることが期待される。

オリーブオイル負荷による WHHL ウサギの外因性脂質吸収能の評価

塩見 雅志, 伊藤 隆, 田村 敏昌, 山田 悟士, 木下 肇* (神戸大・医・動物実験施設, *日本たばこ・医薬研究所)

【目的】低比重リポタンパク (LDL) 受容体機能が遺伝的に異常をきたしている WHHL ウサギの内因性リポタンパクおよび小腸で吸収された外因性脂質を血中で搬送しているカイロミクロンの代謝については詳細に検討されている。しかし、小腸における外因性脂質の吸収能についての検討は少ない。WHHL ウサギの外因性脂質の吸収能を調べる目的で、オリーブオイルを経口投与し、血漿脂質に及ぼす影響を検討したので報告する。

【方法】6月齢のオスの WHHL ウサギを生理食塩水投与群 (5匹)、オリーブオイル投与群 (5匹)、オリーブオイル+MTP 阻害剤投与群 (5匹) に区分した。24 時間絶食後、オリーブオイルあるいは生理食塩水 1.5 ml/kg を経口投与した。MTP 阻害剤 (JTT-722) は 100 mg/kg の用量でオリーブオイル投与 30 分前に投与した。オリーブオイルあるいは生理食塩水投与前と投与後に採血し、EDTA を添加して血漿を調製した。血漿中の中性脂肪、総コレステロール、リン脂質は酵素法で測定した。リポタンパクはアガロースゲル (タイタジェルリポタンパク, ヘレナ研究所) を支持体として電気泳動で分画し、分画後中性脂肪用染色液 (タイタジェル S-トリグリセライド, ヘレナ研究所) でゲルを染色し、デンシトメータで解析した。また同月齢の日本白色種ウサギ 5 匹にオリーブオイルを経口投与し、血漿脂質値を測定した。

【結果】中性脂肪は、生理食塩水群ではほぼ一定であったが、オリーブオイル群ではオリーブオイル投与前の 227 ± 39 mg/dl (mean $\pm$ SEM) から投与 14 時間後の 364 ± 30 mg/dl に 1.7 倍に増加した ($P < 0.001$)。しかし、中性脂肪のリポタンパクへの組み込みを阻害する MTP 阻害剤の投与によってオリーブオイル投与後の血漿中性脂肪の増加は抑制され、血漿脂質値はオリーブオイル投与前に対して有意な変動を示さなかった。オリーブオイル投与は総コレステロール値とリン脂質値には影響を及ぼさなかった。カイロミクロン分画の中性脂肪値は生理食塩水群では有意な変動を示さなかったが、オリーブオイル群では投与前の 3.5 ± 1.0 mg/dl から投与 10 時間後の 7.3 ± 1.4 mg/dl ($P < 0.05$), 14 時間後の 10.8 ± 1.6 mg/dl ($P < 0.005$) にそれぞれ有意に上昇した。この上昇は MTP 阻害剤の投与によって有意に抑制された。また、LDL 中の中性脂肪値もオリーブオイル投与群で有意に増加したが、MTP 阻害剤との併用によってこの増加は抑制された。日本白色種ウサギではオリーブオイルの投与によって血漿中性脂肪値は投与前の 39.0 ± 1.4 mg/dl から投与 10 時間後の 53.3 ± 6.7 mg/dl に増加し (1.4 倍), 増加率は WHHL ウサギとの間に有意な差がなかった。

【考察】WHHL ウサギのオリーブオイル吸収能は JW と同様と考えられた。なお、WHHL ウサギにおける LDL および血漿中の中性脂肪値の上昇は、LDL 受容体の機能異常による可能性が考えられた。

ラット脳からのピューロマイシン感受性アミノペプチダーゼの単離・精製と諸性質の検討

山本 好男¹⁾、大久保 岩男²⁾、西 克治¹⁾

(¹⁾ 滋賀医大・法医学、²⁾ 同・生化学第二)

【目的】

ピューロマイシン感受性アミノペプチダーゼ(PSA)は、種々の哺乳類の肝臓、腎臓、肺や胎盤等に存在する蛋白分解酵素の一つであり、enkephalin や Met-Lys-bradykinin などの生理活性物質の N 末端の Ala や Met 等のアミノ酸を一残基遊離することによって、これらの生理活性物質を不活化することが知られている。また、PSA は細胞質や細胞分裂時の核、分裂時の微小管に局在すること、PSA による細胞周期を制御するタンパク質やペプチドの分解が阻害された結果アポトーシスが起こること、PSA の欠損が無痛症や性行動・生殖機能の形成あるいは維持に異常をきたすことなどが報告されている。

今回、私共は、細胞質加水分解酵素の存在意義を明らかにする目的で、PSA をラット脳から精製し、精製酵素の物理化学的諸性質を検討したので報告する。

【材料および方法】

ラット脳をワーリングブレンダーでホモジナイズし、105,000×g にて遠心し、上清を得た。次いで、硫酸分画(40-70%飽和)、Q-Sepharose、MatrexRed A、Superdex 200、Hydroxy apatite などのカラムを用いて、PSA を単離・精製した。得られた精製酵素について、基質特異性、インヒビター、金属イオンの影響、N 末端のアミノ酸配列などを含む生化学的諸性質の検討を行った。さらに cDNA 構造解析結果を比較検討した。

【結果および考察】

ラット脳より精製された PSA の分子量はゲル濾過法で約 100,000、PAGE および SDS-PAGE 上で分子量約 98,000 の単一バンドを示し、native な状態での本酵素は単量体であると考えられた。また、基質特異性や本酵素活性が 1,10-phenanthroline, PCMBs, AEBSF, DFP, amastatin, puromycin などのインヒビターで強く阻害を受け、さらには Zn^{2+} , Cd^{2+} , Hg^{2+} などの金属イオンで阻害されたことから、本酵素は metalloenzyme と serine protease の両方の性質を有することが明らかになった。

N 末端のアミノ酸配列は、マウスやヒトにおいて cDNA 解析により決定されている PSA との間に高い相同性が示され、僅かにマウス PSA とは第 12 番目が、ヒト PSA とは第 11 および 12 番目のアミノ酸残基に違いがみられた。さらに、活性中心のアミノ酸配列は HEXXH(-18 残基)E であり、アミノ酸配列上に、核移行シグナルが一カ所ともう一カ所なりうる配列があり、微小管結合部位が二カ所、cAMP/cGMP 依存性キナーゼによってリン酸化される可能性のある部位が一カ所、カゼインキナーゼによってリン酸化される可能性のある部位が 8 箇所存在することが明らかになった。

〈第69回研究会（平成13年3月3日）〉

テーマ：実験動物の微生物モニタリング項目に関する最近の動向

1. 遺伝子改変動物の授受に伴う微生物感染の増加と実験への影響

八神 健一（筑波大・生命科学動物資源センター）

2. 実験動物を取り巻く環境の変化と ICLAS モニタリングセンターの
微生物検査項目の見直し

高倉 彰（財実験動物中央研究所 ICLAS モニタリングセンター）

3. 実験動物品質の国際標準化 AALAS Health Monitoring Committee の動向

黒澤 努（大阪大・医・動物実験施設）

遺伝子改変動物の授受に伴う微生物感染の増加と実験への影響

筑波大学生命科学動物資源センター 八神健一

1. 遺伝子改変マウスの微生物汚染

従来より、研究者間で学術研究用試料を相互にやり取りする習慣がある。研究成果を人類共通の資産として活用するうえでも極めて重要であり、最近では、国際的な学術雑誌で公表した後は、使用した遺伝子、細胞、微生物などの試料を公的機関に寄託したり、他の研究者の要望に応じて学術研究用の供与を誓約することもある。実験動物においても研究者間で特殊系統の授受が行われてきたが、遺伝子改変マウスの普及とともに、その数は激増している。筑波大学動物実験センター（現：生命科学動物資源センター）における特殊系統（遺伝子改変マウス、ミュータントマウス等）の搬入件数の推移を見ると、1991～1993 年には年平均 1～2 件であったのに対し、1995～1997 年には 30 件以上にのぼり、更に上昇傾向は続いている。これらのマウスは、微生物統御の不完全な環境で飼育され種々の病原微生物に汚染していることも稀でなく、*Pasteurella pneumotropica*, *Syphacia* spp., *Pneumocystis carinii*, *Trichomonas* spp., *Mycoplasma pulmonis*, mouse hepatitis virus, CAR bacillus, GDVII, EDIM, mouse parvovirus などに汚染した例が見られている。同様な遺伝子改変マウスの微生物汚染は国内の大学動物実験施設で度々起きている。国立大学動物実験施設協議会（国動協）のアンケート調査（1998 年実施）によれば、これらのマウスを導入する際、大学や研究機関の動物施設では様々な対応策が取られているが、無条件に導入する例もある。多くの場合、分与する側が微生物検査成績を添付し、被分与側がその情報をもとに、飼育室や飼育装置による隔離の程度を決定する方法が一般的である。帝王切開や胚移植による汚染微生物の除去（微生物クリーニング）を行った後に、導入する例もある。すなわち、実験動物の導入の可否は、受け入れる実験動物飼育施設（被分与施設）の管理者の判断による場合が多い。ところが、微生物検査に対する各施設の取り組みには差があり、共通の受け入れ基準を求める声が強まった。そこで、国動協では 1999 年に「実験動物の授受に関するガイドライン」を制定することとなった。

2. 実験動物の授受に関するガイドライン（国動協）

本ガイドラインは、実験動物の授受に際して、分与者、分与施設管理者、被分与者

および被分与施設管理者が遵守すべき事項を明記し、病原微生物の伝搬防止や輸送中の事故防止等を図ることを目的とし、本文、調査レポート（表1）、微生物モニタリング対象項目（表2）から構成されている。分与動物に添付する情報として、微生物検査成績表に加え、分与動物の健康状態や飼育環境を示す調査レポートを加えた。検査対象項目の選定にあたり、（財）実験動物中央研究所（ICLAS モニタリングセンター）の検査体制や日本実験動物協会（日動協）の推奨する検査項目（日動協メニュー）に加えて、国内外の主要な実験動物生産施設や研究所の検査項目を参考とした。これらの対象項目をリストアップしたのち、病原性や実験への影響をもとに A～E のカテゴリー（実験動物の微生物モニタリングマニュアル、日本実験動物協会/ICLAS モニタリングセンター編集、1988 年）に再分類した。さらに国内での発生頻度を4段階で示し、これらを総合的に判断して3種類（minimum, common, excellent）の微生物学的ステータスに分類した。各ステータスのコンセプトは次のとおりである。Minimum：これらの病原微生物は陰性であること、common：これらの病原微生物は陰性であることが望ましく、系統維持動物では陰性であることを目指す、excellent：免疫抑制動物や免疫抑制実験では陰性であることが望ましいが、通常の動物実験においては存在の可否を問わない。表2にマウスおよびラットの微生物検査項目を示す。また、微生物モニタリングとして定期的に検査すべき項目と、施設の状況や実験目的に応じて各施設が随時に行う非定期検査の区分も行った。その後、公私立大学実験動物施設協議会においても、本ガイドラインに準拠して実験動物の授受を行うことが申し合わされ、現在に至っている。

実験動物の授受に伴う微生物汚染の問題解決には、分与施設、被分与施設が次のようなコンセプトを基本とすべきであろう。①研究用資源である実験動物を供給する側にとって、安定した微生物学的品質を確保し、その情報を提供することは社会的使命である。②それを利用する側は添付される情報を参考として、自己の責任において検疫や微生物清浄化等の対応を取り、その動物の飼育環境を決めるべきである。

3. 授受に伴う微生物汚染に対する今後の課題

1) 技術的課題

急速に普及した遺伝子改変動物やミュータント動物を用いる動物実験の展開は、実験動物の流通や微生物検査にも大きな変革を余儀無くしている。研究用資源の保存供

給体制が整備され、適正に品質管理された実験動物の入手が容易になることが重要である。それにより、研究者間の微生物的品質の不明瞭な実験動物の授受も減少するであろう。また、凍結胚や精子で保存・供給する技術の普及も、授受に伴う微生物汚染の問題解決に大きく貢献するであろう。

一方、実験動物の微生物モニタリングにおいて、検査項目だけでなく検査方法の標準化も重要な課題であると思う。従来、病原微生物感染の診断は、発症した動物やヒトの病巣からの病原因子の分離・同定、あるいは血清中の抗体の検出により行われて来た。この場合、感染動物の病巣には高濃度の微生物が存在し、典型的な症状を示し、抗体産生も明瞭である。一方、飲料水や食品中の微生物検査は、対象物の品質検査の一環として行われる。実験動物学の黎明期においては、前者の方法による病原性の強い微生物に対する検査方法が確立されてきた。ところが、SPF 動物の普及とともに、発症動物を対象とした検査ではなく、後者のような品質管理すなわち微生物モニタリングが定着した。その方法は前者の方法を準用したものであり、当然、検出感度や特異性に限界があることを忘れてはならない。微生物モニタリングは、あらかじめ設定した検査項目を、一定の検査方法で、定期的に行うものであることを、常に念頭におくべきであろう。

2) 病原性の再評価（ウイルス感染の動物実験への影響）

前述のガイドラインで「minimum」に分類された微生物は、病原性や伝搬力が強く実験動物を発症、致死させる微生物、あるいは重要な人獣共通感染症の原因となる。一方、「common」に属する微生物は、致死적ではないが発病の可能性や生理機能を変えるおそれがあり、実験への影響が懸念されるのである。しかし、感染症に共通な免疫系以外への影響やそのメカニズムは殆ど明らかにされていない。マウスやラットに感染するパルボウイルスを例に宿主の生理機能への影響のメカニズムについて概説する。

齧歯類パルボウイルスは、マウスに感染する Minute virus of mice (MVM)、ラットに感染する Kilham's rat virus (RV)、H-1 virus (H-1) の 3 血清型が知られており、主に不顕性感染を起こすが、流死産、新生仔や幼若個体の先天異常（小脳や骨形成不全）、脳炎、肝炎等の病原性を示すこともある。また、in vivo および in vitro で抗腫瘍活性を示したり、自己免疫性糖尿病との関連も知られている（1）。

パルボウイルスは最小の DNA ウイルスであり、限られた遺伝情報しか持たないため、ウイルスの複製には宿主因子を巧みに利用している。約 5 kb のウイルスゲノムには P4 および P38 の 2 つのプロモーターがあり、P4 プロモーターから 2 種類の非構造タンパク質 (NS-1 および NS-2)、P38 プロモーターからは 2 種類のキャプシドタンパク質 (VP-1 および VP-2) が合成される。NS-1 および NS-2 は感染初期に作られる初期タンパクであり、ウイルス構成成分である VP (後期タンパク) の合成や宿主の生理機能を調節すると考えられている。特に、NS-1 はエンドヌクレアーゼ活性やヘリカーゼ活性を持つとともに、P38 プロモーターに作用して VP-1 や VP-2 の転写を促進する。同時に、宿主遺伝子に対しても転写因子として作用し、その過剰発現により感染細胞にアポトーシスを誘導する (3)。最近、我々は MVM の NS-1 に結合する宿主因子のひとつとして、転写のコアクチベーターである CREB binding protein (CBP) を明らかにした (2)。CBP は宿主の様々な遺伝子の転写を介在する分子として知られており、NS-1 は CBP との相互作用を介して、宿主の様々な遺伝子の発現を修飾している可能性が高い。

近年、MVM、RV、H-1 とは血清学的に区別される変異型パルボウイルスによる実験動物の汚染が世界的に広まっている (1, 6)。マウスから分離された mouse parvovirus (MPV)、ラットから分離された rat parvovirus (RPV) などが知られ、これらの新型ウイルスは、*in vivo* においてリンパ系組織への親和性が強く、感染個体はこれらのリンパ系組織に長期間ウイルスを保有すると考えられる (5, 6)。我々が見出した RPV は *in vitro* でラット T リンパ腫細胞 (C58 (NT)) に感染・増殖し、アポトーシスを誘導する。さらに一部の細胞は感染後も生存し、C58(NT)とは表現型の異なる耐過細胞クローンに変化する (図 1)。興味深いことに、耐過細胞はウイルスの再感染に抵抗し、アポトーシス抵抗性や造腫瘍性の低下 (図 2) も観察される (4)。パルボウイルスは最小の遺伝情報しか持たないウイルスであり、感染細胞の表現型の変化、宿主の生理機能の変化や病態は、ウイルス初期タンパクである NS に起因する可能性が高い。

このように、ウイルス感染は、宿主にとって一過性の遺伝子導入に相当する。ウイルス遺伝子の産物が宿主の細胞内の情報伝達経路を修飾し、分子レベル、細胞レベルあるいは個体レベルで様々な影響を実験動物に与えている。今後、従来から知られている実験動物由来微生物の、動物実験への影響を明らかにするためには、病原性の再評価が必要であろう。そのためには実験的な研究と共に、様々な遺伝子改変動物における微生物感染の症例を詳細に解析、報告し、知見の集積を図ることも重要である。

参考文献

1. Jacoby RO, Ball-Goodrich LJ, Besselsen DG, McKisic MD, Riley LK, Smith AL. Rodent parvovirus infections. 1996. *Lab Anim Sci.* 46(4):370-380.
2. Ohshima T, Yoshida E, Nakajima T, Yagami K, Fukamizu A. Effects of interaction between parvovirus minute virus of mice NS1 and coactivator CBP on NS1- and p53-transactivation. 2001. *Int J Mol Med.* 7(1):49-54.
3. Ohshima T, Iwama M, Ueno Y, Sugiyama F, Nakajima T, Fukamizu A, Yagami K. Induction of apoptosis in vitro and in vivo by H-1 parvovirus infection. 1998. *J Gen Virol.* 1998. 79: 3067-3071.
4. Ueno Y, Harada T, Iseki H, Ohshima T, Sugiyama F, Yagami K. Propagation of rat parvovirus in thymic lymphoma cell line C58(NT)d and subsequent appearance of a resistant cell clone after lytic infection. 2001. *J Virol.* 75(8):3965-3970.
5. Ueno Y, Sugiyama F, Sugiyama Y, Ohsawa K, Sato H, Yagami K. Epidemiological characterization of newly recognized rat parvovirus, "rat orphan parvovirus". 1997. *J Vet Med Sci.* 159: 265-269.
6. Ueno Y, Sugiyama F, Yagami K. Detection and in vivo transmission of rat orphan parvovirus (ROPV). 1996. *Lab Anim.* 30:114-119.

表 1. 実験動物の授受に関するガイドラインにおける「調査レポート」

(様式 4 号の 1)

実験動物授受のための動物健康及び飼育形態調査レポート

— Rodent Transfer Report —

本レポートは、被分与施設における分与動物の受け入れの際に参考資料として活用されますので、是非回答のご協力をお願いします。

1. 動物の健康調査に関して

- A. 分与動物名: _____
- B. 分与動物に関するこの健康調査レポートは、貴施設におけるどの動物に対しての情報提供ですか？
☐ 貴施設の全動物 ☐ 分与動物が飼育されていた部屋の動物のみ
- C. 貴施設では、動物の微生物モニタリングについて、実験動物の授受に関するガイドライン（国動協）または実験動物のモニタリングに関する指針（公私動協）に準拠していますか？
☐ はい ☐ いいえ
- D. 貴施設では、動物の微生物モニタリングをどのくらいの頻度で行っていますか？
☐ 1 回未満/年、☐ 1 回程度/年、☐ 2 回程度/年、☐ 3 回程度/年、
☐ 4 回程度/年、☐ 6 回以上/年、☐ その他

E. 微生物モニタリングに提供された動物は次のどちらですか？また、検査動物数をお答え下さい。

- ☐ モニター（センチネル）動物（検査動物数: 匹）
- 分与動物と ☐ 同じケージ、☐ 同じラック、☐ 同じ飼育室、☐ 同じ飼育区域）内で飼育
- ☐ 無作為抽出動物（検査動物数: 匹）
- 分与動物と ☐ 同じケージ、☐ 同じラック、☐ 同じ飼育室、☐ 同じ飼育区域）内で飼育

F. この健康調査レポートを提出する以前に、養殖上の問題が生じたことがありますか？
 （注：少なくとも最近 1 年以内に起きた問題については必ず記入して下さい。）

- ① 施設全体上の問題
☐ はい ☐ いいえ（“はい”の場合、支障がなければそのレポート等のコピーを提出して下さい。）
- ② 分与動物に関連する問題
☐ はい ☐ いいえ（“はい”の場合、支障がなければそのレポート等のコピーを提出して下さい。）
- G. 貴施設では信頼のおけるブリーダー以外の動物を検査せずに導入することがありますか？
☐ はい ☐ いいえ（“はい”の場合は、検査しなかった理由を以下に説明して下さい。また隔離しない場合は後日検査をしましたか？）

(様式 4 号の 2)

H. 今回の分与動物は上記の情報におけるブリーダー以外の動物と同室で同居していますか？

- ☐ はい ☐ いいえ（“はい”の場合、支障がなければ上記の動物についての健康状態に関する資料のコピーも提出して下さい。）

2. 分与動物の飼育形態について

A. 貴施設における分与動物の飼育形態はいずれかと考えますか？

- ☐ バリア・SPF（完全滅菌のブース、マスク、ガウン使用や入域制限区域など）
☐ 準 SPF 扱い（高性能フィルターによる空調、滅菌済み飼育器材類使用、しかし一般的滅菌衣服、入域制限なしなど）
☐ コンベンショナル（未滅菌飼育器材類の使用、オープンケージなど）
☐ その他（以下に具体的に記入して下さい。）

B. 分与動物に対して最近よく使用されているマイクロアインソレーター・ケージや一方方向性気流方式飼育装置などを使用していますか？

- ☐ はい ☐ いいえ（“はい”の場合、次のどの装置ですか？）
☐ マイクロアインソレーター・ケージ、☐ フィルタートップ・ケージ、☐ クリーン・ラック類、
☐ 一方方向性気流方式飼育装置、☐ その他（ ）

C. 同一飼育室で複数の動物種を飼育していますか？

- ☐ はい ☐ いいえ

D. 分与動物が飼育されている部屋で、繁殖は行われていますか？

- ☐ はい ☐ いいえ

3. 分与動物についてなにかコメントがあれば以下に記入して下さい。

回答者（分与者及び分与施設管理者）

1. 分与者氏名: _____

TEL _____
 FAX _____
 E-mail _____

2. 分与施設管理者氏名: _____

TEL _____
 FAX _____
 E-mail _____

3. レポート作成日: 平成 年 月 日

表2. 実験動物の授受に関するガイドラインにおける検査対象微生物

マウス

Pathogen	カテゴリー (*)	発生頻度 (**)	ステータス	定期／非定期検査
Mouse hepatitis virus	B	☆☆☆	Min	定期
Sendai virus (HVJ)	B	☆☆☆	Min	定期
Ectromelia virus	B		Min	非定期
Lymphocytic choriomeningitis virus	A		Min	非定期
Mouse rotavirus (EDIMV)	B/C	☆☆	Com	非定期
Mouse parvovirus MVM/MPV)	C	☆☆	Com	非定期
Mouse encephalomyelitis virus (TMEV)	C	☆☆	Com	非定期
Pneumonia virus of mice (PVM)	C	☆☆	Com	非定期
Mouse adenovirus	C	☆	Com	非定期
Reovirus type 3	C	☆	Com	非定期
Lactate dehydrogenase elevating virus	C	☆☆	Com	非定期
<i>Mycoplasma pulmonis</i>	B	☆☆☆	Min	定期
<i>Salmonella</i> spp.	A	☆	Min	定期
<i>Clostridium piliformis</i> (Tyzzer's organism)	C	☆☆	Min	定期
<i>Corynebacterium kutscheri</i>	C	☆☆	Min	定期
<i>Pasteurella pneumotropica</i>	C	☆☆☆	Com	定期
Cilia-associated respiratory bacillus (CAR)	C	☆☆	Com	非定期
<i>Citrobacter rodentium</i> (<i>Escherichia coli</i> O15 a.c:K(B))	B/C	☆	Com	非定期
<i>Helicobacter hepaticus</i>	C	☆☆	Com	非定期
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	D/E	☆☆☆	Ex	定期／非定期
<i>Staphylococcus aureus</i>	D/E	☆☆☆	Ex	非定期
<i>Pneumocystis carinii</i>	D	☆☆	Ex	非定期
Pathogenic protozoa		☆☆	Ex	非定期
<i>Giardia muris</i>	C	☆☆	Com	定期
<i>Spironucleus muris</i>	C	☆☆	Com	定期
Nonpathogenic protozoa		☆☆☆	Ex	定期
Trichomonads etc.	E	☆☆☆	Ex	定期
Helminths (pinworms)	C	☆☆☆	Com	定期

ラット

Pathogen	カテゴリー (*)	発生頻度 (**)	ステータス	定期／非定期検査
Sladacryoadenitis virus (SDAV)	B	☆☆☆	Min	定期
Sendai virus (HVJ)	B	☆☆☆	Min	定期
Hanta virus	A	☆	Min	定期
Rat parvovirus (KRV/H-1/RPV)	C	☆☆	Com	非定期
Mouse encephalomyelitis virus (TMEV)	C	☆	Com	非定期
Pneumonia virus of mice (PVM)	C	☆☆	Com	非定期
Mouse adenovirus	C	☆	Com	非定期
Reovirus type 3	C	☆	Com	非定期
<i>Mycoplasma pulmonis</i>	B	☆☆☆	Min	定期
<i>Salmonella</i> spp.	A	☆	Min	定期
<i>Clostridium piliformis</i> (Tyzzer's organism)	C	☆☆	Min	定期
<i>Corynebacterium kutscheri</i>	C	☆☆	Min	定期
<i>Bordetella bronchiseptica</i>	C	☆☆	Min	定期
<i>Pasteurella pneumotropica</i>	C	☆☆☆	Com	定期
<i>Streptococcus pneumoniae</i>	C	☆	Com	非定期
Cilia-associated respiratory bacillus (CAR)	C	☆☆	Com	非定期
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	D/E	☆☆☆	Ex	定期／非定期
<i>Staphylococcus aureus</i>	D/E	☆☆☆	Ex	非定期
<i>Pneumocystis carinii</i>	D	☆☆	Ex	非定期
Pathogenic protozoa		☆☆	Ex	非定期
<i>Giardia muris</i>	C	☆☆	Com	定期
<i>Spironucleus muris</i>	C	☆☆	Com	定期
Nonpathogenic protozoa		☆☆☆	Ex	定期
Trichomonads etc.	E	☆☆☆	Ex	定期
Helminths (pinworms)	C	☆☆☆	Com	定期

(*)「実験動物の微生物モニタリングマニュアル」日本実験動物協会、1988。ここでは、本マニュアルのカテゴリーに沿って新たな微生物・寄生虫も追加分類した。(**) ☆：過去20年程度に国内での発生がわずかにあり、☆☆：時々あり、☆☆☆：頻繁にあり、無印：全くなし。

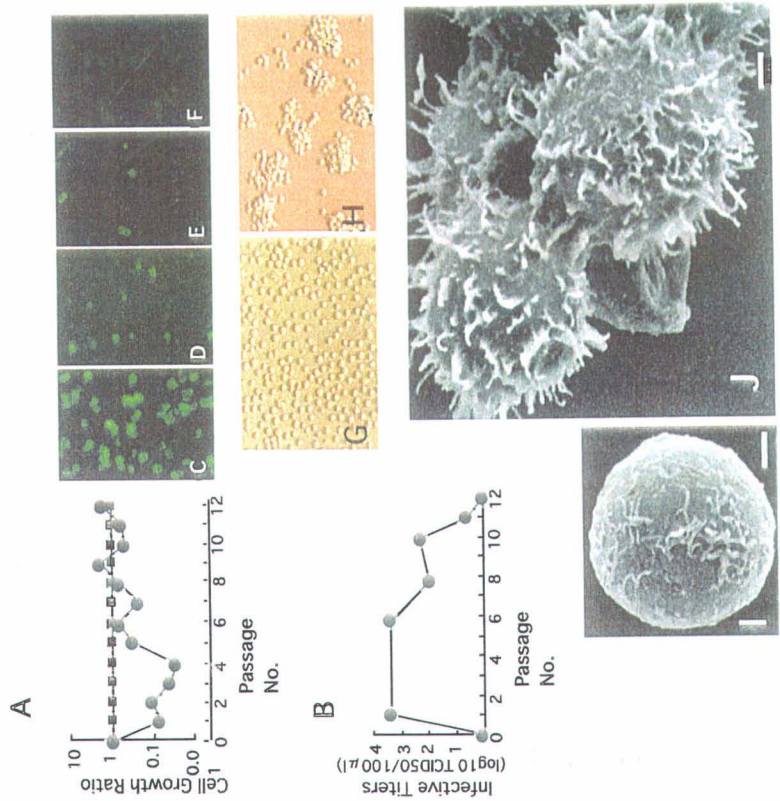


図1.Tリンパ腫細胞のバルボウイルス感染と抵抗性細胞の出現

A: バルボウイルスに感染したラットTリンパ腫 (C58(NT)細胞 (●)) は大多数の細胞が死滅し、生細胞の増殖性は正常細胞 (■) より低下するが、継代培養を続けると増殖性は回復する。B: この間、ウイルスの持続感染がみられるが、継代12代以降、感染性ウイルスは認められない。感染性ウイルスの消失は、IF-Aによるウイルス抗原の検出でも確認できる (C: 4th, D: 8th, E: 10th, F: 12th)。未感染細胞 (G, I) に比較し、感染後に出現した抵抗性細胞 (H, J) は細胞の接着性の亢進が見られ、細胞形態の変化も認められた。

Bar=1 μm. (J. Virol. 2001)

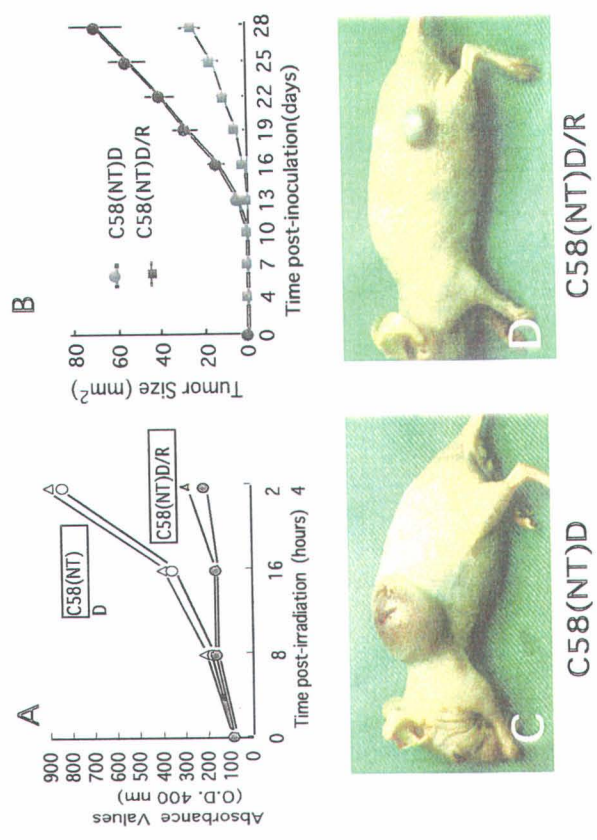


図2.Tリンパ腫 (C58(NT)D) 細胞と抵抗性細胞 (C58(NT)D/R) のアポトーシス抵抗性と造腫瘍性

A: 両細胞に600(○, ●)および800(△, ▲) GyのX線を照射し、DNA fragmentationをELISA法で検出した。C58(NT)D/Rでアポトーシス抵抗性が認められた。

B, C, D: 両細胞をヌードマウスに皮下接種し、腫瘍の形成時期と腫瘍サイズを測定した。C58(NT)D/Rで造腫瘍性の低下が認められた。(J. Virol. 2001)

実験動物を取り巻く環境の変化と ICLAS モニタリングセンターの微生物検査項目の見直し

(財)実験動物中央研究所
ICLAS モニタリングセンター
微生物検査部
高倉 彰

1. はじめに

近年わが国の実験動物の微生物学的な品質は向上し、過去見られたような動物を致死させる、あるいは動物の生産、動物実験成績に重大な影響を及ぼすような病原性の強い微生物の感染事故の発生は減少した。この理由は、実験動物生産者、飼育者そして研究者の微生物コントロールに対する意識向上にあることはいうまでもない。

さて、その微生物コントロールには欠かせない微生物モニタリングを実施するためには、各施設の目的にあった検査項目を決める必要がある。ICLAS モニタリングセンターにおいて現在実施している微生物検査項目は、1978年から2年間行われた文部省科研費特定研究(1)「実験動物の品質基準の作成及び検査方法の確立に関する研究(研究代表者:野村達次)」におけるわが国のマウス・ラットの生産・実験施設の微生物汚染調査結果をもとに検討され確立された。そして当センターでは、その中から汚染率や病原性を考慮し、培養、血清反応、寄生虫のセットを設定した。しかしそれから約20年経過し、これら検査項目は、実験動物施設における汚染微生物の変化、*Helicobacter* 属のような新しい病原体の出現、腎症候性出血熱など人畜共通伝染病検査の必要性の認知、国内外機関間の動物交流の増加等によるユーザーからの検査項目に対する要望の変化など、現状に合わなくなってきた点が多くなってきた。そこで当センターでは、これらの状況を考慮し、さらに各微生物の重要度(病原性、汚染率)の再評価を実施し、モニタリング項目の見直しを実施した。そこで今回本誌上をお借りして、この20年の実験動物の微生物学的な環境の変化を振り返りながら、変更理由を解説したい。

今回の見直しにあたり、当センターでは①センターが提唱している各微生物の病原性のカテゴリーを念頭に置く(表1)②実験動物施設における現在の汚染率を考慮する③新興感染症を加える④ユーザーの要望に対応する。を基本的な考えとして作業を進めた。以下新しいセット項目について、その設定理由を説明する。

2. 培養 I セット

本セット(表2)には、培養検査において重要度(病原性、汚染率)の高い微生物を組み合わせた。旧セット(培養A)からの変更点は、これまでオプション項目であった *M. pulmonis* をセットに加え、*Paeruginosa* をオプション項目(培養Ⅳ)としたことである。*M. pulmonis* の汚染率は、図1、2の1980年～81年と1992年～96年の汚染微生物の推移を見てもわかるように、大学・研究所等のマウス・ラットにおいて依然として高く、またカテゴリーB であることから、重要度が高いと考え培養 I セットに加えた。一方 *Paeruginosa* は汚染率が高いものの、病原性はカテゴリーD に位置し、通常はほとんど発病しない日和見病原体である。また従来は、重要度の高い微生物と同じセットであったことから、陽性になった際それらと同等に考えられ、混乱を招くことがあった。そこで本菌の病原性からみた重要度を理解してもらう意図も含め新セットから除外した。なお *P. pneumoniae* は病原性は弱い、汚染率から見て重要が高いと考え、培養 I に組み込んだ。

3. 血清反応 I セット

本セット(表2)も、血清反応において最も重要度の高い微生物(病原性、汚染率)を組み合わせた。従来のセット(血清反応 A)からの大きな変更点は、Hantavirus と LCM virus を加え、MAV, *S. typhimurium* そして *C. kutscheri* を除外したことである。まず Hantavirus と LCM virus を加えた理由は、言うまでもなく両者は重要度の高い人畜共通伝染病(カテゴリーA)であること、中でも Hantavirus はわが国の実験動物施設においても過去2回の感染事故例があり、また図3の最近増加している検査依頼に示すように、本ウイルスの検査依頼は5年程前から急増し、各施設における関心が高いことがあげられる。また LCM virus は現在国内における汚染例はないと思われるが、欧州ではハムスターや腫瘍細胞における汚染例が報告されており、実験動物の輸入の際には注意を要する。一方 MAV は図2、3を見てもわかるように汚染率が低く、病原性も弱いこと(カテゴリーC)から、あとで説明する血清反応セットⅡに加えた。また *S. typhimurium*(同A)と *C. kutscheri*(同C)はその病原性は強いが MAV 同様汚染率が低いことから旧セットから除外し、新たに血清反応Ⅲセットを設定した。なお従来からセットに組み込まれていた Sendai virus, MHV, SDAV, *M. pulmonis* そして *C. piriforme*(Tyzzar 菌)は、病原性が強い、あるいは現在でも汚染率が高いこと、また Ectromelia virus は国内における汚染例は認められないが、米国や中国では汚染報告があり、病原性(同B)も強いことを考慮し、現在でも重要度が高い微生物と考えた。

4. 血清反応Ⅱセット

このセット(表2)に含まれる微生物の多くは病原性が弱い murine virus(同C)である。これら微生物は旧血清反応 A セットが確立された後、オプション項目として順次、当センターの検査項目に加えられたが、国内における汚染報告例は少ない。しかし図3に示すように、ここ数年これら微生物の検査依頼が増加している。その大きな理由は、

実験動物の国際交流の増加が考えられる。つまり海外に動物を輸出する際、先方よりこれら項目を加えた健康証明書の添付が要求されるからである。またこの検査依頼は、これら微生物をまとめて依頼される例が多いことから、このセットを設定した。

5. 鏡検 I セット

従来の寄生虫検査は、過去の汚染率の高さを考慮し、*Giardia muris*, *Spiroplasma muris* そして *Syphacia* spp. の3項目をセットにして実施してきた。しかし近年、遺伝子操作動物の維持・実験施設において、消化管内原虫や *Aspiculuris tetraptera* (ネズミ大腸ぎょう虫) の汚染が認められるようになってきていること、そして前出の健康証明書において外部寄生虫の検査も求められることが多い。これらの理由により従来実施していた名称による検査ではなく、寄生虫全般をカバーできる検査内容に変更した(表2)。

6. 検査技術の進歩と新しい検査依頼への対応

微生物検査技術はこの10年前後の間に目覚しく進歩した。たとえば遺伝子増幅法(PCR)は、分離・培養が難しい微生物の検査に大きく貢献している。図3を見るとマウス・ラットに移植する腫瘍細胞や株化細胞の検査依頼が増加してきている。この検査依頼の多くは検査材料からの分離・培養が難しい MHV, CAR bacillus, *C. piliforme* (Tyzzer 菌) や LDH virus などの検査が主体である。しかしこれらはPCRを用いることにより比較的容易に短期間で検査することが可能になった。また新興微生物で、マウスへの病原性が明らかになっている *Helicobacter hepaticus* や *Helicobacter bilis* も分離・培養が困難な微生物であるが、この方法により検査可能になった。そこでユーザーからの要望が増加している新しい検査依頼へ対応するために、PCRを用いた検査を新たに設定した(表2)。

7. おわりに

はじめにも述べたように、わが国の実験動物の微生物学的な品質は、この20年間に目覚しく向上し、図1, 2に示すように、Sendai virus や *M. pulmonis* のような病原性の強い病原体による大規模な感染事故は激減した。しかし感染症は無くなったわけではなく、現在でもMHVはマウス施設から高率に検出され、またConv. 施設からは多くの病原微生物が検出されている。したがって、実験動物施設における微生物コントロールには、今後とも気を緩めてはいけなことは言うまでもない。

ところで微生物モニタリングを実施する際、多くの人から「検査項目はどう選択すればよいのか？」あるいは「SPF動物の基準は？」などの相談を受ける。当センターが多くの検査項目を揃える理由は、依頼者のニーズに答えるためであり、決してこれら全てを検査すべきであると考えているわけではない。検査項目は、各実験動物施設自体が各微生物の病原性を理解し、その実験目的、施設のハード・ソフトを考慮し、無理のない項目を選択すべきであると考えている。つまり実験動物施設の微生物コントロールにおいて大切なことは、各施設が施設にあった検査項目を設定し、それを適正な方法にて実

施し、その成績を施設の管理・運営に有効利用するとともに、その情報を公開することであると考える。

以上本誌をお借りして、当センターの検査項目の変更とその理由を紹介させていただいたが、当センターでは、今回再設定した培養、血清反応、鏡検の各 I セットに組み込まれている微生物は、マウス・ラットの実験動物施設における微生物コントロールにおいては、重要度が高く、施設から排除すべき微生物であると考える。しかしはじめにも書いたように、本変更により生じる不都合をできるだけ少なくするために、今後とも機会を設け、各関係機関と意見交換していきたいと考えている。

「参考文献」

1. 文部省特定研究(1)報告書「実験動物の作成及び検査方法の確立に関する研究」(1980)
2. (社)日本実験動物協会・微生物モニタリングの実施要領とその解説ーマウス・ラット編ー(1991)
3. 伊藤豊志雄他、*Helicobacter hepaticus* 感染、アニテックス、(1997)

表1 病原性による微生物のカテゴリー

- A: 人畜共通伝染病
 B: 感染力が強く動物を致死させる恐れがある微生物
 C: 致死させることはないが発病あるいは不顕性感染を起こす微生物
 D: 日和見感染を起こす微生物
 E: 通常は病原性はないが、飼育環境の指標になる微生物

表2 新しいマウス・ラットの検査項目

検査方法	検査項目	カテゴリー	検査方法	検査項目	カテゴリー
培養 I	<i>Salmonella</i> spp.	A	血清反応 I	Hantavirus(ラット)	A
	<i>Citrobacter rodentium</i> (<i>E. coli</i> O-115, マウス)	A		Lymphocytic choriomengitis virus(マウス)	A
	<i>Mycoplasma pulmonis</i>	B		Sendai virus	B
	<i>Pasteurella pneumotropica</i>	C		Mouse hepatitis virus	B
	<i>Bordetella bronchiseptica</i> (ラット)	C		Ectromelia virus(マウス)	B
	<i>Corynebacterium kutscheri</i> (ラット)	C		<i>Mycoplasma pulmonis</i>	B
	<i>Streptococcus pneumoniae</i> (ラット)	C		<i>Cilistridium piriforme</i> (Tyzzer菌)	C
培養 II	Dermatophytes	A		<i>Sialodacryoadenitis virus</i> (ラット)	C
培養 III	<i>Staphylococcus aureus</i>	D	血清反応 II	Cilia-associated respiratory bacillus	C
培養 IV	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	D		Pneumonia virus of mice	C
鏡検 I	消化管内原虫	C, E		Mouse encephalomyelitis virus	C
	ぎょう虫	C, E		Kilham rat virus(ラット)	C
	外部寄生虫	C, E		H-1 virus(ラット)	C
鏡検 II	<i>Pneumocystis carinii</i>	B		Minute virus of mice	C
PCR	<i>Helicobacter hepaticus</i>	C		Reovirus Type 3	C
	<i>Helicobacter bilis</i>	C		Mouse adenovirus	C
	Cilia-associated respiratory bacillus	C		Mouse rotavirus(EDIMV, マウス)	C
	Mouse hepatitis virus	B		Mouse cytomegalovirus(マウス)	C
	<i>Clostridium piriforme</i> (Tyzzer菌)	C	血清反応 III	<i>Salmonella typhimurium</i>	A
	LDHvirus	C		<i>Corynebacterium kutscheri</i>	C

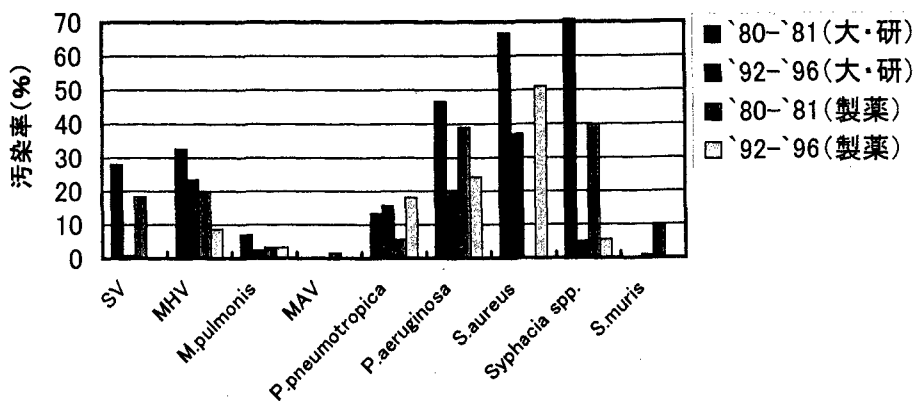


図 1 動物実験施設の汚染微生物の推移(マウス)
 -1980年から1981年と1992年から1996年の大学・研究所と製薬会社等の比較-

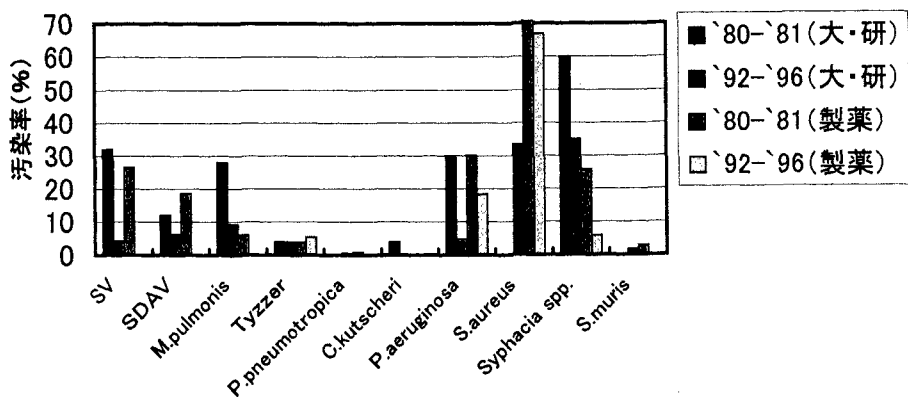


図2 動物実験施設の汚染微生物の推移(ラット)
 -1980年から1981年と1992年から1996年の大学・研究所と製薬会社等の比較-

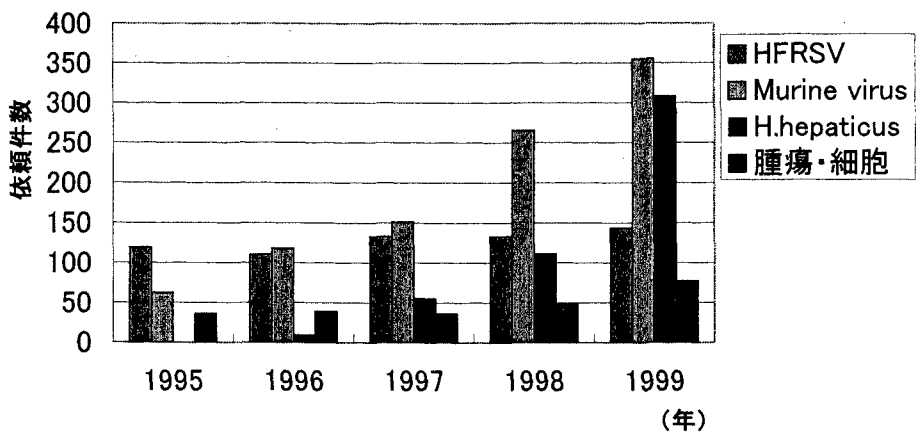


図3 最近増加している検査依頼

実験動物品質の国際標準化
AALAS Health Monitoring Committee の動向
大阪大学医学部附属動物実験施設
黒澤 努

第 50 回米国実験動物学会 (AALAS, 1999 Indiana Polis) において AALAS 科学委員会の提唱により、実験動物品質の国際標準化に関する会議があった。この会議では遺伝学的品質と微生物学的品質の 2 つの国際的グループを形成し話し合いを継続することとなった。日本実験動物学会には微生物学的品質に対応する組織がみあたらないこともあり、日本実験動物医学会がこの問題に対応することとし、私が窓口を勤めることとなった。委員長は Rela Reiley 氏であり、ドイツからは Werner Nicklas 氏が参加し、全 6 委員で審議が開始された。この背景には遺伝子改変動物の急増によりゲッシ動物の国内、国際を問わず、移動が極めて増加し、それにともない感染症の発生が頻発している事が上げられる。

第 51 回 AALAS 時 (2000 年 10 月) に委員会が開催され、当初のたたき台としては FELASA の実験動物微生物の勧告 (Fig. 1) を用いることが提言された。ここには紙面の都合上マウスの病原体リストだけを示すが、実際問題としてはこれほど多くの検査をすべての研究機関が行うことは困難とされている。そこで、これを元に最小限の微生物リストを作ることなどが相談された。さらに今後は ML にて議論を進め、来年の AALAS にはセミナーを開催してそれまでにまとまった成果を公表しようということとなった。逆に言えば本年の秋までに結論を出そうということである。

ところが米国はニューヨークの世界貿易ビルの爆破事故の後、バイオテロと目される炭疽菌の感染事故が相次ぎ、米国実験動物学会に参加することができなくなった。したがってあらたな情報は執筆時点では入手していない。

実際、この活動はすでに始まり、Fig. 2 に示すような案がすでに提案されている。現在、日本実験動物医学会の認定医のうちから微生物を専門とされている鍵山、八神両先生にお入りいただいて、日本実験動物医学会の理事会内で検討を重ねている。その結果米国実験動物学会の開催までに Fig. 3 に示すような提案を作成した。これは最小限のリストを作成しようとの意図をこめているが、実際的にはもっとリストを縮小せざるを得ないのではないかと推測している。

この提案はすでに委員会の ML には送っており、さらには発表予定のスライドも送付した。しかし、この提案に対する反論、あるいは送付したスライドの扱いがどのようなになったかはまだ承知していない。

現在提案された表を概観すると、我が国における微生物学的品質とは大きく異なっている印象を受ける。国際的な取り決めはいつのまにか、どこかで決まってしまった感じをもつものも多いが、今回は最低我が国から委員を選任して意見を求めているのであるから、積極的に発言して行きたい。この問題はやがて我が国の実験動物界に大きな影響を持つことも考えられ、日本実験動物医学会の責任は重いものと受け止めている。しかし、こうした問題は1学会内のみで扱うのは適当ではなく、今後はこの問題に興味を持つ広い分野の専門家の意見を反映させ、我が国を代表する意見として提案して行きたい。

Fig.1 FELASA-APPROVED HEALTH MONITORING REPORT

Name and address of the breeder:

Date of issue: Unit No: Latest test date: Rederivation

Species: Mouse Strain:

HISTORICAL results pos/tested: LATEST TEST results pos/tested:

LABORATORY: METHOD

BACTERIAL AND FUNGAL INFECTIONS

Clostridium piliforme

Bordetella bronchiseptica

Citrobacter freundii (4280)

Corynebacterium kutscheri

Leptospira spp.

Serotype:

Serotype:

Mycoplasma spp.

Biotype:

Pasteurella spp.

Biotype:

*Salmonella*ae

Serotype

Streptobacillus moniliformis

β -haemolytic streptococci

Lancefield grp:

Streptococcus pneumoniae

Other microorganisms associated
with lesions

VIRAL INFECTIONS

Hantaan virus

Lymphocytic choriomeningitis virus

Parvovirus

Mouse hepatitis virus

Pneumonia virus of mice

Reovirus type 3

Sendai virus

Theiler's encephalomyelitis virus

Ectromelia virus

Lactic dehydrogenase virus

PARASITOLOGICAL INFECTIONS

Arthropods

Gastrointestinal helminths

Giardia spp.

Entamoeba muris

Other flagellates

Eimeria spp.

Klossiella spp.

Encephalitozoon cuniculi

Toxoplasma gondii

Spironucleus spp.

PATHOLOGICAL LESIONS OBSERVED

Strain: Lesions:

Fig. 2 現在米国より提案されている微生物リスト

Agent Group	Agent Name	Mice	Rats
Viruses	Sendai	X	X
	PVM	X	X
	MVM	X	
	MHV	X	
	Mouse Parvovirus	X	
	EDIM	X	
	KRV		X
	Rat Parvovirus		X
	SDAV		X
Bacteria	CAR Bacillus	X	X
	C. bovis*	X	
	C. piliforme	X	X
	Helicobacter	X	X
	Mycoplasma	X	X
	Salmonella	X	X
	Strep. pneumoniae		X
	Strep. B-hemolytic	X	
Parasites, Other	Helminths	X	X
	Ectoparasites	X	X
	Pneumocystis*	X	X

● Immunodeficient stocks only

Fig. 3 我が国から提案した微生物リスト

マウス

Mouse hepatitis virus
Sendai virus (HVJ)
Ectromelia virus
Lymphocytic choriomeningitis virus
Mycoplasma pulmonis
Salmonella spp.
Clostridium piliformis (Tyzzer's organism)
Corynebacterium kutscheri

Pasteurella pneumotropica
Helicobacter hepaticus
Helminths(Pin worms)

ラット

Sialodacryoadenitis virus(SDAV)
Sendai virus (HVJ)
Hanta virus
Mycoplasma pulmonis
Salmonella spp.
Clostridium piliformis (Tyzzer's organism)
Corynebacterium kutscheri
Bordetella bronchiseptica

Pasteurella pneumotropica
Helminths(Pin worms)

〈第70回研究会（平成13年6月15日）〉

テーマ：バイオメディカルサイエンスにおける遺伝子改変動物等を用いた新規アプローチの紹介

1. 小脳プルキンエ層及び網膜に遺伝子組換え酵素 Cre を発現する動物の作製

鈴木 昇（三重大医・動物実験施設）

2. 糖転移酵素遺伝子ノックアウトマウスを用いた糖鎖機能の解析

浅野 雅秀（金沢大医・動物実験施設）

3. 遺伝子から見た哺乳動物精子形成の特徴

野崎 正美（大阪大・微生物病研究所）

小脳プルキンエ層及び網膜に遺伝子組換え酵素Creを発現する動物の作製

鈴木 昇 三重大学医学部附属動物実験施設

「要約」

ジターゲットイング法を用いて、L7遺伝子翻訳開始部位に、バクテリオファージ由来遺伝子組換え酵素Cre遺伝子を挿入した動物を作製した。この動物を用いることによって、小脳の神経細胞であるプルキンエ細胞と網膜神経細胞の双極細胞で特異的に遺伝子の過剰発現やノックアウトが可能となった。

「はじめに」

現在、ヒトの遺伝子の全塩基配列を明らかにするゲノムプロジェクトが終わりヒト遺伝子の総数は、約4万個であることが明らかにされた。ポストゲノムプロジェクトとして、その塩基配列が明らかとなった約4万個の遺伝子の一つ一つについて機能を調べるプロジェクトがある。そのような研究の最も強力な方法の一つは、研究対象の遺伝子について突然変異動物を作製することであると考えられる。

これまで、遺伝子ターゲットイングの手法を用いて数多くの突然変異動物が作製されてきたが、成体を用いた遺伝子機能研究の障害となる以下の3つの主要な問題点があった。

第一に、対象遺伝子が動物の胚発生に重要な場合である。突然変異動物は、胎児期に死亡してしまい遺伝子の機能解析ができない。

第二に、対象遺伝子が複数の臓器で発現している場合である。突然変異動物の示す症状は複数臓器の異常に由来する複雑な症状となり、原因を特定臓器の異常に帰着することが困難となるため、遺伝子の機能解析ができない。

第三に、対象遺伝子が、ひとつの臓器の複数のタイプの細胞で発現している場合である。突然変異動物の症状を特定のタイプの細胞の機能異常に帰着することが困難であり目的遺伝子の機能解析ができない。

上記の問題点を解決するため、バクテリオファージCre遺伝子を有するマウスを利用したディショナルノックアウトシステムが開発されつつある。組織・細胞特異的にCreたんぱくが発現する部位でのみ、遺伝子組換えがおこすことができる。

われわれは、C r e 遺伝子をL 7 遺伝子座に挿入した。L 7 遺伝子は、1988年にN o r d q u i s t によって、そのcDNAクローニングが報告された遺伝子であり (Nordquist DT, Kozak CA, Orr HT. (1988))、小脳の神経細胞のプルキンエ細胞と網膜神経細胞の双極細胞でのみ発現する特異性の高い遺伝子として研究されている遺伝子であるが、これまでのところ、L 7 遺伝子ノックアウトマウスを作製しても何ら異常を見出せず、機能が不明のままである。

本小文は、L 7 遺伝子の代わりにバクテリオファージC r e 遺伝子を有するマウスを利用したコンディショナルノックアウトシステム、実験動物系の開発を報告するものである。プルキンエ細胞と網膜神経細胞の双極細胞でのみ、目的とする遺伝子の機能を喪失させ又は特定遺伝子を発現させることが可能にする動物システムが基礎医学・医薬品開発等の分野で大いに応用されることが期待される。

「方法と結果」

マウスゲノム遺伝子のクローニングと解析

マウスゲノムライブラリーは、遺伝子ターゲティングに使用するE S細胞株R W 4 (G e n o m e S y s t e m s 社) が由来した129SVマウスの細胞より抽出した染色体DNAをもとに作製されたものを用いた (S t r a t a g e n e 社)。B a l b / c マウスのL 7 ゲノムDNA 3. 5 k b (翻訳開始部位をコードする配列のすぐ上流のP v u I から、下流へ3. 5 k b はなれたクローンの末端までを使用。) をプローブにして約50万個のファージをスクリーニングして、7個の陽性クローンを取得した。遺伝子ターゲティングベクターを作製するため、L 7 遺伝子の第2エクソンを持つ2つのファージクローンL 7-1とL 7-5を詳細に解析して、制限酵素地図を作成した (図1)。

ノックインのための遺伝子ターゲティングベクターの構築

ノックインとは、遺伝子ターゲティング法を用いて染色体遺伝子の狙った位置に相同組換えによって特定のDNA配列を挿入することを言う。

相同組換え法によるC r e 遺伝子ノックインのための遺伝子ターゲティングベクターについては、ノックインされた組換え酵素C r e 遺伝子がマウスL 7 遺伝子の発現制御と同一の制御下に転写制御を受けるようにするために、C r e 遺伝

子が翻訳開始点をコードするATG配列のすぐ上流にあるPvuI切断部位に挿入されるようにデザインした(図2)。

ターゲティングベクターの5'ホモロジーには、そのPvuIから上流のSpeIまでの5.1kb断片を使用した。3'ホモロジーには、同PvuIから下流のXhoIまでの2.3kb断片を使用した。Cre遺伝子には、Creたんぱくが遺伝子の組換えを担うことから細胞核内で働くことを考慮し、その翻訳開始点をコードする配列の上流にSV40ウイルスT抗原の核移行シグナル5'-CATCATGAGCGGCCCTCCAAAAAAGAAGAGAAAGGTAGAAGACCCGGGCGGCCGC-3')をインフレームに付加した遺伝子(n1-Cre)を用いた。ポジティブセレクション用のネオマイシン薬剤耐性遺伝子については、組み込み部位の転写制御に影響を与えないように、プロモーターとしてマウスのフォスフォグリセロカイネース(PGK)遺伝子のプロモーターを用い、また、転写方向がCre遺伝子の転写と逆向きになるようにした。さらに、非相同組み換え細胞を選択的に死滅させる(ネガティブセレクション)ために、ジフテリア毒素A遺伝子(DT-A)を連結した。構築したプラスミドを制限酵素SwaIで切断して、ターゲティングベクター:pL7KICre/SwaIを調整した。

このベクターでターゲティングを行うと、5'ホモロジー領域と対応する染色体DNA領域の間、3'ホモロジー領域と対応する染色体DNA領域の間で相同組換えがおこり、目的のノックインされたES細胞はネオマイシン耐性になり選別されうると考えた。

ES細胞へのターゲティングベクターの導入とノックイン組換え体の選択

ES細胞としてはRW4(Genome Systems社)を使用した。細胞培養及びターゲティングの操作は基本的にSuzukiらの方法(Development., 122(11), 3587-95.)に従った。5×10⁷の7乗個のES細胞と50μgの調整ターゲティングベクターを0.8mlの緩衝液中で混ぜ、Bio-Rad Gene Pulser(400V, 25μF, 電極幅0.4cm)

を用いた電気パルス法により細胞にDNAを導入した。電気パルスをかけた後、細胞を、10 cmシャーレの底面に単層培養したフィーダー細胞上に培養した。フィーダー細胞としては、ネオマイシン耐性を獲得した細胞からなるトランスジェニックマウスの交尾後12.5日めの胎児の線維細胞を0.1 mg/mlのマイトマイシンCで2時間処理し不活性化し、分裂停止状態にした細胞を用いた。培養開始24時間後に、G418を160 μ g/mlの濃度で添加し、選別を開始した。

培養開始7日後、ネオマイシン耐性のコロニー約600クローンを96穴プレートに移し、さらに培養を続け、十分に増殖したところで、2枚の96穴プレートに分けた。さらに増殖させ、1枚は零下85度冷凍庫で保存し、他の1枚はサザンハイブリダイゼーションによる組み換え体（ノックインを起こした細胞）検出のためのDNA抽出用に使用した。DNA抽出は、常法にしたがったが、検体数が多いため、Proteinase K処理後のフェノール処理を省き、酵素の不活性化のステップとして、96穴プレートのままエタノール沈殿1回、70%エタノールによる洗浄3回を施した。各クローンから抽出したDNAを制限酵素EcoRVで切断してサザンハイブリダイゼーションを行った。プローブは、図に示すように、ターゲティングベクターに使用した3'側ホモロジーのさらに下流に位置するXhoI-EcoRVの0.5 kb DNA断片を使用した。このプローブを用いると、検出されるバンドはもとのES細胞株では5.1 kbの大きさに検出されるが、ノックインをおこした細胞では、ネオマイシン耐性遺伝子内にEcoRV部位が1カ所あることから、約0.8 kb大きくなることが期待された（図2）。

サザンハイブリダイゼーションの結果は、Bio-Image Analyzer BAS2000 (Fujii) により解析した。ノックインを起こしたES細胞コロニーの出現頻度は約25%であった。5.1 kbと5.9 kbのバンドがほぼ同じ強さで出る細胞を選択し（図3）、それをキメラマウス作製に用いた。

図3に、ノックインマウスの尾の一部からDNAを抽出し、EcoRVで消化

し、XhoI-EcoRV 0.5 kb DNA断片をプローブにサザンハイブリダイゼーションを行った結果を示す。相同組み換えを起こしたL7遺伝子座は、ネオマイシン耐性遺伝子の挿入により、約0.8 kb大きなバンドを示す。

キメラマウスの作製とノックインマウス (L7-Creマウス) の選別

キメラマウス作製は、基本的には凝集法に従ったが、透明体を除去した8細胞期のマウス胚1個に対して、5個から7個の細胞からなるES細胞塊を凝集させマウス胚を効率よく利用する方法をとった。その概略を図4に示す。C57BL/6Jの交尾後2.5日の卵管より8細胞期胚を採取した。ES細胞塊と凝集させた胚は、24時間培養して、胚盤胞まで発生させた後、偽妊娠させたICRマウスの子宮内に戻した

仮親から生まれたキメラマウスにおけるES細胞の寄与率を毛色より判断した。これは、宿主胚のC57BL/6Jの細胞由来の毛は均一な黒色を示し、ES細胞由来の毛は色素分布が不均一なアグーチ色（野ねずみ色）を示すことを利用したものである。キメラ作製に使用した3クローンのES細胞クローンのすべてから、85%以上の高いキメラ率の個体を得ることができた。

次に、キメラマウス体内のES細胞に由来する生殖細胞の有無をテストするため、ES細胞寄与率の90%以上の雄3個体（1クローンあたり1個体）を選び、C57BL/6J雌マウスと交配を行った。ES細胞由来の生殖細胞（この場合は精子）由来の仔の毛色は全身でアグーチ色となる。独立した2クローンES細胞由来のキメラマウスのそれぞれから、アグーチ色のマウスが得られた。このことは、キメラ作製にもちいた3クローン中2クローンのES細胞のノックイン遺伝子座が、このマウスに伝播されたことを意味していた。

より詳しくは、マウスの体毛色をコントロールする遺伝子座は基本的に、A、B、Cの3つあり、C57BL/6Jマウスでは(a a, B B, C C)、129マウスに由来するES細胞では(A^wA^w, B B, c c)である。A^wはWhite-bellied agoutiの意味で、A^wA^w, B B, C Cでは腹が白いアグーチ色となる。アグーチ色のマウスが生まれたことは、このマウスの遺伝

子型が (A^w, B B, C c) であり雄由来の染色体が E S 細胞由来であることを意味していた。

次に、0.5 K b の X h o I - E c o R V DNA断片をプローブにサザンハイブリダイゼーションで解析したところ、アグーチ色個体の約半数が 5.1 k b と 5.9 k b のバンドを示し、片方の染色体の L 7 遺伝子座が相同組換えを起こしていること、即ち、C r e 遺伝子のノックインが起こっていることが確認できた。

その後、これらのヘテロ同士の交配によって、両方の染色体の L 7 遺伝子座に相同組換えをおこしたマウスを作製することができた。ノックインマウスを作製するにあたって、L 7 遺伝子を破壊されたマウスでは正常マウスとの比較で形態学的にも生理学的にも差を認めない報告や (Nordquist DT, et.al. J Neurosci. 8(12), 4780-4789、Vassileva, G. Et.al. Brain Res Mol Brain Res, 46, 333-337)、C r e たんぱくの哺乳動物細胞における毒性が報告されていないことから、当該ノックインマウスも異常なしであることを予想していたが、その通りであった。リッターメイト (兄弟姉妹) 間で、L 7 / L 7, L 7 / C r e, C r e / C r e の遺伝子型を持つマウスが、ほぼ 1 : 2 : 1 で生まれてくることから、当該ノックインマウスが通常の遺伝子型の動物と同様に発生・誕生・発育することが判断できた。

テスターマウスとの交配による L 7 - C r e マウスの解析

図 5 に、ノックインマウス (図 5 (A)、L 7 - C r e マウス) とテスターマウス (図 5 (B)) との交配の概略を示す。ここでテスターマウスとは、L a c Z テスタートランスジーン (すべてのタイプの細胞で機能する C A G プロモーター、1 つめの L o x P 配列、クロラムフェニコールアセチルトランスフェラーゼ (C A T) 遺伝子、二つめの L o x P 配列、大腸菌ベータガラクトシダーゼ遺伝子、ポリ A 付加シグナルの順に連結したトランスジーン) を有するトランスジェニックマウスである。C A G プロモーターとは、サイトメガロウィルスのエンハ

ンサー、ニワトリ β アクチンプロモーター、ウサギ β グロビンのエクソンからなる合成プロモーターである。

テスターマウスにおける大腸菌ベータガラクトシダーゼ遺伝子は、上流の L o x P 配列にはさまれている C A T 遺伝子のためサイレントであり、たんぱくへの翻訳はされない。したがってテスターマウスでは大腸菌ベータガラクトシダーゼ活性は検出されない。

テスターマウスと L 7 - C r e マウスを交配して得られた動物 (図 5 (C)) について、生後 1 ~ 6 週に尾より染色体 DNA を抽出し、大腸菌ベータガラクトシダーゼ遺伝子と C r e 遺伝子をプローベにサザンブロット解析を行った。抽出法は、プロテアーゼ K を用いる方法をとった。

また、生後 3 ~ 6 週後、C r e 遺伝子とテスタートランスジーンの双方を保持する動物の脳と眼球 (網膜) を摘出して、4 % パラホルムアルデヒドで固定した後、大腸菌ベータガラクトシダーゼ酵素活性 (L a c Z 活性) を組織化学的に検査した。

その結果を図 6 に示す。図 6 の A 左図は、脳の矢状面切断図である。* で示してある一層の小脳プルキンエ細胞の細胞質でのみ大腸菌の L a c Z 酵素活性のために濃紺 (白黒図のため黒色) の染色が認められる。即ち、L a c Z 酵素による X - G a l の分解物 X の濃紺の不溶性沈殿物の生成が確認された。図 6 の A 右図は、小脳部分の拡大図である。同 B は、網膜の断面図である。各細胞層の範囲を縦線で表し、名称を記した。* で示した双極細胞の細胞質に L a c Z 酵素活性のために濃紺 (白黒図のため黒色) の染色が認められる。また、脳と網膜以外の組織・器官では、大腸菌 L a c Z 産物を認めなかった。

即ち、L a c Z テスタートランスジーンと C r e 遺伝子の双方を有するマウスのみが、2 種類の神経細胞、小脳プルキンエ細胞と網膜双極細胞、に限定した大腸菌ベータガラクトシダーゼの酵素活性を示すことが分かる。これは、L 7 遺伝子の発現パターン通り、小脳プルキンエ細胞と網膜双極細胞においてのみ C r e たんぱくの発現があり、それが染色体 DNA に組み込まれたテスター遺伝子の 2

つのLoxP配列を認識し、CAT遺伝子の欠失が起こったことを示している。

以上、L7-Creマウスでは、小脳プルキンエ細胞と網膜双極細胞において、いかなる遺伝子であってもLoxP配列の間にあれば欠失されることを、個体のレベルで機能的に実証した。

さらに、合成Cre遺伝子やLacZ遺伝子をこの2タイプの神経細胞でのみ発現することに成功したことから、種を問わないあらゆる遺伝子をこれらの細胞特異的に、かつ人工的に発現できることも示した。

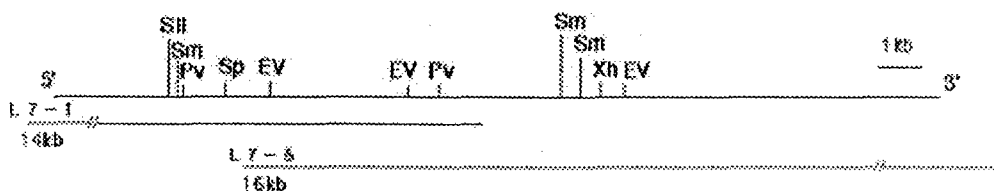
「結論」

本研究によって、小脳の神経細胞の1タイプであるプルキンエ細胞、又は、網膜の神経細胞の1タイプである双極細胞に限定して遺伝子操作（対象である特定の遺伝子の機能の喪失、減弱又は亢進させること。正常では起こり得ない、たとえばバクテリアの遺伝子などを人工的に発現すること。）が可能である動物を作製に成功した。

この動物は、小脳プルキンエ細胞、又は、網膜双極細胞における遺伝子機能の研究用の実験動物の開発や小脳プルキンエ細胞、又は、網膜双極細胞に限定して遺伝子操作を施した小脳疾患・眼疾患についてモデル系の開発に利用できるため、関連疾患の研究・治療薬の開発研究に応用することができる。

【図とその簡単な説明】

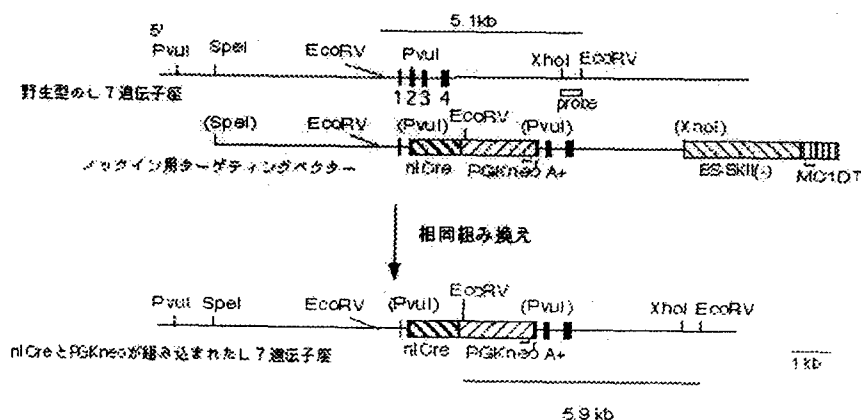
【図1】



L7遺伝子の第2エクソンを持つ2つのファージクローンL7-1とL7-5の制限酵素地図を表す図である。図中、上線はマウスL7遺伝子の制限酵素切断部位を示す。SII、Sm、Pv、Sp、EV、XhはそれぞれSacII、SmaI、PvuI、SpeI、EcoRV、XhoIを意味する。L7-1及びL7-5は、マウスゲノムDNAライブラリーからクローン化したラムダファ-

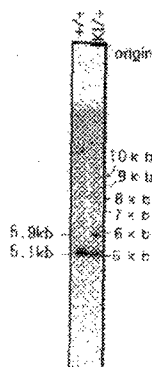
ジの保持している領域を大きさ（単位はk b、千塩基対）と共に示す。

【図2】



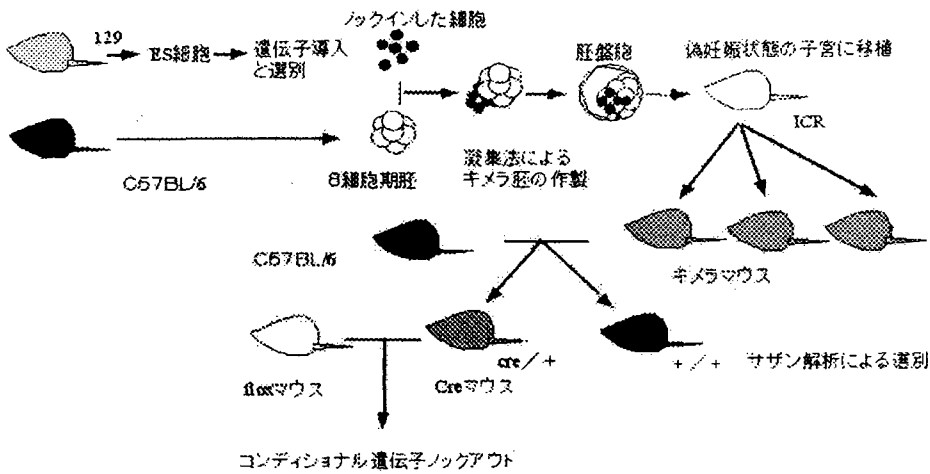
ノックイン用ターゲティングベクターの構造と、組み換え前後のL7遺伝子座上段にマウスL7遺伝子の制限酵素切断部位と、EcoRVで切断、XhoI-EcoRV 0.8 kb DNA断片を相同組み換え検出用のプローブとしてサザン解析して検出される断片の大きさを示す図である。■はエクソンを表し下部の数字でその番号を示している。中段は作製したノックインベクターである。相同組み換え用の5' ホモロジーとしてSpeI-PvuI 5.1 kb、3' ホモロジーとしてPvuI-XhoI 2.3 kbを使用した。下段にnCreとPGKneoが組み込まれた（ノックインされた）L7遺伝子座を示している。サザン解析によって検出される、ノックインされた遺伝子座に由来する断片の大きさを示す。

【図3】



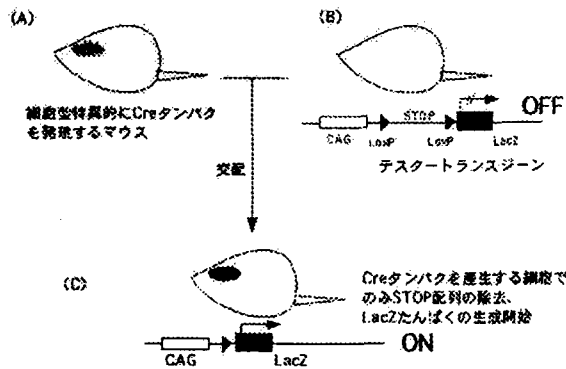
ノックインマウスについてのサザン法による解析を示す図である。

【図4】



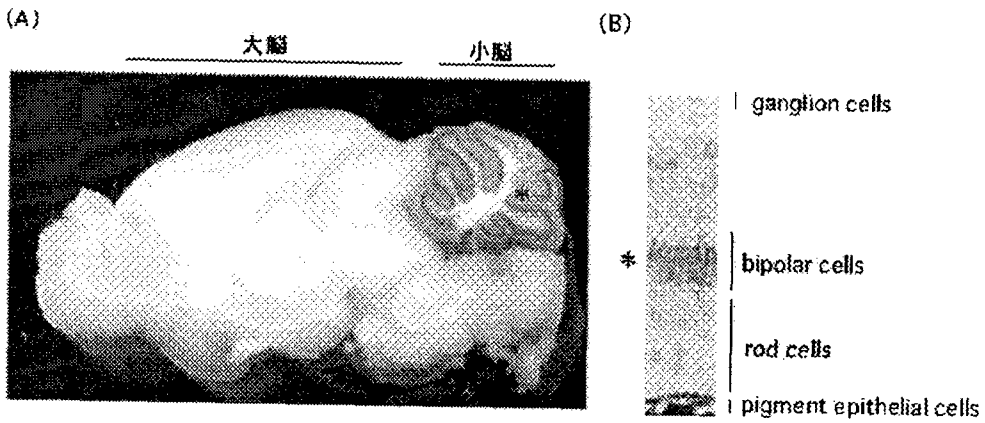
小脳プルキンエ細胞及び網膜双極細胞に遺伝子操作を可能にする動物の作製方法の概略を示す図である。

【図5】



L7-Creマウス (A) とテスターマウス (B) との交配の概略を示す図である。

【図6】



L7Creマウスとテスターマウスの交配によって得られた動物の脳と網膜における組織化学的解析を示す図である。

糖転移酵素遺伝子ノックアウトマウスを用いた糖鎖機能の解析

金沢大学医学系研究科

脳医科学専攻遺伝子改変動物学

(金沢大学医学部附属動物実験施設)

浅野 雅秀

〔はじめに〕

糖鎖は核酸、タンパク質に続く三番目の生体情報高分子であり、細胞と細胞あるいは分子と分子の相互認識に関わる重要な暗号（グライココード）を担っている。複雑な糖鎖構造で表現されるグライココードは、遺伝暗号では一義的に決まらないので、ヒトゲノム配列の解読がほぼ終了したといえども、その全容の解明はまさにこれからの課題となってきた。糖鎖を遺伝的にリモデリングして、ある特定の糖鎖構造を欠損したモデルマウスを作製するには、糖転移酵素遺伝子のノックアウト（KO）マウスを作製することが有効な方法である。我々は、ガラクトース糖鎖に注目して、 β -1,4-ガラクトース転移酵素-I（GalT-I）遺伝子 KO マウスを作製して研究を行ってきたので、本研究会ではこのマウスの解析からわかってきた糖鎖機能¹⁻⁷について報告する。

〔目的〕

GalT-I は糖タンパク質糖鎖の N-アセチルグルコサミン末端にガラクトースを β -1,4 結合で転位する糖転移酵素であり、2 型基幹構造の形成に必須である。また、乳腺細胞では α -ラクトアルブミンと結合することによって立体構造が変化して、グルコースにガラクトースを転移するラクトース合成酵素として働くことも知られている。ガラクトースを含む糖鎖は、これまでいくつかの生物学的な重要性が指摘されてきた。シアリルルイス X やシアリルルイス A はセレクチンのリガンド糖鎖として、細胞接着に関与しており、SSEA-1 は桑実胚のコンパクションや胚盤胞の形成に重要である。いろいろな細胞接着に関与するガレクチンのリガンド糖鎖もガラクトースを含んでおり、リウマチ患者のリウマチ因子の形成にも関与する可能性が考えられている。このようなガラクトース糖鎖の機能を明らかにするために、我々は ES 細胞を用いた相同組み換え法により GalT-I KO マウスを作製した。

〔結果と考察〕

上皮細胞の増殖と分化

GalT-I が合成する糖鎖は初期発生に重要な働きをしていると考えられていたが、予想に反して 129xB6 背景の GalT-I KO マウスは正常に出生した。しかし、授乳中に成長遅延を示し、約半数が離乳前に死亡した。皮膚や小腸の上皮細胞の増殖が亢進しており、小腸絨毛細胞の分化も異常が見られ、GalT-I が合成する糖鎖は上皮系の細胞の増殖と分化を制御していることがわかった。小腸絨毛細胞での二糖類の分解酵素の発現パターンが大きく乱れており、特に授乳期にラクトースを分解するラクターゼの発現が低下していることが、成長遅延と部分致死の原因と考えられた¹。

GalT 遺伝子ファミリー

GalT-I KO マウスの肝臓や血清中の β -1,4-ガラクトース転移酵素活性を測定したところ、ほとんど検出されなかったが、数%の残存活性が検出された。また、RCA-I などのレクチンを用いて血清糖タンパク質の糖鎖構造を解析したところ、 β -1,4 結合のガラクトースはほとんど消失していたが、若干のバンドが検出された。このことは他にも GalT 遺伝子が存在する可能性を示唆していた^{1,5}。長年 GalT 遺伝子は一つであると考えられていたが、1998 年になって次々と新しい GalT 遺伝子が単離され、現在 7 個の遺伝子からなるファミリーを形成していることがわかってきた。したがって、GalT-I KO マウスで検出された GalT 活性は他の GalT 遺伝子由来であることがわかり、各々の GalT 遺伝子がどのように役割分担をしているのかが今後の問題となってきた。

セレクトインのリガンド糖鎖

炎症や感染時に炎症部位に白血球が集積する際には、白血球と血管内皮細胞の間の幾つかの細胞接着機構が関与する。セレクトインを介した細胞接着機構は最初のステップである白血球のローリングを担っていると言われている。GalT-I は、このセレクトインのリガンド糖鎖の合成を担う可能性がある。GalT-I KO マウスの白血球の糖鎖構造を調べたところ、セレクトインのリガンド糖鎖であるシアリルルイス X が発現しているコア 2 の O 型糖鎖の合成が著しく低下していることがわかった。そして実際に、GalT-I KO マウスの好中球や単球に対する P-セレクトインの結合が低下していた。白血球の血管内皮への接着が低下しているため、GalT-I KO はセレクトインの KO マウスと同様に末梢での白血球増多症を示し、慢性炎症反応の一つである接触過敏症反応が低下していた。以上のことから GalT-I はセレクトインのリガンド糖鎖の合成を担っており、GalT-I KO マウスはセレクトインを介した免疫反応が低下していることが明かとなった⁷。

発生過程での役割

GalT-I KO マウスを更に詳細に解析するために、C57BL/6 や BALB/c に戻し交配したところ、驚いたことに前者は出生直後に死亡し、後者は胎生後期に致死となった。両者は死亡時期が異なるが、どちらも死亡する数日前から胎仔の成長遅延が認められ、特に胎盤の形成不全が示唆された。胎盤の組織切片を作製してみると、胎仔側の胎盤の形成不全が認められた。胎盤の異常は BALB/c 背景のマウスで顕著であったが、C57BL/6 背景のマウスでも本質的には同じ結果であった。以上のことからコンジェニック系統では、GalT-I の合成する糖鎖は胎盤の形成に重要な役割を果たしており、胎盤の機能不全が原因で胎生致死になっている可能性が示唆された。このようにマウスの遺伝的背景により KO マウスの表現型が変化する例は幾つか報告があり、EGF-R KO マウスも系統によって致死性が大きく変化する。GalT-I KO マウスの致死性が大きく変化する理由はよく分からないが、一つの可能性として GalT-I を相補する他の GalT 遺伝子の発現がマウスの系統によって異なることがあり得ると考えている。

[おわりに]

このように糖転移酵素遺伝子 KO マウスを作製することで、生体内での糖鎖をリモデリングして、特定の糖鎖構造が担っている生物活性を明らかにすることができる。我々はこのようなアプローチを他の糖鎖構造についても応用することによって、ポストゲノムにおける糖鎖機能の解明に少しでも貢献できればと考えている。

最後にこのような研究に興味を持ってくれる大学院生やポスドクを募集しています。研究室のプロジェクトについては、以下の HP にアクセスしてみてください。<http://web.kanazawa-u.ac.jp/~med38/>

[参考文献]

1. Asano, M., Furukawa, K., Kido, M., Matsumoto, S., Umesaki, Y., Kochibe, N. and Iwakura, Y. "Growth retardation and early death of β -1,4-galactosyltransferase knockout mice with augmented proliferation and abnormal differentiation of epithelial cells." *EMBO J.* 16: 1850-1857, 1997.
2. Kido, M., Asano, M., Iwakura, Y., Ichinose, M., Miki, K. and Furukawa, K. "Presence of polysialic acid and HNK-1 carbohydrate on brain glycoproteins from β -1,4-galactosyltransferase-knockout mice." *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 245: 860-864, 1998.
3. Kotani, N., Asano, M., Iwakura, Y. and Takasaki, S. "Impaired β -1,4-

- galactosylation of core 2 O-glycans in erythrocytes of β -1,4-galactosyltransferase knockout mice." *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 260: 94-98, 1999.
4. Kido, M., Asano, M., Iwakura, Y., Ichinose, M., Miki, K., Furukawa, K. "Normal levels of serum glycoproteins maintained in β -1,4-galactosyltransferase I-knockout mice." *FEBS Letters* 464: 75-79, 1999.
 5. Kido, M., Asano, M., Iwakura, Y., Ichinose, M., Miki, K. and Furukawa, K. "Presence of a higher molecular weight β -1,4-galactosyltransferase in mouse liver." *Acta. Histochem. Cytochem.* 33: 215-221, 2000.
 6. Kotani, N., Asano, M., Iwakura, Y. and Takasaki, S. "Knockout of mouse β 1,4-galactosyltransferase-1 gene results in a dramatic shift of outer chain moieties of N-glycans from type 2 to type 1 chains in hepatic membrane and plasma glycoproteins." *Biochem. J.* 357: 827-834, 2001.
 7. Asano, M. Nakae, S., Kotani, N., Shirafuji, N., Hashimoto N., Takasaki, S. and Iwakura, Y. "Impaired selectin ligand biosynthesis and reduced contact hypersensitivity response in β -1,4-galactosyltransferase-I-deficient mice." Submitted.

遺伝子から見た哺乳動物精子形成の特徴

大阪大学微生物病研究所感染動物実験施設

野崎 正美

始めに

最近世間を賑わせているゲノムは「いのちの設計図」である。この設計図をもとにして私たちの身体は出来上がり、活動し、いろいろなことを考える。もちろん、生まれた後、生活環境からの様々な刺激を通じて色づけされるから、すべてが設計図に書いてあるわけではないが、本質は変わらない。おもしろいことに設計図は世代を越えて受け継がれ、ヒトはヒトとして生き続ける。この設計図を世代を越えて運ぶのが生殖細胞で細胞は細胞からしか生じないから、新しい個体は生殖細胞からしか生まれない。生き物について語るとき、たいてい種を一つの単位として語るので、生殖細胞はきわめて重要なのだが、生活の中では個体の方がずっと大事で、体細胞の塊である身体のことしか、たいていは気にしていない。従って、我々ヒトを中心とした生物学研究は体細胞の研究であり、生殖細胞の研究は意外と遅れている。

哺乳動物の生殖細胞は発生と比較的初期に体細胞の中に忽然と現れ、別の場所にできつつある生殖腺の原基まで移動する。その後、雌雄分化が生殖腺で起こり、雌では卵形成、雄では精子形成が始まる。雌の生殖細胞は発生過程で減数分裂に入り、生まれるまでに第一減数分裂前期がほぼ終わった状態で静止している。従って生まれた後に卵母細胞が増えることはない。一方、雄の生殖細胞は生まれた後でも生殖幹細胞を持ち、自己増殖をしつつ精子形成も行う。

哺乳動物精子形成は生殖幹細胞である精原細胞 (spermatogonia) の自己増殖から分化への転換、精母細胞 (spermatocyte) における減数分裂、半数体精子細胞 (spermatid) の精子への形態形成といった、3段階を経て完成する。減数分裂は体細胞では起こらず、半数体細胞の形態形成は雄性生殖細胞特有の現象である。従って、これらの過程に重要な役割を持つ遺伝子は生殖細胞だけで発現するものが多く含まれることが予想される。そこで、本研究においては、哺乳動物の精子形成を遺伝子レベルで理解することを目的としてマウス精巢生

殖細胞特異的遺伝子群の網羅的クローニングとその解析を行っているので、遺伝子のレベルから精子形成を見てみることにする。

マウス精巣生殖細胞特異的遺伝子の網羅的クローニング

マウス精子形成は生後数日で始まり、その後、基本的には生涯、精子形成サイクルが波状的に繰り返す。一回目のサイクルでは生後17日を過ぎると減数分裂が終わり半数体精子細胞が出現し、35日になると精子が出来上がる。そこで、35日齢マウス精巣 cDNA から17日齢マウス精巣 mRNA を差し引いたサブトラクティッド cDNA ライブラリーを作成し、さらに重差分化法を併用することで、発現レベルの高低にかかわらず減数分裂以後、半数体精子細胞特異的に発現する遺伝子 cDNA を網羅的にクローニングした。ノーザンハイブリダイゼーションと in situ hybridization さらに抗体染色によって精巣半数体精子細胞だけで発現することがわかった遺伝子が約90種類得られ、予想以上に多くの遺伝子がこの時期特異的に発現することが明らかとなった。そのうちの約半数は既知遺伝子と全く相同性を持たない新規遺伝子であり、残りの半数は既知遺伝子、他は相同性を持つ新規遺伝子であった。

半数体精子細胞は約2週間かけて精子になるが、その過程でほとんどの細胞質を捨て、核は凝縮し、最終的に転写は完全に抑制される。ただし、減数分裂後期から球形精子細胞 (round spermatid) にかけては、基本転写因子群の量が極めて多く、mRNA 合成能が高いことがわかっている。従って、これだけ多くの遺伝子が特異的に半数体精子細胞で発現していることは round spermatid における転写レベルの昂進を反映するものと考えられる。これらの多くの遺伝子は核蛋白質、細胞骨格系蛋白質、シグナル伝達関連蛋白質、代謝関連蛋白質などの蛋白質をコードしており、発現時期と考え合わせると、精子完成期、あるいは精子において形態形成や運動などに重要な機能を果たすことが予想される。

マウス精巣生殖細胞特異的遺伝子の構造上の特徴

クローニングした精巣生殖細胞特異的遺伝子の中で、蛋白質をコードする遺伝子は2群に分けられる。第一はプロタミンなど、精子特異的蛋白質をコードするもので、精子形成過程で特異的に発現するばかりでなく、その構造も

特異的であり、体細胞で発現する遺伝子の中に類を見ない。第二は精巢生殖細胞特異的にしか発現しないが、コードしている蛋白質の構造から見ると、体細胞で発現する遺伝子の中に、非常によく似たものが存在する精巢型アイソフォームであった。このことは、体細胞で用いられる遺伝子セットだけでは生殖細胞にとっては不十分であり、何らかの新しい機能が付加された遺伝子が体細胞型遺伝子をもとに作り出されたことを意味する。これら精巢型アイソフォーム遺伝子をクローニングして遺伝子構造を調べたところ、半数は普通の遺伝子重複により生じたエクソンイントロン構造を持つ遺伝子であったが、残りの約半数はイントロンレス遺伝子であった。イントロンレス遺伝子は遺伝子下流にポリ A の残骸を持ち、ダイレクトリピートが遺伝子上流と下流に存在するものが多く、レトロポジションにより生じたことを示している。レトロポジションとは転写物である mRNA から逆転写によって cDNA ができて、それが二本鎖になった後、ゲノム DNA 中に挿入されることによって生ずる。従って、本来このようなイントロンレス遺伝子は、プロモーターを持たないため転写されず、変異の蓄積により偽遺伝子となる。ところが、精巢生殖細胞特異的イントロンレス遺伝子は生殖細胞特異的発現機構を獲得し、機能遺伝子となって精子形成を支えている。体細胞で発現する機能的イントロンレス遺伝子はもちろんあるが、発現する遺伝子の数からすると精巢生殖細胞が圧倒的に多い。従って、本来プロモーターを持たなかった遺伝子の発現を容易にするような変わった環境を精巢生殖細胞細胞は持っていることになる。

マウス精巢生殖細胞特異的遺伝子の CpG 配列とメチル化との相関

精巢生殖細胞特異的遺伝子にはイントロンレス遺伝子が多いことが明らかとなったが、さらにこれらは遺伝子内部に CpG 配列を極めて多く持っていることがわかった。哺乳動物細胞はシトシンメチル化酵素を持っていて、そのターゲットは CpG である。従って、ゲノム配列上の CpG の C はある頻度でメチル化される。メチル化 C にはメチルシトシン結合蛋白質(MeCP)などが結合し、ヒストン脱アセチル化酵素(HDAC)を呼び込んで、ヒストンを脱アセチル化することによって、転写を抑制する。一方、ハウスキーピング遺伝子は上流領域に CpG アイランドと呼ばれる CpG 配列の豊富な構造を有し、メチル化されることはなく、遺伝子は常に転写される。このように DNA メチル化と転写の間には一般的には負の相関が見られる。ただし、メチル化された C は脱アミノ反

応により T に変換するため、自然点突然変異のホットスポットとなり、ゲノム上から徐々に減っていく。従って、CpG は哺乳動物ゲノム上での存在頻度が低く、しかも非常な偏りを持って分布する。本研究により明らかにされた精巢生殖細胞特異的遺伝子の場合には、遺伝子の上流域ではなく、むしろコーディングに CpG が多いという特徴を持つ、これは、どちらかといえば、ウイルスやバクテリアなどの遺伝子、あるいはパラサイト遺伝子の特徴に近い。このような精巢生殖細胞特異的イントロンレス遺伝子 DNA 内部の CpG のメチル化パターンと発現との相関を種々の組織で調べた。その結果、CpG を多く持つ精巢生殖細胞特異的遺伝子は精巣では全くメチル化されておらず、体細胞ではほぼすべての CpG がメチル化されていた。これらの結果は CpG 配列を多く持つ精巢生殖細胞特異的遺伝子は体細胞では強くメチル化されることにより、遺伝子発現が起こらないようになっている可能性を示唆する。

哺乳動物ゲノムでは CpG はある頻度でメチル化されることにより、TpG に置換されその割合は減少してきた。にもかかわらず、精巢生殖細胞特異的イントロンレス遺伝子では遺伝子内に CpG が高頻度で保存されている。その理由は何だろうか。これらの遺伝子の CpG はコーディング内に多いので、変異はアミノ酸置換に直結し、蛋白質機能変化につながる。もしこの蛋白質の機能が精巣形成あるいは精子機能に重要であった場合、その変異は生殖不全をまねき、次世代へのゲノムの伝達が阻害されるので、変異が集団内で固定されないのではなかろうか。あるいは遺伝子内の CpG のメチル化が体細胞での発現抑制に重要ならば、その CpG が減少するとメチル化による発現抑制は起こらず、発現の特異性が変化する。それによって個体レベルで問題が生じ、生存に不利なために CpG が保存されるのかもしれない。

精巢生殖細胞特異的遺伝子制御領域の特徴

精巢生殖細胞特異的遺伝子のプロモーター構造を調べたところ、ほとんどの場合、通常の遺伝子プロモーターに見られる TATA-box, GC-box さらに CCAT-box のいずれもが存在せず、その代わり、cAMP response element (CRE)-like 配列を持つものが多かった。このような構造上の特徴を持つプロモーターが単独で発現特異性を制御できるかどうか調べるために、精巢生殖細胞特異的遺伝子プロモーターを含む領域をレポーター遺伝子である GFP につないだコンストラクトを用いてトランスジェニックマウスを作成し、GFP の発現を調べたとこ

ろ、多くの場合、上流 150 塩基ほどの短い領域だけで精巣生殖細胞、特に半数体精子細胞特異的発現に十分であることがわかった。この短い配列には上述のように通常の遺伝子プロモーターの持つモチーフはほとんど存在せず、CRE 配列のみを持つ場合がほとんどであった。

プロモーターに存在する CRE 配列には CRE 結合蛋白質(CREB)やモジュレーター蛋白質(CREM)などが結合する。CREM は基本的には転写抑制因子であるが、スプライスバリエーションが多く存在し、精巣特異的な CREM-tau は転写活性化因子である。また CREM はノックアウトマウスの解析から精子形成に必須の転写因子であることが知られているので、プロモーターの CRE と精巣特異的 CREM-tau が精巣生殖細胞特異的遺伝子群の発現制御に広範に関与する可能性が強い。また、TATA-box を持たない遺伝子が多かったことから、CRE 配列を介した特異的制御ばかりでなく、基本転写因子の特異性にも興味を持たれる。最近になり、基本転写因子群にも多様性のあることが示され、それらの組織特異的な組み合わせによる特異的遺伝子発現制御の可能性が今後研究されるものと思われる。

終わりに

私たちがマウスでクローニングした遺伝子群のほとんどはヒトにも存在する。従って、これら精子形成関連遺伝子群は哺乳動物全般に存在している可能性が高く、精子が本質的には種を越えて保存されていることを反映するのだろう。また、逆にいくつかの遺伝子についてはマウスには存在するがヒトには存在しない。このことは精子が基本的には構造も機能も共通であるが、細かい点で種間でかなりの多様性を持つことを反映するのかもしれない。いずれにしても遺伝子構造やその発現制御を種間で比較解析することは生殖細胞をもとに進化を語る上で大変興味深いと考える。

関西実験動物研究会だより

<その他>

関西実験動物研究会だより

関西実験動物研究会会報第 21 号に掲載した第 67 回研究会以後、以下の研究会が開催された。

- 1) 第 68 回研究会（平成 12 年 12 月 1 日 於京都市勧業館「みやこめっせ」）
会員による研究発表（14 題）
＜特別講演-1＞ 日合 弘（京都大院・医・病態生物医学）
Pre-B リンパ腫好発系 SL/Kh マウスの遺伝学的研究
＜特別講演-2＞ 鳥居隆三（滋賀医大・医・動物実験施設）
サル（カニクイザル、ニホンザル）ES 細胞株の樹立とこれからの展開
- 2) 第 69 回研究会（平成 13 年 3 月 2 日 於京大会館）
＜講演会＞ テーマ：実験動物の微生物モニタリング項目に関する最近の動向
 1. 遺伝子改変動物の授受に伴う微生物感染の増加と実験への影響
八神健一（筑波大・動物実験センター）
 2. 実験動物を取り巻く環境の変化と ICLAS モニタリングセンター微生物検査項目の見直し
高倉 彰（（財）実験動物中央研究所 ICLAS モニタリングセンター）
 3. 実験動物品質の国際標準化 AALAS Health Monitoring Committee の動向
黒澤 努（大阪大・医・動物実験施設）
＜維持会員ニュース＞ （株）新日本科学「安全性薬理におけるテレメトリー試験」
- 3) 第 70 回研究会（平成 13 年 6 月 15 日 於大阪大学医学部学友会館「銀杏会館」）
＜講演会＞ テーマ：バイオメディカルサイエンスにおける遺伝子改変動物等を用いた新規アプローチの紹介
 1. 神経細胞特異的なノックアウトに必要な動物の開発
鈴木 昇（三重大・医・動物実験施設）
 2. 糖転移酵素遺伝子ノックアウトマウスを用いた糖鎖機能の解析
浅野雅秀（金沢大・医・動物実験施設）
 3. 遺伝子から見た哺乳動物精子形成の特徴
野崎正美（大阪大・微生物病研究所）
＜維持会員ニュース＞ （株）共生「酸素クラスターによる動物実験施設での脱臭効果」
- 4) 第 71 回研究会（平成 13 年 9 月 28 日 於京大会館）
＜講演会＞ テーマ：マウス・ラットの行動解析と痴呆症の動物モデル
 1. 概日行動の分子生物学
海老原史樹文（名古屋大院・生命農学研究科）
 2. 老化促進モデルマウスの加齢依存性の行動変化とその特性
宮本政臣（武田薬品工業（株）・創薬第一研究所）
 3. 痴呆症の動物モデルを考えるー脳内サイトカインと β -アミロイド前駆物質の見地からー
山本経之（九州大院・薬学研究科）
＜維持会員ニュース＞ ハムリー（株）「最近の輸入サル類の検疫成績と 3D オートフィーダー（自動給餌器）について」

幹事会、評議員会、総会の議事録

1) 幹事会の概要 (平成 13 年 2 月 23 日 於 京都大・院・医・附属動物実験施設)

1. 出席：阿部、浅野、飯田、池田、喜多、北田、久保、黒澤、塩見、芹川、新谷、前田、三日月、森岡、森本、山本 (15名)
2. 議事
 - (1) 平成 12 年度の事業報告について話し合わせ、平成 12 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 21 号の発行されたことが報告された。
 - (3) 平成 12 年度の決算報告について話し合わせ、平成 12 年度決算報告が作成された。
 - (4) 平成 13 年度の事業計画について話し合わせ、平成 13 年度事業計画案が作成された。
 - (5) 平成 13 年度の機関誌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 22 号の発行予定を決定した。
 - (6) 平成 13 年度の予算について話し合わせ、平成 13 年度予算計画案が作成された。
 - (7) 新評議員として、田島 優氏 (大阪大学) の選出を評議員会に諮ることが決定された。また、集会幹事の岡本宗裕氏より辞任の申し出があり、これを了承した。
 - (8) 第 70 回研究会を 6 月 15 日に大阪で開催し、金沢大学医学部の浅野雅秀先生、三重大学医学部の鈴木 昇先生、大阪大学微生物研究所の野崎正美先生に講演をお願いする事が決定された。第 71 回研究会は 9 月に大阪で、第 72 回研究会は 12 月に京都で開催することが決定された。

2) 集会幹事会の概要 (平成 13 年 9 月 28 日 於 京大会館)

1. 出席：阿部、池田、喜多、北田、久保、黒澤、芹川、森岡 (8名)
2. 議事
 - (1) 第 72 回研究会の特別講演の候補者について討議した。
 - (2) 第 73 回研究会を 3 月 8 日に京都で開催することが決定された。
 - (3) 第 73 回研究会より、研究会への参加者全員に名札を着用していただくことが決定された。
 - (4) 関西実験動物研究会が第 14 回国際ラット遺伝システムワークショップ (会期平成 14 年 10 月 8 日- 11 日、オーガナイザー芹川忠夫) の後援をすることが決定された。

3) 第 19 回評議員会の概要 (平成 13 年 3 月 2 日 於 京大会館)

1. 出席：浅田、浅野、阿部、飯田、池田、稲垣、内海、海野、江馬、及川、岡本、喜多、北田、黒澤、久保、塩見、芹川、高島、千葉、螺良、鳥居、中井、新谷、原田、平川、古河、前田、増岡、宮嶋、宮脇、森岡、森島、森本、安田、山添、山中、山本、家森、田島 (40名)
2. 議事
 - (1) 平成 12 年度事業報告：阿部幹事 (集会) より平成12年度事業報告が行われ、承認された。

- (2) 平成 12 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21号が発行されたことが報告され、承認された。
- (3) 平成 12 年度決算報告：喜多幹事（庶務）より平成 12 年度収支決算報告が報告された。芹川会長より、監事による監査の結果適正であったことが報告され、平成 12 年度決算報告が承認された。
- (4) 家森幸男評議員より辞任の申し出があり、了承された。新評議員として、池田克巳氏（京都大学）、田島 優氏（大阪大学）が推薦され、選出された。岡本幹事より幹事辞任の申し出があり、了承された。田島 優氏（大阪大学）が幹事として推薦され、選出された。
- (5) 平成 13 年度事業計画案：阿部幹事（集会）より平成 13 年度事業計画案が説明され、承認された。
- (6) 平成 13 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 22 号の発行を予定している旨説明され、承認された。
- (7) 平成 13 年度予算案：喜多幹事（庶務）より平成 13 年度の予算案が説明され、承認された。芹川会長より、今後、会誌の存続、会費の見直し等を含め、会計の健全化を図る努力を続けることが表明された。
- (8) 会誌発行に関わる諸問題、および会誌の電子化について、議論された。今後も引き続き、幹事会にて会誌発行に関わる問題を継続審議することが了承された。
- (9) 芹川会長より、日本実験動物科学技術大会 2001「実験動物 50 年史」に、関西実験動物研究会に関する資料提供を行ったことが報告された。

4) 第 18 回総会の概要（平成 13 年 3 月 2 日 於 京大会館）

- (1) 平成 12 年度事業報告が行われ、承認された。
- (2) 平成 12 年度においては、関西実験動物研究会会報第21号が発行された旨報告され、承認された。
- (3) 平成 12 年度収支決算報告が行われた。また、高木監事より、監査の結果適正であったことが報告され、平成 12 年度決算報告が承認された。
- (4) 家森幸男評議員の辞任、および、新評議員として池田克巳氏（京都大学）、田島 優氏（大阪大学）が選出された旨が報告され、承認された。岡本幹事の辞任、および、田島 優氏（大阪大学）が幹事として選出された旨が報告され、承認された。
- (5) 平成 13 年度事業計画案が説明され、承認された。
- (6) 平成 13 年において、関西実験動物研究会会報第22号の発行を予定していることが説明され、承認された。
- (7) 平成 13 年度の予算案が説明され、承認された。
- (8) 芹川会長より日本実験動物科学技術大会 2001「実験動物 50 年史」に、関西実験動物研究会に関する資料提供を行ったことが報告された。

《会員の異動》

(平成12年10月～平成13年10月)

入会者	浜田 修一	エスエス製薬(株) 中央研究所
	佐藤 雅樹	(株) 新日本科学 薬物代謝分析センター
	桑村 充	大阪府立大学・農・獣医病理
	前田 昌也	大阪府立大学・農・獣医病理
	谷本 憲昭	田辺製薬(株) 安全性研究所
	大槻 重信	
	辻 嘉昭	スリジヤン株式会社
	荒木 しおり	(株) 環境バイリス研究所
	吾郷 昭夫	島根医科大学附属動物実験施設
	坂本 雄二	千寿製薬(株)
	堀江 信一	(株) 新日本科学
	森 幹雄	大日本製薬(株) 開発研究所
	鎗木 力	清水実験材料(株)
	角井 正義	(株) 武田ラビックス 技術教育担当
	原田 延行	日本農産工業(株) バイオ部バイオ第1グループ
	岡田 利也	大阪府立大学・院・農学生命科学研・実験動物学
	乾 公正	石原産業(株) 中央研究所
退会者	岩堀 恭祐	(株) ケーエーシー
	大江 治	藤沢薬品工業(株) 実験サービスセンター
	下西 功	日本オルガノン(株) 開発企画部
	長谷川 治子	
	細野 和裕	武田薬品工業(株) 開拓第三研究所
	森 聖	塩野義製薬(株) 医薬情報部
	小松 正美	
	奥村 正直	
	富田 喜久雄	塩野義製薬(株) 実験動物研究センター
	大野 周三	藤沢テクニス(株) 業務Ⅱ部
	西田 伊久男	環境保健生物研究センター
	杉谷順康	武田薬品工業(株) 薬事管理部監査室
	森 幸生	(株) アズウエル
	青木 純二	アニマルケア
	青野 皆基	武田薬品工業(株) 薬事管理部監査室
	小田 厚子	武田薬品工業(株) 薬物機能第二研・光支所
	藤井 登志之	藤沢薬品工業(株) 安全性研究所
	家森 幸男	京都大学人間環境学部
	高折 修二	島根医科大学
	木下 明美	大阪大学医学部附属動物実験施設
	棕本 末男	藤沢薬品工業(株) 分子生物研究室
	境 陽子	塩野義製薬(株) 油日ラボラトリーズ
	吉澤 達	(株) ケーエーシー
	渡辺 弘之	岡崎産業(株)
	林 新茂	
	中村 智恵美	岡山大学医学部法医学教室

関西実験動物研究会（個人会員名簿） 2001年10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			
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 薫	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
吾郷 昭夫	693-8501	出雲市堀治町 89-1	島根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	541-8505	大阪市中央区道修町 3-2-10	田辺製薬福祉共済会
浅沼 武敏	060-0818	札幌市北区北18条西9丁目	北海道大学大学院獣医学研究科放射線学教室
東文 男	640-1473	和歌山県海南郡美里町毛原宮 486	(株)紀和実験動物研究所
足立 民子	532-8505	大阪市淀川区加島 3-16-89	田辺製薬（株）安全研
○◎ 阿部 敏男	532-8686	大阪市淀川区十三本町 2-17-85	(株)武田ラビックス 系統管理部
安倍 宏明	550-0005	大阪市西区西本町 1-11-7	日本チャールズリバー（株）
新井 健史	103-8655	東京都中央区日本橋 2-14-9	豊田通商（株）ライフサイエンスグループ
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
荒木 しおり	528-0052	滋賀県甲賀郡水口町大字宇川字稲場 555	(株)環境バイロクス研究所
有富 博之	561-0825	大阪府豊中市二葉町 3-1-1	シオノギ製薬 新薬研 実験動物管理室
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) 薬物機能第二研究所
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	日本ペーリンガー・インゲルハイム(株)
○◎ 池田 卓也	520-3493	滋賀県甲賀郡甲賀町島居野 121-1	バイエル薬品（株）滋賀工場品質管理
○ 池田 克己	606-8316	京都市左京区吉田二本松町	京都大学大学院人間環境学研究所
石川 尚明	300-2656	茨城県つくば市真瀬 940-1	三協ラボサービス（株）つくば営業所
石川 隆司	564-0053	吹田市江ノ木町 3-9-4	大日本製薬（株）総合研究所
伊藤 隆康	532-8686	大阪市淀川区十三本町 2-17-85	武田薬品工業（株）薬物機能第二研究所
伊東 久男	663-8501	西宮市武庫川 1-1	兵庫医科大学動物実験施設
○ 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
乾 公正	525-0025	滋賀県草津市西沢川 2-3-1	石原産業（株）中央研究所
井上 勉	578-0901	東大阪市加納 7 丁目 23-3-112	
今井 章浩	665-0876	兵庫県宝塚市中山台 1-3-14	大阪府立成人病センター研究所
新比恵 啓志	532-8505	大阪市淀川区加島 3 丁目 16-89	田辺製薬（株）安全性研究所
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）研究推進部
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
梅田 光夫	561-0827	大阪府豊中市大黒町 1-1-11	大日本除虫菊（株）
○◎ 海野 隆	534-0016	大阪市都島区友海町 1-5-90	日本オルガノン（株）研究開発本部薬事申請部
え 榎本 康弘	220-8146	横浜市区みなとみらい 2-2-1 ラッドマナワ 46階	日本農産工業（株）
○◎ 江馬 真	540-8146	大阪市中央区法門坂 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	
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）薬物機能第二研究所
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
大槻 重信	620-0802	京都府福知山市宇興 493	
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 民生	466-8550	名古屋市昭和区鶴舞町 65	名古屋大学医学部附属動物実験施設
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 6F	(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）
岡田 利也	599-8531	堺市学園町 1-1	大阪府立大学・院・農学生命科学研・実験動物学
尾形 美和子	554-8558	大阪市此花区春日出中 3-1-98	住化テクノサービス（株）
○ 岡庭 梓	532-0003	大阪市淀川区宮原 5-1-3	(株) ポソリサーチセンター
○ 岡本 宗裕	565-0871	吹田市山田丘 2-2	大阪大学医学部附属動物実験施設
沖本 一夫	564-0053	吹田市江の木町 33-94	大日本製薬（株）総合研究所
小木曾 敬吉	464-0044	名古屋市中千種区自由ヶ丘 2-12-4-104	
荻野 信二	567-0878	大阪府茨木市蔵垣内 1-3-45	住友製薬（株）茨木工場
奥田 誠治	586-0006	河内長野市松ヶ丘中町 1330-1	堺化学工業（株）医薬事業部研究開発部
奥本 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 潤一郎	532-8505	大阪市淀川区加島 3-16-89	田辺製薬（株）安全性研究所
か 鍵山 莊一朗	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
樫原 昭裕	771-0132	徳島市川内町平石字奥野 224-2	大鵬薬品（株）

関西実験動物研究会（個人会員名簿） 2001年10月現在

	氏名	〒	住所	所属
	加藤 鋭二	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
	鎌木 力	606-8304	京都市左京区吉田下阿達町	清水実験材料（株）
	川合 是彰	532-8505	大阪市淀川区加島 3-16-89	田辺製薬（株）安全性研究所
○	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
	河田 昭彦	433-8114	浜松市葵東 3-5-1	日本エスエルシー（株）受託研究部
	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	大阪府豊中市二葉町 3-1-1	塩野義製薬（株）新薬研究所
き○◎	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 一博	606-8501	京都市左京区吉田近衛町	京都大学大学院医学研究科附属動物実験施設
	北山 博章	615-0882	京都市右京区西京極葛野町 28 番	オリエンタルバイオサービス
く	久世博	532-8505	大阪市淀川区加島 3-16-89	田辺製薬（株）安全性研究所
	国友 一朗	580-0016	大阪府松原市上田 8-1-20	
○◎	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
	久保 武	520-0842	大津市園山 3 丁目 1-2	東レ（株）安全性研究室
	倉林 譲	700-0914	岡山市鹿田町 2-5-1	岡山大学医学部附属動物実験施設
○◎	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
	桑村 充	599-8531	大阪府堺市学園町 1-1	大阪府立大学・農・獣医病理
こ	小泉 清	240-0012	神奈川県横浜市保土ヶ谷区月見台 33-8-201	
	甲田 彰	541-8510	大阪府中央区道修町 2-2-8	住友製薬（株）開発計画推進部
○	小嶋 明廣	565-0824	吹田市山田西 1-22 A 2-816	
	小谷 猛夫	599-8531	堺市学園町 1-1	大阪府立大学大学院農学生命科学研究科
	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	坂田 太二	532-8505	大阪市淀川区加島 3-16-89	田辺 R&D サービス
	坂本 雄二	651-2241	神戸市西区室谷 1-5-4	千寿製薬（株）
	佐藤 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 良夫	565-0871	吹田市山田丘 1-8	大阪大学歯学部中央研究室
	佐藤 雅樹	642-0017	海南市南赤坂 16-1	（株）新日本科学 薬物代謝分析センター
	鮫島 秀暢	890-0011	鹿児島市玉里団地 1 丁目 22-19	
し	塩田 恒三	602-0000	京都市上京区河原町広小路	京都府立医科大学医動物学教室
○◎	塩見 雅志	650-0017	神戸市中央区楠町 7-5-1	神戸大学医学部附属動物実験施設
	柴生田 正樹	541-0045	大阪府中央区道修町 2-3-6	武田薬品工業（株）薬事管理部監査室
	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）研究推進部
	眞田 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
	銀一之	742-0021	山口県柳井市宮本開作	白銀工業（株）柳井製作所
す	菅原 努	606-8225	京都市左京区田中門前町 103	バスター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
	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
	角井 正義	532-8686	大阪市淀川区十三本町 2-17-85	（株）武田ラビックス 技術教育担当
せ★○◎	芹川 忠夫	606-8501	京都市左京区吉田近衛町	京都大学大学院医学研究科附属動物実験施設
	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	187-0031	東京都小平市小川東町 4-1-1	国立精神神経センター神経研究所
	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	バスターールビル 5 F（財）体質研究会
	竹之下 誠	648-0003	橋本市隅田町山内 514	
○	竹之下 洋司	648-0003	和歌山県橋本市隅田町山内 514	
○◎	田島 優	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
	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

関西実験動物研究会（個人会員名簿） 2001年10月現在

	氏名	〒	住所	所属
○	谷村 孝	590-0137	堺市城山台1-14-10	
	谷本 憲昭	532-8505	大阪市淀川区加島 3-16-89	田辺製薬（株）安全性研究所
	谷本 純一	583-0872	羽曳野市はびきの 4-15-4	
	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）薬物機能第二研・光支所
	玉田 尋通	599-8231	堺市学園町 1-1	大阪府立大学農学部獣医学科
ち○	千葉 薫	569-1125	高槻市紫町 1-1	（財）たばこ産業弘済会 高槻事業所
	千葉 博喜	520-3423	滋賀県甲賀郡甲賀町五反田 1405	塩野義製薬（株）実験動物研究センター
つ	塚原 清志	520-3423	滋賀県甲賀郡甲賀町五反田 1405	塩野義製薬（株）実験動物研究センター
	辻 嘉昭	650-0033	神戸市江戸町85-1 ベイ・ウイング 神戸ビル801号	ｽﾌｨﾝｸﾞﾞﾝ株式会社
	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看護学教室
○	蝶良 愛郎	570-0074	守口市文圃町10-15	関西医大・第2病理
	蝶良 義彦	661-0002	尼崎市塚口町 1-33-21	
	坪田 裕司	641-0012	和歌山市紀三井寺 811-1	和歌山県立医大第二生理学
	津村 秀樹	514-0001	三重県津市江戸橋 2-174	三重大学医学部附属動物実験施設
と	鎧 友成	564-0043	吹田市南吹田 4丁目 4-1	オリエンタル酵母工業（株）大阪バイオ営業所
	堂前 嘉代子	663-8558	西宮市池間町 6-46	武庫川女子大学生生活環境学部
	徳本 和弥	566-0022	摂津市三島 2丁目 5番 1号	塩野義製薬（株）摂津工場生物試験棟
○◎	島居 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	大腸薬品（株）
	中川 照文	125-0041	東京都葛飾区金町 3-5-13 ワコーレエレガンス301	科研製薬（株）
	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
	中根 良文	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
	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 正典	534-0016	大阪市都島区友浜町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 3-28-10	
	夏目 克彦	113-8551	東京都文京区湯島 2-18-6	夏目製作所（株）
	並河 知子	535-0004	大阪市旭区生江 1丁目 8-14	沢井製薬（株）研究部
に○◎	新谷 聰	565-8565	吹田市藤白台 5-125	国立循環器病センター研究所
	西川 健志	605-8550	京都市南区西大路通り八条下ル	日本新薬（株）安全性研究所
	西川 哲	431-3192	浜松市半田山 2-20-1	浜松医科大学 動物実験施設
	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字川稻場 555	（株）環境バイリス研究所
	西村 正彦	466-0065	名古屋市中区昭和区鶴舞町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
	西山 秀志	532-8686	淀川区十三本町 2-17-85	（株）武田ラビックス
ぬ	沼沢 拓身	673-1461	兵庫県加東郡社町木梨	日本臓器製薬（株）
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
	根縫 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	野澤 謙	467-0035	名古屋市中区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
	浜田 修一	286-8511	千葉県成田市南平台1143	エスエス製薬（株）中央研究所
	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	920-1161	金沢市鈴見台4-12-6	
	原 卓司	755-8501	山口県宇部市藤曲2548	協和発酵工業（株）安全性研究所
	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 園 景	540-0006	大阪市中央区法円坂1-1-43	国立医薬品食品衛生研究所大阪支所
○	原田 正史	545-0051	大阪市阿倍野区旭町	大阪市立大学医学部
	原田 延行	220-8146	横浜市西区みなとみらい2-2-1ランドマークタワー4	日本農産工業（株）バイオ部バイオ第1グループ
ひ	東 稔広	532-0004	大阪市淀川区西宮原 2-6-64	日本シエーリング（株）
	東山 昇	561-0825	豊中市二葉町 3-1-1	塩野義製薬（株）新薬研究所

関西実験動物研究会（個人会員名簿）2001年10月現在

	氏名	〒	住所	所属
	疋田 精一	607-8042	京都市山科区四ノ宮南河原町	科研製薬（株）中研・研究企画部
	日高 隆義	676-0027	兵庫県高砂市高砂町宮前町 1-8	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
	Birger Voigt	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
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	891-1394	鹿児島県吉田町宮之浦 2438	（株）新日本科学
	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
	藤島 昇一	566-0022	摂津市三島 3-5-1	塩野義製薬（株）摂津工場 品質評価研
	藤平 司郎	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
○	藤村 一	606-0805	京都市左京区下鴨森本町 15	（財）生産開発科学研究所
○	古河 恵一	589-8511	大阪府大阪狭山市大野東 377-2	近畿大学医学部共同研究実験動物室
ほ	千場 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
	堀江 信一	541-0044	大阪市中央区伏見町 2-1-1住友銀行高麗橋ビル	（株）新日本科学
	堀江 良一	693-0021	出雲市塩冶町 89-1	島根医科大学第2病理学教室
	堀川 洋子	565-0871	吹田市山田丘 2-2	大阪大学医学部附属動物実験施設
ま	前田 勝弘	564-0053	吹田市江の木町 33-94	大日本製薬（株）研究管理部動物飼室
○◎	前田 敏宏	564-0053	吹田市江の木町 33-94	大日本製薬（株）研究管理部動物飼室
	前田 昌也	599-8531	大阪府堺市学園町1-1	大阪府立大学・農・獣医病理
	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 達	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	高槻市大蔵町 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
	豆越 慎一	230-	横浜市鶴見区下末吉2-1-1	（株）森永科学研究所
み○◎	三日月 勝男	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	335-8505	埼玉県戸田市川岸2-2-50	田辺製薬（株）創薬研究所
	水野 信哉	565-0081	吹田市山田丘 2-2	大阪大学医学部バイオテクノロジー・腫瘍生化学講座
	三原 匡子	410-0866	静岡県沼津市市道町 13-4 本山方	
☆○	宮島 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	641-8509	和歌山市紀三井寺 811-1	和歌山県立医科大学実験動物室
	宮本 誠	553-0003	福島県福島 1-1-50	大阪大学医学部附属病院病理部
○◎	宮脇 茂樹	305-0003	つくば市桜 3丁目14-1	日本新薬（株）東部創薬研究所
む	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	605-0976	京都市東山区泉涌寺東林町2	
も	本山 守夫	531-0071	大阪市北区中津 1-6-28 中津ビル 4F	実医研（株）
	森 幹雄	564-0053	吹田市江の木町 33-94	大日本製薬（株）開発研究所
○◎	森岡 宏至	599-8531	堺市学園町 1-1	大阪府立大学・院・農学生命科学研・獣医学・実験動物学
	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）薬物機能第二研究所
	森田 剛仁	680-0945	鳥取市湖山町南4丁目101	鳥取大学農学部家畜病理学教室
○◎	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	大阪医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）研究推進部
	柳本 行雄	550-0005	大阪市西区西本町 2-5-19	生活化学研究所
	矢野 賢一	679-2296	兵庫県神崎郡福崎町山崎 214-1	吉富製薬（株）安全性研究所
	山北 修	771-0132	徳島市川内町平石字典野 224-2	大腸薬品工業（株）研究部
	山口 哲生	392-0016	長野県諏訪市豊田 6598	（株）CSKリサーチパーク
	山崎 俊幸	666-0116	兵庫県川西市水明台4丁目2-35	
	山下 武夫	520-3423	滋賀県甲賀郡甲賀町五反田 1405	塩野義製薬（株）実験動物研究センター
	山下 浩文	520-3423	滋賀県甲賀郡甲賀町五反田 1405	塩野義製薬（株）実験動物研究センター
	山田 宣永	606-8224	京都市左京区北白川追分町	京都大学大学院農学研究科
	山田 秀一	606-8397	京都市左京区聖護院川原町53	京都大学ウイルス研究所
○	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

関西実験動物研究会（個人会員名簿）2001年10月現在

	氏名	〒	住所	所属
○◎	山中 久	541-0045	中央区道修町2-2-6道修町後藤ビル3F	(株)イナリサーチ 大阪支所
	山元 勝一	520-3423	滋賀県甲賀郡甲賀町五反田1450	塩野義製薬(株)実験動物研究センター
	山本 孝史	598-8540	大阪府泉佐野市住吉町一番地	不二製油(株)生物化学研究所
	山本 利彦	535-0004	大阪市旭区生江 1-8-14	沢井製薬 大阪研究所 生物研究課
○	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
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)薬物機能第二研究所
	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	池田市伏尾町103	大日本製薬(株)7-7サイエンス部研究所
	吉船 伸一	567-0806	茨木市庄 2 丁目 24-3	(株)アズウエル
わ	余野 清香	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
	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
	脇坂 江美	648-0003	和歌山県橋本市隅田町山内 514	(株)ケアリー 和歌山研究所
	渡辺 信介	589-0014	大阪府大阪狭山市大野東 377-2	近畿大学ライフサイエンス研究所
	渡辺 清	520-3423	滋賀県甲賀郡甲賀町五反田 1405	塩野義製薬(株)実験動物研究センター
	和田 あづみ	599-8531	堺市学園町 1-1	大阪府立大学農学部獣医学科

上記個人会員名簿に追加、訂正等があれば

事務局(TEL:075-753-4489, FAX:075-753-4409, e-mail:cyamachi@ip.media.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13年10月現在)

No.	社名	〒	住所
1	(株) イナリサーチ大阪支所	541-0045	大阪市中央区道修町2-2-6道修町後藤ビル3F
2	ウエルファイド(株) 研究本部 開発研究所	679-2296	兵庫県神崎郡福崎町山崎 214-1
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
4	オリエンタル酵母(株) 大阪バイオ営業所	564-0043	吹田市南吹田 4-4-1
5	(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
6	(株) カワシマ商事	501-6024	岐阜県羽島郡川島町竹早町2-1
7	北山ラベス(株)	396-0021	長野県伊那市荒井区川北 3052
8	(株) 共生	453-0856	名古屋市中村区並木2丁目68
9	(株) ケアリー	531-0072	大阪市北区豊崎 4-12-1
10	(株) ケー・エー・シー	604-8423	京都市中京区西の京西月光町 40
11	三協ラボサービス	132-0023	東京都江戸川区西一之江2-13-16
12	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
13	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
14	(株) 実医研	531-0071	大阪市北区中津 1-6-28 ホークビル4F
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	豊田通商(株) 東京本社物資部ライフサイエンスグループ	103-8655	東京都中央区日本橋 2-14-9
21	(株) 夏目製作所	113-0034	東京都文京区湯島 2-18-6
22	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
23	日本オルガノン(株)	534-0016	大阪市都島区友淵町 1-5-90
24	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
25	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
26	日本チャールス・リバー(株)	550-0005	大阪市西区西本町 1-11-7
27	日本ベーリンガーインゲルハイム(株)	666-0193	兵庫県川西市矢間 3 丁目10-1
28	ハムリー(株) 大阪営業所	532-0011	大阪市淀川区西中島 7-14-35-303
29	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
30	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
31	丸石製薬(株) 中央研究所	538-0042	大阪市鶴見区今津中 2-2-18
32	(株) 三菱化学安全科学研究所大阪支店	530-6035	大阪市北区天満橋 1-8-30 OAPタワー35F
33	(株) 美濃ラボ	503-0321	岐阜県海津郡平田町今尾 1195-1
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)

入会

(株) カワシマ商事
(株) 共生
三協ラボサービス
ハムリー(株) 大阪営業所

退会

(株) アズウェル
白銀工業(株) 柳井製作所

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	田辺製薬福祉共済会
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) 滋賀工場品質管理
池田 克己	京都大学大学院人間環境学研究所
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	日本シエーリング(株) 前臨床開発研究部
江馬 眞	国立医薬品食品衛生研究所
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
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
塩見 雅志	神戸大学医学部附属動物実験施設
鈴木 昇	三重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
田島 優	大阪大学医学部附属動物実験施設
谷村 孝	
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
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
藤村 一	(財) 生産開発科学研究所
古河 恵一	近畿大学医学部共同研実験動物室
前田 敏宏	大日本製薬(株) 研究管理部動飼室

氏名	所属
牧野 進	塩野義製薬（株）実験動物研究センター
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
宮嶌 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	大阪府立大学大学院農学生命科学科獣医学実験動物学
森島 英喜	武田薬品工業（株）薬物機能第二研究所
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
吉田 元信	大日本製薬（株）アミノサイエンス部

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 13 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	田辺製薬福祉共済会
	池田 卓也	バイエル薬品(株) 滋賀工場品質管理
	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
	田島 優	大阪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	大阪府大大学院農学生命科学研究科獣医学実験動物学
	森本 純司	大阪医科大学実験動物センター
編集：		
(京都 G)	山本 好男	滋賀医科大学法医学教室
	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：		
(大阪 G)	新谷 聡	国立循環器病センター研究所
	飯田 晶敏	日本エスエルシー(株)
	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13年12月15日 印 刷
平成13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22号
Kansai Journal of Laboratory Animals

平成13年12月

第64回研究会

家森 幸男：疾患モデルからヒトへー予知・予防医学への貢献 3

第65回研究会：実験動物の国際化を巡って

Ken Boschert：Informatics in Laboratory Animal Science—International Standards 25

第66回研究会：医薬品開発の前臨床試験における新しい動向と国際戦略を考える

堀井 郁夫：医薬品の創薬・開発研究における毒性試験の新しい動向 31

第67回研究会：高次神経機能を動物実験により解明する

三浦 正幸：プログラム細胞死の人為的操作による神経疾患治療の試み 35

第68回研究会

日合 弘：SL/Kh マウスの Pre-B リンパ腫発生の遺伝機構 45

鳥居 隆三：サル（ニホンザル、カニクイザル）ES 細胞株の樹立とこれからの展開 55

抄録：会員による研究発表（14題） 65

第69回研究会：実験動物の微生物モニタリング項目に関する最近の動向

八神 健一：遺伝子改変動物の授受に伴う微生物感染の増加と実験への影響 81

高倉 彰：実験動物を取り巻く環境の変化とICLASモニタリングセンターの微生物検査項目の見直し 89

黒澤 努：実験動物品質の国際標準化 AALAS Health Monitoring Committee の動向 95

第70回研究会：バイオメディカルサイエンスにおける遺伝子改変動物等を用いた新規アプローチの紹介

鈴木 昇：小脳プルキンエ層及び網膜に遺伝子組換え酵素 Cre を発現する動物の作製 101

浅野、雅秀：糖転移酵素遺伝子ノックアウトマウスを用いた糖鎖機能の解析 112

野崎 正美：遺伝子から見た哺乳動物精子形成の特徴 116

〈関西実験動物研究会だより〉 123

幹事会、評議員会、総会の議事概要 124

会員の異動 126

個人会員名簿 127

維持会員名簿 132

評議員名簿 133

会長、幹事、監事名簿 135