

関西実験動物研究会会報

Kansai Journal of Laboratory Animals

平成14年12月 23号

関西実験動物研究会

Kansai Laboratory Animal Reserch Association

目 次

〈第71回研究会（平成13年9月28日）〉

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）----- 3

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（武田薬品医薬研究本部・創薬第一研究所）----- 7

3. 作業記憶に対する炎症性サイトカイン及びアミロイド前駆体蛋白末端フラグメントの作用に関する行動薬理的検討

山本 経之、松本 裕司、渡辺 繁紀（九州大・院・薬学研究院）----- 15

〈第72回研究会（平成13年12月14日）〉

特別講演

「マウスの歴史と遺伝子の歴史」

森脇 和郎（理研バイオリソースセンター）----- 25

特別講演

「実験用ラットの価値」

芹川 忠夫（京大・院・医・動物実験施設）----- 27

会員による研究発表（15題）----- 37

〈第73回研究会（平成14年3月8日）〉

テーマ：「動物を用いた発がん研究の最前線」

1. 実験動物を用いたヒト発ガン研究—遺伝子機能を共通言語として

牛島 俊和（国立がんセンター発がん研究部）----- 55

2. 環境因子の発がんリスク：環境発がん物質に閾値が存在するか

福島 昭治、鰐淵 英機、森村 圭一朗、魏 民（大阪市大・院・医・都市環境病理）----- 58

〈第74回研究会（平成14年6月14日）〉

テーマ：「生殖・発生研究の最前線」

1. 卵胞選択の制御機構：顆粒層細胞に特異的な新規細胞死受容体について

眞鍋 昇（京大・院・農・生体機構学）----- 71

2. 核の初期化機構とクローン技術の応用

若山 照彦（理化研・発生・再生科学総合研）----- 79

〈関西実験動物研究会だより〉----- 85

〈幹事会、評議員会、総会の議事概要〉----- 86

〈会員の異動〉----- 89

〈個人会員名簿〉----- 90

〈維持会員名簿〉----- 94

〈評議員名簿〉----- 95

〈会長、幹事、監事名簿〉----- 97

〈第71回研究会（平成13年9月28日）〉

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. 作業記憶に対する炎症性サイトカイン及びアミロイド前駆体

蛋白末端フラグメントの作用に関する行動薬理学的検討

山本 経之（九州大・院・薬学研究院）

概日行動の分子生物学

名古屋大学大学院生命農学研究科 応用分子生命科学専攻
バイオモデリング講座 動物行動統御学研究分野

海老原史樹文

昼行性、夜行性動物と呼ばれるように、多くの動物は、その活動時間を一日の限られた時間帯に集中させている。このような動物の活動リズムは、体内時計、あるいは生物時計と呼ばれる内因性の時計機構の支配のもとに発現するもので、明暗などの一日の環境サイクルに対する適応として、生物が進化の過程で獲得した重要な生理機能である。生物時計により形成されるリズムは、恒常条件下の周期が約 24 時間であることから概日リズムと呼ばれ、代謝、生理、摂食、生殖など生体の基本的生命現象に関連する多くの機能に強い影響を与えている。

最近、概日リズムの発振に関与する多くの時計遺伝子が明らかにされ、リズム発現の分子機構が急速に解明されつつある。すなわち、概日リズムの振動は、時計遺伝子の転写・翻訳を基礎とする負のフィードバックループにより発現し、少なくとも動物界では同じ時計遺伝子・時計蛋白質がそれに関わっていることが明らかになってきた。マウスでもいくつかのリズム変異体が得られているが、これらのマウスは、哺乳類における概日時計の分子機構の解明のみならず、ヒトの睡眠覚醒リズム障害の解明や治療にとって有用なモデル動物となりうる。また、光周性や性周期など繁殖生理現象は概日リズムと密接に関連することから、農学における動物生産の観点からもリズム突然変異マウスは有用な実験動物となると思われる。

我々は、マウスを用いて概日リズムの突然変異体を分離するために、既存系統のスクリーニングや野生マウス集団からリズム異常個体を分離する試みを行ってきた。その結果、幾つかの突然変異マウスを発見した。ここでは、これらのマウスについて遺伝学的、生理学的及び分子生物学的観点から検討した結果について簡単に述べる。

既存系統のスクリーニング

概日リズム研究では、以前から、概日周期の系統差などが取り上げられていたが、それほど多くの研究が行われていたわけではない。しかし、近年、概日リズムの分子機構に関する研究が盛んになるにつれ、マウスを用いた研究が増えてきた。我々は、多くの近交系マウスについて、概日リズムを調べ、概日周期、概日光感受性、薬物による位相応答性などに差を示すマウスを見いだした。

(1) CS マウス

以前から、CS マウスは暗期だけでなく明期にも活発に活動することが報告されていたが (Ebihara & Tsuji, 1976)、さらに詳細にその特徴を明らかにするために、恒暗条件下

の概日リズムを解析した (Abe et al, 1999)。その結果、CS マウスの概日周期は個体間の変動幅が大きく、平均周期がほぼ 24 時間と一般に周期が長い特徴が認められた。また、個体内の変動幅も大きく、24 時間より長い周期から短い周期に突然変化する個体も見られ、周期の不安定性も大きな特徴であった。さらに、特徴的な点は、リズム splitting を起こすことで、いわゆる morning component と evening component と呼ばれる二つの明確な活動帯が出現することである。これらの component を対象として光パルスを与えたときの位相反応曲線をそれぞれについて求めたところ、主観的夜の後半に与えたパルスは morning component にのみ位相前進を引き起こし、一方、主観的夜の前半に与えたパルスは evening component にのみ位相後退を引き起こした。これらの事実から、CS マウスの概日システムは二つの相互にカップルした振動体により形成されていることが推測された。また、CS マウスの視交差上核における時計遺伝子の発現を調べたところ、行動リズムが splitting しているにもかかわらず、正常な発現パターンを示し、行動リズムと視交差上核のリズムの解離が起きていることがわかった (Abe et al. 2001)。

以上の行動学的、分子生物学的所見に基づき、次に、リズム異常を引き起こす遺伝子を染色体上にマッピングする試みを行った。ここでは、量的形質として取り扱いができる概日周期を対象として QTL(Quantitative trait loci) 解析を行った。まず、C57BL/6 を交配相手として F2 マウスを作成し解析したところ、第 12 染色体及び第 19 染色体に QTL の存在が示唆された。そこで次に、これらを確認するために日本産野生マウスを起源とする近交系マウス MSM との交配より得た F2 個体についてこれらの領域を調べたところ、第 19 染色体上の同じ染色体領域で高い LOD 値が得られた。以上の結果から、CS マウスの周期に影響する遺伝子は複数存在するが、特に、第 19 染色体上の遺伝子が周期延長に強く関与していることが示唆された (Suzuki et al. 2001)。

さらに、脳波を測定し、覚醒、non-REM 睡眠、REM 睡眠について詳しく解析したところ、REM 睡眠圧が高く、覚醒から REM へ直接ステージが頻繁に移行するナルコレプシー様の異常現象が認められた。この結果から、CS マウスがヒト睡眠障害の有用なモデル動物となる可能性が示された

(2) 概日光感受性低下マウス

網膜の主に桿体細胞が退化、消失する *rd* マウスは、古くから知られており、概日光受容系を解明する上で有用な突然変異体である。*rd* 遺伝子は常染色体性劣性遺伝子で、桿体細胞において情報伝達を行っている cGMP を 5'-GMP に変換する酵素である cGMP-PDE (phosphodiesterase) の β サブユニットをコードする DNA の塩基配列が正常のものとは異なっている。そのため *rd* マウスでは cGMP-PDE が不活性となり、cGMP が 5'-GMP に変換されずに視細胞内に蓄積されるため網膜変性が生じる。この突然変異遺伝子を持つ CBA/J-*rd/rd* は、正常網膜の CBA/N-+/+ に比べ、単一光パルスによる位相変位量が有意に小さい (Yoshimura et al. 1994)。しかし、同一の突然変異遺伝子を持つ C57BL/6J-*rd/rd* マウスは、正常な網膜を持つマウスと同じ概日光感受性を示すことが分かっており、遺伝的背景の違いにより概日光感受性に差が生じることが考えられた。そこで、CBA/J-*rd/rd* と C57BL/6J-*rd/rd* マウスを使って、概日光感受性に影響する遺伝子を

QTL解析した。その結果、第12染色体及び第17染色体に significant な領域が検出され、また、第8染色体に suggestive な領域が得られた。

(3) GABA系薬物投与による位相応答性異常マウス

GABA系薬物（ペントバルビタール、トリアゾラム、ムシモール）の投与でリズムの位相変位が生じる系統（SK/Nga, DBA/2）と、どの時刻に投与しても位相変位が生じない系統（C57BL/6）を見出した。この形質に関与する遺伝子のマッピングには、C57BL/6J と DBA/2J から作出された BXD リコンビナント近交系が有用である。

(4) SMXA リコンビナント近交系マウス

SM 系統は活動量が多く概日周期が短い特徴を持ち、A 系統は逆に活動量が少なく周期が SM に比べ長い。本実験では、これらのマウスを起源とする SMXA リコンビナント近交系を材料に活動リズムの QTL 解析を行った (Suzuki et al. 2000)。その結果、フリーラン周期では第7、18染色体上の3つのマーカーで高い相関が認められた。また位相角差については第7染色体上にマップされ、アルビノマウスに関する以前の報告（c 遺伝子座）を支持する結果が得られた。活動量に関しては第1染色体、第17染色体上にマップされた。

野生マウス集団からの分離

動物自然集団には突然変異遺伝子が高頻度に保有されているという理論に基づき、フィリピンで捕獲した野生キャストネウス・マウスから概日リズム突然変異マウスを分離することを試みた。すなわち、捕獲した約40匹のマウスを実験室に導入し、F1を得、さらにキャストネウス雄へ交配して得られる N2（戻し交配）マウス数千匹の行動リズムをスクリーニングしたところ、恒暗条件下でリズムを消失する無周期マウスを発見した。このマウスの多くは、明暗条件から恒暗条件下へ移行した後しばらくリズムを継続するが、周期が次第に短くなりリズムを失う。リズムを消失した後、6時間の光パルスを与えると、一時的にリズムが回復した。無周期マウスの視交差上核を組織学的に調べたが、正常マウスを比べ形態学的な差異は認められなかった。リズム異常の原因遺伝子を明らかにする目的で、遺伝解析を行った。まず、C57BL/6J マウスと交配し、得られた F1 個体を調べたが、リズムの消失が起きなかった。しかし、それらの個体を示す概日周期は無周期マウス（リズムが消失する前の周期）と C57BL/6J マウスとのほぼ中間の値を示した。QTL 解析により、周期、周期性、位相角差など色々なリズムの特性に関連する遺伝子をマッピングしたところ、複数の領域に QTL が検出された。また、リズム消失マウスの視交差上核について、各種時計遺伝子（*mPer1*, *mPer2*, *mPer3*, *clock*, *BMAL1*）の発現を調べた。その結果、明暗周期下では、これらの時計遺伝子の発現リズムが正常マウスと比べて大きく異なることはなかった。さらに、松果体メラトニンリズムについても検討したが、メラトニンの分泌パターンは正常と大きく変わらなかった。これらの結果から、行動リズムの消失には複数の遺伝子が関与すること、また、これら複数の遺伝子は、リズム発振の本体と考えられる負のフィードバックループには直接影響を及ぼしていない可能性が考えられた。

文献

S.Ebihara and K.Tsuji. Strain differences in the mouse's wheel-running behavior. *Jap.Psychol.Res.*18:20-29, 1976

H.Abe, S.Honma, K.Honma, T.Suzuki and S.Ebihara. Functional diversities of two activity components of circadian rhythm in genetical splitting mice (CS strain). *J.Comp.Physiol.A* 184:243-251, 1999

H.Abe, S.Honma, M.Namihira, S.Masubuchi, M.Ikeda, S.Ebihara and K.Honma. Clock gene expressions in the suprachiasmatic nucleus and other areas of the brain during rhythm splitting in CS mice. *Mol. Brain Res.* 87:92-99, 2001

T.Suzuki, A.Ishikawa, T.Yoshimura, T.Namikawa, H.Abe, S.Honma, K.Honma and S.Ebihara. Quantitative trait locus analysis of abnormal circadian period in CS mice. *Mammalian Genome* 12:272-277, 2001

T.Yoshimura, M.Nishio, M.Goto and S.Ebihara. Differences in circadian photosensitivity between retinally degenerate CBA/J mice (rd/rd) and normal CBA/N mice (+/+). *J.Biol.Rhythms* 9: 51-60, 1994

T.Suzuki, T.Yoshimura, A.Ishikawa, T.Namikawa, M.Nishimura and S.Ebihara. Mapping Quantitative trait loci for behavioural circadian rhythms in SMXA recombinant inbred strains. *Behav. Genet* 30:447-453, 2000

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

武田薬品医薬研究本部・創薬第一研究所

宮本政臣

老化促進モデルマウス (Senescence-Accelerated Mouse, SAM) は、京都大学胸部疾患研究所 (現在の再生医科学研究所) において竹田らによって開発された促進老化を示すモデル動物である¹⁾。SAM は老化促進を主徴とする P (prone) 系と正常老化を示すと考えられる R (resistant) 系からなる。P 系は活動性の低下、脱毛、被毛粗雑、寿命短縮などの共通の所見に加え、それぞれの系統により老化アミロイド症、白内障、骨粗鬆症、学習記憶障害などの特性を有する²⁾。ここでは学習記憶障害、情動障害、生体リズム障害などが著しい SAMP8 系^{3,4)} および脳萎縮を特徴とする SAMP10 系マウス^{5,6)} の加齢に伴う行動生理学的変化の特性と老化動物モデルとしての有用性について述べる。実験で使用された動物は 武田薬品医薬研究本部において SPF 環境下で飼育された SAMRITA (以下 SAMR1 と略)、SAMP8/Ta (SAMP8 と略) および SAMP10//Ta (SAMP10 と略) 系雄性マウスである。

1. 学習記憶障害

SAMP8 系マウスは step-through 型の受動的回避反応およびシャトル箱を用いた能動的回避反応において SAMR1 系対照群に比較し、加齢依存性の顕著な学習障害を示す。図 1 に 8 ヶ月齢の SAMP8 および SAMP10 系マウスの受動的回避反応を示す。SAMP8 および SAMP10 マウスともに獲得試行時での暗室への移動潜時において有意な短縮を示した。また、24 時間後の保持テストでは SAMR1 系マウスが良好な回避反応を示すのに対し、P8 および P10 系マウスともに回避時間の有意な短縮を示した。特に、SAMP8 における回避反応障害は顕著であった。P8 系マウスはシドマン回避課題においても著明な障害を示すことが報告されている。さらに、SAMP8 は多重 T 字型水迷路やモリスの水迷路学習においても明らかな障害を示す^{3,4)}

以上のように、SAMP8 マウスは受動的回避反応学習や水迷路学習において顕著な障害を示す。しかしながら、エサなどの陽性報酬刺激を動因とした迷路課題

では、その障害は極めて軽度ある。8 アーム放射状迷路課題においてランダム選択した 5 本のアームのみに餌を置いて訓練したときの空間記憶学習において、SAMP8 は参照記憶エラーおよび作業記憶エラーのいずれにおいても R1 より高値を示すもののその障害は軽度であった⁸⁾。このことは SAMP8 が電気刺激の回避や水から逃避など嫌悪刺激を用いた学習課題において顕著な障害を示すこと示唆する。

SAMP8 の学習障害が薬物投与によって緩解されるか否かは、SAMP8 が老化依存性の学習障害モデルとして有用であるか否かを判断する上で重要である。いくつかの研究グループが SAMP8 の学習障害が諸種薬物で改善されることを報告し、モデルとしての有用性を明らかにしている^{9,10)}。

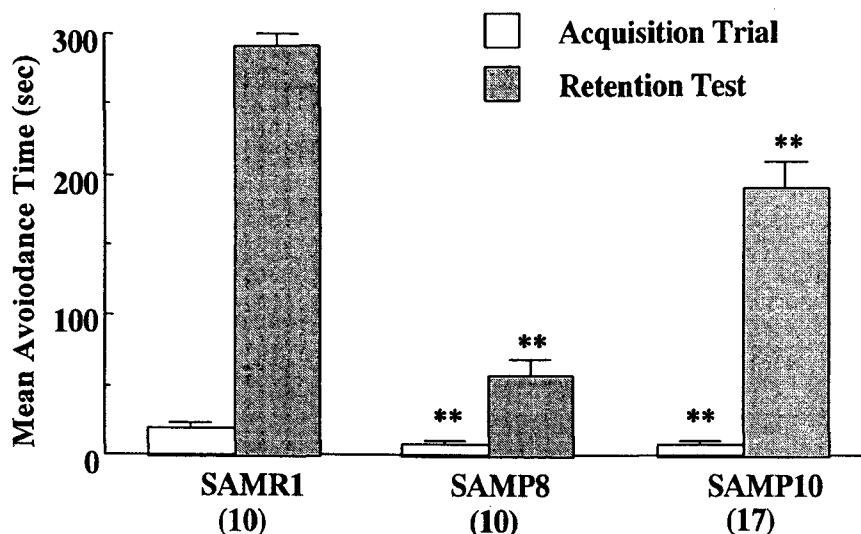


図 1. SAMP8 および SAMP10 マウスにおける受動的回避反応
8 カ月齢のマウスを用い、ステップスルー型受動的回避反応での回避時間を示す。回避時間は 300 秒まで測定。括弧内は動物の匹数を示す。* $P < 0.01$ (SAMR1 照群と比較、獲得試行および保持テストの検定には Student's t-test および Mann-Whitney U-test を使用)⁸⁾。

2. 情動障害

高架式プラス迷路は動物の情動性の変化、特に動物の不安レベルを測る簡便な方法として広く用いられている¹¹⁾。SAMP8 は高架式プラス迷路において SAMR1 系マウスに比較し、4-12 カ月齢のいずれの時期においても有意な開放アームへの進入数の増加および開放アームでの滞在時間の増加を示す³⁾。SAMP8 および

SAMP10 系マウスの 8 カ月齢におけるプラス迷路における行動を図 2 に示す。SAMP8 系マウスでは SAMR1 対照群に比較し、開放アームおよび遮蔽アームへの進入回数が有意に増加し、不安レベルが高いとされている開放アームでの滞在時間が長い。一方、SAMP10 系マウスの行動は SAMR1 系マウスと変わらず、開放アームへの進入はすくなく滞在時間も短い。SAMP8 系マウスの行動は低不安様の行動であり、正常動物が抗不安薬を投与された時の行動と類似する。また、Vogel 型の water drinking conflict 行動¹²⁾においても、SAMP8 は電気ショックを伴わない飲水に関しては無影響であったが電気ショックを伴う飲水の著明な増加を示した¹³⁾。SAMP8 におけるこのような低不安様の行動は、食餌性 neophobia においても認められる。すなわち、SAMP8 は摂食制限下、新規の餌を呈示したときの摂食開始までの時間において明らかな短潜時を示す⁴⁾。この行動変化には脳内ノルアドレナリン系およびコリン系の機能低下が関与すると推定される。このような SAMP8 マウス における低不安様行動は、P8 系 が条件回避課題や水迷路課題において著しい障害を示すことと関連していると考えられる。

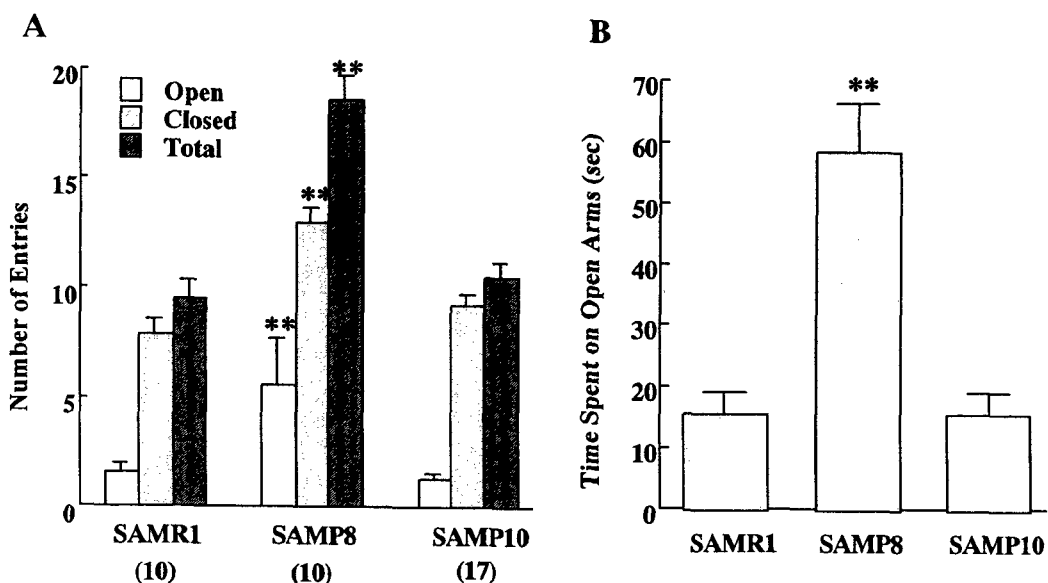


図 2. SAMP8 および SAMP10 系マウスの高架式プラス迷路における行動
8 カ月齢の SAMR1、SAMP8 および SAMP10 系マウスを使用。SAMP8 系は SAMR1 および SAMP10 系マウスに比較し、開放アーム、遮蔽アームへの進入の増加と開放アームでの滞在時間の増加を示す。括弧内の数字は 1 群の匹数を示す。* * $P < 0.01$ vs SAMR1 対照群 (Student's t-test)⁸⁾。

Tail suspension test(尾懸垂法)は動物のうつ状態を検出する方法として用いられている¹⁴⁾。尾懸垂法においては、SAMP8 系マウスおよび SAMP10 系マウスは高架式プラス迷路における行動とは対照的な変化を示す。図 3 は 8 ヶ月齢のマウスを用い、15 分間の尾懸垂時における不動時間の経時変化を示したものである。SAMR1 および SAMP8 系マウスは時間経過と共に不動時間が増加するが、もがき行動を示している時間の方が長い。それに対し、SAMP10 系マウスは尾懸垂の初期から不動時間の増加を示し、テストの後半ではほとんどもがき行動を示さない。すなわち、SAMP10 系マウスは容易に自発性の低下を示し、抑うつ状態になることを示している⁸⁾。このような行動は forced swimming test(強制水泳テスト)でも見られる⁷⁾。我々は SAMP10 系マウスが加齢依存性の自発性低下のモデルとして有用であると考えている。

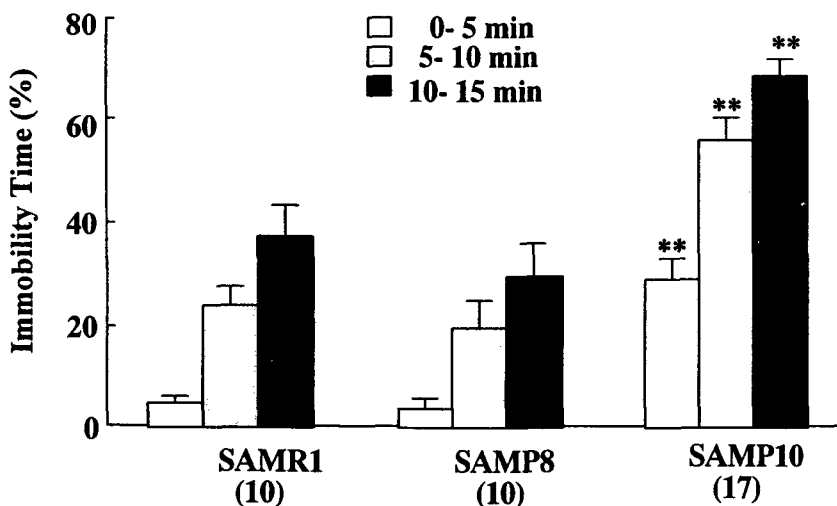


図 3. SMP10 および SAMP8 系マウスの尾懸垂テストにおける行動変化
8 ヶ月齢のマウスを使用し、15 分間の尾懸垂時の不動時間を各 5 分の 3 ブロックに分けて示す。SAMP10 系マウスは不動時間の著しい増加を示す。括弧内の数字はマウスの匹数を示す。* $P < 0.01$ (SAMR1 対照群と比較、Student's t-test)⁸⁾。

3. 概日リズム障害

SAMR1 系における自発運動量は暗期に高く明期に低い、げっ歯動物特有の日内リズムを示す。R1 系における自発運動リズムの振幅は加齢に伴って減少した。摂水行動に関しても暗期に高く明期に少ないげっ歯動物に典型的なリズムを示

した。このリズムの振幅も自発運動リズム同様に 4-12 カ月齢では加齢依存性の減少を示した。R1 系が正常な自発運動の日内リズムの加齢変化を示すのに対し、SAMP8 は暗期における自発運動量の低下と明期移行後における自発運動の亢進を示した（図 4）。SAMP8 系は摂水行動動の日内リズムにおいても明らかな異常を示すことが明らかとなった。これらのリズム異常は SAMP10 系にも認められた。SAMP8 における自発運動リズムの異常は、12 時間 LD サイクル時の明期における光照射強度を上げることにより、ほぼ完全に回復した⁸⁾。このことは SAMP8 におけるリズム異常には光入力に対する感受性の低下が関与することを示唆する。

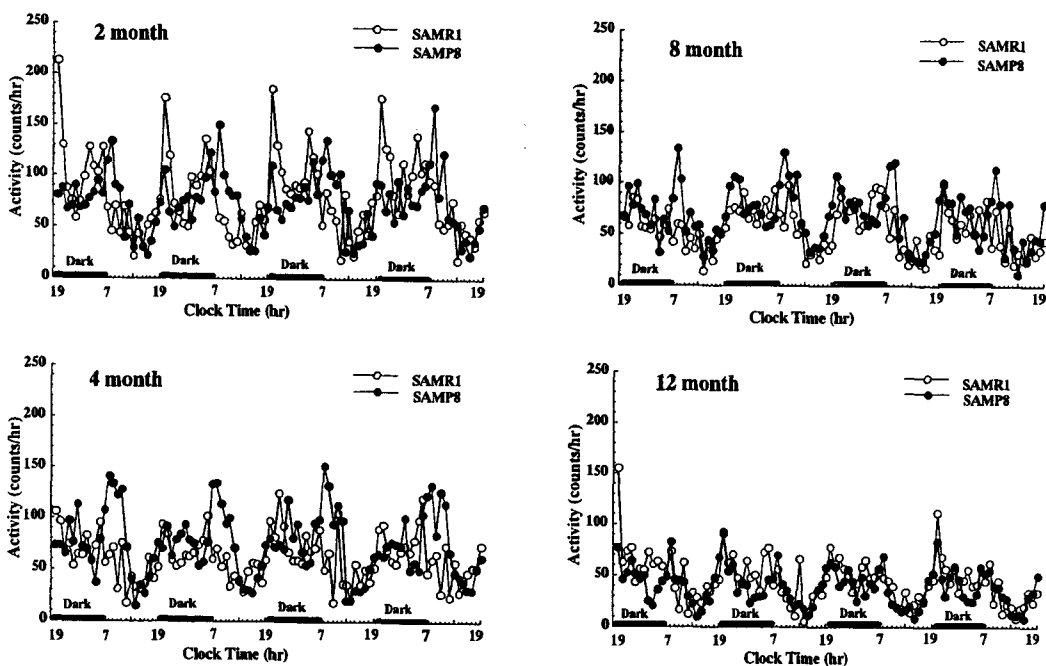


図 4. SAMP8 系マウスの自発運動リズムの加齢依存性変化

2-12 カ月齢のマウスを使用。23 x 30 x 17 cm の透明アクリル製測定ケージに各マウス 1 匹を入れ、昼夜の運動量をケージ内に張った 3 本の赤外線ビームの遮断回数により測定。1 群 15 匹のマウスを使用。

4. 考察と結論

アルツハイマー病 (AD) では脳エネルギー代謝の低下が臨床症状の初期から認められる。そこで、SAMP8 系における脳内へのグルコースの移行と代謝を R1 系を対照として検討すると、P8 におけるグルコースの脳内移行は R1 と変化が

ないが、脳内グルコース代謝は明らかに低下している。この低下は受動的回避学習における回避時間短縮と有意な相関が認められた¹⁵⁾。このように SAMP8 はグルコース代謝においても障害があることが明らかとなった。SAMP8 脳においては酸化ストレスの亢進が指摘されている^{16,17)}。我々は酸化ストレスに対して著明な拮抗作用を示すイデベノンの長期投与の効果について検討した。イデベノンは諸種の行動障害を改善するとともに P8 における老化兆候も抑制した¹⁸⁾。このことから、SAMP8 の老化促進には酸化ストレスの関与が大きいと考えられている。SAMP8 ではミトコンドリアの DNA (mtDNA) の欠損が高頻度に認められること²⁰⁾もこの推定を支持する。SAMP8 系マウスは脳のエネルギー代謝の低下を伴う学習障害、情動障害および生体リズム異常を示すことが示唆された。これら変化は AD を含む老年期痴呆に見られる症状との類似点が多い。最近、AD においても mtDNA の欠損を伴うミトコンドリア機能の低下あるいは β -アミロイドの神経毒性における酸化ストレスの関与が注目されており、SAMP8 の病態の解明は AD 治療薬開発の糸口を与えることが期待される。

一方、SAMP10 の自発性の低下に関しては明らかなメカニズムは分かっていない。これまで明らかになっている行動変化と脳萎縮との関連性が注目される場所である。これまでの著者らの研究では前脳におけるドパミン神経の機能低下が示唆されている。脳萎縮が前脳を中心に見られることと関連している可能性がある。また、中枢神経系で主たる抑制性神経伝達物質である GABA 系の変化も見られており、これからの研究が待たれるところである。SAMP10 における自発性の低下のメカニズム解明はヒトにおける加齢依存性の自発性低下や老人性うつ治療薬の開発に繋がると考える。

[文献]

- 1) Takeda T., Hosokawa M., Takeshita S., Irino M., Higuchi K., Matsushita T., Tomita Y., Yasuhira K., Hamamoto H., Shimizu K., Ishii M. and Yamamuro T., A new murine model of accelerated senescence. *Mech. Ageing Dev.* 17, 183-194, 1981.
- 2) Takeda T., Hosokawa M. and Higuchi K., Senescence-accelerated mouse (SAM): a novel murine model of accelerated senescence. *J. Am. Geriatr. Soc.* 39: 911-919, 1991.
- 3) Miyamoto M., Kiyota Y., Yamazaki N., Nagaoka A., Matsuo T., Nagawa Y. and Takeda T., Age-related changes in learning and memory in the

- senescence-accelerated mouse (SAM). *Physiol. Behav.* 38: 399-406, 1986.
- 4) Miyamoto M., Kiyota Y., Nishiyama M. and Nagaoka A., Senescence-accelerated mouse (SAM): age-related reduced anxiety-like behavior in the SAM-P/8 strain. *Physiol. Behav.* 51: 979-985, 1992.
 - 5) Shimada A., Ohta A., Akiguchi I. and Takeda T., Inbred SAM-P/10 as a mouse model of spontaneous inherited brain atrophy. *J. Neuropathol. Exp. Neurol.* 51, 440-450, 1992.
 - 6) Shimada A., Ohta A., Akiguchi I. and Takeda T., Age-related deterioration in conditioned avoidance task In the SAM-P/10 mouse, an animal model of spontaneous brain atrophy. *Brain Res.* 608, 266-272, 1993.
 - 7) Miyamoto M., Characteristics of age-related behavioral changes in senescence-accelerated mouse SAMP8 and SAMP10. *Exp. Gerontol.* 32, 139-148, 1997.
 - 8) Miyamoto M., Takahashi H., Ohta H. and Sakamoto J., Animal model of brain aging: senescence-accelerated mouse (SAM). *CNS Drug Reviews* 4, 361-375, 1998.
 - 9) Food J.F., Morley J.E. and La Reginna M., Age-related changes in the pharmacological involvement of retention in senescence accelerated mouse (SAM). *Neurobiol. Aging* 14, 159-166, 1993.
 - 10) Sasaki K., Tooyama I., Li A.J., Oomura Y. and Kimura H., Effects of an acidic fibroblast growth factor fragment analog on learning and memory and on medial septum cholinergic neurons in senescence-accelerated mice. *Neuroscience* 92, 1287-1294, 1999.
 - 11) Pellow S., Chopin P., File S.E., Briley M., Validation of open closed arm entries in an elevated plus-maze as a measure of anxiety in the rat. *Neurosci. Methods* 14, 149-165, 1985.
 - 12) Vogel J.R., Beer B. and Clody D.E., A simple and reliable conflict procedure for testing antianxiety agents. *Psychopharmacologia* 4, 1-7, 1971.
 - 13) 宮本政臣、抗痴呆薬開発のための実験手技 (8) -老化促進モデルマウス：行動薬理学的観点より、日本神経精神薬理学雑誌 14, 323-335, 1994.
 - 14) Steru L., Chermat R., Thierry B. and Simon P., The tail suspension test:

- a new method for screening antidepressants in mice. *Psychopharmacology* 85, 367-370, 1985.
- 15) Ohta H., Nishikawa H., Hirai K., Kato K. and Miyamoto M., Relationship of impaired brain glucose metabolism to learning deficit in the senescence-accelerated mouse. *Neurosci. Lett.* 217, 37-40, 1996.
 - 16) Sato E., Oda N., Ozaki N., Hashimoto S., Kurokawa T. and Ishibashi S., Early and transient increase in oxidative stress in the cerebral cortex of senescence-accelerated mouse. *Mech. Ageing Dev.* 86, 105-114, 1996.
 - 17) Matsugo S., Kitagawa T., Minami S., Ebashi Y., Oomura Y., Tokumaru S., Kojo S., Matsushima K. and Sasaki K., Age-dependent changes in lipid peroxide levels in peripheral organs, but not in brain, in senescence-accelerated mice. *Neurosci. Lett.* 278, 105-108, 2000.
 - 18) Takahashi H., Nishiyama M., Takami K., Miyamoto M. and Nagaoka A., Effects of chronic administration of idebenone on age-related behavioral disorders in senescence-accelerated mice (SAMP8). In: *The SAM Model of Senescence*, Takeda T. (Editor), pp 427-430, Excerpta Medica, Elsevier Press B.V., Amsterdam, 1994.
 - 19) Fujibayashi Y., Yamamoto S., Waki A., Konishi J. and Yonekura Y., Increased mitochondrial DNA deletion in the brain of SAMP8, a mouse model for spontaneous oxidative stress brain. *Neurosci. Lett.* 254, 109-112, 1998.

作業記憶に対する炎症性サイトカイン及びアミロイド前駆体蛋白 末端フラグメントの作用に関する行動薬理学的検討

九州大学大学院薬学研究院薬効解析学

山本経之、松本裕司、渡辺繁紀

アルツハイマー病は進行性の記憶障害を中心とする認知機能の全般的な低下をきたす原因不明の神経変性疾患である。その病理学的特徴として神経原線維変化及び老人斑が脳内、特に大脳皮質及び海馬に出現・蓄積する¹⁾。 β -アミロイド($A\beta$)は老人斑の主要な構成物であるだけでなく、神経細胞毒性を有することも明らかとされている^{2), 3)}。これらの知見から $A\beta$ はアルツハイマー病における重要な原因物質として注目を集めているが、 $A\beta$ の異常な増加が認められてもアルツハイマー病を発症していない高齢者も存在している。したがって、アルツハイマー病の成因として、 $A\beta$ の単独作用だけで解釈することは困難である。

一方、アルツハイマー病患者の老人斑及びその周辺において炎症性サイトカインの著しい産生亢進が生じていることが近年明らかとなった⁴⁾。これは老人斑の形成・成長に炎症性サイトカインが何らかの役割を果たしていることを示唆している。さらに、炎症性サイトカインはアミロイド前駆体蛋白 (APP) の転写活性化を介して $A\beta$ の産生を増加するという報告⁵⁾ もあり、 $A\beta$ とサイトカインが互いを活性化・増加するという悪循環が脳内において起こっている可能性が指摘されている。

これとは別に Selkoe 等は、 $A\beta$ とは別の APP 由来の C 末端フラグメントがアルツハイマー病脳内に存在し、 $A\beta$ と同様にアミロイド線維を形成することを報告している⁶⁾。さらに、Suh 等は 105 アミノ酸残基からなる C 末端フラグメント (CT105) が、①カチオンチャネル形成を亢進し $A\beta$ よりはるかに強い細胞毒性を発現すること⁷⁾、及び②海馬 LTP の誘導を抑制すること⁸⁾ を報告している。また CT105 により腫瘍壊死因子 (TNF- α) およびインターロイキン-1 β (IL-1 β) が誘導され、その作用強度は $A\beta$ より非常に大きいこと⁹⁾ も明らかにされている。このことから前述したアルツハイマー病脳における炎症性サイトカインの増加は C 末端フラグメントに起因することが示唆される。C 末端フラグメントに関するこれらの知見は、 $A\beta$ に代わるアルツハイマー病の真の原因物質としての可能性を示唆している。さらにアルツハイマー病の成因が単一の物質の増減ではなく複数因子の量的変化・機能低下 (multidysfunction) であることを考慮に入れると、C 末端フラグメントと炎症性サイトカインとの相互作用がアルツハイマー病において認められる認知機能全般の低下に対していかなる役割を担っているのかを検討することは意義がある。

以上の知見を背景として、アルツハイマー病の初期に障害が認められる作業記憶に焦点を当て、本研究は炎症性サイトカイン IL-1 β 及び TNF- α 、さらに APP の C 末端フラグメント CT105 の作用を明らかとすることを目的として行動薬理的検討を行った。さらに、サイトカインと CT105 の相互作用により作業記憶に及ぼされる影響についても同様に検討した。

実験方法

実験動物

実験には 8-10 週齢の Wistar 系雄性ラットを用いた。食餌制限を行い、実験開始時の体重を自由摂食時の約 80 % として実験を行った。

実験装置

実験は 3-パネルランウェイ装置¹⁰⁾を用いて行った。本装置はスタートボックス、ゴールボックスおよび 4 つの関門より成る。各関門は 3 つのパネルゲートより構成されており、すべてのパネルゲートはストッパーによってスタートボックス方向への逆戻りができないようになっている。また各関門の 3 つのパネルゲートのうち 2 つはストッパーが設置され、ゴールボックス方向への通過が不可能となっている。ゴールボックス内には正強化として餌が設けてある。ラットがスタートボックスから出て餌を獲得するまでの試行を 1 trial とし、各 trial におけるラットが通過不可能なパネルゲートを押した回数 (エラー回数; number of errors) ならびにラットがスタートボックスを出てから餌を獲得するまでに要した時間 (反応時間; latency) を記録測定した。

学習獲得の為の訓練

各関門の 3 つのパネルゲートのうち 1 つだけ通過可能な状態を設定した。ラットがスタートボックスから出て餌を獲得するまでの試行を 1 trial とし、2 分間隔で 6 trial を 1 日に行い、これを 1 session とした (図1)。

ラットは作業記憶課題を用いて訓練した。すなわち、通過可能なパネルゲートの位置の配列 (課題) は session 毎に変え、session 内の 6 trial では同一とした。学習訓練を重ね、3 session 連続して第 2 trial から第 6 trial までのエラー回数の合計値 (作業記憶のエラー回数) が 8 以下となったラットを作業記憶の完成したものとし、海馬へのカニューレ植え込み手術及び薬物投与実験を行った。

海馬内薬物注入用ガイドカニューレ植え込み手術ならびに 薬物注入法

sodium pentobarbital (40 mg/kg i.p.) 麻酔下に、学習が完成したラットの頭部にステンレス製ガイドカニューレを刺入・固定した¹¹⁾。術後 5 日間以上の回復期間を与えた後、ランウェイ試行を再開し、学習完成の基準に達しているラットに薬物処置を行った。薬液あるいは生理食塩水を、注入量を片側当たり 2 μ l、注入速度を 0.5 μ l/min として注入用カニューレを介して両側性に背側海馬に注入した。

使用薬物

本実験では IL-1 β は試行 10 分前、TNF- α 及び CT105 は 24 時間前に海馬内投与を行った。CT105 はリン酸緩衝生理食塩液に、IL-1 β 及び TNF- α は生理食塩水にそれぞれ溶解して用いた。

組織学的検討

行動学的なテスト試行が終了した後、エーテル深麻酔下で左心室より 10 % paraformaldehyde 溶液にて頭部血管を灌流し、脳を頭蓋骨から摘出後さらに 48 時間 paraformaldehyde 溶液中で固定した。厚さ 50 μ m の切片をミクロトームで作製し、Cresyl violet で染色して組織学的に注入部位を確認した。

統計学的処理

値はすべて平均 $\pm$ 標準誤差で表した。一元配置分散分析法 (ANOVA) を用いて解析した後、群間の有意差検定は Dunnett test を用いて行った。

結果

IL-1 β 海馬内注入によって作業記憶のエラー回数は用量依存的に増加し、32 及び 100 ng/side の投与により生理食塩水投与群に対し有意に増加した。このとき、第 1 trial におけるエラー回数には影響が無かった。また反応時間もいずれの trial においても変化は認められなかった (Fig. 1)。

TNF- α の 560 ng/side 海馬内注入直後では作業記憶のエラー回数は影響を受けなかったが、注入 24 時間後では著明に増加した。しかしながら、この時も第 1 trial におけるエラー回数及び全 trial での反応時間には変化が認められなかった。

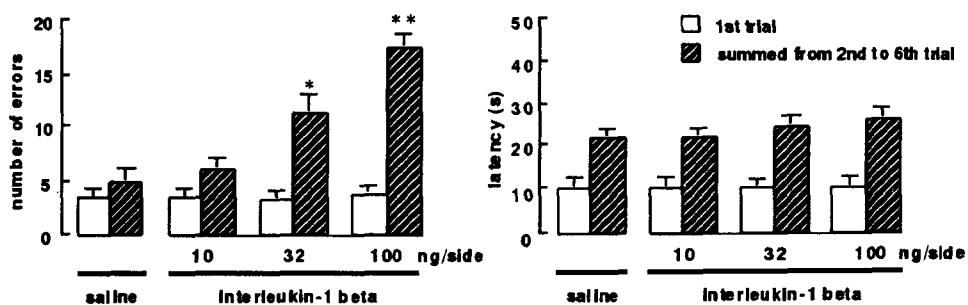


Fig. 1. Effect of intrahippocampal administration of IL-1 β on the number of errors and latency in a 3-panel runway task in rats. * $P<.05$ vs saline.

CT105 3.2 nmol/side を 3 日間反復投与し、作業記憶の測定はその 24 時間後に行った (Fig. 2)。CT105 海馬内注入により、作業記憶のエラー回数は、第 2 session から有意に増加した。このエラー回数の増加は注入を中止しても持続し、8 日目まで対照群に比べ高かった。また、この実験期間を通して第 1 trial におけるエラー回数には変化がなかった。

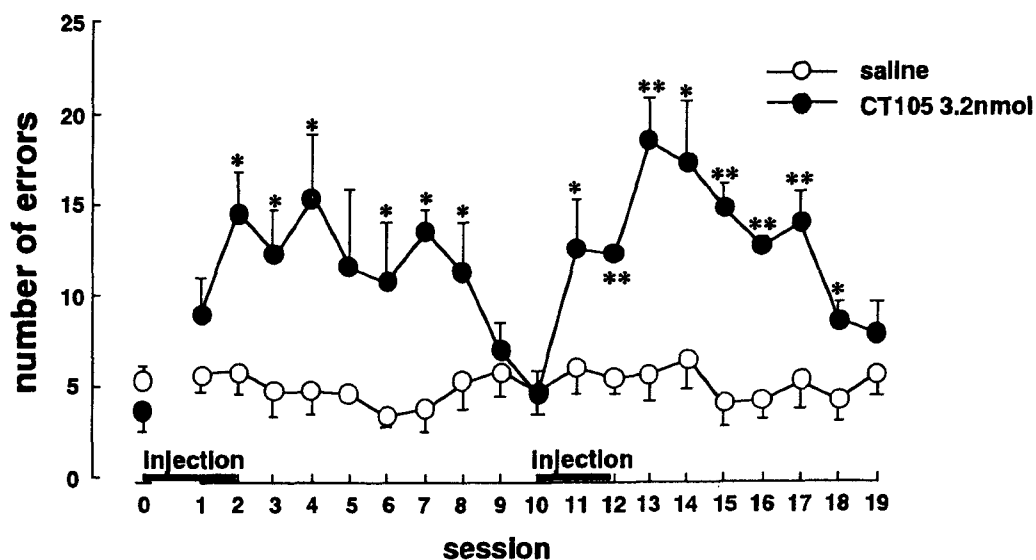


Fig. 2. Effect of intrahippocampal administration of CT105 on the number of working memory errors. * $P<.05$, ** $P<.01$ vs saline.

さらに、単独投与では影響を及ぼさない CT105 1.0 nmol/side (8.750 ± 1.109) と TNF- α 100ng/side (5.875 ± 1.060) の海馬内同時投与により、作業記憶のエラー回数は対照群 (4.167 ± 0.307) に比べ有意に増加した (20.75 ± 2.097)。このとき、いずれの薬物も単独では影響を及ぼさなかった。反応時間もエラー回数と同様に、同時投与によって有意に増加した (21.50 ± 1.628 to 31.00 ± 4.062)。このエラー回数の増加は投与 96 時間後でも持続した。

考察

IL-1 β 及び TNF- α の海馬内注入により作業記憶のエラー数が上昇し、またいずれの薬物注入によっても第 1 trial におけるエラー数及び反応時間は変化しなかった。このことより、炎症性サイトカインの増加は作業記憶を障害することが明らかとなった。しかしながら、その障害の発現時間は IL-1 β では注入 10 分後であるのに対し TNF- α では注入 24 時間後であり、その作用機序が異なることが示唆された。海馬でのアセチルコリン神経系の機能低下は作業記憶障害を惹起することが行動薬理学的に明らかとなっているが、IL-1 β はこのアセチルコリンの遊離を阻害する。従って、IL-1 β による作業記憶障害はアセチルコリン神経伝達の急速な低下によることが考えられる。一方、TNF- α は神経伝達物質の遊離応答には関与していないが、活性酸素種の産生を亢進し神経細胞に直接的な傷害を及ぼすことが知られている。これらの知見から、TNF- α により惹起される作業記憶障害は活性酸素種の産生を介した細胞傷害に基因することが示唆される。

APP の C 末端ペプチド CT105 の海馬内反復注入によってラットの作業記憶は著しく障害され、その作用は注入を止めても持続した。CT105 は細胞膜にカチオンチャネルを形成し、これにより細胞毒性を発揮するとされている⁸⁾。また、Rah 等は CT105 によりアストロサイトやミクログリアが活性化され、それに伴って産生される多量のサイトカインが神経細胞へ障害を起こす可能性を示している⁹⁾。これらのことから、CT105 はその細胞毒性による直接的作用とサイトカイン産生を介した間接的な作用の二つの経路により神経細胞に対して影響を及ぼすと考えられる。本実験における CT105 による持続的な作業記憶障害作用は、その細胞毒性及び脳内で増加したサイトカインの作用の両方に基因する可能性が示唆される。

さらに、CT105 及び TNF- α の、単独では影響を及ぼさない用量での同時投与により相乗的な作業記憶障害が認められた。これは TNF- α の同時投与により上述した CT105 のサイトカイン産生を介した作用が著しく増強されたことによるものと考えられる。この知見は、単一の原因物質の変容だけで起こって

いると考えるよりも、単一では正常範囲内での変化であっても複数の因子が重なり初めて病的状況を起こしている (multidysfunction) 可能性が示唆される。

以上、本研究では炎症性サイトカイン(IL-1 β 、TNF- α) および CT105 により作業記憶は障害され、さらに CT105 と TNF- α の同時注入により作業記憶障害は相乗的に増強された。臨床的にも C 末端フラグメントは A β 同様にアルツハイマー病脳内に存在していることが明らかとなっており、その病態形成に重要な役割を演じていることが強く示唆される。さらに、脳内でのサイトカインの増加は単なる炎症反応を指しているのではなく、A β や C 末端フラグメントと相互作用し本疾患の主要因となっている可能性がある。

参考文献

- 1) D.J. Selkoe, Alzheimer's disease: a central role for amyloid. J. Neuropathol. Exp. Neurosci. 60 (1994) 607-619.
- 2) G.G. Glenner, C.W. Wang, Alzheimer's disease: initial report of the purification and characterization of a novel cerebrovascular amyloid protein, Biochem. Biophys. Res. Commun. 120 (1984) 885-890.
- 3) J. Hardy, K. Duff, K. Hardy, J. Perez-Tur, M. Hutton, Genetic dissection of Alzheimer's disease and related dementias: amyloid and its relationship to tau, Nat. Neurosci. 1 (1998) 355-358.
- 4) R. Cacabelos, X.A. Alvarez, L. Fernandez-Novoa, A. Franco, R. Mangues, A. Pellicer, T. Nishimura, Brain interleukin-1 beta in Alzheimer's disease and vascular dementia, Methods Find. Exp. Clin. Pharmacol. 16 (1994) 141-151.
- 5) L. Meda, M.A. Cassatella, G.I. Szendrei, L. Otvos Jr., P. Baron, M. Villalba, D. Ferrari, F. Rossi, Activation of microglial cells by beta-amyloid protein and interferon-gamma, Nature 374 (1995) 647-650.
- 6) D.J. Selkoe, M.B. Podlisny, C.L. Joachim, E.A. Vickers, G. Lee, L.C. Fritz, T. Oltersdorf, Beta-amyloid precursor protein of Alzheimer disease occurs as 110- to 135-kilodalton membrane-associated proteins in neural and nonneural tissues, Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 85 (1988) 7341-7345.
- 7) H.J. Kim, Y.H. Suh, M.H. Lee, P.D. Ryu, Cation selective channels formed by a C-terminal fragment of beta-amyloid precursor protein, Neuroreport 10 (1999) 1427-1431.

- 8) W.K. Cullen, Y.H. Suh, R. Anwyl, M.J. Rowan, Block of LTP in rat hippocampus in vivo by beta-amyloid precursor protein fragments, *Neuroreport* 8 (1997) 3213-3217.
- 9) J.C. Rah, H.S. Kim, S.S. Kim, J.H. Bach, Y.S. Kim, C.H. Park, J.H. Seo, S.J. Jeong, Y.H. Suh, Effects of carboxyl-terminal fragment of Alzheimer's amyloid precursor protein and amyloid beta-peptide on the production of cytokines and nitric oxide in glial cells, *FASEB J.* 15 (2001) 1463-1465.
- 10) Y. Furuya, T. Yamamoto, S. Yatsugi, S. Ueki, A new method for studying working memory by using the three-panel runway apparatus in rats. *Jpn. J. Pharmacol.* 46 (1988) 183-188.
- 11) M. Ohno, T. Yamamoto, S. Watanabe, Effects of intrahippocampal injections of N-methyl-D-aspartate receptor antagonists and scopolamine on working and reference memory assessed in rats by a three-panel runway task, *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 263 (1992) 943-950.

〈第72回研究会（平成13年12月14日）〉

特別講演

「マウスの歴史と遺伝子の歴史」

森脇 和郎（理研バイオリソースセンター）

特別講演

「実験用ラットの価値」

芹川 忠夫（京大・院・医・動物実験施設）

マウスの歴史と遺伝子の歴史

森脇 和郎（理研バイオリソースセンター）

1900年代の後半に至り、遺伝子操作や胚操作の技術の著しい発展の結果、遺伝子が生命の構造と機能を制御していることが明らかになった。この流れに遺伝子操作動物の開発育成が大きく貢献した事はいうまでもない。一方、遺伝子分析技術の発達、ヒトとマウスの間に染色体上の遺伝子配列や遺伝子 DNA の塩基配列にかなりの相同性があることを示した。ヒトの正常な生命機能およびその異常としての疾患のモデルとしての実験動物、特にマウスの位置はこれまでよりはるかに高いものとなった。

この趨勢を踏まえ実験用マウスとその遺伝子の歴史を考えてみたい。

ユーラシア大陸に生息する野生マウスは遺伝学的には互いに100万年近く前に分岐した少なくとも *domesticus*, *castaneus*, *musculus* という3つの亜種グループに分けられる。今日の実験用マウスはヨーロッパ産の *domesticus* 亜種グループから愛玩用マウスを経て育成された。その育成の過程で自然集団の持つ大きな遺伝的多様性が失われたことは、多様性に富むヒトのモデルとするときに問題となる。長い進化の歴史を背負っているマウス野生集団に着目する必要がある理由の一つである。野生マウスが一般に肺がん感受性が低いのに対して実験用マウスが高い感受性を持つことは、それらの育成過程における高発ガン感受性への選抜の影響を示唆している。

さらにアジア産の野生マウスは実験用マウスの元になったヨーロッパ産野生マウスと遺伝的に大きな隔たりを持つために独自の遺伝子変異を豊富に包含している点でさらに重要である。MHC 遺伝子領域における極めて高頻度の遺伝的組み換えを持つマウスがアジア産亜種グループから見出されたことも興味ある一例である。

今日遺伝子操作動物を用いた遺伝子機能の研究が隆盛を極めているが、個体レベルの形質発現の研究が進むにつれて、ひとつの主遺伝子の他に遺伝的背景の中にある第二、第三の遺伝子の関与が注目されるに至った。ここでも実験用マウス系統に見出された四肢形成の遺伝的変異の発現における遺伝的背景の遺伝子の存在がアジア産マウスとの交配実験で明らかにされた。

次に、ヘモグロビン遺伝子をひとつの例として取り上げ、その歴史をたどってみる。マウスのヘモグロビンベータ鎖遺伝子 (*Hbb*) には、これまで3つのハプロタイプ、*d*, *s*, *p* が知られていたが、我々は1900年代のはじめに中国西域

で4つ目の ハプロタイプ, w1 を見出し、BALB/c 系統に導入して Congenic 系統を育成した。

アジア全域の調査から、インド、パキスタン、東南アジア、南中国等に生息する castaneus 亜種グループは d - ハプロタイプ をもち、北中国、中国東北地域、東ロシア、朝鮮半島、日本等に分布する musculus 亜種グループは p - および w1 - ハプロタイプ をもつ事がわかった。

b1, b2 遺伝子およびその間にあるスペーサー領域からなる Hbb 遺伝子全領域約 15Kb の DNA 塩基配列の分析を d, p, w1 の各 ハプロタイプ について行った結果、p-ハプロタイプは d タイプの b1 遺伝子と w1 タイプの b2 遺伝子をもつ亜種間の d / w1 組み換え体であることが明らかになった。

3 種のハプロタイプの塩基配列の比較は、この組み換えの起こった部位は b1 遺伝子の下流約 1 Kb のスペーサー領域にある事を示した。

ハプロタイプ d および p の b1 遺伝子イントロン領域塩基配列の比較、同様にハプロタイプ w1 および p の b2 遺伝子イントロン領域塩基配列の比較から、この組み換えが起こったのは 10 万乃至 50 万年前と推定される。

地理的にはなれた 5 地点に由来する p ハプロタイプマウスが同じ組み換え部位を持つことから、この組み換えは共通の起源において 1 回しか起こらなかったと考えられる。

p ハプロタイプ Hbb をもつ 2 つの系統 AU および MSM のスペーサー領域塩基配列を、d および w1 ハプロタイプと詳細に比較したところ、d / w1 組み換えはいくつもの部位で起こっている。

始めの組み換えが d ハプロタイプの集団の中で起こったため、その後、度々周辺の d ハプロタイプ個体との間に交配が起こり、何らかの機構で高頻度の 2 番目, 3 番目の組み換えが起こったのではないかと？ 始めの組み換え体のもつ w1 染色体上に繰り返し塩基置換がおこり、それらが偶然 d ハプロタイプと同じであったとは考えにくい。

最近カザクスタンから新しいハプロタイプ w2 が見出されたが、これも w1 / w3 の組み換え体である。このスペーサー領域は recombination hot spot なのかもしれない。

古い歴史を持つ遺伝子は内なる遺伝的背景および外なる地球環境との相互作用を潜り抜けて生き残ってきた筈である。従って、マウスおよびその遺伝子の歴史を明らかにすることには進化的な問題にとどまらず、ゲノム機能という今日的な問題を解析する上でも意義がある。

実験用ラットの価値

芹川 忠夫（京都大学大学院医学研究科附属動物実験施設）

1. はじめに

現代の生命科学研究の中心的な興味は、生命現象を物質レベルで捉えることであろう。これは、ルネッサンスにおける物理化学の萌芽発展に続く、生命科学における大革命に源流を発する。19 世紀のフランスの生理学者であるクロード・ベルナールは、「生物体においても無生物におけると同様に、すべての現象の存在条件は絶対的に決定されている。これに反するものがある場合には、それは我々の知識が不十分であることを示し、この原則の絶対性を否定するものではない。」と実験医学のバイブル「実験医学序説」に記述している。この生命現象に対する温和な絶対的デテルミニズムの未知なる部分を明らかにしていくことが、後代の生物学者に課せられた。この課題達成のための欲求は、無限の生命観を有限の世界へと導くヒトゲノムシーケンシングプロジェクトを発足させ、2002 年 2 月に、そのドラフトシーケンシングを発表させるに至らしめた。ヒトという生物を知るには、実験的操作あるいは比較研究ができる実験生物、別の角度から言えば進化的に異なる複数の動物種（線虫、ゼブラフィッシュ、ショウジョウバエ、マウス、ラット、霊長類）のゲノムをも明らかにする必要がある。

2. モデル動物

ヒトのみならず動物の普遍的な生命現象の解明に利用される「遺伝子機能解析モデルあるいは生物学的モデル動物」とヒト疾患の解析、予防・治療法の開発を目的として使用される類似疾患を示す「疾患モデル動物」が、モデル動物として挙げられる。図 1 に示すように、遺伝子改変動物であれ自然発症のミュータントであれ、主遺伝子に加えて修飾遺伝子をも制御することにより、あるいは選抜育種を行うことにより、用途に適したヒト疾患モデルが得られる可能性がある。しかし、表現型としての病態が類似していても原因遺伝子が異なる場合には、モデルとしての価値に疑問符が打たれる。近年、個々の動物種のゲノム解析ツールが開発され、また、ヒトと実験動物との比較ゲノム解析も容易になってきたので、疾患モデルラットの原因遺伝子をポジショナルクローニングあるいはポジショナル候補遺伝子探索法により同定できるようになった。その結果、疾患モデル動物の原因遺伝子がヒト疾患の原因遺伝子に相当する真正相同遺伝子オーソログであるかどうかを知ることができる。原因遺伝子がオーソログであれば、原因遺伝子と表現型（病態）が一致したモデルとして活用で

きるようになる。オーソログでない他の原因遺伝子であることがわかれば、同様の表現型（病態）が得られる疾患発症機構を示す例として、新たな概念を生むことになる。個々の生物種において得られた個体レベルの表現型情報が遺伝子と関連付けられると、共通祖先からそれぞれの生物種に引き継がれてきたオーソログを介して、他の生物種にその遺伝子機能情報を付加することができる。遺伝子ノックアウト動物の表現型解析は、この直接的な研究手法である。自然発症ミュータント、人工的誘発ミュータント、さらには育種開発された疾患モデルについてもポジショナルクローニングあるいはポジショナル候補遺伝子探索法により、表現型（疾患）を逆の方向から遺伝子に結びつけることができる。ゲノム解読情報と遺伝解析ツールの整備は、主たる原因遺伝子のみならず修飾遺伝子の同定をも可能にするであろう。そこで、今、古くて新しいテーマである「疾患モデルラットの開発」が見直されるようになったのである。疾患モデルのこのような原因遺伝子の同定研究は遺伝子機能の新たな発見をもたらすので、疾患モデルは遺伝子機能解析モデルあるいは生物学的モデル動物と言える。

3. ラットモデル

ラットは、ヒトと同じ哺乳動物であること、遺伝学的基盤の上で実験研究ができること、マウスに比べると約 10 倍という適当な大きさをもつこと、学習能力がマウスより高いことなどから、医学、薬学、生物学、心理学等の分野で多用されてきた。その結果、このモデル系においては、基礎データと実験データが豊富に蓄積されている。ラットの場合、トランスジェニック動物の作製は可能であるが、この用途に適した胚性幹細胞系が開発されていないがために、相同遺伝子組換えによるノックアウトあるいは遺伝子改変動物は作製されていない。これは、遺伝子機能解析モデルとしてラットを使用することに大きな制限をもたらしている。それゆえ、ラットは特に疾患モデルの開発・利用という点に焦点がおかれる。

実験用ラットの用途と利点および難点

- ・ マウスとほぼ同様の遺伝的解析法が駆使できる実験系
- ・ マウスの 10 倍以上の大きさに由来する多くの利点
- ・ 治療実験系（遺伝子治療を含む）への適用
- ・ 学習記憶、生理学、病態生理学的研究への適用
- ・ 医薬品の開発や安全性評価試験に利用される主な実験動物
- ・ 実際によく利用されている（MedLine:1991～1999, Rat で検索できる論文数 188,463 件、Mouse で検索できる論文数 85,660 件（ラット論文数は 2.2 倍多い）

- ・ マウスに比べ広い飼育容積を要し、経費が割高。
- ・ トランスジェニックラットは作れるが、適当な ES 細胞系が未開発のため相同組替え法による遺伝子改変操作を適用できない。
- ・ 疾患モデルとしての有用性

疾患モデルラットについては、その応用研究に加えて、遺伝解析を起点にして疾患候補遺伝子の発見、同定、遺伝子機能解析、そして疾患の分子メカニズムの解明からヒト疾患の治療と予防法の開発、改良、創薬の道が開かれる。ラットゲノム、マウスゲノム、そしてヒトゲノムとの比較ゲノム解析は、これを容易にさせている（図 2 参照）。

4. わが国で維持されている疾患モデルラット

疾患モデルラットは、わが国の研究者の独自の研究指向によって先導的に開発されてきた。これらを有効に利用できるようにするため、「日本で維持されている自然発症疾患モデルラットの一覧」を <http://www.anim.med.kyoto-u.ac.jp/model/ratmodel.html> に掲載している。ここには、主に自然発症のミュータントを含め育種開発された疾患モデルが、ラットの「系統別分類」と「疾患別分類」の 2 つの分類から索引できる。ラット系統数は現在 112 系統であり、70 系統については、キーワード、由来、表現型・病態、病因（原因遺伝子）、臨床への応用・有用性、維持機関、文献からなる紹介記事がある。疾患別分類については、図 3 に示すとおり、1. 肥満・糖尿病・高脂血症、2. 高血圧・循環器疾患、3. 脳神経系疾患、4. がん・腫瘍、5. 代謝・内分泌、6. 骨形態異常、7. 眼疾患、8. 腎疾患、9. 消化器疾患、10. 歯科疾患、11. 皮膚疾患、12. 免疫・アレルギー疾患、13. 消化器疾患、14. 血液疾患、15. 学習、16. 生理、と多岐にわたっている。個々の系統紹介は、下記の執筆者によっている。安藤洋介（三共（株））、池田克巳（武庫川女子大学）、石橋光太郎（第一製薬（株））、石井寿幸（東京大学）、織田銃一（名古屋大学）、北田一博（北海道大学）、庫本高志（京都大学）、国枝哲夫（岡山大学）、桑村充（大阪府立大学）、近藤靖（田辺製薬（株））、佐々木敬幸（（財）動物繁殖研究所）、篠原光子（大阪歯科大学）、朱宮正剛（東京都老人総合研究所）、鈴木浩悦（日本獣医畜産大学）、芹川忠夫（京都大学）、竹野友理子（岡山大学）、友廣雅之（国立精神・神経センター神経研究所）、中根良文（京都大学）、野口純子（（独）農業生物資源研究所）、浜田修一（エスエス製薬（株））東監（産業医科大学）、牧野順四郎（筑波大学）、松本清司（信州大学）、森政之（信州大学）、横井伯英（千葉大学）、若藤靖匡（（株）ライサ）。

5. ラット系統保存センター

米国では、ポストゲノムシーケンスの時代を迎え、ラット系統の保存に力点を置こうとしている。この流れは、NIH のバーモス所長によって呼びかけられた 1998 年の NIH Rat Model Repository Workshop に始まる。ここにおいて、米国からだけでなく世界中からラット研究者が集められ、ラット系統保存センターの具体案が策定され答申された。その結果、NIH Rat Autoimmune Repository が 2000 年に、Rat Resource and Research Center (RRRC) が 2001 年に開かれた。この他、ウイスコンシン医科大学グループを中心とする生理学的 PhysGen プロジェクトラットにおいては生理学的ゲノミックスを実践する研究システムがウイスコンシン医科大学を中心に構築されている。これは、食塩感受性の高血圧モデルラットである SS という近交系ラットと対照系統としての BN ラットの間で各染色体の 1 つをそれぞれ置き換えたコンソミック系統のセットを作製して、それぞれのライン群ごとに生理学的特長を集積して、遺伝子情報、ゲノムシーケンス情報から個々の特性を最終的には遺伝子と結びつけようとするものである。

わが国の文部科学省は、平成 14 年から 5 年間の予定で、ナショナルバイオリソースプロジェクトを発足させた。ラットの中核機関として、京都大学大学院医学研究科附属動物実験施設が採択され、主にわが国のラット系統の収集・保存・提供事業を担うことになった。講演時には、未決定であったが、ここに付記しておく。

6. 疾患モデルラットの意義を示す事例の紹介

2 種のミュータントラットを交配することから得たダブルミュータントである自然発症てんかんラット (Spontaneously Epileptic Rat, SER) は、既存の坑てんかん薬について得られた多くの知見から薬効評価試験系として確立し、新薬の認可に一役を担っている (図 3 参照)。また、原因遺伝子の同定がなされたことから、てんかん候補薬の検定に利用できたが、この原因遺伝子 tremor (tm) 遺伝子と zitter (zi) 遺伝子の原因遺伝子をポジショナルクローニング法により同定して、新たな遺伝子機能の発見と疾患の治療実験系の開発に繋がっている。tm 遺伝子変異はアスパルトアシラーゼの欠損を含むゲノム欠失であることから、tm ホモミュータントの tremor ラットは、ヒトの遺伝性疾患であるカナバン病のモデルとして本疾患の治療法の開発研究に応用されることになった。アスパルトアシラーゼを欠くノックアウトマウスも作製されたが、詳細な脳波測定が可能なラットは応用研究に確かに有利性を示した。一方、zitter 遺伝子は、アトラクチン遺伝子の変異であった。このマウスミュータントは、マホガニー遺伝子として知られていた。zitter 遺伝子として知られたアトラクチン遺伝子の機能欠損は、振戦と中枢のミエリン形成異常として現れたのであるが、マウス

における機能欠損は被毛の黒色化と脂肪蓄積低下として現れた。ラットに顕著であった振戦と中枢のミエリン形成異常については、マホガニーマウスでは、何ら指摘されてはいなかった。そこで、マウス (C3H/HeJ-mg3J) を詳細に調べてみると離乳後に軽度の振戦が観察され、中枢神経系にミエリン形成異常を認めた。一方、アルビノラットにおけるアトラクチン遺伝子変異であるがために、気づかなかった被毛の黒色化は、ラットにおいても起こることが野生型遺伝子背景の下でアトラクチン遺伝子変異をホモ型に入れることで確かめられた。このように、マウスのみを用いた遺伝子機能解析においては、重要な機能の見落としが生じることがありえる。ヒトとマウス、およびヒトとラット間のゲノム相同性は共に 85%、マウスとラット間のゲノム相同性は 94%であると言う。ヒトと同じ哺乳動物の実験モデルとして、マウスとは異なる種であるラットが担うところは大きい。

参考文献

クロード・ベルナール「実験医学序説」、三浦岱栄訳、岩波文庫

Kuramoto, T., Kitada, K., Inui, T., Sasaki, Y., Ito, K., Hase, T., Kawaguchi, S., Ogawa, Y., Nakao, K., Barsh, G. S., Nagao, M., Ushijima, T. and Serikawa, T.: Attractin/Mahogany/Zitter plays a critical role in myelination of the central nervous system. *Proc Natl Acad Sci USA*, 98 (2): 559-564, 2001

Kitada, K., Akimitsu, T., Shigematsu, Y., Kondo, A., Maihara, T., Yokoi, N., Kuramoto, T., Sasa, M. and Serikawa, T.: Accumulation of N-acetyl-L-aspartate in the brain of the tremor rat, a mutant exhibiting absence-like seizure and spongiform degeneration in the central nervous system. *J. Neurochem*, 74: 2512-2519, 2000

図 2

病気の治療と予防法の開発・改良、創薬

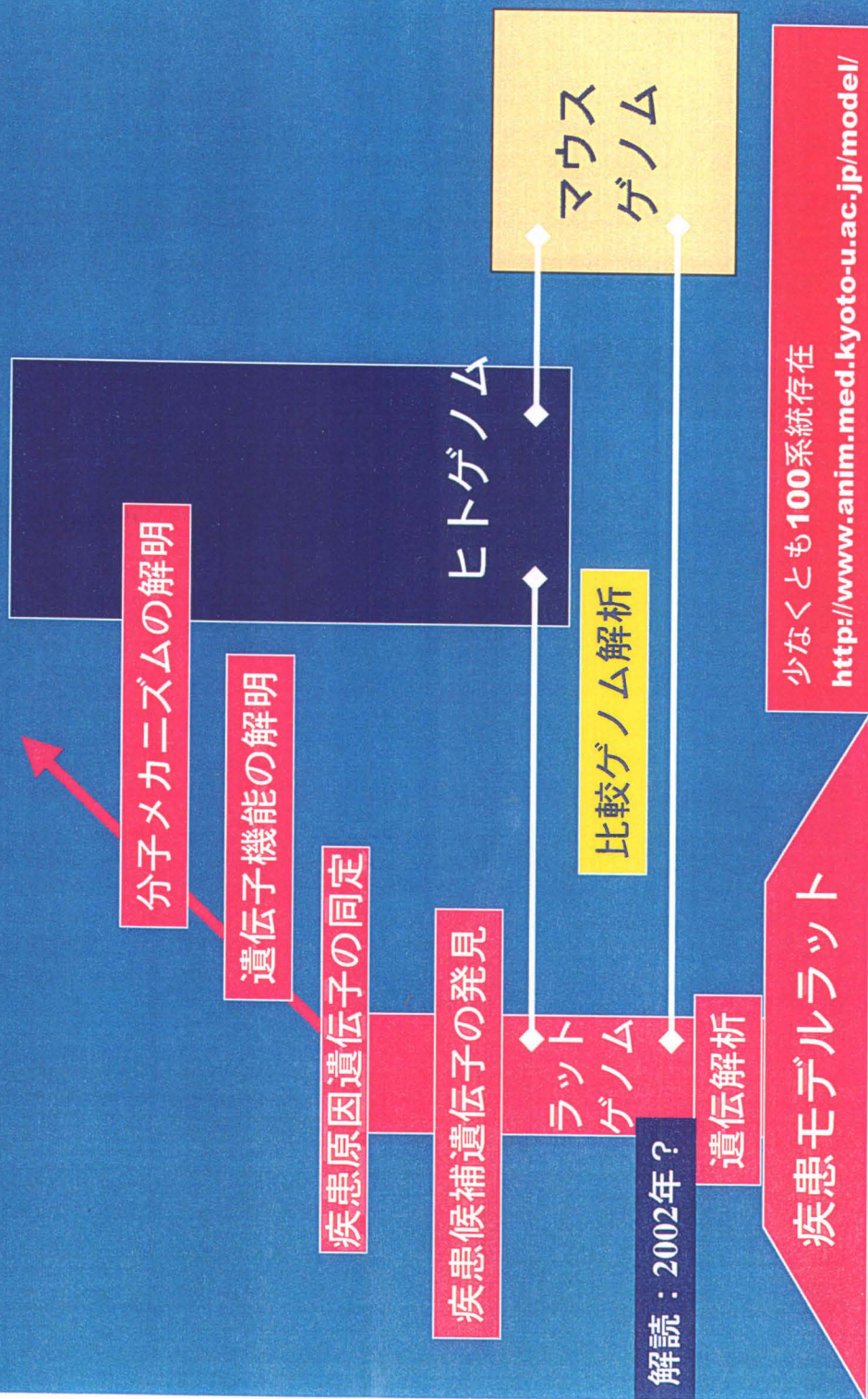
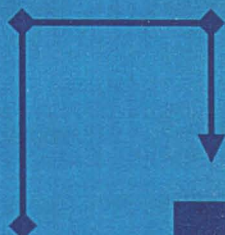


図3 抗てんかん薬のSERにおける発作抑制効果

- ・体の震え
- ・欠神様発作と強直性痙攣
- ・中枢神経系の空胞形成
- ・不妊（雌雄生殖器の萎縮）
- ・被毛と触毛の異常



各種薬剤による反応性

Single inoculation (i.p.)	欠神様発作	強直性痙攣
Trimethadione	○	×
Ethosuximide	○	×
Phenytoin	×	○
Zonisamide	×	○
20-Hydroxyecdysone	×	○
Phenobarbital	○	○
Valproate	○	○
TRH	○	○
Carbamazepine	○	○
Diazepam	○	○
Clobazam (newly approved)	○	○
Piracetam (newly approved)	○	○
CNK-602A	○	○
Continuous inoculation (p.o)		
CNK-602A	○	○
Phenobarbital	×	○⇒×

〈第72回研究会（平成13年12月14日）〉
会員による研究発表（15題）

〈第72回研究会（平成13年12月14日）〉

第72回関西実験動物研究会発表抄録

1. イベルメクチン噴霧によるネズミ盲腸蟻虫駆除
2. コンベンショナルマウスから分離した *Pasteurella pneumotropica* のバイオタイプ
3. ウシLegumain のcDNAクローニングと免疫組織化学的研究およびそのタンパク質分解
4. ラット腎臓由来の Tripeptidyl peptidase I の構造と機能に関する研究
5. カニクイザルを用いたパラフィン切片による免疫染色の試み
6. 雌性 B6C3F1マウスにおける骨線維化病変 fibro-osseous lesion：卵巣摘出動物との比較
7. WHHLウサギ動脈硬化血管の in vivo における反応性
8. 微少重力がサイトカイン産生に与える影響
9. Introduction of Experimental Animal Facility in Korea.
10. マウス遺伝子のシーケンスホモロジーより得られた43個のラット遺伝子の染色体マッピング
11. 強直性および欠神様発作を示すあらたな自然発症てんかんラットWER（Wakayama Epilepsy Rat）系統について
12. dmy ラットの病態解析
ーミエリン形成およびオリゴデンドログリアの動態ー
13. qc ラットの中樞神経発生
14. 市販マウスの胚凍結保存液／融解液キットを用いたマウス胚凍結保存の成績について
15. 大阪産野生マウス由来近交系 MSKR 系統の発生工学的基礎特性

イベルメクチン噴霧によるネズミ盲腸蟯虫駆除

○多根井昌孝、松本英樹、河合千秋、中谷有里、中原哲也、
桑島淳二、増岡通夫（㈱ケー・エー・シー 生物科学センター）

〔緒言〕近年、遺伝子操作マウスを使った研究が急速に進歩し、各大学や民間企業の動物実験施設では遺伝子改変マウスの授受が激増している。それに伴って施設間での微生物感染の問題が懸念され、病原微生物の侵入に見舞われる例が少なくない。当社の動物施設においても定期的モニタリング検査の結果、ネズミ盲腸蟯虫（*Syphacia obvelata*）に感染している遺伝子改変マウスが発見された。

ネズミ盲腸蟯虫は非常に伝播性が強く、また駆除後も再感染を起こしやすい点でその根絶が難しいとされている。今回、当施設でイベルメクチンを用いたネズミ盲腸蟯虫駆除を実施する機会があったので、その方法を紹介する。

〔実施方法〕モニタリング検査でネズミ盲腸蟯虫陽性と判定された1飼育室の全マウスを駆虫対象マウスとした。駆虫薬はイベルメクチン（アイボメック注射液、塩野義製薬）の10倍希釈水溶液（1mg/mL）を使用し、ケージ交換を行った直後の全ケージの床敷にケージ当たり1～2mLをハンドスプレーにて週1回、6週間噴霧した。その後、薬液噴霧を中止し、2週間の休薬期間を設けた。薬液噴霧開始後、週2回、マウスの肛門部虫卵の有無を顕微鏡で観察した。

駆虫効果は、肛門部虫卵陽性マウスを確認した6ケージを選別し、虫卵の消失経過を観察することにより判定した。虫卵陽性6ケージの全マウスで虫卵陰性状態が1ヶ月以上維持された時点で、飼育室の全ケージのマウスについて虫卵検査を実施した。

〔実施結果〕イベルメクチン噴霧開始後7日目で虫卵陽性ケージのマウスの虫卵はすべて消失し、その後も虫卵陰性状態が1ヶ月以上維持された。39日目に飼育室の全ケージの各マウスについて虫卵を検査した結果、すべてのマウスで虫卵は陰性であった。その後、イベルメクチンの噴霧を中止し、その2週間後に再度虫卵を検査したが、すべてのマウスで虫卵陰性であることを確認した。飼育室の全マウスで虫卵陰性状態が1ヶ月以上にわたり維持されたことより、ネズミ盲腸蟯虫はすべて駆除できたものと判断した。その後の定期的モニタリング検査でネズミ盲腸蟯虫は陰性状態を維持している。イベルメクチンの噴霧期間中および休薬期間中を通じて、マウスの一般症状に異常は認められなかった。

〔結論〕

ネズミ盲腸蟯虫の駆虫法としてイベルメクチンの噴霧法は駆虫効果も確実で、経済的かつ効果的な方法であることが確認できた。

コンベンショナルマウスから分離した *Pasteurella pneumotropica*のバイオタイプ

鍵山壮一郎、田島 優、近藤里香、黒澤 努（大阪大・医・附属動物実験施設）

【目的】世界各国で種々の遺伝子改変マウスが作成され実験に用いられるようになった。当施設でも多くの研究者が遺伝子改変マウスを用いて実験を行っている。このような動物は SPF 環境で維持された動物ばかりでなく、*Pasteurella pneumotropica*（以下、P.p.）等、各種病原体に汚染している例が多く認められる。分類学上 P.p. は 2 種類のバイオタイプが報告されているが、その病原性の報告が少ない。1999 年 Kodjo らは P.p. を 16Sr-RNA の塩基配列に対する特異プライマーを作成して PCR を行い、Jawetz と Heyl の 2 つのバイオタイプを分類する特異プライマーを提案している。しかし、彼らはこのプライマーを用いて分離された野外株に対する同定を行っていない。そこで、我々はこのプライマーを用いて当施設で分離した P.p. の両バイオタイプの汚染状況を把握するため、各分離株のバイオタイプの分類を行った。また、生化学及び凝集試験を行い、各分離株の性状について調査した。

【方法】分離株：当施設コンベンショナルマウスの咽喉頭ぬぐい液をチョコレート寒天培地を用いて分離した。分離株から、コロニー形状、菌の形態が類似し、三日月の選択培地で増殖した 39 株を用いた。

PCR 試験：

バイオタイプ	プライマー	位置	配列
Jawetz	71P	71-90	5'-ACA GGA GAA AGC TTG CTN TC -3'
	1008M	1027-1008	5'-TTC CCT AAG GCA CAA AAC TA -3'
Heyl	Heylam1P	425-444	5'-GTT TGG TTA ATA GCC AAG C -3'
	Heylam2M	988-971	5'-TCC CGT ATC TCT ACA GGA -3'

生化学試験：API20NE

凝集試験：抗 ATCC35149 ウサギ抗体

【結果】PCR 試験では分離株 39 株中 18 株が Jawetz 特異プライマーに反応し（以下 J 群）、12 株が Heyl 特異プライマーに反応したが（以下 H 群）、9 株は何れのプライマーにも反応しなかった（以下その他群）。しかし、双方共に反応する分離株はなかった。生化学試験では J 群は 4 パターン、H 群では 1 パターン、その他群では 2 パターンが確認された。さらに、分離株 39 株で凝集試験を行い、J 群では 6 株中 5 株、H 群では 11 株中 4 株、その他では 2 株中 2 株で凝集反応が陽性であった。

【考察】Kodjo らが開発した各バイオタイプ特異プライマーいずれにも反応する野外株は分離されず、これらのプライマーは 2 つのバイオタイプを区別できる特異性が高いプライマーであると考えられた。また、いずれのバイオタイプも当施設コンベンショナル区域のマウスコロニーで感染が成立していることが明らかとなった。

しかし、今回の用いたプライマーではバイオタイプを分別不能な菌株が見られたこと、Jawetz Type プライマーで分離した菌株の生化学性状にばらつきが見られることから、不明株の同定、全てのバイオタイプの P.p. に反応するプライマーの検討などを含む、改善の余地があるものと考えられる。

また、分離株の凝集試験では、陰性となった株が見つかったことから、現在の P.p. 凝集試験法に用いられる抗血清は、全てのバイオタイプの P.p. に有効ではないと考えられる。

ウシ Legumain の cDNA クローニングと免疫組織化学的研究および そのタンパク質分解

○山根拓也, 竹内圭介², 山本幸子², 山本好男¹, 西克治¹, 高橋敏³,
大久保岩男 (滋賀医大・生化², 法医¹, 龍谷大・理工², 京都女子大・家政³)

【目 的】 Legumain は Asn 残基と次のアミノ酸残基の間のペプチド結合を特異的に切断するシステインペプチダーゼである。この legumain について全一次構造をクローニング技術を用いて決定した。また, legumain の組織局在については未だ明らかにされておらず, 精製 legumain を用いて調製した抗体を使い, 免疫組織染色を試みた。また, 本酵素が生体内のどのようなタンパク質を分解するかについても不明であり, 2-3 のタンパク質を例にそれらが分解されるか否かを検討した。

【方 法】 ウシ腎臓 cDNA library をラット legumain cDNA を用いてスクリーニングし, 得られたウシ legumain cDNA の塩基配列からその全一次構造を決定した。また, 家兎を用いて精製酵素に対する抗体を作製し, ウシ腎臓ホモジネート, ラット腎臓, 肝臓, 精巣ホモジネートをサンプルとしてウエスタンブロッティングを, またラット各臓器における免疫組織染色を行った。さらに, ウシ legumain の精製過程において co-purified された annexin II はその N 末端シーケンスから legumain によって切断された可能性が高いことから, その N 末端(Gly²⁴-Asp³⁷)のペプチドを固相法で合成し, legumain で 15-120 min, 37℃で処理した後, ペプチドが切断されるか否かを HPLC を用いて分析した。また, 精製 annexin II を用いて抗体を作製し, E-64 または NEM の存在下でウシ腎臓をホモジナイズし, その 12,000×g 遠心上清をサンプルとしてウエスタンブロッティングを行うことで, annexin II の切断が起こるか否かについても検討した。さらに腎臓の近位尿細管上皮細胞において megalin のリガンドとして知られる vitamin D-binding protein (DBP)が legumain により分解されるかを明らかにするために, DBP を 37℃で 15-60 min, legumain で処理し, SDS-PAGE を用いて分析を行った。切断されたフラグメントの切断部位をプロテインシーケンサーを用いて同定した。

【結 果】 (1) ウシ legumain はアミノ酸レベルでヒトとの比較では 82.9%, ラットでは 80.9%, マウスでは 81.1% 相同であった。(2) 免疫組織染色の結果, legumain は腎臓では近位尿細管, 肝臓では肝細胞, 精巣ではライディッヒ細胞, 精巣上体では不動毛に局在していることが明らかとなった。(3) 近位尿細管において megalin のリガンドとして知られる DBP は legumain によって 15 min で分解され, SDS-PAGE において二つのバンドが検出された。その切断部位は両バンドとも Asn 残基であった。(4) Legumain の精製過程において Heparin sepharose column のステップで annexin II が co-purified されることが確認されたが, その N 末端アミノ酸配列は Asn 残基の直後から始まっていた。(5) ウエスタンブロッティングの結果, E-64 存在下では annexin II の切断が起こったが, NEM 存在下では起こらなかった。

【考 察】 ウシ legumain cDNA から推定されたアミノ酸配列は精製酵素の N 末端, 内部アミノ酸配列と一致したことから, ウシ legumain の全一次構造を決定した。Pre-legumain は 433 アミノ酸残基からなり, その配列中に 5 つの N-糖鎖結合部位が存在していることが明らかとなった。ヒト, マウス, ラットとの相同性は 80%程度あり, 7 つの Cys 残基はよく保存されていた。さらに, legumain の精製過程において co-purified された annexin II はその N 末端アミノ酸配列が Asn 残基の直後から始まっており, legumain によって切断されている可能性が考えられたが, Annexin II の N 末端ペプチドは legumain によって Asn 残基で切断されたこと, 抗 annexin II 抗体を用いたウエスタンブロッティングで NEM 存在下でのウシ腎臓ホモジネートのみ annexin II の切断が検出されたことは annexin II の N 末端が legumain により分解されている可能性が示唆された。Annexin II の N 末端には幾つかの機能を有していることおよびエンドソームの豊富な構成物質であることなどから, annexin II がエンドソーム或いはリソソームにおいて legumain により分解され, 不活化される可能性が考えられた。さらに legumain が腎臓において近位尿細管に局在していることが免疫組織染色により明らかとなり, DBP が legumain により分解された結果から, 近位尿細管上皮細胞で megalin と結合した DBP はエンドサイトーシスされた後, リソソームにおいて legumain により分解を受けている可能性が推測された。

○ 杜培革, 加藤 茂², 李 堯華, 前田利長, 山根拓也, 山本茂人, 藤原学²,
山本好男¹, 西克治¹, 大久保岩男 (滋賀医大・生化二, 法医¹, 龍谷大・理工²)

【目 的】Tripeptidyl peptidase I (TPP I) はタンパク質やペプチドの N 末端に存在する Ala-Ala-Phe- のアミノ酸を特異的に認識し、遊離するリソソーム局在のプロテアーゼである。この酵素は哺乳類の腎臓、肝臓、脾臓、脳、肺などに存在する。本酵素の遺伝子欠損または異常は、classical late infantile neuronal lipofusinosi を引き起こすことが知られている。しかし、その分子構造、物理化学的諸性質、生理機能などについては未だ不明な点が多い。本研究では、ラット腎臓由来 TPP I を精製し、その物理化学的諸性質や全一次構造、機能発現および組織局在などの解析を行った。

【方 法】ラット腎臓 (約 500g) を細断し、生理食塩水による洗浄後、warring blender でホモジナイズし、次いで 17,300g で遠心分離してリソソーム分画を得た。次いで、SP-Sepharose, Phenyl-Cellulofine, Resource-S, Superdex G-75 などのカラムを用いて本酵素を精製し、その N 末端のアミノ酸配列を含む諸性質を検討し、さらに本酵素による種々の生理活性ペプチドの切断についても検討した。さらに、 $[\alpha\text{-P}^{32}]$ dCTP でラベルしたヒト CLN₂ プロープでラット肝臓 cDNA ライブラリーより TPP I をコードする cDNA を単離し、そのヌクレオチド構造から一次構造を推定した。ノーザンブロッティング法による mRNA の臓器発現を解析し、さらに抗ラット TPP I 抗体を用いて (ABC 法), TPP I の組織局在も明らかにした。

【結 果】1: TPP I はラット腎臓より回収率 7.4%, 精製倍率約 8,000 倍まで精製された。2: 本酵素は SDS-PAGE 上で単一バンドを示し、還元剤非存在下と存在下での分子量はそれぞれ 43,000, 46,000 であった。TOF-MS では 46,904.32 であった。Native-PAGE およびゲル濾過法における分子量が 280,000, ゲル濾過法での分子量が 290,000 であった。3: 本酵素の N 末端のアミノ酸配列 51 残基を決定した。4: 本酵素は Ala-Ala-Phe-MCA のみ基質特異性を示した。その K_m , V_{max} , K_{cat} と K_{cat}/K_m はそれぞれ 680 μM , 3.7 $\mu\text{moles/mg/min}$, 33.1 s^{-1} と $4.87 \times 10^4 \text{ s}^{-1} \cdot \text{M}^{-1}$ であった。5: 本酵素は PCMBs と HgCl_2 によって強く阻害され、DFP には軽度阻害された。6: 14 種類の生理活性ペプチドのうち、angiotensins (I-III), neuromedin B, neurotensin および β -neoendorphin は TPP I によって分解された。特に、angiotensin III は 15 分間で、95% が切断された。7: cDNA は 2,485 bp よりなり、本酵素の N 末端のアミノ酸配列を含む 563 残基の pre-TPP I の全一次配列を決定した。ラットのアミノ酸配列はヒトとマウスの TPP I に対して、それぞれ 87.57% と 94.01% の相同性を示した。8: Northern blot analysis では、腎臓に最も mRNA の発現が多く、次いで肝臓 > 心臓 > 脳 > 肺 > 脾臓 > 筋肉、精巣の順であった。9: 免疫組織染色では、腎臓の遠位尿細胞および集合管、肝臓の肝細胞、脾臓の赤脾髄細胞などに TPP I が強く染色された。

【考 察】ラット腎臓のリソソーム分画由来 TPP I を単一標品にまで精製した。精製酵素の分子量は TOF-MS, 電気泳動法などの結果から、6 個の同一サブユニットから構成されていることが判明した。本酵素の物理化学的諸性質はウシやヒトなどで報告されている性質と類似していた。TPP I は PCMBs と HgCl_2 によって強く阻害され、DFP には軽度阻害されることから、本酵素が SH 試薬により活性が制御される serine-type の peptidase であることが示唆された。本酵素の活性中心と考えられる serine 近傍のアミノ酸配列は GTSAT であり、serine peptidase のコンセンサス配列 (G-X-S-X-G) として報告されているものとは 1 残基異なっていた。この 1 残基の違いが DFP による軽度阻害の原因と考えられた。ラットの pre-TPP I 活性中心付近のアミノ酸配列はヒトやマウスのそれと一致していた。また、ラット TPP I は Ala-Ala-Phe-MCA より速く angiotensin III から Arg-Val-Tyr を遊離し、Ala-Ala-Phe-MCA と同様の速さで neuromedin B より Gly-Asn-Leu の tripeptidase を遊離した。この結果から angiotensin III と neuromedin B が TPP I のよい基質であること、および TPP I の新たな基質特異性 (認識配列) が明らかとなった。TPP I mRNA は腎臓、肝臓や心臓などで強く発現しており、免疫組織化学的染色による組織局在の結果とほぼ一致していた。

カニクイザルを用いたパラフィン切片による免疫染色の試み

○ 福田綾子, 宗岡篤信, 上村裕洋, 不二哲, 平川公昭, 前田博
(株式会社新日本科学 毒性病理部)

医薬品の開発において安全性及び薬理効果の確認に形態のみならず, 組織や細胞を対象に特定の物質を抗原抗体反応によって検出する方法, すなわち免疫組織化学的検索法が汎用されるようになってきている. また, 実験動物もよりヒトに近い種であるサル類が用いられるようになってきた. われわれは, そのようなニーズに答えるため, カニクイザルを用いた免疫組織学的検査の検討をいくつか行っている. 今回は, 血液細胞の分化抗原 (CD4, CD8, CD20), 細胞増殖マーカー (PCNA, BrdU), 中間径フィラメントの主成分である Vimentin についての染色条件及び結果について報告する.

中国産カニクイザルの 10%中性緩衝ホルマリンまたは 70%エタノール固定組織 (腎臓, 胸腺, 腸間膜リンパ節, 脾臓) を使用した. 抗体は DAKO, ニチレイ, NOVO, IMMUNON 各社製のモノクローナル抗体 (マウス) を PBS にて希釈して用いた.

今回は, 抗原賦活化の条件設定に着目した.

結果

以下の条件下で最も良い結果が得られた.

抗体	使用器官	抗原賦活化 賦活化時間	内因性 ブロック	非特異 ブロック	一次抗体 反応時間	二次抗体 反応時間	その他
CD4	脾臓	ProK ×10 室温12分	0.3%*	正常血清 室温30分	室温 1時間	室温 30分	ABC法 DAB発色
CD8	脾臓	ProK 室温12分	0.3%*	正常血清 室温30分	室温 1時間	室温 30分	ABC法 DAB発色
CD20	脾臓	**** 121℃ 3分	0.3%*	正常血清 室温30分	室温 1時間	室温 30分	ABC法 DAB発色
Vimentin	腎臓	**** 121℃ 20分	0.3%*	正常血清 室温30分	室温 1時間	室温 30分	ABC法 DAB発色
BrdU	腎臓 空腸	2mol 塩酸***	0.3%*	5%** 室温30分	室温 1時間	室温 30分	ABC法 DAB発色
PCNA	腎臓 空腸	****121℃ 3分 賦活化なし	0.3%*	5%** 室温30分	室温 1時間	室温 30分	ABC法 DAB発色

0.3*: 0.3%過酸化水素加メタノール

***: DNA一本鎖化

ProK: Proteinase K

5%*: 5%スキムミルク

****: クエン酸Buffer

正常血清:ウマ正常血清

今回使用した抗体は全て抗ヒト抗体であるが, カニクイザルにも反応することがわかった. これらの抗体では, 抗原賦活化が効果的であった. また抗体によって抗原賦活化の条件設定が重要である.

雌性 B6C3F1 マウスにおける骨線維化病変 fibro-osseous lesion: 卵巣摘出動物との比較

○飯田晶敏、笹山尚光、村松浩二、佐藤紀子、河田昭彦、内山長久（日本エスエルシー(株)）

骨線維化病変 fibro-osseous lesion(FOL)は B6C3F1 系雌マウスに特有の骨病変で、2 年間飼育試験における発生率は 40-60%以上に達するが、一方、同系の雄あるいは他系統のマウスでは発生頻度は極めて低いとされている。

本骨病変の原因の一つとして、本症例には子宮内膜増生が合併することから、エストロゲンなど性ホルモンの不均衡が考えられている。そこで、本研究では若齢から高齢にわたる雌性 B6C3F1 マウス（無処置）および同系統の卵巣摘出（卵摘）マウスを組織学的に検査して、無処置および卵摘動物における骨病変とその発生状況を比較検討した。

【材料と方法】 10-108 週齢の無処置、および 14-56 週齢の Slc:B6C3F1 マウスを経時的に剖検し、その胸骨、大腿骨、脛骨、卵巣および子宮を組織学的に検査した。また、無処置動物において赤血球数、白血球数、および血中アルカリ・フォスファターゼを測定した。

【結果】 無処置動物の 10-36 週齢では FOL はみられなかったが、同 46 週齢以降では 50%以上の動物に FOL が出現し、加齢と共に発生率の増加がみられた。その骨病変は胸骨に高い発生率を示した。また、子宮内膜増生が 23 週齢より、卵巣の萎縮性変化が 46 週齢よりそれぞれみられた。一方、卵摘動物における FOL の発生は低頻度で、子宮内膜増生はみられなかった。

なお、無処置動物において FOL 例と非 FOL 例間の赤血球数、白血球数、および血中アルカリ・フォスファターゼ値を比較したが、両者間に差異はみられなかった。

【結論】 雌 B6C3F1 マウスに好発する骨線維化病変 fibro-osseous lesion (FOL)は 46 週齢から出現し、以後加齢と共に増加した。また、卵摘動物における本病変は低頻度であったことから、その病理発生に卵巣ホルモンの関与が示唆された。

WHHL ウサギ動脈硬化血管の in vivo における反応性

山田 悟士, 伊藤 隆, 塩見 雅志 (神戸大・医・動物実験施設)

【目的】高脂血症, 動脈硬化の発症にともなって動脈内皮細胞の機能が低下することが指摘されている。血管内皮細胞は動脈硬化プラークの進展・不安定化および急性心筋梗塞の発症にも関与すると考えられていると同時に血管弛緩反応にも大きく関与している。本研究では, in vivo における動脈の反応性について動脈硬化が発症している WHHL ウサを用いて検討した。

【方法】12 月齢の WHHL ウサギおよび日本白色種ウサギのオスを用い, 血管反応性に関する実験で各 7 匹, 血中窒素酸化物の測定では各々 12 匹および 6 匹を使用した。Ketamine + xylazine の点滴麻酔下(2.0 μg of ketamin/min) にアセチルコリン (3 $\mu\text{g}/\text{kg}$), ブラジキニン (0.5 $\mu\text{g}/\text{kg}$), sodium nitroprusside (SNP, 3.0 $\mu\text{g}/\text{kg}$)を耳介周縁静脈から投与し, 大腿動脈で血圧を, 頸動脈で血流量をモニターした。血中 NO_x 濃度は酸化窒素分析システムを用いて測定した。実験終了後ウサギを安楽死して動脈硬化病変を病理組織学的に検討した。動物実験は「神戸大学における動物実験に関する指針」に従って実施した。

【結果】薬剤投与前の血圧, 血流量は WHHL ウサギと日本白色種ウサギとの間に有意な差は認められなかった。アセチルコリン, ブラジキニン, SNP の投与によって, 日本白色種ウサギおよび WHHL ウサギともに血圧は低下し, 血流量は増加した。SNP 投与による血圧や血流量の変化の程度には両群の間で差異が認められなかったが, アセチルコリンおよびブラジキニン投与による血圧および血流量の変化の程度は WHHL ウサギで低値を示した。WHHL ウサギの血中 NO_x 濃度は日本白色種ウサギの 15%と低値を示した。WHHL ウサギでは上向大動脈に重度の動脈硬化病変が認められ, 内膜表層にマクロファージが集簇している部分で内皮細胞の消失が認められた。

【考察】WHHL ウサギの SNP に対する血管の反応性は正常ウサギと同程度であったが, 血中窒素酸化物濃度およびアセチルコリン/ブラジキニンに対する血管の反応性が正常ウサギに比較して低下していた。SNP は直接動脈中膜に作用し, アセチルコリンやブラジキニンは内皮細胞に作用して内皮由来血管弛緩物質を分泌させることによって血管を弛緩させることが報告されている。したがって, これらの結果は, 12 月齢の WHHL ウサギにおいては, 頸動脈中膜の弛緩反応は障害されていないが, 動脈血管内皮細胞由来の弛緩反応が低下していることが示唆された。また, WHHL ウサギでは血管内皮細胞由来の血管弛緩物質である窒素酸化物の血中濃度が低下していたことから, 動脈硬化の発症によって動脈内皮細胞の機能が低下したことがアセチルコリンやブラジキニンに対する血管反応性の低下の原因と考えられた。

微小重力がサイトカイン産生に与える影響

○喜多正和¹、山本俊郎¹、布施 晃²、今西二郎¹
(京府医大・微生物¹、国立感染研²)

【目的】微小重力環境におかれる宇宙飛行により生体の免疫能は低下することが知られているが、その機序については不明な点が多い。今回、我々はマウスを用い、パラボリックフライト後のサイトカイン産生能の変動を経時的に検討した。

【材料と方法】パラボリックフライト直後、1日後、3日後、7日後のBALB/cマウスから脾を摘出し、脾細胞をPMA/IMで刺激後、培養上清中のサイトカイン量をELISA法で測定した。

【結果】パラボリックフライト直後、マウスのIL-2, IL-6, IFN- γ , TNF- α 産生能は一時的に減少したが、1日後には対照群とほぼ同レベルまで回復し、7日後まで正常レベルを持続した。一方、IL-3, IL-4, IL-18産生能はほとんど有意な変動を示さなかった。しかし、IL-2産生能はパラボリックフライト1日後より、IL-5産生能は3日後に正常レベルより有意に増加し、7日後でも増加傾向が認められた。

【考察】サイトカイン産生に与える微小重力の影響をパラボリックフライトにより検討した結果、パラボリックフライト直後に、IL-2, IFN- γ などのTh1サイトカイン産生能およびIL-6, TNF- α などの炎症性サイトカイン産生能の一過性の減弱が認められた。このサイトカイン産生能の変動が無重力による影響であるかどうかを明らかにするためには、飛行中の無重力状態での解析などを検討する必要があると考えられる。

Introduction of Experimental Animal Facility in Korea.

Byeong-Cheol Kang, Dae-Young Seok, Myung-Hun Sung, Kook-Hyun Lee

Division of Experimental Animal Research, Clinical Research Institute,

Seoul National University Hospital, Korea

In May 1998, a revolutionary era was opened in the field of clinical research in Korea with the completion of the Clinical Research Institute (CRI) building at Seoul National University Hospital(SNUH), which is equipped with world standard facilities. The CRI building, an 11 story high building (total area: 20,385 m²) with a basement, is the largest in its kind in Korea and has up-to-date research equipments and excellent research teams. We are preparing for the new millennium by opening its door to researchers from other sectors, such as industry, academia, and other research centers.

The Division of Experimental Animal Research, which is located at the 9th and the 10th floor (3,555 m²), has facilities for animal care and experiment, including P3 Lab., surgical units, microsurgery units, radioisotope room, fluoroscopic room and sound proof room. Investigators can use various kinds of animals such as SPF rodents, rabbit, dog, pig, sheep and cow etc.

Animal experiments request institutional management, facilities, staff, and established practices that reasonably ensure appropriate levels of environmental quality, safety and care. For last 3 years, we have struggled to set up the system that is required in managing the animal facility and to actualize the standardization in animal experiment. Especially, we concentrated on microbiological monitoring system, education system of animal experiment technique, and quality assurance techniques in animal facilities. In that period, we have met and overcome the several times of trouble owing to other satellite animal facilities in same campus.

Today, we will introduce the several animal facilities and present state of laboratory animal science in Korea.

マウス遺伝子のシーケンスホモロジーより得られた 43 個のラット遺伝子の染色体マッピング

○中根良文・Birger Voigt・北田一博・芹川忠夫（京大・院・医）

〔目的〕我々は現在までに、ラット遺伝的連鎖地図の構築・拡充に取り組み、それに基づいたラット・マウス・ヒト比較遺伝子地図の作成を継続的に行ってきた。これまでの結果から、ラット・マウス間で相同関係が確認できていない領域が一部残存していることが判明した。そこで本研究では、それらの領域について比較ゲノムマップの拡充を行うことを目的とした。

〔方法〕8つのマウス染色体（MMU）、すなわち MMU1（0-20cM）、MMU4（0-20cM、79 cM-テロメア）、MMU8（0-4cM、46-53cM、68cM-テロメア）、MMU13（0-10cM、58cM-テロメア）、MMU14（0-13cM）、MMU15（0-28cM）、MMU16（5-10cM、28-43cM）、および MMU17（0-7cM、33cM-テロメア）上の各領域中にマッピングされているマウス遺伝子から、シーケンス情報をもっているものを Mouse Genome Database より選び出し、ラットシーケンスデータに対してホモロジーサーチを行った。この結果から得られたラット相同遺伝子の特異的に増幅するようなプライマーを設計し、Somatic Cell Hybrid (SH) および Radiation Hybrid (RH) マッピングを行った。RH マッピングには、Rat Genome Database のマッピングサーバー(<http://rgd.mcw.edu/>)を用いた。SH および RH マッピングの結果と、web 上より入手した最新のマウス・ラットおよびマウス・ヒト相同遺伝子のマッピング情報を用いて、ラット・マウス・ヒト比較ゲノムマップを作成した。

〔結果と考察〕遺伝的地図上の位置が明らかなマウス遺伝子のホモロジーサーチによって、今回新たに 43 個のラット相同遺伝子のマッピングに成功した。このマッピング結果と、最新のマウス・ラットおよびマウス・ヒト相同遺伝子のマッピング情報を基にして、新たなラット・マウス・ヒト比較ゲノムマップが作成できた。このうち、新たなホモロジー関係（ラット第 1 染色体-マウス第 16 染色体-ヒト第 11 染色体）がラット *Ndufv1* のマッピングから見いだされた。本研究により、ラット・マウス間で相同関係が確認されていなかった比較的広い領域は縮小され、各マウス染色体上に小さなギャップが存在する程度になった。今後は、各論的に、ヒトでは約 3 万個程度あると言われている各遺伝子のラット、マウス、ヒトそれぞれにおけるマッピングの結果や、近い将来明らかとなるであろうラット、マウス、ヒトそれぞれの全シーケンス情報等を基に、より詳細な比較ゲノムマップが作成されることが期待される。

強直性および欠神様発作を示すあらたな自然発症てんかん ラットWER (Wakayama Epilepsy Rat) 系統について

坪田裕司、真壁恭子、湯川和典、前田正信（和歌山県立医大・第二生理）

【はじめに】 我々は1993年にkwl:Wistarラットの雄1頭が、外部刺激に対して欠神様の脱力を示すことを発見した。この個体を同腹と思われる同系統コロニー雌ラットと交配し、これらを起源として新たな自然発症性てんかんラット、WER (Wakayama Epilepsy Rat) を系統育成している。発端個体と正常個体のF1はすべて外見正常であったが、3世代以降から強直性痙攣発作を同時に発症する個体が新たに観察された。以降同一個体で2種類のてんかん発作を起こす系統として継代してきた。WER系統ラットにおいて現在明らかな特徴について報告する。

【方法】

実験にはすべてWER系統ラットを用いた。脳波の測定は、硬膜上電極を設置し一部は有線で、発作頻度の測定にはテレメトリー送信機を埋め込み、単独飼育無拘束下で脳波データをパソコンに収集した。収集したデータより発作パターンを確認して発作発生を確認し、8から53時間の観察結果から1時間あたり発生の有無を集計した。発症時期は、244個体を用いて、週1回の強直性発作肉眼観察を行い推定した。同発作の遺伝様式は交配実験から推定された。

【結果と考察】

WERラット強直性発作発症個体は、高周波低振幅からなる強直性発作のみならず5Hz前後の特徴的な棘徐波(Spike&Wave)結合からなる群発放電を示す欠神様発作を示していた。強直性発作については、発症時期は25から70日齢の間であることが示され、この間に、大発作によると考えられる突然死が、発作を発症した生存個体と同数程度認められた。交配データから、強直性発作は常染色体劣性遺伝することが明らかにされた。発症個体間の交配からの発症個体分離比は、合計116頭を得て半年間の発作観察を行った結果、発症100個体に対して未発症16個体に分離した。以上からこのてんかん発作を支配する主要遺伝子をwer-1と命名し、また強直性発作発症の浸透度は86%と推定された。現在のところ脳波測定を行った発症個体9個体ではすべて両発作脳波が観察された。発作頻度は、予備の実験ながら、5個体の平均で強直性発作が39%、24時間あたりでは平均9回、欠神様発作は、90%に観察され、24時間あたり平均21回であった。WERの他に自然発症性に2種類のてんかん発作を起こす疾患モデル動物にはSER, tremorラット、sweマウスが知られている。WERラットはSER, tremorの示す発作症状、発作時脳波と類似した表現型を示すが、その他の形態的特徴や繁殖性について特に顕著な異常を認めず明らかな違いを示した。以上から、WER系統ラットは新たなてんかんモデル動物として有用であると考えられた。

dmy ラットの病態解析
-ミエリン形成およびオリゴデンドログリアの動態-

○徳田智子、桑村充、北田一博¹、山崎賢一¹、山手丈至、小谷猛夫、芹川忠夫¹
(大阪府大院・獣医病理、¹ 京大院・動物施設)

[背景・目的]

dmy ラットは、脳および脊髄のミエリン崩壊を特徴とするミュータントであり、原因遺伝子 *dmy* はラット第 17 番染色体上にマッピングされている (Kuramoto et al., Mamm Genome 7:890-894,1996)。臨床症状が進行する 4 週齢以降の dmy ラットの検討から、dmy ラットの病変はミエリン成熟後に進行するミエリンの崩壊を基礎病変とすることが示唆されている。今回、dmy ラットの表現型を詳細に検討する目的で、dmy ラットの初期ミエリン形成および病変進行期のオリゴデンドログリアの動態について解析を行った。

[材料・方法]

動物：1、2、3、8 週齢の dmy ラットおよび同腹非発症ラットを調べた。電顕・形態計測：1、2、3 週齢のラットをカルノブスキーで灌流固定後、脊髄を採材した。定法に従ってエポン樹脂包埋し、電子顕微鏡観察を行った。さらに画像解析装置を用いて、胸髄腹索白質の有髄神経線維の軸索径・周囲長、神経線維径・周囲長について形態計測を行い、ミエリン厚、ミエリン比 (ミエリン厚/線維径)、*g*-ratio (軸索径/線維径) を算出した。TUNEL 法：8 週齢の dmy ラットを 4%パラホルムアルデヒド灌流固定後、大脳、脊髄を採材した。パラフィン切片を作製し、TUNEL 法を行った。

[結果]

電顕・形態計測：1-3 週齢の dmy ラットの軸索径およびミエリン径は同腹非発症ラットと比較し有意に小さかった。さらに 1 週齢の dmy ラットではミエリン厚、ミエリン比、*g*-ratio についても同腹非発症ラットと比較し有意に小さかった。TUNEL 法：大脳・脊髄ともに白質の空胞形成部に一致して多数の TUNEL 陽性細胞が認められた。

[考察]

dmy ラットの病変として、ミエリン成熟後のミエリン崩壊に加え、ミエリン形成初期におけるミエリン・軸索の形成遅延が示唆された。また、TUNEL 法の結果から、ミエリン崩壊の進行にはオリゴデンドログリアのアポトーシスが関連することが示唆された。今後、TUNEL 陽性細胞の細胞同定とグリアマーカーを用いてオリゴデンドログリアの動態を検討する予定である。

qc ラットの中枢神経発生

○松井多美子 桑村充 竹中重雄¹ 村口武彦² 北田一博² 山手丈至 小谷猛夫
Jean-Louis Guénet³ 芹川忠夫² (大阪府大院 獣医病理、同・分子生物¹、
京大院・医・動物実験施設²、パスツール研究所³)

[目的]

qc ラットは、パスツール研究所の ACI ラットコロニーで発見された神経系ミュータントで、外見的には、尾の形態異常や後肢の歩行異常といった行動異常を示す。その原因遺伝子 *qc* は、常染色体上の劣性遺伝子でラット第 13 染色体上にマップされている。また、表現型が酷似する *dreher* マウスの原因遺伝子 *lmx1a* の cDNA クローニングにより、qc ラットでは *lmx1a* 遺伝子のホメオボックスドメインが欠損していることが明らかとなっている。本研究は、qc ラットの病理発生を明らかにする目的で、主に胎生期の神経発生を検討した。

[材料・方法]

動物：胎齢 16 日～20 日齢の胎仔および生後 1 日齢の qc ラットおよび同腹の非発症ラット（各 5 例以上）を用いた。病理組織学：剖検後、脳、脊髄、生殖器をブアン固定あるいはメタカン固定し、定法に従って病理組織学的に解析した。免疫組織化学：抗 Vimentin 抗体（グリア線維）、抗 PCNA 抗体（増殖細胞）を用い検討した。神経細胞移動：剖検 1 時間前あるいは 2 日前に BrdU を腹腔内投与し、抗 BrdU 抗体を用いた免疫組織化学を施し、ラベルされた細胞の 2 日間の移動を検討した。

[結果・考察]

胎齢 16 日(E16)の発症ラットにおいて、脳室の狭小化が見られたが、基本的な組織構築に異常は認められなかった。E18 では、しばしばマトリックス層の接着が認められ、接着部のマトリックス細胞やグリア線維の配列異常が見られた。また、BrdU を用いた細胞移動の観察により、接着部での神経細胞の移動異常が示された。中脳水道の狭小化が見られ、しばしば中脳実質内にマトリックス細胞のロゼット状配列が観察された。以上の所見から qc ラットにおける神経細胞の移動異常が示唆された。また、In situ hybridization により、正常ラットの脊髄背側で *lmx1a* 発現が見られた。

今後、正常ラットにおける *lmx1a* の発現パターンを詳細に調べ、神経発生における *lmx1a* の役割を解析する予定である。

市販マウス胚凍結保存液／融解液キットを用いたマウス胚凍結保存の成績について

○吉田悦子¹, 笹岡俊邦², 萩原康子³, 高橋明男¹

(¹国立精神・神経センター神経研究所実験動物管理室、²同疾病研究第7部、³同モデル動物開発部)

【はじめに】

マウス配偶子、特にマウス受精卵の凍結保存は、系統保存における研究者からの要望や施設における飼育スペース節約の必要性から、各研究機関の実験動物施設において定常的な業務として定着しつつある。当実験動物研究施設においても、効率的かつ安定したマウス受精卵凍結保存のシステムを確立するため、市販マウス胚凍結保存液／融解液キットを用いた凍結保存の受託を開始したので、その成績及び凍結保存系統の傾向について報告する。

【材料及び方法】

凍結保存用受精卵は、基本的に委託者より供給される対象雄マウスから採取した精子と過排卵処置を施した野生型近交系マウスから採取した卵子とを、マウス胚凍結保存液キット(ダイアytロン社製)に含まれるTYH培養液中で試験管内受精(IVF)させて取得した。IVF処置後、顕微鏡下で形態正常胚の選別を行い、選別された形態正常胚をさらに炭酸ガスインキュベーター(37℃、5%CO₂、95%空気)内で18時間培養した。培養終了時点で形態が正常な2細胞期胚を選別し、この2細胞期胚のみをマウス胚凍結保存液キットを用いて凍結処理を施した後、最終的に液体窒素内へ保存した。また、凍結保存状態を確認する目的で、全ての凍結ロットにおいて一部の胚を保存1週間後にマウス胚融解液キット(ダイアytロン社製)により融解し、偽妊娠代理母マウスへ移植することで得られる産仔数を確認した。

【結果】

委託を受け本実験に供与されたマウス全8系統の内訳は、Tgマウス3系統、KO/KIマウス2系統、病態モデルマウス1系統、一般系統マウス2系統であった。これらにおける受精率は、Tgの1系統が40.7%と低かったほかは55.4-74.5%であった。同様にTg、KO/KI、病態モデル、一般系統間ならびに各個別系統間で、2細胞期胚発生率は82.1-96.3%、融解後形態正常率は84.9-100.0%、個体再生率は30.5-69.2%であった。

【考察】

市販マウス胚凍結保存液／融解液キットを用いたマウス2細胞期胚の凍結保存および融解・個体再生は良好な成績を示した。また、操作が短時間かつ容易で試薬調整等が不要な点からも、当施設でのマウス胚凍結受精システムに適していると判断された。また一方、凍結保存依頼が遺伝子操作動物主体であり、かつ今回、例数は少ないがTg1系統に低受精率が認められたことを考慮すれば、一連の凍結保存操作において系統差に留意する必要性が、改めて示唆された。

大阪産野生マウス由来近交系MSKR系統の発生工学的基礎特性

○和田あづみ、都築政起¹、西村正彦（名古屋大院・医、¹広島大・生物生産）

MSKR系統は、1992年5月に大阪府堺市で捕獲された一匹の被毛色変異をもつ雌マウスと、同じ大阪府堺市で1991年11月に捕獲された雌雄より誕生した雄マウスを起源に、全兄妹交配によって育成された系統である。1998年4月に全兄妹交配20世代に達して近交系として成立し、2001年12月現在近交30世代に達している。

今回は、本系統に発生工学的な手法を適応する為に必要な基礎特性のうち、各日齢における過排卵処置成績、ならびに超急速法によって凍結された胚の融解成績について報告する。

過排卵処置として、25日齢以降の雌マウスに対し飼育室消灯前0-60分前にPMSG2.5単位を腹腔内に投与し、その47.5-49時間後にhCG5単位を腹腔内に投与した。hCG投与後13-16時間後に、定法に従って採卵と体外受精を行った。媒精24-26時間後に、二細胞期に達している胚を選別・計数した後、中潟らの超急速凍結方法により凍結を行った。凍結した胚は適時、定法に従って融解し生存胚を計数した。

過排卵処置に対する反応は、25-30日齢の雌マウス18匹中15匹(83.3%)が171個(排卵雌1匹あたり11.4個)、31-40日齢48匹中44匹(91.7%)が579個(1匹あたり13.2個)、41-70日齢17匹中16匹(94.1%)が189個(1匹あたり11.8個)の卵を排卵した。これらの成績は、我々の育成した他の野生マウス由来近交系および家系の過排卵成績〔25-30日齢22匹中11匹(50.0%)が57個(1匹あたり5.2個)、31-40日齢55匹中50匹(90.9%)が452個(1匹あたり9.0個)、41-70日齢33匹中32匹(97.0%)が171個(1匹あたり5.3個)排卵〕より優れた成績であった。

また、本系統の凍結融解した二細胞期胚533個中、形態が正常であった胚は436個(81.8%)であり、我々が施行したその他系統・家系の融解成績〔二細胞期胚341個中形態が正常であった胚は279個(81.8%)〕と同等であった。

〈第73回研究会（平成14年3月8日）〉

テーマ：動物を用いた発がん研究の最前線

1. 実験動物を用いたヒト発がん研究—モデルの特徴を見つめて
牛島 俊和（国立がんセンター発がん研究部）
2. 環境因子の発がんリスク：環境発がん物質に閾値が存在するか
福島 昭治、鰐淵 英機、森村 圭一朗、魏 民
（大阪市大・院・医・都市環境病理）

実験動物を用いたヒト発がん研究—モデルの特徴を見つめて

牛島 俊和（国立がんセンター研究所 発がん研究部）

発がん研究は、実験動物での発がん実験を中心に発展してきた。発がん感受性が異なる多くの近交系ラット・マウスが利用可能であること、一定のプロトコルを利用すれば、狙った臓器に腫瘍を誘発できること、その過程で様々な段階の病変を観察・採取できること、新鮮な材料が採取可能で DNA/RNA や蛋白質の解析に適することなどが、その理由である。

しかし、連鎖解析や cDNA マイクロアレイなどのゲノム的解析手法により見いだされた遺伝子は、そのままヒトに応用可能な場合もあれば、不可能な場合もある。実験モデルを用いる場合、遺伝子がヒトへ応用可能なのか、現象が応用可能なのか、応用可能性は不明だが何らかの真理がわかるのか、そこを明確にしておく必要があると思われる。

遺伝子異常と組織型

膀胱がんを誘発する際に、*N*-nitrosobis(2-hydroxypropyl)amine (BHP)をハムスターに投与すれば、膀胱がんが誘発される。一方、BHP をラットに投与すれば膵腺房がんが誘発される。ハムスターの膀胱がんでは、90 %以上に *Ki-ras* 遺伝子の突然変異が認められるのに対し、ラットの膵腺房がんでは、*Ki-ras* 遺伝子の突然変異は全くない。

ヒトの膀胱がんは、ほとんどが膀胱がんであり、*Ki-ras* 遺伝子の突然変異が非常に高率に認められることが知られる。組織型がヒトと類似するモデルを用いた方が、ヒトと共通の遺伝子変化を認める可能性が高いことを示す好例と思われる¹⁾。

胃がん感受性の研究

ヒト胃がんの発生には、食塩や *Helicobacter pylori* のような環境要因が大切だが、遺伝的な素因も関与すると考えられる。しかし、弱い遺伝的素因の存在は、なかなか証明することが難しい。そこで、実験動物で、発がん感受性に関与する遺伝子を同定し、ヒトに戻って検討しようというアプローチがある。

N-Methyl-*N'*-nitro-*N*-nitrosoguanidine (MNNG)による胃発がんに関して、ACI/N ラットは高感受性、BUF/Nac ラットは抵抗性である。BUF ラットの抵抗性が優性であるとされてきたので、ACI x (ACI x BUF)_{F1} バッククロスラットを用いて、胃がん感受性遺伝子をマップした。染色体 15 に BUF 由来のアレルが胃がん感

受性となる座位、染色体 4, 3, 16 番に BUF 由来のアレルが胃がん抵抗性となる座位をマップした²⁾。現在、コンジェニックラットを作成、各座位の発がん感受性への影響を正確に評価できるように準備を進めている。

ラット系統間での遺伝子発現の違い

上記のようなアプローチは極めて時間がかかる。そこで、ACI ラットと BUF ラットの幽門腺では、MNNG による粘膜障害に対して、細胞増殖反応の程度が異なることを利用し、発がん感受性にアプローチできないかと考えた。細胞増殖の程度が異なれば、突然変異の生じる量にも差が出来、発がん感受性も異なるであろうと予測される。

そこで、ACI ラットと BUF ラットとで発現量に違いがある遺伝子を検索した。研究開始時には、まだラットの GeneChip は利用不可能であったので、cDNA-representational difference analysis (cDNA-RDA)法によるサブトラクションを行った。その結果、ACI ラットで高発現する遺伝子 9 個、BUF ラットで高発現する遺伝子 7 個を分離した。これら 16 個について、(ACI×BUF) F_1 , WKY, LEW, F344 での発現量が、細胞増殖反応の強弱と相関するか否かを検討した。細胞増殖反応の強弱と密接に関係する遺伝子として、*cellular retinoic acid-binding protein II* (*CrabpII*)などを見出した³⁾。

解析対象としている系統のみならず、他の系統の表現形質と遺伝子発現情報を利用することは、ゲノム網羅的解析により分離された「多すぎる」遺伝子の整理に有用と思われる。

発がん物質特異的な遺伝子発現プロファイル

実験動物の腫瘍の利点の一つは、その原因が明らかで、単純であることである。ヒトの腫瘍では、個々の腫瘍の発生原因となった因子は、複合しており、肝炎ウイルスや紫外線など一部を除き、ほとんど分らない。

そこで、7,12-dimethylbenz[a]anthracene (DMBA) と 2-amino-1-methyl-6-phenylimidazo[4,5-b]pyridine (PhIP)により雌ラットに誘発した乳がん、発現プロファイルを比較した。これらの乳がんは、ともに腺がん、組織学的には区別しがたい。それでも、原因が異なれば発現プロファイルが異なるかどうか、興味あるところであった。GeneChip により約 8,000 個の遺伝子について発現プロファイルを検討すると、DMBA による乳がん特異的に発現変化する遺伝子群、PhIP による乳がん特異的に発現変化する遺伝子群が、それぞれ認められた⁴⁾。

発がん物質ごとに、変異をうけるがん関連遺伝子のセットが異なり、その結果、発がんプロファイルが異なるのであろうと考えている。

以上のように、ユニークな発がんモデルを開発・研究する際に、どの部分をヒトに応用しようとするのかを常に明確にしておく、その後の発展もスムーズと思われる。

文 献

- 1) Ushijima, T., Tsutsumi, M., Sakai, R., Ishizaka, Y., Takaku, F., Konishi, Y., Takahashi, M., Sugimura, T. and Nagao, M. Ki-*ras* activation in pancreatic carcinomas of Syrian hamsters induced by *N*-nitrosobis(2-hydroxypropyl)amine. *Jpn. J. Cancer Res.*, **82**, 965-968 (1991).
- 2) Ushijima, T., Yamamoto, M., Suzui, M., Kuramoto, T., Yoshida, Y., Nomoto, T., Tatematsu, M., Sugimura, T. and Nagao, M. Chromosomal mapping of genes controlling development, histological grade, depth of invasion, and size of rat stomach carcinomas. *Cancer Res*, **60**, 1092-1096 (2000).
- 3) Yamashita, S., Wakazono, K., Sugimura, T. and Ushijima, T. Profiling and selection of genes differentially expressed in the pylorus of rat strains with different proliferative responses and stomach cancer susceptibility. *Carcinogenesis*, **23**, 923-928 (2002).
- 4) Kuramoto, T., Morimura, K., Yamashita, S., Okochi, E., Watanabe, N., Ohta, T., Ohki, M., Fukushima, S., Sugimura, T. and Ushijima, T. Etiology-specific gene expression profiles in rat mammary carcinomas. *Cancer Res*, **62**, 3592-3597 (2002).

環境因子の発がんリスク：環境発がん物質に閾値が存在するか

福島昭治，鰐淵英機，森村圭一郎，魏 民

(大阪市立大学大学院医学研究科都市環境病理学)

1. はじめに

我々の環境中には多数の化学物質が存在し、それらが社会生活をこの上なく豊かにしてきたことは大きな事実である。一方、それが人々の健康に障害になっていることも事実である。話題を発がん物質に限ってみても、イギリスの疫学者である Doll 博士¹⁾はヒトがんの発生原因の約 80 %は環境中に存在する発がん要因に帰すると述べている。したがって、空気、食物、飲料水、煙草などの嗜好品、医薬品、農薬などに存在する発がん物質がヒトのがん発生に実際に重大な影響を及ぼすのか、またそうだとすればそれはどの程度なのか、などの問題は医学的にも、さらに、社会的にも極めて重要な課題である。しかし現在の段階では、個々の発がん物質ががんの発生にどの程度、関与しているか否かは定かではない。我々は化学物質のもつ恩恵とリスクの挟間で、確固たる科学的根拠をもって発がん物質に対するリスクを説明し得る情報を持ち合わせていないのが現状である。しかも発がん物質には人工のみならず天然のものがある。したがって、ヒトは発がん物質と共存しなければならないという大前提がある。

そこで、本日は環境発がん物質のリスクに対する科学的根拠に焦点をあわせて我々の最近の基礎的データを報告する。

2. 低用量域での発がん

化学物質の発がん性の同定はヒトについての疫学的情報によってもたらされる。しかし、大部分の化学物質についての発がん性はヒトでは未知である。したがって、実験動物を用いての発がん性試験を介して、発がん物質が同定されるのが大半である。

化学物質の発がん性は、実験的には一般にラットないしマウスを用いて最大耐量を含む高用量域での発がん性試験をもって同定され、その結果と変異原性試験の結果を合わせてヒトへの発がんリスク評価を行っている。また、高用量

域での発がん性は他の毒性と同様、用量相関曲線、即ちS字状曲線をもってみられることが証明されており、高用量域でのこの曲線を低用量域に延ばすことにより低用量域での発がん性のヒトへの外挿が行われている。しかも外挿に際し、この低用量域での発がん性は、0 にたどる曲線と理解されている。それは発がん物質の作用は不可逆的であり、かつ、低用量での発がん実験では発がんS物質であったとしても発がん頻度は極めて低く、自然発生腫瘍の発生頻度との間に統計的に有意差を見出しがたく、発がん性には閾値は存在しないという仮説が採用されているからである。このことが正しいかどうかを科学的に証明することが極めて重要な課題であり、いわゆる“weight of evidence”の観点からこの点を解決すべく発がん実験を行った。

1) 遺伝毒性発がん物質の発がん性

(1) 2-Amino-3,8-dimethylimidazo[4,5-f]quinoxaline (MeIQx)の肝発がん性

MeIQx は焼け焦げ中に存在するヘテロサイクリックアミンの一種で、ラットにおける肝がんの発生は100 から 400 ppm という高用量域で用量相関性をもって認められている²⁾。日本人は魚や肉を食べることによってMeIQxを1日0.2~2.6 μg 摂取していると計算されている³⁾。さらに、心筋梗塞で亡くなられた患者の腎臓や結腸がんの手術症例の正常と思われる結腸に MeIQx-DNA 付加体が認められ、ヒトは確実に MeIQx に曝露されていることを示すデータがある⁴⁾。

そこで、MeIQx の低用量域での肝発がん性を検証するために離乳後、肝細胞の増殖能が最も高い21日齢の雄性F344ラット2140匹を用い、MeIQxを0, 0.001, 0.01, 0.1, 1 および 10 ppm の低用量域ならびに 100 ppm の MeIQx を16週間連続混餌投与した⁵⁾。

その結果、図1の如く、肝における前がん変化の指標である glutathione S-transferase placental form (GST-P)陽性細胞巢の発生は MeIQx の 0.001~1 ppm 群では対照群と全く差はないものの、10 ppm では増加傾向が認められ、高用量の 100 ppm では明らかに有意な発生増加を示した(平坦-立ち上がり直線)。また MeIQx 投与の4週において肝における MeIQx-DNA 付加体(dG-C8-MeIQx)が 100 ppm 群で有意に検出され、しかも MeIQx 投与量と付加体量との間に直線的な相関を認めた(図2)。酸化ストレスのマーカーである肝DNAの8-hydroxy-

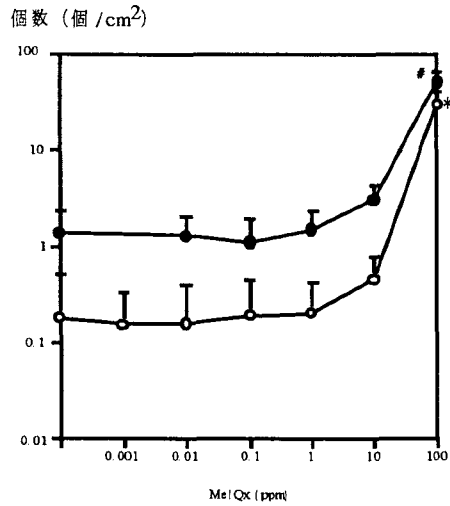


図1 MeIQx 16ないし32週間投与ラット肝におけるGST-P陽性細胞巢の発生、(○—○ 16週間、●—● 32週間)
*, # $p < 0.01$ (vs.それぞれの対照群), Bars, SD.

deoxyguanosine(8-OHdG)形成レベルは、MeIQx 投与の4週目では1 ppm から上昇し、1 ppm 以上で有意に増加した(平坦—立ち上がり直線)(図 2)。さらに MeIQx 16 週間投与においても MeIQx-DNA 付加体と 8-OHdG 形成レベルは4週のデータと同様の傾向を示した。また、MeIQx によるラット肝 GST-P 陽性細胞巢の発生において MeIQx の投与期間を16 週から 32 週間に延長しても、16 週間と同様の曲線が得られた(図 1)。

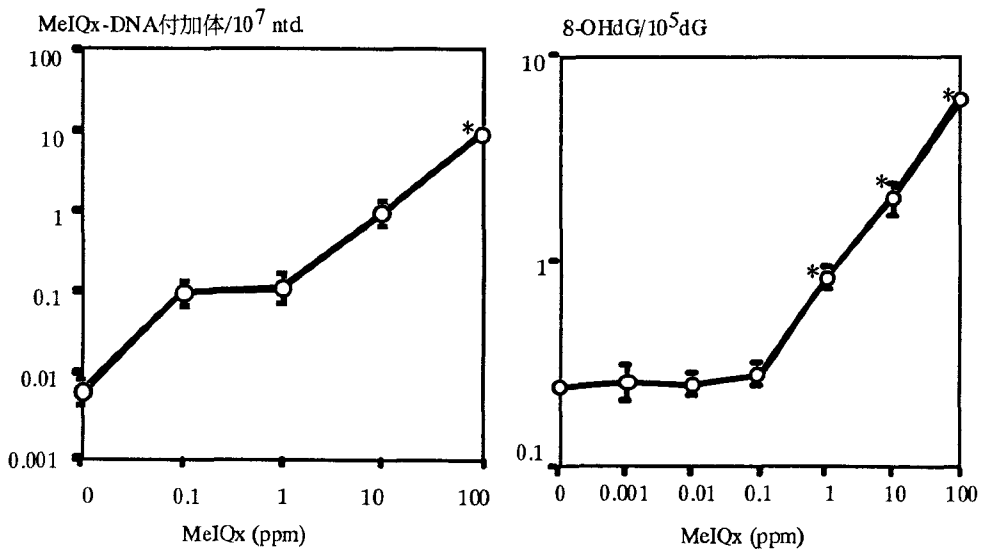


図2 MeIQx 4週間投与ラット肝におけるMeIQx-DNA付加体と8-OHdG形成レベル
* $p < 0.01$ (vs. 対照群), Bars, SD.

さらに、MeIQx 投与 2 年間の発がん実験で検討した結果、16 週と 32 週投与実験の時と同様、腫瘍ならびに GST-P 陽性細胞巢の発生でも 1 ppm までは対照群と変化なく 100 ppm ではじめて有意に腫瘍が発生した。すなわち、1 ppm までが実質上の無作用量域と判断された。以上より、MeIQx のラット肝発がん性には DNA 付加体形成の曝露指標とは異なり、ある程度の無作用量域があって 8-OHdG レベルの上昇が見られ、さらにある程度の無作用量域の後、GST-P 陽性細胞巢および腫瘍発生の増加がみられることが明らかとなった（図 3）。

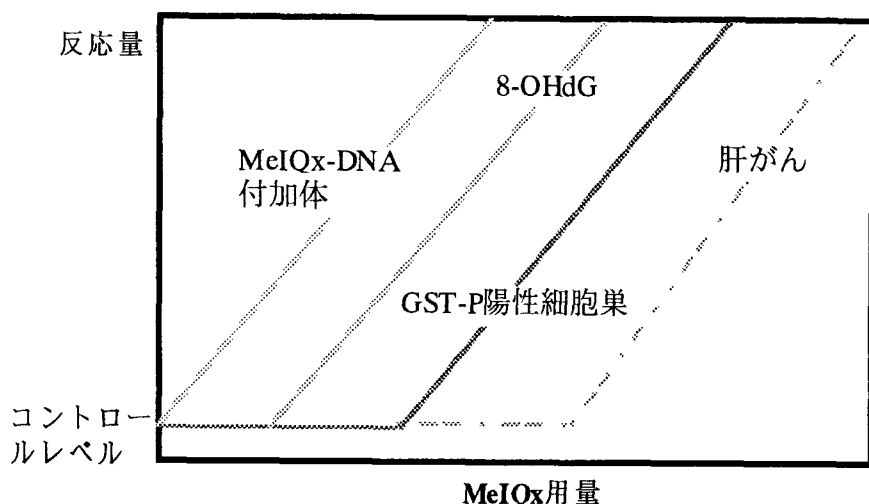


図3 肝発がんリスク：MeIQx低用量域における各種発がんメーカーの反応

（2）Diethylnitrosamine (DEN)の肝発がん性

N-ニトロソ化合物である DEN の低用量域におけるラット肝発がん性を検討した。21 日齢の雄性 F344 ラット 1520 匹に種々の低用量の DEN 含有飲料水を 16 週間投与した⁵⁾。その結果、肝における GST-P 陽性細胞巢の発生は 0.01 ppm までは 0 ppm 群と差がなく、0.1 ppm 以上で有意な増加を示した（平坦－立ち上がり曲線）（図 4）。

（3）2-Amino-1-methyl-6-phenylimidazo[4,5-b]pyridine(PhIP)の大腸発がん性

ヘテロサイクリックアミンである PhIP の低用量域における大腸発がん性を 6 週齢の雄性 F344 ラット 1920 匹を用いて検討した。0.001 から 400 ppm までの種々の用量の PhIP 含有飼料をラットに 16 週間連続投与した。大腸における前

がん病変の指標である aberrant crypt foci(ACF)の発生は 10 ppm までは 0 ppm 群と差がなく、50 ppm から 400 ppm にかけて有意な増加を示した（平坦—立ち上がり曲線）。

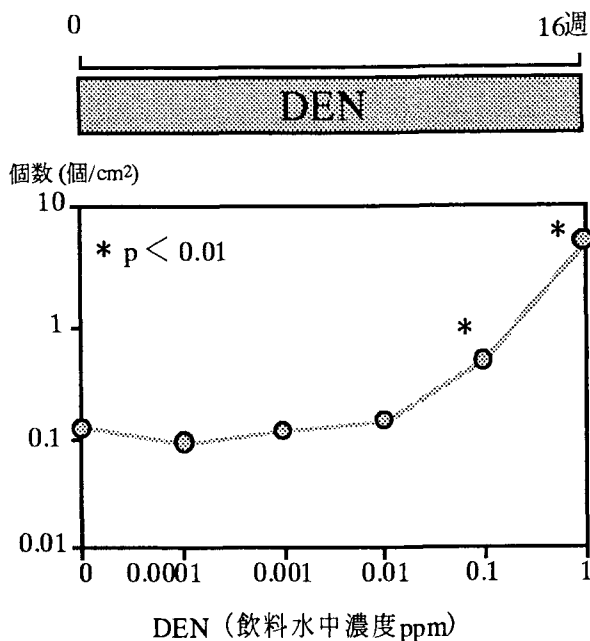


図4 DENの低用量域におけるラット肝発がん性：
GST-P陽性細胞巢の発生

以上、遺伝毒性発がん物質である MeIQx, DEN と PhIP の発がん性には、實際上、閾値があり、無作用量を求め得ることが判明した。すなわち、遺伝毒性発がん物質には實際上、閾値が存在すると結論される。

2) 非遺伝毒性発がん物質の発がん性

(1) Phenobarbital (PB)の肝発がん性

鎮静剤として用いられている PB は変異原性陰性で、ラットやマウスに肝発がん性を発揮する。今回、PB の発がん作用を二段階肝発がん実験モデル（伊東法）⁹⁾を用いて検討した⁷⁾。6 週齢の雄性 F344 ラット 180 匹を用い、DEN を 1 回腹腔内投与し、その 2 週間後より 0, 1, 2, 4 ppm などの低用量から 500 ppm までの PB を飼料に混ぜ、6 週間投与した。なお、肝細胞増殖を増幅させるため、第 3 週に全群のラットに 3 分の 2 肝部分切除を行い、8 週終了後、肝にお

ける GST-P 陽性細胞巢を検討した。その結果、GST-P 陽性細胞巢の発生は個数では 500 ppm で確実に増加した。しかし、用量を低くすると対照群と同じレベルになり、さらに低用量域ではその発生は対照群より有意に減少した (図 5A)。GST-P 陽性細胞巢の面積でも同様の結果を示した (図 5B)。すなわち GST-P 陽性細胞巢の発生は J 字型曲線を示し (ホルミシス現象)、PB の発がん作用には閾値が存在することが明らかとなった。PB の高用量投与は肝に DMPO-OH ラジカルを産生させ、それは CYP3A2 発現および 8-OHdG 産生の亢進に随伴していた。PB 高用量投与により 8-OHdG の形成レベルは上昇したが、低用量投与では無処置対照群のそれ以下であった。

さらに、PB のラット長期間投与による発がんホルミシス現象を DEN をイニシエーションとする二段階発がん検索法を用いて検証した結果、2 ppm で対照群より肝腫瘍の数が有意に減少し、腫瘍の発生にホルミシス現象が認められ、PB のプロモーション作用には閾値が存在することを最近、明らかにした。

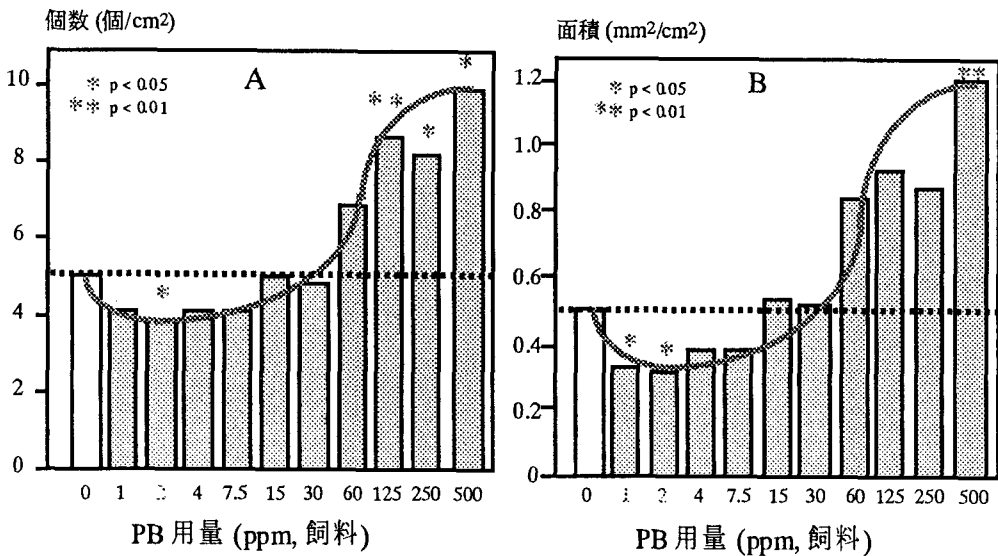


図5 PB投与ラット肝におけるGST-P陽性細胞巢の発生

(2) 有機塩素系化合物である α -BHC, p, p'-DDT と dieldrin の肝発がん性

農薬として我が国でかつて使用されていた α -BHC の肝発がん性を発がんプロモーション作用の面から伊東法を用いて検討した⁸⁾。その結果、ラット肝 GST-P 陽性細胞巢の発生は低用量域では PB と同様の J 字型曲線の傾向を示し、閾値

の存在が求められた。

p,p'-DDT によるラット肝 GST-P 陽性細胞巢の発生を 21 日齢雄性ラットを用いて検索すると、その発生は J 字型曲線を示し、PB と同様、その発がん性に閾値の存在が強く示唆された⁹⁾ (図 6)。また p,p'-DDT 投与による肝 CYP3A2 の発現は GST-P 陽性細胞巢の出現と同様、J 字型曲線を示した (図 7)。しかも、低用量では 8-OHdG 形成レベルの減少も認められた。さらに CYP3A2 の発現を制御する IL-1R1 と TNF- α R1 mRNA は低用量では逆 U 字型曲線を示し、かつ iNOS mRNA も逆 U 字型曲線を示した。

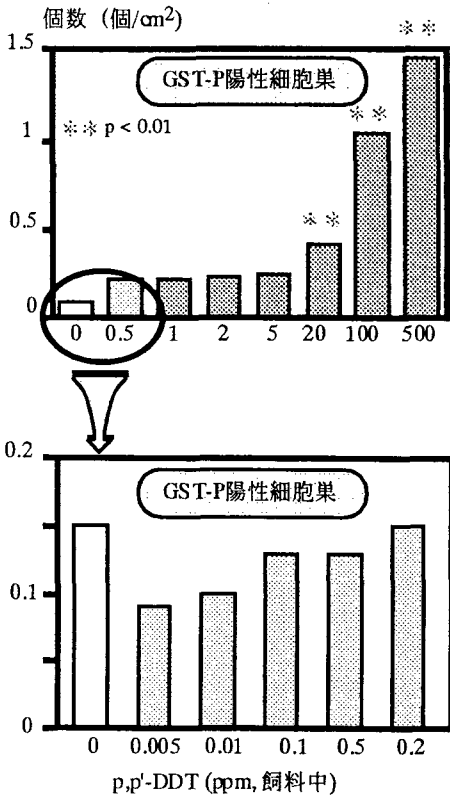


図6 p,p'-DDT投与ラット肝における GST-P陽性細胞巢の発生

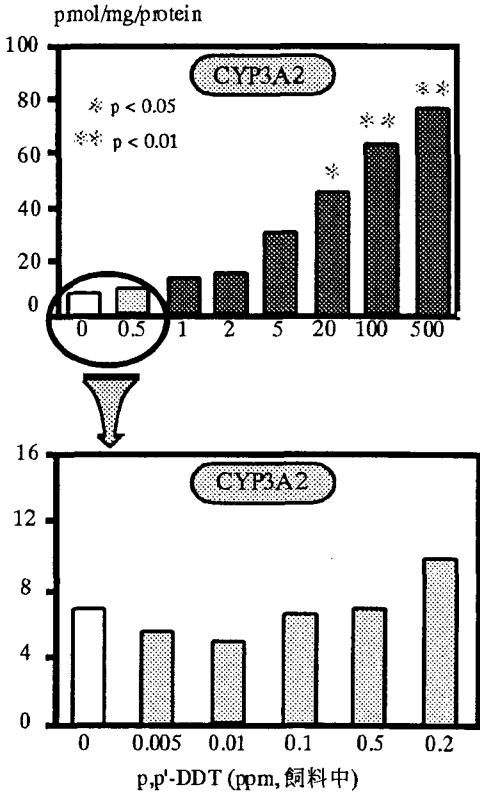


図7 p,p'-DDT投与ラット肝における CYP3A2の変動

さらに、dieldrin のラット肝発がん性を伊東法を用いて検討した。dieldrin の投与量は最低 0.01 ppm で、最高は 500 ppm である。その結果、dieldrin においては GST-P 陽性細胞巢の発生は低用量域では J 字型曲線を示さず、PB, α -BHC

さらに p,p'-DDT のそれとは異なっていた。

以上、非遺伝毒性発がん物質である PB, α -BHC および p, p'-DDT の肝発がん性に関し、確実に閾値が存在することを実証した。また、dieldrin にも同様、閾値が存在すると考えられた。

3. MeIQx ラット肝発がんに関与する修飾要因

1) 低用量複合投与による影響

MeIQx とニトロソ化合物の DEN との低用量複合投与によるラット肝発がん性を検討した。DEN の投与量を 0.01 ppm に一定とし、MeIQx の投与量を 0.01 ppm から 100 ppm までとし、16 週間投与すると肝における GST-P 陽性細胞巢の発生は、複合投与しても DEN を投与しないのと同様、MeIQx 10 ppm までは対照群と変化なく 100 ppm ではじめて有意な増加を示した。また、低用量の MeIQx 投与各群における GST-P 陽性細胞巢の発生に DEN 投与の影響は認められなかった。この現象は高用量の 100 ppm 群でも同様であった。

2) 肝障害状態による影響

四塩化炭素あるいはアルコールによる肝障害状態における MeIQx の低用量の発がん性をラット肝を用いて検討した。その結果、GST-P 陽性細胞巢の発生には MeIQx 単独投与に比べ、四塩化炭素による肝障害による嵩上げが認められた¹⁰⁾。また、MeIQx 投与量による変化は四塩化炭素非投与群では 10 ppm まで対照群と有意な差は認めなかったのに対し、四塩化炭素投与群では 10 ppm から有意に増加していた (図 8)。また、アルコール投与による肝障害時でも同様の変化が認められた。すなわち肝障害状態でも MeIQx の発がん性には閾値があることが判明した。しかし、無作用量は障害がない状態に比較して低値を示した。

3) 食餌制限による影響

MeIQx 10 ppm を雄性ラットに投与後、20 %食餌制限をして 24 週まで飼育すると、肝の GST-P 陽性細胞巢の発生は餌を自由に食べさせた群に比較して、約 3 分の 2 と有意に減少した。さらに肝の 8-OHdG と血清 IGF-1 レベルも有意に減少した。このことは食餌制限が発がんリスクを軽減させることを示した。

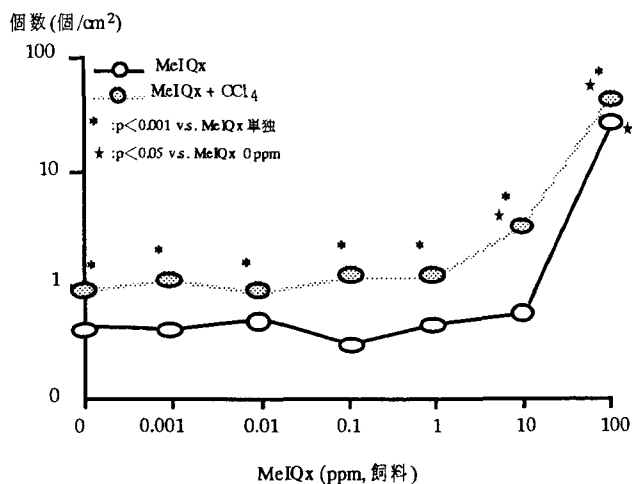


図8 MeIQxと四塩化炭素との低用量複合投与による
ラット肝発がん性：GST-P陽性細胞巣の発生

4) 経胎盤および授乳曝露による影響

ラット雌雄の交配前から胎生、分娩後から離乳まで継続的に低用量の MeIQx を投与し、その後、さらに 24 週齢まで MeIQx を投与した群における肝 GST-P 陽性巣の発生は、離乳後のみ MeIQx を投与した群に比較して有意差がなく、離乳までの MeIQx の低用量曝露は MeIQx 肝発がんには影響を及ぼさないと解釈された。

4. 結論

低用量の環境発がん物質に対する生体の反応は高用量とは明らかに異なり、遺伝毒性発がん物質には實際上、閾値が存在することが判明した。また、非遺伝毒性発がん物質の低用量では発がんが逆に抑制されるというホルミシス現象が認められ、閾値の存在が明らかとなった。さらに、低用量の発がん物質に対して標的細胞は生体の適応応答現象により調節されていると考えられた。

[遺伝毒性発がん物質の発がん実験に関しては、国立がんセンター研究所：津田、若林、国立医薬品食品衛生研究所：高橋、広瀬、名古屋市立大学医学部：白井、今井田（現香川医科大学）、愛知県がんセンター研究所：立松、奈良県立医科大学附属がんセンター：小西、中江（現佐々木研究所）の諸施設との協同研究である。]

文 献

1. Doll, R. and Peto, R.: The case of cancer: quantitative estimates of avoidable risks of cancer in the United States today. *J. Natl. Cancer Inst.* 66, 1192-1308, 1982.
2. Kishida, H., Wakabayashi, K., Sato, H., Katami, M., Kurisaka, R. and Nagao, M.: Carcinogenesis in rats of a mutagenic compound, 2-amino-3, 8-dimethylimidazo[4,5-f]quinoxaline. *Cancer Lett.*, 83, 31-35, 1994.
3. Wakabayashi, K., Ushizima, H., Takahashi, M., Nakaya, H., Kim, S-B., Hirose, M., Ochiai, M., Sugimura, T. and Nagao, M.: Exposure to heterocyclic amines. *Environ. Health Perspect.* 99, 129-133, 1993.
4. Totsuka, Y., Fukutome, K., Takahashi, M., Takahashi, S., Tada, A., Sugimura, T. and Wakabayashi, K.: Presence of N2-(deoxyguanosin-8-yl)2-amino-3, 8-dimethylimidazo[4,5-f]quinoxaline (dG-C8-MeIQx) in human tissues. *Carcinogenesis*, 17, 1029-1034, 1996.
5. Fukushima, S., Wanibuchi, H., Morimura, K., Wei, M., Nakae, D., Konishi, Y., Tsuda, H., Uehara, N., Imaida, K., Shirai, T., Tatematsu, M., Tsukamoto, T., Hirose, M., Furukawa, F., Wakabayashi, K. and Totsuka, Y.: Lack of a dose-response relationship for carcinogenicity in the rat liver with low doses of 2-amino-3,8-dimethylimidazo[4,5-f]quinoxaline or *N*-Nitrosodiethylamine. *Jpn. J. Cancer Res.*, 93, 1076-1082, 2002.
6. Ito N., Hasegawa R., Imaida K., Hirose, M., Shirai, T., Tamano, S. and Hagiwara, A.: Medium-term rat liver bioassay for rapid detection of hepatocarcinogenic substance. *J. Toxicol. Pathol.*, 10, 1-11, 1997.
7. Kitano M., Ichihara T., Matsuda T., Wanibuchi, H., Tamano S., Hagiwara A., Imaoka S., Funae Y., Shirai T., Fukushima S.: Presence of a threshold for promoting effects of phenobarbital on diethylnitrosamine-induced hepatic foci in the rat. *Carcinogenesis* 19: 1475-1480, 1998.
8. Masuda, C., Wanibuchi, H., Otori, K., Wei, M., Yamamoto, S., Hiroi, T., Imaoka, S., Funae, Y. and Fukushima, S.: Presence of a no-observed effect level for enhancing effects of development of the α -isomer of benzene hexachloride (α -BHC) on

- diethylnitrosamine-initiated hepatic foci in rats. *Cancer Lett.*, 163, 179-185, 2001.
9. Sukata, T., Uwagawa, S., Ozaki, K., Ogawa, M., Nishikawa, T., Iwai, S., Kinoshita, A., Wanibuchi, H., Imaoka, S., Funae, Y., Okuno, Y. and Fukushima, S.: Detailed low-dose study of 1,1-bis(*p*-chlorophenyl)-2,2,2-trichloroethane carcinogenesis suggests the possibility of a hormetic effect. *Int. J. Cancer*, 99, 112-118, 2002.
10. Iwai, S., Karim, R., Kitano, M., Sukata, T., Wei, M., Morimura, K., Wanibuchi, H. and Fukushima, S.: Role of oxidative DNA damage caused by carbon tetrachlorede-induced liver injury — enhancement of MeIQx-induced glutathione S-transferase placental form-positive foci in rats. *Cancer Lett.*, 179, 15-24, 2002.

〈第74回研究会（平成14年6月14日）〉

テーマ：生殖・発生研究の最前線

1. 卵胞選択の制御機構：顆粒層細胞に特異的な新規細胞死受容体について
眞鍋 昇（京都大・院・農・応用生物科学）
2. 核の初期化機構とクローン技術の応用
若山 照彦（理研・発生・再生科学総合研）

卵胞選択の制御機構：顆粒層細胞に特異的な新規細胞死受容体について

眞鍋 昇

京都大学大学院 農学研究科 応用生物学専攻 生体機構学

1. はじめに

生理的な細胞死が注目されている。今から 117 年前、Flemming¹⁾ はウサギの卵胞の成長・成熟を詳細に研究して多くの閉鎖する卵胞において顆粒層細胞に特徴的な核濃縮 (chromatolysis) が生じることを見いだしたが、この核濃縮が生理学的に意味するところは長い間不明であった。丁度 30 年前、カーら²⁾ は、病理組織学的に哺乳類の細胞死には少なくとも 2 種類あることを発見した。すなわち、細胞死のタイプのひとつは、従来から壊死 (necrosis: 遺伝子に制御されていない細胞死、事故死的細胞死) と呼ばれてきたもので、毒物や外傷などの様々な事故死的要因によって細胞はホメオスターシスが保てなくなって死滅するもので、そこでは好中球やマクロファージなどの多数の炎症性細胞が集簇して激しい炎症が生じる。カーらが新たに見いだした細胞死は、壊死とは異なり、生命体を生きながらえさせるために細胞が積極的に死滅するものである。このような生理的細胞死は、ホメロスのイーリアス第 146 節「季節の訪れとともに木の葉が舞い散るように人もまた去っていく」から引用したギリシア語の apo (off) と ptosis (falling) を合成してアポトーシス (apoptosis: 遺伝子に制御された細胞死、生理的細胞死) と名付けた。アポトーシスは、形態形成、増殖性細胞の除去、自己攻撃性免疫細胞の除去、がん化細胞やウイルス感染細胞の自滅などの様々な生理的かつ能動的な細胞死において認められ、アポトーシスが様々な生命現象や病態の制御に重要な役割を果たしていることが明らかとなっている。

哺乳類の卵巣においては性周期毎に 99% 以上の卵母細胞が成熟する過程で選択的に死滅するが、この機構は未だに不明な点が多い。最近になって、卵胞の生育・成熟過程で認められる選択的退行変性の過程に顆粒層細胞のアポトーシスが重要に関わっていることが分かってきた^{3,39)}。申請者らは、顕微鏡下に卵胞を構成する細胞を容易に分離・調製できるブタ卵胞を材料として、卵胞腔が形成され卵丘細胞とよばれる数層の顆粒層細胞に包まれた卵母細胞が卵胞の辺縁に位置するようになった状態の二次卵胞から成熟卵胞に至る過程でみられる卵胞選抜にともなう卵胞退行における顆粒層細胞のアポトーシスの役割とその制御機構を明らかにしようとしている。

2. 材料および方法

顆粒層細胞の調製：食肉処理場において未経産 (6～7 月齢、体重 100～120 kg) 雌性ブタより摘出した卵巣の周囲に付着した余分な組織を丁寧に取り除いた後、滅菌蒸留水にて 50 倍希釈した cetyltrimethyl-ammonium bromide 中で 2 回洗浄後 phosphate buffered saline (PBS、pH 7.4) 中で洗浄し、25℃ 以上に維持したポリエチレン容器に入れて実験室に持ち帰った。クリーンベ

ンチ内の実体顕微鏡下に卵胞を切り出し、健常および変性卵胞を類別した。なお、卵胞の退行変性の指標として卵胞液中の 17β -エストラジオールおよびプロジェステロン濃度を ^{125}I -RIA 法にて測定し、 17β -エストラジオール/プロジェステロン比が 15 以上のものを健常卵胞とし、それ以下を退行卵胞とした^{3,9)}。各々の卵胞から顆粒層および卵丘細胞を外科的に分離し、0.05 mM EGTA を含む培養液中にて 37°C 5 分間培養して単離調製した。併行して、この卵胞から顆粒層細胞を調製し、抗原として用いた。なお、この細胞が健常であることを確認するため、下記のように、細胞のゲノム DNA 分断の有無をアガロースゲル電気泳動法にて確認した¹⁾。

組織化学的および細胞学的観察：食肉処理場にて採取した卵巣を直ちに 10% 緩衝フォルマリン固定液 (pH 7.4) にて固定し、常法に従ってパラフィンに包埋後薄切した。この切片に terminal deoxynucleotidyl transferase-mediated biotinylated deoxyuridinetriphosphate nick end-labeling (TUNEL) 染色をほどこしてアポトーシス細胞を検出し、その局在を観察した^{3,9)}。あわせて卵巣を細切し、常法にてグルタルアルデヒド・オスミウム酸二重固定した後エポキシ樹脂に包埋して超薄切とした。これにウラン・鉛二重染色を施して透過型電子顕微鏡にてアポトーシス細胞の微細形態を観察した¹³⁾。

顆粒層および卵丘細胞におけるエンドヌクレアーゼ活性の測定：単離した顆粒層および卵丘細胞における中性 $\text{Ca}^{2+}/\text{Mg}^{2+}$ -依存性、中性 Ca^{2+} -依存性、中性 Mg^{2+} -依存性、酸性カチオン非依存性エンドヌクレアーゼ活性を測定した⁵⁾。すなわち、単離した細胞をホモジネートして核画分と細胞質可溶画分を調整した。別途 0.5% diethylpyrocarbonate 処理によって内因性エンドヌクレアーゼを失活させたミエローマ (Sp2/O-Ag14 cell) 細胞から調整した核画分を、健常あるいは退行卵胞の顆粒層あるいは卵丘細胞から調整した細胞質可溶画分と反応液 (10 mM Tris-HCl, pH 7.0, 25 mM NaCl, 340 mM sucrose; これに $\text{Ca}^{2+}/\text{Mg}^{2+}$ -依存性エンドヌクレアーゼの場合は 1 mM CaCl_2 と 5 mM MgCl_2 を、中性 Ca^{2+} -依存性エンドヌクレアーゼの場合は 1 mM CaCl_2 を、中性 Mg^{2+} -依存性エンドヌクレアーゼの場合は 5 mM MgCl_2 を添加) の混合液に加え、 37°C にて 10 分間反応させた後、5 mM ZnCl_2 、100 $\mu\text{g}/\text{ml}$ aurintricarboxylic acid および 20 mg/ml proteinase K (Sigma) 含む停止液を添加して反応を停止させた。酸性カチオン非依存性エンドヌクレアーゼに関しては、上記核画分を、健常あるいは退行卵胞の顆粒層あるいは卵丘細胞から調整した細胞質可溶画分と反応液 (10 mM N-2-hydroxyethyl piperazine-N'-2-ethane sulfonic acid buffer, pH5.0、中に 20 μM carbonylcyanide-3-chlorophenylhydrazone を含有) の混合液に加え、 37°C にて 180 分間反応させた後、停止液 (0.5 M Tris-HCl, pH8.0) を添加して反応を停止させた。次いで、183,000g にて 60 分間遠心することで核画分から高分子 (ペレット) および低分子 (上清) DNA 画分を得、各 DNA 画分に含まれる DNA 量を 4',6-diamidino-2-phenylindole dihydrochloride 発色法にて測定し、低分子 DNA 量/総 DNA 量 $\times 100$ をエンドヌクレアーゼ活性とした。

ゲノム DNA の分断の検定：エンドヌクレアーゼ活性を測定した標本の一部を用いて、各ゲノム DNA 標本におけるヌクレオソーム単位での分断の有無を 2%アガロースゲル電気泳動法にて調べた¹⁾。すなわち、反応後の DNA 標

本を 40 mM Tris-acetate 緩衝液 (pH 8.1) に 2% agarose、2 mM EDTA、18 mM NaCl および 10 μ g/ml ethidium bromide を溶解したゲルに添加し、60V、90 分間電気泳動し、紫外線イルミネーター下に DNA バンドを観察した。

モノクローナル抗体の作製：常法に従って、雌性 BALB/c マウスに単離調製した顆粒層細胞を静脈注射することで感作した²⁴⁾。抗ブタ顆粒層細胞抗体を産生しているマウスを選抜するために、ブタ卵巣未固定凍結切片を -80℃ アセトン固定し、蛍光抗体法にて染色した。抗ブタ顆粒層細胞抗体を産生しているマウスを選抜し、この脾細胞とミエローマ細胞 (Sp2/O-Ag14) をポリエチレングリコール法にて融合させてハイブリドーマを作製した。上記と同様に蛍光抗体法にて抗ブタ顆粒層細胞抗体を産生している細胞株を選抜し、限界希釈法にてクローニングを行って PFG-5 および PFG-6 クローンを得た²⁴⁾。

モノクローナル抗体の特性

- a) ウエスタンブロット法：PFG-5 および PFG-6 クローンが産生する抗体 (各々 PFG-5 および PFG-6 抗体) の特性を明らかにするため、1 次元および 2 次元ウエスタンブロットを行い、この抗体が認識する抗原を同定した²⁴⁾。すなわち、1 次元ウエスタンブロットは、顆粒層細胞から細胞膜フラクションを調製し、6%-SDS ポリアクリルアミドゲル電気泳動法にてタンパク質を分離後ブロッキングを行った。2 次元ウエスタンブロットは、4% ポリアクリルアミドゲルにて等電点電気泳動を行った後、7.5%-SDS・ポリアクリルアミドゲル電気泳動法にてタンパク質を分離してブロッキングを行った。あわせて、肝、腎、副腎、脾、膵、肺、心、胸腺、大脳、小脳、小腸、大腸、卵管、子宮、精巣などの諸組織のホモジネートを作製し、1 次元ウエスタンブロット法にて PFG-5 および PFG-6 抗体が認識するタンパク質の臓器特異性を調べた²⁴⁾。
- b) 蛍光抗体染色：抗体が認識する抗原の局在を明らかにするために、ブタ卵巣を蛍光抗体法にて染色した²⁴⁾。すなわち、ブタ卵巣凍結切片を -80℃ アセトン固定後、蛍光抗体法にて PFG-5 および PFG-6 抗体と反応する細胞の局在を調べた。
- c) アポトーシス誘導活性：抗体による初代培養顆粒層細胞へのアポトーシス誘導活性の有無を調べた²⁴⁾。すなわち、10% 非働化ウシ胎仔血清 (FCS) を含む M199 培地に 0.001~100 μ g/ml の抗体を添加し、この培地中にて顆粒層細胞を 3~48 時間培養した。その後 Hoechst 33258 にて核染色した後細胞核形態を観察した。培養後、細胞核ペレットからゲノム DNA を抽出して 2% アガロース電気泳動して DNA 分断の有無を判定した。併せてエタノール固定した細胞にプロピウムイオダイド (PI) 核酸染色を施し、フローサイトメトリーにて核相分析した。

3. 結果および考察

組織化学的および細胞学的所見：卵巣の組織標本にヘマトキシリン・エオジン染色のような一般染色したのみでは核凝縮が全く観察できないような初期のアポトーシス細胞を TUNEL 染色法は鋭敏に検出できる^{3, 9)}。健常卵胞におい

てはアポトーシス (TUNEL 陽性) 細胞は全く観察されなかった。いまだ顆粒層細胞は層状構造を保ち、卵子-卵丘細胞複合体が顆粒層細胞層と結合しているような極初期の退行変性過程の卵胞においては、卵胞内腔側の顆粒層細胞からアポトーシスが始まることが分かった。卵胞退行の進行に伴ってアポトーシス細胞は数を増しつつ顆粒層細胞の基底膜側に広がるが、80%以上の顆粒層細胞がアポトーシスをおこす後期のステージでも卵丘細胞は TUNEL 陰性であった。基底膜に直接接した顆粒層細胞にもアポトーシスが認められる中期の変性ステージになると、卵胞腔側には凝縮し分断した核小片 (アポトーシス小体) が観察され、このステージの顆粒層細胞を電子顕微鏡にて観察するとアポトーシスに典型的な微細形態が観察されたが、同じ卵胞の卵丘細胞の形態は正常であった¹³⁾。これらの組織細胞学的所見から、ブタ退行卵胞では内腔側の細胞から始まったアポトーシスは基底膜側に広がること、および退行の進行した卵胞でも卵丘細胞にはアポトーシスが認められないことが判明した。

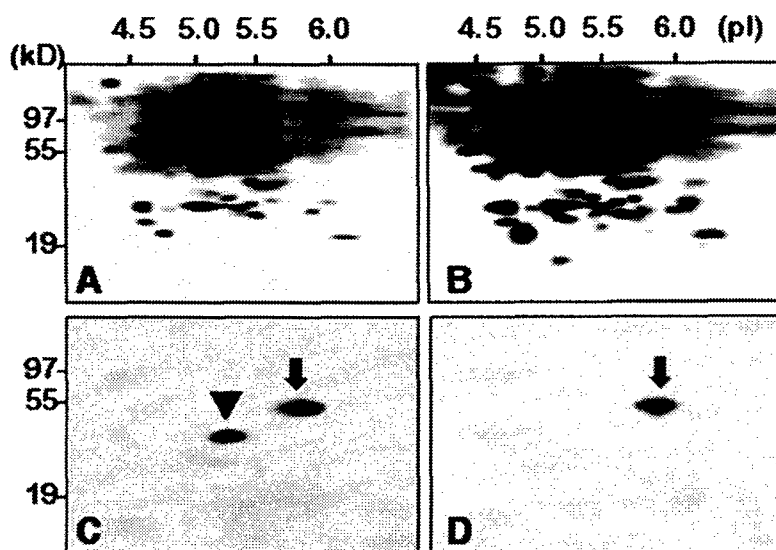


Fig. 1. Representative results of 2D-Western blotting analysis of granulosa cell-membrane antigens recognized by PFG-5 antibody (C and D). Granulosa cell membrane fractions prepared from healthy (A and C) and atretic (B and D) follicles were separated by 2D-PAGE. Separated protein spots in gels were detected by Coomassie brilliant blue staining (A and B). After electrophoresis, the protein spots were transferred onto nitrocellulose sheets and the antigens were visualized by PFG-5 antibody. Two specific spots (42 kD-pI 5.2 and 55 kD-pI 5.9: arrowhead and arrow, respectively) were observed in healthy follicles, (C), but the spot of 42 kD-pI 5.2 disappeared in atretic follicles (D).

顆粒層および卵丘細胞における中性 $\text{Ca}^{2+}/\text{Mg}^{2+}$ -依存性、中性 Ca^{2+} -依存性、中性 Mg^{2+} -依存性および酸性カチオン非依存性エンドヌクレアーゼ活性：ブタ卵巣から切出した健常および変性卵胞から調製した顆粒層および卵丘細胞における、遺伝子 DNA をヌクレオソーム間のリンカー部位でヌクレオソーム単位に

特異的に分断するエンドヌクレアーゼの活性を調べた結果、変性卵胞から調製した顆粒層細胞においてのみ中性 $\text{Ca}^{2+}/\text{Mg}^{2+}$ -依存性エンドヌクレアーゼ活性の顕著な上昇を検出できた⁵⁾。しかしながら、健常および変性卵胞から調製した顆粒層および卵丘細胞のいずれにおいても他のエンドヌクレアーゼ活性は検出できなかった。酵素活性を測定した後の DNA 標本を電気電気泳動的に調べた結果、変性卵胞から調製した顆粒層細胞で中性 $\text{Ca}^{2+}/\text{Mg}^{2+}$ -依存性エンドヌクレアーゼ活性が検出できた標本でのみアポトーシスに特徴的なヌクレオソーム単位で DNA 分断した梯子状像が観察された。さらに、顆粒層細胞においては中性 $\text{Ca}^{2+}/\text{Mg}^{2+}$ -依存性エンドヌクレアーゼ活性と卵胞液エストラジオール濃度/プロゲステロン濃度比との間には高い正相関が認められたが、卵丘細胞においては認められなかった。これらの生化学的知見から、ブタ顆粒層細胞のアポトーシスには中性 $\text{Ca}^{2+}/\text{Mg}^{2+}$ -依存性エンドヌクレアーゼのみが関与すると考えられた。さらに卵丘細胞にはアポトーシスが認められないことが、組織化学および細胞学的所見のみならず生化学的に遺伝子 DNA をヌクレオソーム単位で分断する酵素活性レベルでも判明した。

健常卵胞から調製した顆粒層細胞（健常顆粒層細胞）を抗原としてモノクローナル抗体を作製し、いくつかの顆粒層細胞特異的タンパクを見いだした^{11, 24, 36)}。そのうちのひとつの健常顆粒層細胞にのみ発現している細胞膜抗原（PFG-5-2 抗原：分子量 55kD、等電点 5.9 の細胞膜貫通型の糖タンパク質）は、IgM モノクローナル抗体（PFG-5 抗体）が認識する抗原のひとつであるので、PFG-5-2 抗原と名付けた（Fig. 1）²⁴⁾。

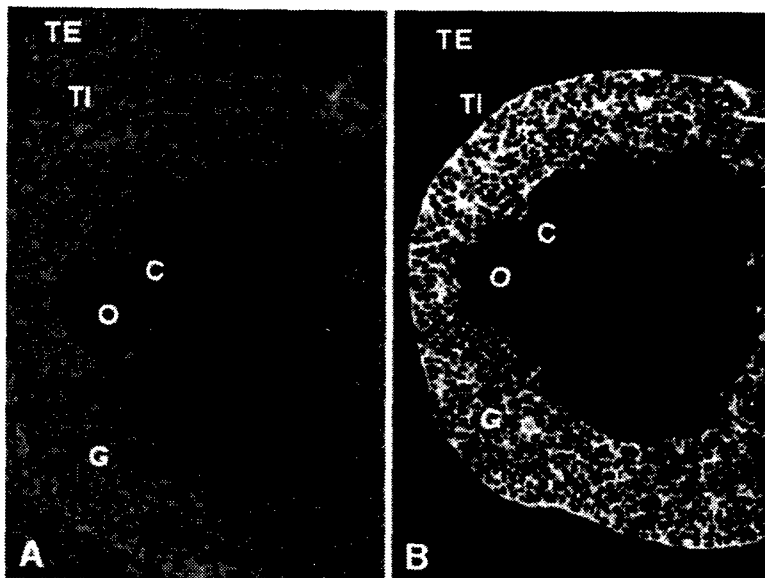


Fig. 2. Composite confocal images of healthy follicles. Frozen section of porcine ovary was stained with Hoechst 33258 (A) to visualize the cell nuclei. The same section was stained with PFG-5 antibody and with FITC-conjugated anti-mouse IgM, to visualize the distribution of granulosa cell membrane antigens (B). The follicle was optically sectioned at $0.5 \mu\text{m}$ and five serial images were generated using the

confocal microscope. PFG-5 antibody showed strong fluorescent staining on granulosa cells (G). No fluorescent staining of cumulus cells (C), oocyte (O), theca interna (TI) or externa (TE) layers was observed. x 200.

また、PFG-5 抗体はもうひとつの細胞膜抗原 (PFG-5-1 抗原: 分子量 42kD、等電点 5.2) を認識した (Fig. 1)。PFG-5 抗体は、顆粒層細胞のみを認識し (Fig. 2)、肝、腎、副腎、脾、膵、肺、心、胸腺、大脳、小脳、小腸、大腸、卵管、子宮、精巣には存在しなかった。興味深いことにこれら 2 種の細胞膜抗原を認識する IgG モノクローナル抗体 (PFG-6 抗体) も作製することができた (Fig. 1)。PFG-5 抗体を初代培養顆粒層細胞に添加することでアポトーシスを誘導でき、PFG-6 抗体と共培養することで PFG-5 抗体誘発性の顆粒層細胞アポトーシスが阻害された。

このように卵胞顆粒層細胞に特異的にアポトーシスを誘導し、卵胞を選択的に閉鎖消滅させる因子を探索できた。この細胞膜タンパク質 (PFG-5-2 抗原) は、健常卵胞の顆粒層細胞に特異的に発現している (Fig. 2)。生化学的、分子生物学的解析、免疫化学的特性などから、PFG-5-2 抗原は新規な細胞死受容体であると考えられ、PFG-5-1 抗原は細胞内にあってアポトーシスシグナルを伝達するデス・ドメインが欠損したデコイ受容体であると推測される²¹⁾。

4. まとめ

サケのように一生に一度だけ全卵子を排卵する動物と異なり、哺乳類は性周期毎に一定数を成熟・排卵することを繰り返す。哺乳類の片側卵巢には胎児期に減数分裂前期後半 (ディプロテン期) で休止した卵母細胞が 5 ~ 50 万個含まれている。性成熟後、性周期毎に卵母細胞はそれを取り囲む卵胞上皮細胞 (発達した卵胞では卵胞腔に面する層状の顆粒層細胞と卵子と結合している卵丘細胞に分化する) と卵胞を形成し、卵胞の発達に呼応しながら発育・成熟するが、最終的に排卵にいたる卵子の 100 倍以上の卵胞が発達する。この卵胞発達とそれに引き続いて起こる卵母細胞の成熟の過程で 99% 以上の卵母細胞は選択的に死滅し、ごく一部の選抜された卵子のみが排卵にいたる。卵胞の選択的死滅 (卵胞退行・卵胞閉鎖) が、より優秀で強靱な子孫を残す戦略として重要であると考えられるが、これを制御している分子機構は未解明である³⁹⁾。

近年、卵胞上皮細胞が顆粒層細胞と卵丘細胞に分化しはじめて卵胞腔が形成されるようになった状態の二次卵胞から成熟卵胞 (グラーフ卵胞) に至る過程でみられる選択的卵胞退行において顆粒層細胞のアポトーシスが支配的な役割をはたしていることがわかってきた。最初に顆粒層細胞にアポトーシスが誘発され、これが卵胞退行を誘導している。私たちは完全性周期動物であるブタの卵巢を材料として用い、卵胞退行の初期において卵胞腔側の顆粒層細胞からアポトーシスが始まり、基底膜側に広がること、しかし卵胞を構成する他の細胞 (卵丘細胞、卵母細胞、内および外卵胞膜細胞) には誘発されないこと、卵胞退行後期まで卵母細胞は受精能を供えていることなどを明らかにした^{14, 18)}。この顆粒層細胞アポトーシスを制御する分子機構を明らかにしようとして、健常卵胞と退行卵胞を分別できるモノクローナル抗体を作製した。モノクローナル抗体のひとつは卵胞顆粒層細胞に特異的な細胞死受容体を認識するものであり、

ひとつはこの細胞死受容体の活性化を抑制的に制御していると推察されるデコイ（Ⅲ）受容体を認識するものであった。この細胞死受容体は、細胞膜結合性の糖タンパク質で、分子量、免疫組織化学的局在性などから既知の細胞死受容体である Fas、TNF 受容体、TRAIL 受容体とは異なる新規な分子である。

卵胞の発育・退行には、これまで主に免疫系細胞や腫瘍細胞を用いて解明されてきた特異的細胞死制御とは異なる制御系も存在することが分かってきたが、未解明な点が多い。哺乳類にとって、卵胞の選択はより強靱な子孫を残すために不可欠であると考えられ、この制御機構を解明することは重要な課題と考える。セミナーでは、この細胞死受容体とデコイ受容体系を中心に、Fas リガンド-Fas 系¹⁰⁾、TNF α -TNF 受容体系³⁷⁾、TRAIL-TRAIL 受容体系³³⁻³⁵⁾をも含めて、卵胞の選択的死滅制御における細胞死受容体系の役割について紹介した。

謝辞

この研究は、科学研究補助金・学術創成研究(13GS0008)等の補助を受けて行っている。

参照となる文献

1. Flemming W. ber die Bildung von Richtungsfiguren in Sugethiereiern beim Untergang Graafscher Follikel. Arch Anat EntGesch 1885; 221-244.
2. Kerr JFR, Wyllie AH, Currie AR. Apoptosis: a basic biological phenomenon with wide ranging implication in tissue kinetics. Br J Cancer 1972; 26: 239-257.
3. Manabe N. et al., Apoptosis occurs in granulosa cells but not cumulus cells in the atretic antral follicles in the pig ovaries. Experientia, 52: 647-651, 1996.
4. Manabe N. et al., Apoptosis occurs in granulosa cells but not cumulus cells in the atretic graafian follicles in the porcine ovaries. Acta Histochem Cytochem, 29: 945-946, 1996.
5. Manabe N. et al., Ca²⁺/Mg²⁺-dependent endonuclease but not Ca²⁺-Dependent, Mg²⁺-Dependent or cation-independent endonuclease is involved in granulosa cell apoptosis of pig atretic follicles. J Reprod Dev, 42: 247-253, 1996.
6. Manabe N. et al., Signal transmission of granulosa cell apoptosis in the atretic antral follicles in the pig ovaries. J Reprod Dev, 42: 135-141, 1996.
7. Manabe N. et al., Apoptosis occurs in granulosa cells but not cumulus cells in the atretic graafian follicles in the porcine ovaries. In: Histochemistry and Cytochemistry, Proceedings of the xth international congress on histochemistry and cytochemistry, Jpn Soc Histochem Cytochem, Kyoto, pp945-946, 1996.
8. Manabe N. et al., Apoptosis occurs in granulosa cells but not cumulus cells in the atretic antral follicles in the porcine ovaries. J Reprod Dev, 43: 179-180. 1997.
9. Manabe N. et al., Apoptosis occurs in granulosa cells but not cumulus cells in the atretic graafian follicles in multiparous pig ovaries. Acta Histochem Cytochem, 30: 85-92. 1997.
10. Sakamaki K. et al., Involvement of Fas antigen in ovarian follicular atresia and leuteolysis. Mol Reprod Dev, 47: 11-18, 1997.
11. Myoumoto A. et al., Monoclonal antibody against pig ovarian follicular granulosa cells induce apoptotic cell death in cultured granulosa cells. J Vet Med Sci, 59: 641-649, 1997.
12. Kimura Y. et al., Examination of granulosa cell glycoconjugates which change during follicular atresia in the pig ovary. J Reprod Dev, 44: 35-44. 1998.
13. Sugimoto M. et al., Ultrastructural changes in granulosa cells in porcine antral follicles undergoing atresia indicate apoptotic cell death. J Reprod Dev, 44: 7-14. 1998.
14. Manabe N. et al., Regulatory mechanisms of granulosa cell apoptosis in porcine ovarian follicle atresia. In: Reproductive biology update: Novel tools for assessment of environmental toxicity, Miyamoto H. and Manabe N. eds., Nakanishi Pub. Co., Kyoto, Japan., pp23-35, 1998.
15. Okamura Y. et al., The role of protein tyrosine kinase in ovarian folliculogenesis. In: Reproductive biology update: Novel tools for assessment of environmental toxicity, Miyamoto H. and Manabe N.

- eds., Nakanishi Pub. Co., Kyoto, Japan., pp37-42, 1998.
16. Kimura Y. et al., Granulosa cell glycoconjugates found in atretic follicles of the pig ovary. In: Reproductive biology update: Novel tools for assessment of environmental toxicity, Miyamoto H. and Manabe N. eds., Nakanishi Pub. Co., Kyoto, Japan, pp59-66, 1998.
 17. Myoumoto A. et al., Ovarian follicular atresia and development: Tyrosin kinase (TK) activity in relation to regulation of granulosa cell apoptosis. In: Reproductive biology update: Novel tools for assessment of environmental toxicity, Miyamoto H. and Manabe N. eds., Nakanishi Pub. Co., Kyoto, Japan., pp67-72, 1998.
 18. Manabe N. et al., Role of granulosa cell apoptosis in ovarian follicle atresia. In: Apoptosis in Animals and Plants, Yamada T eds., Tokyo University Press, Japan, 97-111, 1998
 19. Kimura Y. et al., Examination of granulosa cell glycoconjugates which change during follicular atresia in the pig ovary. *J Reprod Deve.* 44: 35-44. 1998.
 20. Manabe N. et al., Selection of oocytes in mammalian ovaries. *Tiss Cult Engineer* 25: 4-8, 1999.
 21. Imai Y. et al., Interactions of apoptosis and extracellular matrices in granulosa cells of atretic follicles in porcine ovaries. *J Mamm Ova Res.* 16: 59-66, 1999.
 22. Kimura Y. et al., Up-regulation of the α 2,6-sialyltransferase messenger ribonucleic acid increases glycoconjugates containing α 2,6-linked sialic acid residues in granulosa cells during follicular atresia of porcine ovaries. *Biol Reprod*, 60: 1475-1482, 1999.
 23. Yosimura Y. et al., Stage-specific distributions of inhibin α -subunit in bovine ovarian follicles and corresponding concentrations of various hormones in follicular fluid. *J Reprod Dev*, 45: 213-222, 1999.
 24. Manabe N. et al., Immunochemical characteristics of a novel cell death receptor and a decoy receptor on granulosa cells of porcine ovarian follicles. *Cytotechnol*, 31: 189-201, 2000.
 25. Nakayama M. et al., Species specific differences in apoptotic cell localization in granulosa and theca interna cells during follicular atresia in porcine and bovine ovaries. *J Reprod Dev*, 46: 147-156. 2000.
 26. Nishihara S et al., Changes in cell adhesion molecules during follicular atresia in porcine ovaries. *J Reprod Dev*, 46: 325-334. 2000.
 27. Manabe N. et al., Monoclonal antibodies recognize a novel cell death receptor and a decoy receptor on granulosa cells of porcine ovarian follicles. *J Mamm Ova Res*, 18: 1-13. 2001.
 28. Manabe N. et al., Physiological roles of apoptosis in granulosa cells of atretic follicles in porcine ovaries. *J Emb Transf*, 23: 1-10, 2001.
 29. Nakayama M. et al., Changes in localization of type I, III and IV collagens and their mRNA expression during follicular atresia in bovine and porcine ovaries. *J Reprod Dev*, 47: 27-36, 2001.
 30. Manabe N. et al., A novel cell death receptor and a decoy receptor on follicular granulosa cells of porcine ovaries. *J Emb Transf*, 23: 52-60, 2001
 31. Okamura Y. et al., Protein tyrosine kinase expression in the porcine ovary. *Mol Hum Reprod*, 7: 723-729, 2001.
 32. Brussow K-P. et al., Biotechnological aspects of embryo transfer in swine. *Hung J Anim Breed Nutr*, 50: 481-493, 2001.
 33. Wada S. et al., TRAIL-decoy receptor-1 disappears in granulosa cells of atretic follicles in porcine ovaries. *J Reprod Dev*, 48: 167-173, 2002.
 34. Wada S. et al., TRADD is involved in apoptosis induction in granulosa cells during atresia in pig ovaries. *J Reprod Dev*, 48: 175-181, 2002.
 35. Wada S. et al., TRAIL-decoy receptor-1 plays inhibitory role in apoptosis of granulosa cells from pig ovarian follicles. *J Vet Med Sci*, 64: 435-439, 2002.
 36. Tajima C. et al., Monoclonal antibody recognizes follicular granulosa cell antigens in porcine ovaries. *J Reprod Dev*, 2002. (in press)
 37. Nakayama M. et al., Changes in the expression of tumor necrosis factor (TNF) α , TNF α Receptor (TNFR) 2 and TNFR-associated factor 2 in granulosa cells during atresia in pig ovaries. *Biol Reprod*, 2002 (in press)
 38. Matsui T. et al., Changes in the expression and activity of caspase-9 and Apaf1 in granulosa cells during follicular atresia in pig ovaries. *Biol Reprod*, 2002 (in press)
 39. Manabe N., Ovarian follicle selection. In: *The Ovary 2nd Edition*, Leung P, Adashi E eds., Academic Press. NY. USA, 2002 (in press)

核の初期化機構とクローン技術の応用

若山 照彦（理化学研究所 発生・再生科学総合研究センター
ゲノム・リプログラミング研究チーム）

はじめに

現在、クローン羊ドリーに次いで、牛やマウスなどいろいろな動物種でクローンに成功している。しかしクローンに成功しているすべての動物種で、どんな核移植方法を用いてもクローンの成功率は5%以下であり、しかも生まれてきたクローン動物の多くに異常が発生している。この原因としていろいろな仮説が立てられているが、明らかになっていることはひとつもない。

一方胚性幹細胞（ES細胞）を用いた分化誘導の研究から、ES細胞があらたな臓器移植の手段になりうる可能性が出てきた。そのため体細胞クローンの報告がなされるとすぐに、体細胞から核移植によってクローン胚を作り、そこからES細胞（体細胞核移植由来ES細胞：ntES細胞）を作出することが試みられ始めた。自分自身のntES細胞から作られた臓器ならば、拒絶反応はあり得ないからである。その結果ntES細胞を作ることはクローン動物を作るより簡単であるがわかり、全能性のあるntES細胞として樹立するための初期化の方が、成体まで発生するための初期化・全能性の獲得より簡単であるという可能性がでてきた。

我々はこれまでマウスの体細胞やES細胞をもちいて初期化の研究を行ってきた。当面の最重要課題はクローンの成功率の改善であるが、それと同時に核移植の応用なども検討している。そこで本講演では、これまでにマウスを用いたクローンの研究によって明らかになってきたことをかいつまんで紹介する。

I 体細胞の核の初期化

体細胞の核を受精卵の中へ移植した場合、すべての核に染色体レベルでのダメージが生じ、クローンの発生は完全に1-2細胞期でストップしてしまう。しかし未受精卵の中へ体細胞の核を移植すると、低率ではあるが発生を継続し、クローンとして生まれることが出来る。このことからクローンを成功させるためには、

受精卵には無く未受精卵にのみ含まれている初期化因子というものが重要であると考えられている。未受精卵の細胞質にのみ含まれている代表的なものに、分裂中期促進因子（MPF）がある。おそらくこのMPFが体細胞の初期化・全能性の獲得に重要だと考えられているが、はっきりしたことはわかっていない。

最近になってDMSOという化学物質を培養液に加えると、クローン胚の発生率及び出産率を若干改善できることがわかってきた。この結果は、未受精卵に含まれる初期化因子だけでなく、人為的な化学的処理によっても体細胞の初期化・全能性の獲得を促進できることを示している。しかし無数の化学薬品の中から、はたしてより効果のある物質を見つけられるのだろうか。

一方体細胞の種類によっても、クローンの成績が異なることがわかってきた。我々は大人のマウスの卵丘細胞、尻尾の細胞などから多数のクローンマウスを作出したが、それ以外にセルトリ細胞、脳細胞、脾臓、胸腺、及びマクロファージをドナーとしてクローン作りを試み、胸腺細胞以外からは胎児を作ることに成功している。しかしそれらの多くは、妊娠初期に発生を停止あるいは死滅していた。また同じ体細胞でも、マウスの系統によってクローンの成功率が大きく異なっていることがわかっている。マウスの系統間や臓器間にクローンの成功率に差があることは、初期化されやすさに違いがあるのか、あるいは各臓器内にわずかに含まれている幹細胞をたまたま選んだときにだけクローンに成功しているのかもしれない。

II クローンマウスの異常

クローン動物の大部分は出産前に流産してしまう。そしてほんの数パーセントの胎児だけが出産に至るが、いくつかの異常を伴っていることが多い。クローンマウスの場合、すべての赤ちゃんが通常の2から3倍の大きさの胎盤を持っていた。この現象は我々の所だけでなく、別の研究所や、まったく異なる方法で作出されたクローンマウスにも共通している。また出産後に呼吸を始めることができずに死亡する個体も多い。これらの異常は他の動物種のクローンでも報告されていることから、クローン動物に共通する現象だと思われる。最近クローンマウスを用いて詳しい研究がなされた結果、インプリント遺伝子の発現異常が胎盤側でのみ

見られることや、DNAのメチル化部位の一部が胎盤だけでなく胎仔側でもドナーマウスと違っていることが明らかとなった。

胎盤以外の異常として、若齢期には寝返りが出来るようになる日や、耳の穴が開く日が若干遅れることなどがある。そして生後8週齢以降徐々に体重が増加し肥満になるクローン個体や、肝臓や免疫機能の低下などから出生後1年で死に始めるクローン個体もある。しかしすべてに共通する胎盤異常とは異なって、これらの異常はすべてのクローンマウスで見られるわけではない。最初のクローンマウス “Cumulina” は肥満にもならず、平均のマウスより長く生きた（2年7ヶ月）。

クローンマウスにはこれらの異常が見られるが、逆に正常だとわかっていることもある。たとえばクローンマウスは性成熟後、交配により正常な子孫を作ることができ、子孫にはクローンマウスに見られた異常は遺伝しないことがわかっている。またクローンマウスの卵丘細胞から再びクローンマウスを作ることを5回繰り返えすことにも成功した。それぞれの世代のクローンマウスのテロメア長を調べてみたが、テロメアは正常な長さだった。また5世代目のクローンマウスを詳しく調べたが、早老の傾向を示したものは見つからなかった。この結果は、核移植によってドナー細胞の年齢もリセットされている可能性を示している。ただしこのクローニングを繰り返した実験では、成功率が徐々に低下し、最大6世代までしか繰り返すことが出来なかった。

III ntES細胞への初期化と応用

体細胞からのクローンが可能になったことから、核移植を用いれば体細胞からES細胞が作れるのではないか、という考えを思いつくのは容易であり、実際すでに多くの体細胞核移植由来ES細胞（ntES細胞）が樹立されている。ES細胞を用いた再生医療の研究と結びつければ、患者の体細胞、たとえば皮膚から核移植でES細胞を作り、それを神経細胞や血球に分化させ、拒絶反応なしにもとの患者へ移植することが可能になるからである。そのうえES細胞は遺伝子組み替えが容易であることから、遺伝的な欠陥をもつ患者の体細胞からES細胞を樹立し、欠損遺伝子を組み込んで正常な細胞を作ることにも可能である。我々は、卵丘細胞および尻尾の細胞を用いて、近交系、F1、ミュータント系、トランスジェニックなどいく

つかの系統と雄雌を用いて核移植を行い、すべてのドナーから1つ以上のntES細胞株を樹立することができた。これらのntES細胞は、通常のES細胞とまったく同じ性質を持っていた。また体外で神経細胞へ分化させることにも成功した。つまり、脊椎を損傷した人やパーキンソン病になった人の皮膚から体細胞を取り出し、未受精卵への核移植でその人自身のntES細胞を作り出し、体外で神経細胞へ分化させてから自分の体へ戻し、健康な体に戻るということが原理的には可能になったのである。

また、ntES細胞の方がクローン個体よりも樹立しやすいということは、胚盤胞よりほんの少し先に進んだ程度(ntES)までの発生に必要な初期化と、個体までの発生に必要な初期化とでは初期化度（完成度）に差があるからだろうか。初期化及び全能性は1つの状態だけを表す物ではなく、もっと細かく分けることが必要なかもしれない。

おわりに

クローンマウスは、成功率は低いものの確実に再現可能であり、実験動物としての利点を活かし、多くの研究室で基礎研究のために作出され始めている。しかしなぜクローンの成功率は低いのか、体細胞の核のすべてに全能性があるのか、初期化のメカニズムは何なのか、クローンに多発する異常の原因は何なのか、そして初期化・全能性の詳しい分類など、明らかにすべき点は山積みである。一方体細胞からES細胞を作り出す技術は、ES細胞の分化誘導の研究と結びついて、臓器移植などの臨床への基礎研究にも有効であろう。今後の成果がとても楽しみである。

Wakayama, T. et al., Nature 394:369-374, 1998

Wakayama, T. & Yanagimachi, R. Nat. Genet. 22:127-128, 1999

Wakayama, T. et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 96:14984-14989, 1999

Wakayama, T. et al., Nature Genet. 24: 108-109, 2000

Wakayama, T. et al., Nature 407: 318-319, 2000

Wakayama, T. et al., Science 292:740-743, 2001

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 22 号に掲載した第 71 回研究会以後、以下の研究会が開催された。

1) 第 72 回研究会（平成 13 年 12 月 14 日 於京都市勧業館「みやこめっせ」）

会員による研究発表（15 題）

＜特別講演-1＞ 森脇和郎（理研筑波研究所バイオリソースセンター）

マウスの歴史と遺伝子の歴史

＜特別講演-2＞ 芹川忠夫（京都大院・医・動物実験施設）

実験用ラットの価値

2) 第 73 回研究会（平成 14 年 3 月 8 日 於京大会館）

＜講演会＞ テーマ：動物をもちいた発がん研究の最前線

1. 実験動物をもちいたヒト発がん研究－遺伝子機能を共通言語として

牛島俊和（国立がんセンター 発がん研究部）

2. 環境発がん物質には閾値が存在するか

福島昭治（大阪市大・院・医・都市環境病理）

＜維持会員ニュース＞ （株）夏目製作所「これからの動物実験施設」

3) 第 74 回研究会（平成 14 年 6 月 14 日 於大阪大学医学部学友会館「銀杏会館」）

＜講演会＞ テーマ：生殖・発生研究の最前線

1. 卵胞選択の制御機構：顆粒層細胞に特異的な新規細胞死受容体について

眞鍋 昇（京都大・院・農・応用生物科学）

2. クローンマウスの特徴と応用

若山照彦（理化研・発生・再生科学総合研）

＜維持会員ニュース＞

1. 日本エスエルシー（株）「皮膚に関わる自然発症疾患モデル動物」

2. （株）サンブラネット「有色モルモットの紫外線皮膚色素沈着モデル作成方法について」

4) 第 75 回研究会（平成 14 年 9 月 6 日 於大阪大学医学部学友会館「銀杏会館」）

＜講演会＞ テーマ：組換え動物の利用と規制

1. マウス生体への新しい遺伝子導入法

宮崎純一（阪大・医・動物実験施設）

2. 組換え DNA 実験指針改定に伴う動物を用いる実験の取り扱い

安居院高志（名市大院・医・実験動物研究教育センター）

＜維持会員ニュース＞

1. 三浦工業（株）「蒸気滅菌におけるクリーン蒸気の必要性」

2. （株）ケー・エー・シー「弊社・技術研修所における教育カリキュラムの紹介」

幹事会、評議員会、総会の議事録

1) 幹事会の概要（平成 14 年 2 月 22 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、江馬、喜多、久保、黒澤、塩見、田島、芹川、新谷、前田、森岡、森本、山本、山中（17名）
2. 議事
 - (1) 平成 13 年度の事業報告について話し合わせ、平成 14 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 22 号の発行が報告された。
 - (3) 平成 13 年度の決算報告について話し合わせ、平成 13 年度決算報告が作成された。
 - (4) 平成 14 年度の事業計画について話し合わせ、平成 14 年度事業計画案が作成された。
評議員会費の新設により、関西実験動物研究会会則の改正（II. (6)、VI. (23)、VII. (26)）が必要であることが確認され、評議員会、総会の承認を受けることが決定された。
 - (5) 平成 14 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 23 号の発行予定を決定した。
 - (6) 平成 14 年度の予算について話し合わせ、平成 14 年度予算計画案が作成された。
 - (7) 第 7 期（平成14年～16年度）役員の選出にあたり、第 6 期評議員の岡庭 梓、三日月勝見、小嶋明廣、竹之下洋司（ご逝去）より評議員辞退の申し出があり承認された。
新評議員として、新比恵啓志（田辺製薬）、坪田裕司（和歌山県立医大）、岡田利也（大阪府立大）、桑村 充（大阪府立大）、堀江成光（参天製薬）、庫本高志（国立がんセンター）、竹之下 誠（ケアリー）の 7 名の選出を評議員会に諮ることが決定された。第 7 期会長には芹川忠夫 が選出された。また、北田一博 より庶務幹事、森岡宏至 より集会幹事、三日月勝見 より編集幹事辞退の申し出があり、これを了承した。新幹事には庫本高志（庶務会計）、岡田利也（集会幹事）、浅田 孝（編集幹事）が選出された。監事には清水英男、高木貞明 の両名が選出された。
 - (8) 第 74 回研究会を 6 月 14 日、第 75 回を 9 月 6 日に大阪で開催し、第 76 回研究会は 12 月 6 日に京都で開催することが決定された。

2) 第 20 回評議員会の概要（平成 14 年 3 月 8 日 於 京大会館）

1. 出席：浅田、浅野、阿部、飯田、池田、稲垣、内海、江馬、及川、岡本、喜多、北田、黒澤、久保、塩見、鈴木、芹川、田島、千葉、螺良、鳥居、中井、新谷、原田、平川、平沢、古河、前田、増岡、宮嶋、宮脇、森岡、森島、森本、安田、山添、山中、山本、吉田、新比恵、岡田、庫本、桑村、竹之下、坪田、（46名）
2. 議事
 - (1) 役員の改選（第 7 期 平成 14 年～ 16 年）
評議員 再任：旧評議員は承諾書の提出により第 7 期評議員となることが承認された。
新任：新比恵啓志（田辺製薬）、坪田裕司（和歌山県立医大）、岡田利也（大阪府立大）、桑村 充（大阪府立大）、堀江成光（参天製薬）、庫本高志（国立がんセンター）、竹之下 誠（ケアリー）、平沢 勉（塩野義製薬）以上

8 名が推薦書を提出し、承認された。

退任：岡庭梓、三日月勝見、小嶋明廣、竹之下洋司（ご逝去）以上 4 名より退任の届け出があり受理された。

会長 芹川忠夫の再任が決定された。

幹事 北田、三日月、森岡の 3 名の辞退が承認され、庶務会計に庫本、集会幹事に岡田、編集幹事に浅田が選出され承認された。

監事 清水英男、高木貞明の両氏が再任された。

(2) 会則の改正

評議員会費の新設（II. 会員（6）の改正）

個人会費、維持会費以外に平成 14 年度から評議員会費（5,000 円）を新設することが提案され、承認された。

事務局の名称変更（VI. 附則（23）の改正）

「京都大学医学部附属動物実験施設」を「京都大学大学院医学研究科附属動物実験施設」に変更することが提案され承認された。

- (3) 平成 13 年度事業報告：阿部幹事（集会）より平成 13 年度事業報告が行われ、承認された。
- (4) 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 号が発行されたことが報告され、承認された。
- (5) 平成 13 年度決算報告：喜多幹事（庶務）より平成 13 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 13 年度決算報告が承認された。
- (6) 平成 14 年度事業計画案：阿部幹事（集会）より平成 14 年度事業計画案が説明され、承認された。
- (7) 平成 14 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 23 号の発行を予定している旨説明され、承認された。
- (8) 平成 13 年度予算案：喜多幹事（庶務）より平成 14 年度の予算案が説明され、承認された。
- (9) 芹川会長より、評議員に対して、新しい維持会員の勧誘について協力が求められた。
- (10) その他
 - ・竹之下洋司評議員のご逝去 総会で黙祷を捧げることが承認された。
 - ・情報公開請求の動向 京都大学、滋賀医科大学、大阪大学に対する情報公開請求の動向について芹川、鳥居両氏から説明があった。

3) 第 19 回総会の概要（平成 14 年 3 月 8 日 於 京大会館）

- (1) 旧評議員（辞退者を除く）の再任が決定されまた、新評議員に坪田、岡田、桑村、庫本、堀江、新比恵、竹之下、平沢の 8 名が推薦され承認されたことが報告された。
- (2) 会長に芹川忠夫が再任されたことが報告された。
- (3) 幹事の北田、三日月、森岡の 3 名の辞退が報告され、庶務会計幹事として庫本、集会幹事として岡田、編集幹事として浅田が選出されたことが報告された。
- (4) 幹事に清水、高木の両氏が再任されたことが報告された。

- (5) 会則Ⅱ. 会員 (6) 評議員会費の新設、及びⅥ. 附則 (23) 事務局を「京都大学医学部附属動物実験施設内」から「京都大学大学院医学研究科附属動物実験施設内」に変更することが提案され、承認されたことが報告された。
- (6) 平成 13 年度事業報告が行われ、承認された。
- (7) 平成 13 年度においては、関西実験動物研究会会報第 22 号が発行されたことが報告された。
- (8) 平成 13 年度収支決算報告が行われ、清水監事より、監査の結果適正であったことが報告され、承認された。
- (9) 平成 14 年度事業計画案が説明され、承認された。
- (10) 平成 14 年において、関西実験動物研究会会報第 23 号の発行を予定していることが説明され、承認された。
- (11) 平成 14 年度の予算案が説明され、承認された。

(敬称 略)

《会員の異動》

(平成13年11月～平成14年10月)

入会者	山本 利男	(財) 食品農医薬品安全性評価センター 事業部
	福田 綾子	(株) 新日本科学
	増田 亜紀	塩野義製薬(株)
	堀江 成光	参天製薬(株) 奈良研究開発センター
	庫本 高志	国立がんセンター研究所 発がん研究部
	木下 邦明	ポーラ化成工業(株) 医薬品開発研究部 動物管理室
	丁畑 勇一	(株) ケーエーシー
	平山 信恵	(株) 新日本科学
	島 朋絵	日本チャールスリバー(株)
	勝田 敦美	(有) 行動医科学研究所
	上田 正次	(株) ワイエスニューテクノロジー研究所
	山梶 圭二郎	日本チャールスリバー(株)
	鈴木 稔	塩野義製薬(株)
	蓮間 忠芳	生活科学研究所
退会者	竹之下 洋司	ケアリー
	本山 守夫	実医研(株)
	渡辺 清	塩野義製薬(株) 実験動物研究センター
	政本 浩二	湧永製薬(株) 中央研究所
	沼沢 拓身	日本臓器製薬(株)
	鳶田 好文	日本クレア(株) 石部生育場
	川西 和夫	科研製薬(株) 製剤研究部
	大森 吉明	(株) 武田ラビックス 系統管理部
	榎本 康弘	日本農産工業(株)
	中尾 康裕	小野薬品工業(株) 動物管理課
	浜田 祐二	セアック吉富
	辰巳 光義	藤沢テクニス(株) 業務4部 RI 施設
	螺良 義彦	
	野澤 謙	
	松浦 稔	
	中尾 博之	塩野義製薬(株) 実験動物研究センター
	西宗 義武	大阪大学微生物病研究所
	佐藤 公道	京都大学薬学部薬理学教室
	浅沼 武敏	北海道大学大学院獣医学研究科放射線学教室
	小嶋 明廣	
	石川 尚明	三協ラボサービス(株) つくば営業所
	中島 文晴	(株) 化合物安全性研究所 病理検査室
	山本 孝史	不二製油(株) 生物化学研究所
	山元 勝一	塩野義製薬(株) 実験動物研究センター
	前田 昌也	大阪府立大学・農・獣医病理

（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 潔	480-1103	愛知県愛知郡長久手町大字岩作字雁又	愛知医科大学附属動物実験施設
	吾郷 昭夫	693-8501	出雲市塩冶町 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
	東 文男	640-1473	和歌山県海草郡美里町毛原宮 486	(株)紀和実験動物研究所
	足立 民子	532-8505	大阪市淀川区加島 3-16-89	田辺製薬（株）安全研
	◎◎ 阿部 敏男	532-8686	大阪市淀川区十三本町 2-17-85	(株)武田ラビックス 系統管理部
	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)環境バイリス研究所
	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鳥居野 121-1	バイエル薬品（株）滋賀工場品質管理
	○ 池田 克己	663-8137	西宮市池開町 6-46	武庫川女子大学 生活環境学部
	石川 隆司	564-0053	吹田市江ノ木町 3 3 - 9 4	大日本製薬（株）総合研究所
い	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）油日ラボラトリーズ
	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 上田 正次	520-1156	栃木県下都賀郡石橋町下石橋 519	(株)ワイエスニューテクノロジー研究所
	○ 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	大阪市都島区友浜町 1-5-90	日本オルガノン（株）研究開発本部薬事申請部
	え◎◎ 江馬 真	540-8146	大阪市中央区法円坂 1-4-43	国立医薬品食品衛生研究所
	お○ 及川 弘	525-0028	滋賀県草津市上笠 2-1-8-1	
	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	京都府福知山市字興 493	
い	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
	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
	岡 智通	365-0039	埼玉県鴻巣市東 1-1-25	(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	大阪府堺市学園町 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)ボゾリサーチセンター
	○ 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夷野 224-2	大鵬薬品（株）
	勝田 敦美	673-0885	明石市桜町 14-16	(有)行動医科学研究所
	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
か	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
	錦木 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

関西実験動物研究会（個人会員名簿）2002年10月現在

	氏名	〒	住所	所属
	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
	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	060-0810	札幌市北区北10条西8丁目	北海道大学先端科学技術共同研究センター
	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
	木下 邦明	224-0812	横浜市戸塚区粕尾町560	ポーラ化成工業（株）医薬品開発研究部動物管理室
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
○○	庫本 高志	104-0045	東京都中央区築地 5-1-1	国立がんセンター研究所発がん研究部
	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	大阪市中央区道修町 2-2-8	住友製薬（株）開発計画推進部
	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 大二	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 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
	鯉島 秀暢	890-0011	鹿児島市玉里団地 1 丁目 22-19	
	澤浦 雅人	550-0005	大阪市西区西本町 1-6-2 阿波堀ビル8F	日本チャールズリバー（株）
し	塩田 恒三	602-0000	京都市上京区河原町広小路	京都府立医科大学医動物学教室
○○	塩見 雅志	650-0017	神戸市中央区楠町 7-5-1	神戸大学医学部附属動物実験施設
	柴生田 正樹	541-0045	大阪市中央区道修町 2-3-6	武田薬品工業（株）薬事管理部監査室
	島 朋絵	550-0005	大阪市西区西本町 1-6-2 阿波堀ビル8F	日本チャールズリバー（株）
	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
	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
す	菅原 努	606-8225	京都市左京区田中門前町 103	パストゥールビル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
	鈴木 稔	520-3423	滋賀県甲賀郡甲賀町五反田1405	塩野義製薬（株）
	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	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
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	パストゥールビル5 F（財）体質研究会
○	竹之下 誠	648-0003	橋本市隅田町山内 514	
○○	田島 優	565-0871	吹田市山田丘 2-2	大阪大学医学部附属実験動物施設
○	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	日本チャールズリバー（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
	丁畑 勇一	604-8423	京都市中京区西の京西月光町 40	（株）ケーエーシー
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

	氏名	〒	住所	所属
	辻 嘉昭	650-0033	神戸市江戸町85-1	ベリウイグ神戸ビル801号
	都築 政起	739-0046	東広島市鏡山1-4-4	アリアゲヤ株式会社
○	蝶良 愛郎	570-0074	守口市文園町10-15	広島大学生物生産学部家畜育種学教室
○	坪田 裕司	641-0012	和歌山市紀三井寺 811-1	関西医大・第2病理
	津村 秀樹	514-0001	三重県津市江戸橋 2-174	和歌山県立医大第二生理学
と	證 友成	564-0043	吹田市南吹田 4丁目 4-1	三重大学医学部附属動物実験施設
	堂前 嘉代子	663-8558	西宮市池開町6-46	オリエンタル酵母工業（株）大阪バイオ営業所
	徳本 和弥	566-0022	摂津市三島 2丁目 5番 1号	武庫川女子大学生活環境学部
○◎	島居 隆三	520-2192	滋賀県大津市瀬田月輪町	塩野義製薬（株）摂津工場生物試験課
な	中井 健史	520-3423	滋賀県甲賀郡甲賀町五反田 1405	滋賀医科大学医学部附属動物実験施設
○	中井 伸子	601-8550	京都市南区西大路八条下ル	塩野義製薬（株）実験動物研究センター
	中井 洋一	503-0628	岐阜県海津郡海津町福江290	日本新薬（株）安全性研究所
	中川 和年	771-0132	徳島市川内町平石字夷野 224-2	（株）日本生物科学センター
	中川 照文	125-0041	東京都葛飾区金町3-5-13	大腸薬品（株）
	長澤 久充	610-0121	京都府城陽市寺田深谷 7-76	科研製薬（株）
	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	大阪府都島区友通町1-5-90	日本オルガノン（株）医薬研究所
	中山 亮	666-0112	川西市大和西 3-28-10	
	夏目 克彦	113-8551	東京都文京区湯島 2-18-6	夏目製作所（株）
	並河 知子	535-0004	大阪市旭区生江 1丁目 8-14	沢井製薬（株）研究部
に○◎	新谷 聡	565-8565	吹田市藤白台 5-125	国立循環器病センター研究所
	西川 健志	605-8550	京都市南区西大路通り八条下ル	日本新薬（株）安全性研究所
	西川 哲	431-3192	浜松市半田山 2-20-1	浜松医科大学 動物実験施設
	西村 孝義	528-0052	滋賀県甲賀郡水口町宇川稲場 555	（株）環境バイロックス
	西村 正彦	466-0065	名古屋市中区鶴舞町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
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）油日ラボトリーズ
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
	蓮間 忠芳	550-0005	大阪市西区西本町2-5-19	生活科学研究所
	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
	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	大阪府中央区法円坂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	横浜市中区みなとみらい2-2-1ランドマークタワー40F	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	553-0002	大阪市福島区鷺洲 5-12-4	塩野義製薬（株）中央研究所
	疋田 精一	607-8042	京都市山科区四ノ宮南河原町	科研製薬（株）総合研究所
	日高 隆義	676-0027	兵庫県高砂市高砂町宮前町 1-8	鐘淵化学工業（株）高砂研究所
○	平川 公昭	590-0422	泉南郡熊取町希望が丘 1-4-21	（株）新日本科学 薬物代謝分析センター
○	平沢 勉	520-3423	滋賀県甲賀郡甲賀町五反田 1405	塩野義製薬（株）実験動物研究センター
	平山 信恵	641-0012	和歌山市紀三井寺 672 ドエル紀三井寺405	（株）新日本科学
ふ	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
	福岡 俊文	554-0022	大阪市此花区春日日出3-1-98	住友化学工業（株）生物環境科学研究所
	福西 克弘	892-0871	鹿児島県鹿児島市吉田町宮之浦 2438	（株）新日本科学
	福田 綾子	892-0871	鹿児島県鹿児島市吉田町宮之浦 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	干場 純治	700-0914	岡山市鹿田町 2-5-1	岡山大学医学部附属動物実験施設
○	堀江 成光	630-0101	生駒市高山町 8916-16	参天製薬（株）奈良研究開発センター
	堀江 信一	541-0044	大阪府中央区伏見町 2-1-1住友銀行高麗橋ビル	（株）新日本科学
	堀江 良一	693-0021	出雲市塩治町 89-1	島根医科大学第2病理学教室
ま	前田 勝弘	564-0053	吹田市江の木町 33-94	大日本製薬（株）研究管理部動物飼育室
○◎	前田 敏宏	564-0053	吹田市江の木町 33-94	大日本製薬（株）研究管理部動物飼育室
	真壁 恭子	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

関西実験動物研究会（個人会員名簿）2002年10月現在

	氏名	〒	住所	所属
○	牧野 進	528-0005	滋賀県甲賀郡水口町水口1639-28 松尾団地	
	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
	増田 亜紀	561-0825	大阪府豊中市二葉町3-1-1	塩野義製薬（株）
	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）森永生科学研究所
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	大阪大学医学部付属がんセンター腫瘍生化学講座
	水野 洋子	567-0048	大阪府茨木市北春日丘4-5-32 B101	
	三原 匠子	410-0866	静岡県沼津市市道町 13-4 本山方	
☆○	宮駕 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	560-0011	豊中市上野西 1-12-22	
○◎	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	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	591-8022	堺市金岡町 1200-6	
	森岡 一輝	544-8666	大阪市生野区異西 1-8-1	ロート製薬（株）生物臨床研究部開発支援G
	森島 英喜	532-8686	大阪市淀川区十三本町 2-17-85	武田薬品工業（株）薬物機能第二研究所
	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	大阪薬科大学実験動物センター
	安原 吉高	532-8686	大阪市淀川区十三本町 2-17-85	武田薬品工業（株）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
	山嵜 圭二郎	550-0005	大阪市西区西本町 1-6-2 阿波堀ビル8F	日本チャールズリバー（株）
	山北 修	771-0132	徳島市川内町平石字夷野 224-2	大鵬薬品工業（株）製薬業務部 QAU課
	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 宜永	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
○◎	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
	山本 利男	437-1213	静岡県磐田郡福田町塩新田582-2	（財）食品農医薬品安全性評価センター 事業部
	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）新薬研究所
○	吉田 元信	563-0011	池田市伏見町103	大日本製薬（株）アミノ酸部研究所
	吉船 伸一	567-0806	茨木市庄 2丁目 24-3	（株）アズエール
	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
わ	若狭 芳男	399-4501	長野県伊那市西策輪 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
	和田 あづみ	105-8461	東京都港区西新橋 3-25-8	東京慈恵医大・総合医科学研究セ・実験動物

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：kansaijim@anim.med.kyoto-u.ac.jp）にご連絡下さい

関西実験動物研究会 維持会員名簿

(五十音順) (平成 14 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	(株) 大塚製薬工場 鳴門研究所	772-0017	徳島県鳴門市撫養町立岩字芥原 115
3	オリエンタル酵母 (株) 大阪バイオ営業所	564-0043	吹田市南吹田 4-4-1
4	(株) オリエンタル・バイオサービス	615-0882	京都市右京区西京極葛野町 28 番地
5	(株) サンプラネット 川島事業本部	501-6024	岐阜県羽島郡川島町竹早町2-1
6	北山ラベス (株)	396-0021	長野県伊那市荒井区川北 3052
7	(株) 共生 カルモア事業部	453-0856	名古屋市中村区並木2丁目68
8	(株) ケアリー	531-0072	大阪市北区豊崎 4-12-1
9	(株) ケー・エー・シー	604-8423	京都市中京区西の京西月光町 40
10	参天製薬 (株) 中央研究所	533-0021	大阪市東淀川区下新庄 3-9-19
11	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	塩野義製薬 (株) 医薬研究開発本部	520-3423	滋賀県甲賀郡甲賀町五反田 1405
13	白井松器械 (株)	540-0003	大阪市中央区森ノ宮中央 1-19-16
14	(株) 新日本科学	892-0871	鹿児島県鹿児島郡吉田宮之浦2438
15	セアック吉富 (株)	871-0801	福岡県築上郡吉富町大字小祝 955
16	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
17	武田薬品工業 (株) 医薬研究本部	532-8686	大阪市淀川区十三本町 2-17-85
18	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
19	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
20	(株) 夏目製作所	113-0034	東京都文京区湯島 2-18-6
21	日本エスエルシー (株)	601-8151	京都市南区上鳥羽塔ノ森東向町 93-8
22	日本オルガノン (株)	534-0016	大阪市都島区友淵町 1-5-90
23	日本クレア (株) 大阪事業所	564-0053	大阪府吹田市江の木町 6-5
24	日本新薬 (株) 創薬研究本部	601-8550	京都市南区吉祥院西ノ庄門口町 14
25	日本チャールス・リバー (株)	550-0005	大阪市西区西本町 1-11-7
26	日本ベーリンガー・インゲルハイム (株)	666-0193	兵庫県川西市矢間3丁目10-1
27	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
28	藤沢薬品工業 (株) 企画部 研究開発	532-8514	大阪市淀川区加島 2-1-6
29	丸石製薬 (株) 中央研究所	538-0042	大阪市鶴見区今津中 2-2-18
30	三浦工業 (株) メディカル西日本営業部	533-0011	大阪市東淀川区大桐 2-7-12 三浦ビル
31	三菱ウエルファーマ (株) 研究本部 安全性研究所	679-2296	兵庫県神崎郡福崎町山崎 214-1
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 : kansaijim@anim.med.kyoto-u.ac.jp)

入会

白井松器械 (株)

三浦工業 (株) メディカル西日本営業部

退会

(株) 実医研

扶桑薬品工業 (株) 研究開発センター

関西実験動物研究会 評議員名簿

(平成14年度～16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 克巳	京都大学大学院人間環境学研究科
稲垣 晴久	塩野義製薬(株)
新比恵 啓志	田辺製薬(株) 安全性研究所
内海 健二郎	(株)ケーエーシー
海野 隆	日本オルガノン(株) 研究開発研究部
江馬 眞	国立医薬品食品衛生研究所
及川 弘	
岡田 利也	大阪府立大学大学院農学生命科学科獣医学
岡本 宗裕	鳥取大学農学部獣医学科実験動物機能学
喜多 正和	京都府立医科大学実験動物室
北田 一博	北海道大学先端科学共同研究センター
庫本 高志	京都大学大学院医学研究科附属動物実験施設
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
桑村 充	大阪府立大学大学院農学生命科学科獣医学病理
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 誠	(株)ケアリー和歌山研究所
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
坪田 裕司	和歌山県立医科大学第二生理
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 聡	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	大阪市立大学大学院医学研究科動物実験施設
平川 公昭	(株)新日本科学
平沢 勉	塩野義製薬(株) 実験動物研究センター

氏名	所属
古河 恵一	近畿大学医学部共同研実験動物室
堀江 成光	参天製薬（株）奈良研究開発センター
前田 敏宏	大日本製薬（株）研究管理部動飼室
牧野 進	塩野義製薬（株）実験動物研究センター
増岡通夫	（株）ケーエーシー生物科学センター
宮嶋 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	
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）アミライズ部

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：kansaijim@anim.med.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 14 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：	庫本 高志	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	日本オルガノン(株) 研究開発本部 薬事申請部
	江馬 真	国立医薬品食品衛生研究所 総合評価研究室
	岡田 利也	大阪府大大学院農学生命科学研究科実験動物医学研
	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
	森本 純司	大阪医科大学実験動物センター
編集：	山本 好男	滋賀医科大学法医学教室
	浅田 孝	藤沢薬品工業(株) 開発第一研究所
	飯田 晶敏	日本エスエルシー(株)
	鳥居 隆三	滋賀医科大学医学部附属動物実験施設
	新谷 聡	国立循環器病センター研究所
	宮脇 茂樹	日本新薬(株) 東部創薬研究所
	山中 久	(株) イナリサーチ大阪支所
監事：	清水 英男	清水実験材料(株)
	高木 貞明	日本エスエルシー(株)

平成14年12月15日 印 刷
平成14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23号
Kansai Journal of Laboratory Animals
平成14年12月

第71回研究会：マウス・ラットの行動解析と痴呆症の動物モデル

海老原 史樹文：概日行動の分子生物学 3

宮本 政臣：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 7

山本 経之ほか：作業記憶に対する炎症性サイトカイン及びアミロイド前駆体蛋白末端フラグメントの作用に関する行動薬理学的検討 15

第72回研究会

森脇 和郎：マウスの歴史と遺伝子の歴史 25

芹川 忠夫：実験用ラットの価値 27

抄録：会員による研究発表（15題） 37

第73回研究会：動物を用いた発がん研究の最前線

牛島 俊和：実験動物を用いたヒト発がん研究—モデルの特徴を見つめて— 55

福島 昭治ほか：環境因子の発がんリスク：環境発がん物質に閾値が存在するか 58

第74回研究会：生殖・発生研究の最前線

眞鍋 昇：卵胞選択の制御機構：顆粒層細胞に特異的な新規細胞死受容体について 71

若山 照彦：核の初期化機構とクローン技術の応用 79

〈関西実験動物研究会だより〉 85

幹事会、評議員会、総会の議事概要 86

会員の異動 89

個人会員名簿 90

維持会員名簿 94

評議員名簿 95

会長、幹事、監事名簿 97