

関西実験動物研究会会報

Kansai Journal of Laboratory Animals

平成16年12月 25号

関西実験動物研究会

Kansai Laboratory Animal Research Association

目 次

〈第79回研究会（平成15年9月26日）〉

テーマ：腎疾患モデルと投与採血の指針

1. 線維芽細胞を中心とした間質線維化の発症機構について
岩野 正之（奈良県立医大・第一内科学） 3
2. 純系高IgA血症マウス（HIGA）の開発と病態解析
武曾 恵理（財田附興風会医学研究所・北野病院） 7
3. 被験物質の投与（経路と容量を含む）及び採決に関する手引き
中井 伸子（日本新薬(株)・安全性研究部） 9

〈第80回研究会（平成15年12月5日）〉

〈記念フォーラム〉 動物実験の明日を考える

1. 動物実験と実験動物施設が抱える明日への問題点
池田 卓也（グラクソ・スミスクライン(株)） 29
2. ポストゲノム時代と産官学連携時代における実験動物学
北田 一博（北大・先端科学技術共同研究センター） 39
3. 国際的実験動物、動物実験の法規制の趨勢そして国立大学の独立行政法人化
黒澤 努（大阪大・医・動物実験施設） 44

〈特別講演〉

重点先端分野（BT、IT、NT）の融合という名の研究推進

- 鳥居 宏次（奈良先端科学技術大学院大学） 47

〈特別シンポジウム〉 実験動物のたいなる活用

1. プラナリアに再生の秘密を学ぶ
阿形 清和（理研、発生・再生科学総合研究センター） 52
2. 生命医科学における脊椎動物モデルとしてのメダカ
古谷一清木 誠（科学技術振興財団・近藤誘導分化プロジェクト） 57
3. 滑らかな運動制御のための脳による情報処理
河野 憲二（京都大院・医・認知行動脳科学） 58

〈第81回研究会（平成16年3月5日）〉

テーマ：糖尿病モデル動物の開発、解析、そして応用へ

1. KDPラット：1型糖尿病モデルの特性と解析

横井 伯英（神戸大院・医・細胞分子医学）----- 65

2. 糖尿病モデルマウス－Akita mouseの特性 ー何が面白いのかー

小泉 昭夫（京都大院・医・環境衛生学）----- 74

〈第82回研究会（平成16年6月25日）〉

テーマ：再生医療を支える基礎研究のトピックス

1. ES細胞分化の試験管内誘導

西川 伸一（理化学研究所・CDB）----- 87

2. 生殖細胞系列におけるゲノムインプリンティング研究の最新のトピックス

石野 史敏（東京医科歯科大・難治疾患研・エビジェネティクス分野）--- 91

〈関西実験動物研究会だより〉----- 99

〈幹事会、評議員会、総会の議事概要〉----- 101

〈会員の異動〉----- 104

〈個人会員名簿〉----- 105

〈維持会員名簿〉----- 109

〈評議員名簿〉----- 110

〈会長、幹事、監事名簿〉----- 112

〈第79回研究会（平成15年9月26日）〉

テーマ：腎疾患モデルと投与採血の指針

1. 線維芽細胞を中心とした間質線維化の発症機構について

岩野 正之（奈良県立医大・第一内科学）

2. 純系高IgA血症マウス（HIGA）の開発と病態解析

武曾 恵理（財田附興風会医学研究所・北野病院）

3. 被験物質の投与（経路と容量を含む）及び採決に関する手引き

中井 伸子（日本新薬(株)・安全性研究部）

線維芽細胞を中心とした間質線維化の発症機構について

奈良県立医科大学第1内科 岩野正之

はじめに

臓器不全の発症および進展には間質線維化が深く関与している。したがって、間質線維化の発症機序を解明することは、臓器不全の進展を抑制するために不可欠といえる。培養線維芽細胞が間質型コラーゲンを産生することから、古来、線維芽細胞は線維化の進展に重要な役割を果たすと考えられてきた。しかし、線維芽細胞が生体内で線維化の進展に関与することを直接証明した報告はない。また、線維芽細胞の起源については、ほとんど研究が行われていないのが現状である。本研究でわれわれは、各種トランスジェニックマウス (TG)を用いて、線維化における線維芽細胞の役割と線維芽細胞の起源について検討したので紹介したい。

1. マウス生体内での線維芽細胞の役割

Neilson らは、線維芽細胞の特異的マーカーである fibroblast specific protein 1 (FSP1)をクローニングし、FSP1 遺伝子上流解析から線維芽細胞に特異的なプロモーター領域を同定した。われわれは、FSP1 のプロモーター領域に thymidine kinase 遺伝子を繋いで構築されたトランスジーンを導入し、TG (FSP1.TK)を作成した。一側尿管閉塞 (UUO) により腎間質線維化を惹起後、FSP1.TK およびコントロールマウスに ganciclovir (GCV)を腹腔内投与した。GCV の投与で、間質線維化を惹起した FSP1.TK での腎皮質線維芽細胞数 (FSP1 陽性細胞数)は著しく減少していた。次に間質線維化面積を Masson's trichrome 染色および Collagen type1 染色により評価した。GCV の投与で、間質線維化を惹起した FSP1.TK での間質線維化面積は、コントロールマウスに比し、有意に減少していた。以上より、FSP1 陽性線維芽細胞が間質線維化の進展に重要であることが証明された。

2. 線維芽細胞の起源について

線維芽細胞の起源を検討する目的で、Cre-loxP システムを用いて epithelial mesenchymal transition (EMT) の直接証明を試みた。ROSA26 プロモーターに STOP cassette および LacZ 遺伝子を繋いで構築されたトランスジーンを導入し

た TG と近位尿細管上皮細胞で特異的な活性を示す γ glutamyl transferase (γ GT) プロモーターに Cre 遺伝子を繋いで構築されたトランスジーンを導入した TG を交配して Double TG を作成し、近位尿細管上皮細胞を LacZ 遺伝子でパーマネント標識した (図 1)。Double TG に間質線維化を惹起後、間質線維芽細胞での LacZ の発現が認められたことから、線維芽細胞の起源には EMT も関与することが示唆された。

次に、FSP1 のプロモーター領域に EGFP 遺伝子を繋いで構築されたトランスジーンを導入し、TG (FSP1.GFP) を作成した。FSP1.GFP から骨髓細胞を採取し、放射線照射した同系マウスに骨髓移植した。30 日後、UUO によりレシピエントマウスに間質線維化を惹起した。間質線維化領域に、FSP1 陽性かつ GFP 陽性細胞が認められたことから、骨髓細胞由来の線維芽細胞も存在することが示唆された。

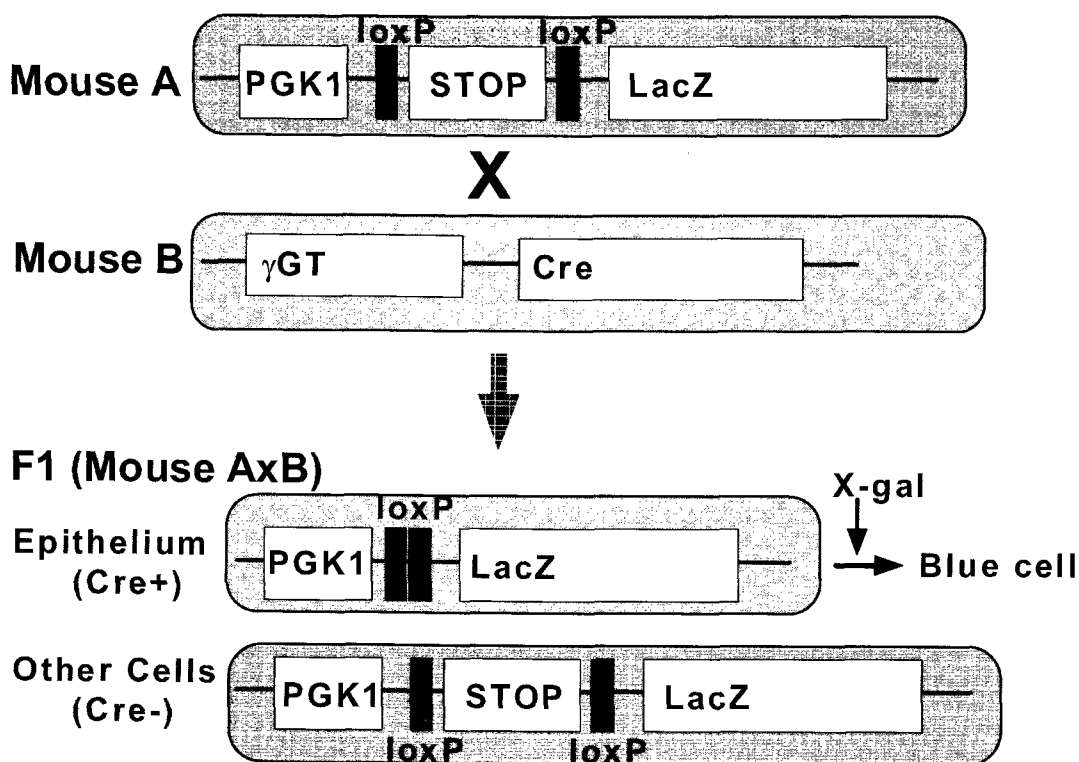


図 1. Cre-loxP システムによるパーマネント標識の原理

3. ヒト糸球体腎炎の進展における FSP1 陽性細胞の役割

腎間質線維化の進展における FSP1 陽性細胞の役割を検討する目的で、腎生検組織における FSP1 陽性細胞数と各種臨床指標、間質病変の程度および IgA 腎症患者の予後との関連を検討した。対象は腎生検施行時に腎機能が正常であった IgA 腎症患者 142 例である。約 8 年間の経過観察を実施し、比例ハザードモデルで予後判定因子を検討した。FSP1 陽性細胞は間質線維化領域に集積しており、HSP47 を発現していた。FSP1 陽性細胞と α SMA 陽性細胞の局在は全く一致しなかった。FSP1 陽性細胞数は、血清クレアチニン値 ($r = 0.73$) および間質線維化面積 ($r = 0.80$) と強い正相関を示した。腎生検所見の中で、FSP1 陽性細胞数のみが有効な予後判定因子であり (relative risk = 19.9)、 α SMA 陽性領域は、有意な予後判定因子とならなかった。FSP1 陽性細胞は、間質線維化の進展に重要な役割を果たすことが明らかになった。

おわりに

間質線維化の進展機序には、サイトカインやケモカインの産生亢進、細胞接着分子や細胞外基質の過剰発現、炎症細胞の浸潤など多因子が複雑に関与している。しかし、今回のわれわれが行った FSP1 をマーカーとした線維芽細胞の研究から線維芽細胞の役割や起源が明らかとなり、間質線維化の治療戦略において標的になる主要細胞は線維芽細胞であることが判明した。したがって、線維芽細胞の増殖抑制および運動能調節、線維芽細胞からの間質型コラーゲンの産生抑制、EMT の出現阻止など、線維芽細胞をターゲットとした間質線維化に対する新しい治療戦略が考えられる。

参考文献

Iwano M, Fischer A, Okada H, Plieth D, Xue C, Danoff TM, Neilson EG. Conditional abatement of tissue fibrosis using nucleoside analogs to selectively corrupt DNA replication in transgenic fibroblasts.

Mol Ther. 2001 Feb;3(2):149-59.

Iwano M, Plieth D, Danoff TM, Xue C, Okada H, Neilson EG. Evidence that fibroblasts derive from epithelium during tissue fibrosis. J Clin Invest 2002;110(3):341-350.

Iwano M, Neilson EG. Mechanisms of tubulointerstitial fibrosis. Curr Opin Nephrol Hypertens (in press)

Nishitani Y, Iwano M, et al. Fibroblast-specific protein 1 is a specific prognostic marker for long-term renal survival in patients with IgA nephropathy. (submitted)

純系高 IgA 血症マウス(HIGA)の開発と病態解析

武曾 恵理 ((財) 田附興風会北野病院 腎臓内科)

はじめに：現在慢性透析患者の数は21万人を超えるが、その原疾患の35%をしめる慢性糸球体腎炎のうち過半数をしめている IgA 腎症は10年間の腎の生存率が57-94%とされ、発症年齢が20—30歳代の若年者が多いことを考慮すると本疾患の進行による社会的損失は多大なものがある。この疾患の発症進展機序を解明し、その阻止を考える上で、本症自然発症モデルの開発が望まれていたが、我々は本疾患の特性である、血清 IgA 高値を呈する high IgA (HIGA) マウスを開発した。

HIGA マウス開発の経緯： IgA 腎症の定義は腎の糸球体に IgA 優位の免疫複合体沈着を認めることであるが、血清学的に高 IgA 血症が約半数の患者で認められる。この特性に注目して、遺伝的に不均一ながら従来本疾患のモデルとされてきた ddY マウスの、高 IgA 血症を呈するものを選択して交配を繰り返し、若年から均一に IgA 高値を呈する純系 high IgA マウス (HIGA) を確立した。

HIGA マウスの病態：本マウスは約25週令から血清 IgA の優位な高値をしめすが、これとともに腎にも IgA の優位な沈着をメサンギウムを中心に認める。さらにこれに伴ってメサンギウム細胞の増殖から週令が進むとむしろ TGF β の発現増強をとまなう CollagenIV, Fibronectin などの基質蛋白の増生による糸球体硬化が進行する。

IgA 分子の特性と産生経路：本マウスの血中 IgA は多量体が中心となり、そのクロノタイプは広がる傾向が強かったが、腎沈着 IgA は酸性に荷電した二量体が優位であり、その hinge 部の糖鎖の異常についても血中、腎沈着 IgA とともにシアル酸とガラクトースの欠損が確認されほぼヒト IgA 腎症における特性を有していた。その IgA 分子産生については脾細胞で表面 IgA 陽性 B 細胞の比は HIGA マウスで有意に多く、また腸管付属リンパ装置構成細胞では IgA+B220-細胞が小腸粘膜固有層単核球内に加齢とともに有意に増加していた。一方、本マウスに正常マウスの骨髄移植を行い、腎病変の改善を見たという観察結果より、骨髄由来細胞の関与も否定できず、骨髄と粘膜由来両方の細胞異常が本マウスの IgA 産生異常の実態である可能性が強い。

HIGA マウスにおける Th1/Th2 バランスとサイトカインの発現異常：本マウスの脾臓 CD4 細胞への PHA による増殖刺激への反応および Th1 を誘導するサイトカインである IL-12 の投与実験による半月外形成性病変誘導より、潜在する Th2 優位性と TGF β 発現増強がその硬化病変と高 IgA 血症を誘導しているが、ひとたび Th1 が刺激を受けると、活動性病変を呈して、さらにこれが硬化を進行させる事が考えられた。

本マウス特性形質の遺伝子解析：21 の染色体に均一に分布する 113 個のマイクロサテライトマーカーを用いた QTL 解析により、高 IgA 血症、多量体 IgA、

糸球体 IgA 沈着のそれぞれの形質を支配する遺伝子座の同定がなされている。注目すべきはそれぞれが独立した部位に位置することが確認されつつあることで、これらの IgA 腎症特異的とされる形質の病態への関与は多元的であることが示唆されている。

被験物質の投与(経路と容量を含む)及び採血に関する手引き

日本新薬㈱ 中井 伸子

A Good Practice Guide to the Administration of Substances and Removal of Blood, Including Routes and Volumes. (被験物質の投与及び採血に関する手引き) が、EFPIA(欧州連邦製薬工業協会)および ECVAM(欧州代替法バリデーションセンター)により作成された¹⁾。これは、製薬企業で動物実験に携わる者にとって待望のものであり、その内容は、全ての動物実験を行う研究者にとって有用なものであると思われた。ただし、英語の原文では日常の手引き書として活用しにくいため、翻訳したものを関係者に私信として配布したところ、より多くの動物実験を行う研究者に活用してもらうために、関西実験動物研究会で紹介してはどうかとの声がかかり、ここで本書を紹介することになった。今回は、翻訳した手引きの内容を中心に、一部周辺事情等も含めて紹介する。

動物実験を行うに当たって考慮すべき重要なポイントとして、国内の法律、国際的な基準および国際的にハーモナイズされた基準などがある。また、その実験処置の細部に至るまで、客観的な妥当性の確保が必要となる。

これらの法律や基準などは、各機関の動物実験施設のホームページにも記載されているが、例えば以下のようなものがある。

- ・動物の愛護および管理に関する法律（環境省）
- ・実験動物の飼養及び保管等に関する基準（総理府）
- ・動物の処分方法に関する指針（総理府）
- ・医薬品の安全性に関する非臨床試験の実施の基準に関する省令(G L P)(厚生労働省)
- ・医薬品のための毒性試験法ガイドライン（厚生労働省）
- ・安全性薬理試験ガイドライン（厚生労働省）
- ・組換え DNA 実験指針（文部科学省）

また、ヨーロッパでは政府機関の、アメリカではIACUC（所内動物実験倫理委員会）のデータベース（<http://www.iacuc.org/>）にも参考になるガイドラインが網羅されており、ここで紹介する投与と採血の手引きもすでに活用されている。

本書が作成された目的の1つは、安全性試験の現場において試験計画を立てる際の参考資料にすると同時に、実験動物の愛護にも最大限配慮することである。更に、重要なポイントとして、動物実験の重複を避けること、すなわち、研究所間で積極的にデータ、経験、技術、問題点を共有することもあげられている。本書はヨーロッパの製薬業界で働く研究者を対象として作られているが、一連のデータセット及び改良案の基礎となる原則は、研究所や大学、さらには異業種を問わず、動物に対して投与・採血等の技術を用いる全ての施設で利用できる。被験物質の投与や血液検体の採取を扱った文献は非常に多くあるが、これはそれだけ多くの試行錯誤がなされてきたことを意味しており、にもかかわらず各研究所には長年の習慣や経験に基づいた独自の「内部」指針も存在する。動物に何らかの苦痛を与えて処置を施して得たデータも公表しなければ、同じ実験が各施設で繰り返されることになる。

従って、繰り返し実験をさけるためにも、このような手引きを共有することが重要であり、同時に、動物愛護に関する経験的な技術及び過量投与等に起因する科学的な問題も共有すべきである。

また、EU指令の規定では、苦痛を最低限に抑えるために、実験法を改良することも指示しているので、被験物質の投与、採血に関する技術を更に改良するという継続的な要求も扱われており、そのための方法も提案されている。

本書は学術雑誌に掲載された文献に基づいて作成されているが、これが不可能な場合には、内部データ及びワーキンググループでの経験（並びに医薬品業界より提出された有用なコメント）を活用して最終意見とされている。

なお、記載されている推奨事項は、「正常」動物に関するものであり、例えば、妊娠期や授乳期の動物については特別の配慮が必要である。投与容量を多量にした場合や過剰量の採血を行った場合、特に麻酔薬を投与した場合には、試験結果の解釈に混乱をきたすおそれがある。

1. 被験物質投与に関する手引き

実験動物への投与は種々の科学的な研究に必要不可欠であり、規制当局の要求に合致させるためにも不可欠である。特に製薬企業では動物愛護と正当な科学研究を両立できる投与方法の基準が検討されてきた(Hull 1995)。

規制当局の要求、すなわち、前臨床試験の1つである安全性試験は、「医薬品のための毒性試験法ガイドライン」に沿って実施されているが、このガイドラインの中には使用する動物種や投与期間、観察項目などについて記載されている。しかし、投与量に関しては、毒性が低い化学薬品やほとんど溶解しない化学薬品では、学術上の要求と規制上の要求の両方を満たすためには、個々の動物に対する投与容量を多量にしなければならないこともある。例えば単回投与毒性試験の場合、技術的に投与可能な最大量(Dose)として、2000mg/kgという数字が記載されているが、この2000mgをどれだけの容量(Volume)で投与するかは被験物質の製剤学的な特性により異なる。また、投与経路やDoseは臨床での使用を想定し決定するが、造影剤、血漿増量剤などは一般的な投与容量を超える場合がある。従って、被験物質の投与に関する手引きが作成された目的は以下の通りである。

- ・規制当局より求められる毒性試験で用いる通常の実験動物種に対する投与容量について、その指針を提供すること。
- ・動物愛護と実用性の観点から最良の実施方法であることを説明できるような定型試験における投与量水準について、統一見解を提供すること。
- ・一般的な試験において上限を提示できる投与量水準の指針を作成すること。なお、この指針は特殊な研究の場合にはあてはまらない。

投与容量

最も頻用されている動物種に一般的に用いられている投与経路で投与する際の投与容量を表1に示す。これらの投与容量は、公表文献及び内部指針に基づくコンセンサスの得られた値である。なお、マーモセットとミニブタもヨーロッパでは使用が増えていることから、現在では頻用動物種に含まれると考えられる。表中各欄の左側の数値は単回もしくは反復投与時の最適投与容量の基準、括弧で括った2番目の数値(記載箇所のみ)は、投与可能な最大容量を示している。この容量を超える場合には動物愛護の問題や科学的問題が密接に関係してくるため、

信頼できる専門獣医師に照会するべきである。なお、表中の数値の中には、薬局方の要件を配慮したものもある。

表 1 推奨投与容量 (許容最大投与容量を含む)

種	投与経路と投与容量(mL/kg *は mL/投与部位)					
	経口	皮下	腹腔内	筋肉内	静脈内 (急速)	静脈内 (低速)
マウス	10 (50)	10 (40)	20 (80)	0.05*(0.1)*	5	(25)
ラット	10(40)	5(10)	10 (20)	0.1* (0.2)*	5	(20)
ウサギ	10 (15)	1 (2)	5 (20)	0.25 (0.5)	2	(10)
イヌ	5 (15)	1 (2)	1 (20)	0.25 (0.5)	2.5	(5)
サル	5 (15)	2 (5)	—(10)	0.25 (0.5)	2	(—)
マーモセット	10 (15)	2 (5)	—(20)	0.25 (0.5)	2.5	(10)
ミニブタ	5 (15)	1 (2)	1 (20)	0.25 (0.5)	2.5	(5)

—:利用できるデータなし

非水性注射物については吸収時間を考慮の上、再投与すること

筋肉内投与の投与部位は 1 日あたり 2 箇所を超えないこととする

皮下投与の投与部位は 1 日あたり 2～3 箇所までとする

皮下投与の投与部位については Freund のアジュバンドの投与は含まない

表中に示した最大投与容量は最近の文献(Flecknell 1996, Wolfensohn & Lloyd 1994)から引用した値であるが、「最適の」投与容量と比べると高くなっている。反復投与を実施する際には、特に動物愛護に関して注意が必要であり、投与容量が多くなる被験物質は処方にも注意が必要である。投与容量を多くすると、それに対する生理反応が生じるため、試験期間は制限され、科学的妥当性も揺らぎかねない。従って、試験開始前に試験計画書の最終版について、査察機関や倫理審査委員会により倫理的な見地からこれらの事項について検討されることが必要である。また、科学的な理由のみならず倫理的な理由からも、新処方の大規模試験を行う際には、事前に物理化学的配合変化に関する試験 (in vitro 試験) と小規模な予備試験 (少数の動物群を用いた試験) を実施するべきである。投与容量は最低限、投与物質の処方及び投与の正確度に見合ったものでなければならない。

投与経路

①経口投与

投与前に実験動物の摂餌を制限する必要がある場合は、吸収に影響を及ぼす可能性がある。投与容量が多い (40mL/kg)と胃に過剰な負荷がかかり、急速に小腸に移行することが確認されている(Hejgaard et al 1999)。絶食期間は、その動物種の摂餌のパターンや生理機能、摂餌制限開始時刻、投与所要時間、摂餌と照明のサイクルによって異なる(Vermeulen et al 1997)。正確な投与を行い、また投与中の事故を避けるため経口ゾンデを用いて投与することを勧める。

②非経口投与

薬物を非経口投与する際に考慮すべき要因は、投与容量、投与前後の処方の安定性、pH、粘度、浸透圧、緩衝能、処方の無菌性や生体適合性があり、特に反復投与試験では重要となる。これらの要因については Claassen (1994)による詳細に記載されている。投与容量、注射液の粘度、注射速度、及び動物種を考慮して最も小さいサイズの注射針を使用すべきである。

a.皮下投与

頻用されている経路であるが、吸収の速度及び程度は処方によって異なる。

b.腹腔内投与

合併症を生じるおそれがあるため反復投与試験ではほとんど使用されない。さらに腸管内に注射する危険性や、刺激性物質の場合には腹膜炎を引き起こすおそれもある。懸濁液として腹腔内投与した場合、腹腔からの吸収は当該薬物粒子の特性と溶媒の性質に左右され、薬物は体循環内と門脈循環内に吸収される。

c.筋肉内投与

筋肉内注射を行うと、注入物質による筋線維への圧迫が避られないため、痛みを伴うことがある。投与部位は、神経損傷を最小限に抑えるように選択しなければならない。また、反復投与試験では投与部位を順番に変える必要がある。親水性の処方と疎水性の処方とを区別する必要もある(吸収速度に差があり、疎水性のものでは24時間以上にもわたって貯溜する傾向がある)。さらに、反復投与試験では、炎症の発現やその後遺症を考慮する必要もある。

d. 静脈内投与

急速静注、低速静注、静脈内持続注入に分類され、表 1 に示した値は、急速静注と低速静注に関するものである。

急速静注：静脈内投与経路を用いるほとんどの試験では、被験物質は 1 分程度の短い時間で投与される。このように比較的急速な注入を行う場合、被験物質は血液と適合するもので、粘性が高くないものでなければならない。投与容量が多い場合は、注射液を体温まで温めておくべきである。静脈内投与を行う場合、注入速度は重要な要素であり、齧歯類については、注入速度は 3 mL/min を超えてはならない。イヌに生理食塩液 6mL/kg を急速静注しても、ヘマトクリット値や心拍数に変化は認められなかったが、20mL/kg 投与時には 15%の血液希釈と一過性の頻脈(1 分間以上にわたり 46%増加)が発現した(Zeoli et al 1998)。

低速静注：被験物質に期待される臨床適応(症)に応じて、あるいは、溶解性・刺激性などの制限因子が存在するため、低速静注による被験物質の投与を考慮しなければならない場合がある。低速静注の際には、被験物質を血管外に投与する恐れを最小限にするため各種の手法が用いられる。5～10 分間かけて低速静注する際には、標準注射針もしくは翼付き針を使用することもある。また、静注用力ニューレを表層部の静脈にテープで固定するか(短時間の場合)、外科的に留置してから使用する(長時間もしくは反復持続注入の場合)のも良い。

ラットに等張生理食塩液を 1mL/min の流速で最大 80mL/kg まで、4 日間連日静脈内投与しても、苦痛の兆候も肺の病変もみられない(Morton et al 1997)。しかし、投与期間を 30 日に延長し、注入速度を 0.25、0.5、1.0mL/min とした場合には、肺病変の発現率が増加し、重症度も増加した(Morton et al 1997)。早期の時点でもすでに好ましくない影響が生じていたが、時間が短かったために病変・病状等を発現するまでには至らなかったのかもしれない。

持続注入：溶解度や、臨床適応(症)など低速静注と同様の理由で持続注入が必要な時があるが、長期にわたって持続注入を行う場合には特に注意が必要である。投与容量及び投与速度は、被験物質及び輸液療法の実施を考慮して決定する。単回投与の場合は循環血液量の 10%未満の容量を 2 時間以上かけて投与するのが基準である。循環血液量については本書の表 3 にまとめて示した。動物の拘束を最小限にして、ストレスをかけないことが長期間の持続注入を考える際に重要である。

表 2 反復静脈内持続注入－投与容量／投与速度

(許容最大投与量／投与速度を含む)

一日の投与時間	マウス	ラット	ウサギ*	イヌ	サル	ミニブタ
一日の総投与液量(mL/kg)						
4 時間	-	20	-	20	-	-
24 時間	96(192)	60(96)	24(72)	24(96)	60	24
速度(mL/kg/h)						
4 時間	-	5	-	5	-	-
24 時間	4(8)	2.5(4)	1(3)	1(4)	2.5	1

- : データなし

* : 胎児発生毒性試験(催奇形性試験) データに基づく

非水性注射物に関しては本文を参照

一回の注入を行う時間も重要な要素の一つである。表 2 に不連続な注入を行う場合(1 日 4 時間)と連続注入を行う場合(24 時間)の注入速度と投与容量の推奨値を示した(この表を完成するためにはもう少しデータが必要である)。

ウサギへの投与容量と投与速度は胎児発生毒性試験データに基づく値であり、母獣に 2mL/kg/h 以上の速度で投与すると、胎児に影響はないが、母獣に血管周囲顆粒球浸潤や増殖性心内膜炎が生じる(McKeon et al 1998)。ラットへの注入速度は一般的に 1～4mL/kg/h の範囲である(Cave et al 1995; Barrow & Heritier 1995; Loget et al 1997) が、催奇形性試験を行う際には 2mL/kg/h を超えてはならない。マウス(van Wijik 1997)、イヌ及びサル (Perkin & Stejskal 1994)、及びミニブタの値は 1 ヶ月反復投与試験の成績に基づいている。

投与容量が多い場合の溶媒の重要性等、その他の制限事項については 4 つの文献(Cornelius et al 1978; Concannon et al 1992; Manenti et al 1992; Mann & Kinter 1993)で詳しく取り上げられている。これらのデータでは、静脈内に注入する許容最大液量は、使用する溶媒により大きく異なることが示されている。

e. 皮内投与

免疫、炎症、感作反応の評価に用いられ(Leenaars 1997; Leenaars et al 1998)、投与物質はアジュバントとともに処方されることもある。皮膚の厚みに応じて、0.05～0.1 mL の投与容量を投与することができる。

投与に用いる溶媒

動物を用いるいずれの試験においても、溶媒の選択は重要な課題である。溶媒は被験物質の暴露を最適化するものでなければならないが、研究対象である被験物質の試験結果に影響を与えるものであってはならない。つまり溶媒としての理想は生物学的に不活性であり、被験物質の生物物理学的特性に影響を与えず、動物に全く毒性を示さないものである。もし溶媒の成分が生物学的作用を示すのであれば、投与量を制限して、そのような作用を最小化するか、もしくは無くさなければならない。被験物質の投与に使われる単純な溶媒には等張性水溶液、緩衝液、共溶媒系、懸濁液、油などがある。非水性注射物については、再投与する前に、吸収時間を検討する必要がある。懸濁液を投与する際には投与液の粘度、pH、及び浸透圧を考慮に入れなければならない。共溶媒系を用いる時には溶媒自体も用量制限毒性（dose limiting toxicity）を示すことに注意しなければならない。多くの研究施設では実施される動物実験方法と研究対象物質の特性をもとに、最適な溶媒を容易に選択できる方法の開発が盛んに行われている。

2. 採血に関する手引き

採血は実験動物に対して行う最も通常の処置の一つである。実験用の哺乳類、鳥類からの採血法は BVA/FRAME/RSPCA/UFOW Joint Working Group on Refinement による最初のレポートに概説されている。本手引きでは、研究者に使いやすい形で最新情報に基づいた許容採血量の基準を提示するとともに、トキシコキネティックス試験(薬物動態試験)及び毒性試験において必要な情報を提供することも目的としている。齧歯類からの採血方法として、眼窩静脈叢からの採血が未だに一般的に使われているが、後遺症等のことを考えて代替法を提案する。

循環血液量

許容採血量の計算は循環血液量に関するデータが正確かどうかにかかっている。文献を再検討したところ、これらの値にはかなりのばらつきがみられた。これは使用された手法や、動物の系統、性別などが関係しているものと思われる。最も頻用される測定方法としては、放射標識赤血球法(Smith 1970; Sluiter et al 1984; Fujii et al 1993)、放射標識トランスフェリン(Argent et al 1994)、放射標識血清

アルブミン法(Callaham et al 1995;Carvalho 1989;Gillen et al 1994)、標識色素法(Schad et al 1987)、酵素希釈法(Holmes & Weiskopf 1987;Visser et al 1982)、Fibre Optics(Kisch et al 1995)、デキストラン-70(Van Kreel et al 1998)などがある。

表 3 実験動物の循環血液量

動物種	血液量(mL/kg)	
	平均値*	平均値の範囲
マウス	72	63-80
ラット	64	58-70
ウサギ	56	44-70
イヌ(ビーグル)	85	79-90
アカゲザル	56	44-67
カニクイザル	65	55-75
マーモセット	70	-82
ミニプタ	65	61-68

*：平均値の範囲の中央値

安全性試験で一般的に使用されている動物種の循環血液量を表 3 に示す。同表には毒性試験で近年使用頻度が増加しているマーモセットとミニプタのデータも記載している。表示した値は、動物は正常な成熟動物であり、栄養水準も適切であることを前提として、様々な情報源から引用したものである(Altman&Dittmer 1974 ; Swenson 1977 ; Jain 1986; McGuill & Rowan 1989 ; First report of the BVA/FRAME/RSPCA/UFAW 1993)。

採血量

本書に記載の採血量に関する推奨事項は、公表文献をはじめ、ある特定の問題を解決するために本ワーキンググループで実施された最近の研究や、標準操作手順書から得られた情報に基づいている。

採血が限界に近づくにつれて、動物愛護の問題が最も重要となるが、データの解釈や妥当性に影響を与えることから、動物の生理反応のもつ科学的な影響も考慮しなければならない。動物の一般症状を評価した際に疑わしいと思われる場合には、採血を行う前に責任者もしくは専門獣医師に問い合わせることが望ましい。

Scipioni ら(1997)の研究で、ラットの総血液量の最高 40%を 24 時間かけて採取し、その 2 週間後に同様の採血を繰り返しても、肉眼的に明らかな病的所見は認められなかった。全般的にみて、採血後の動物の状態にとって最も重要な問題、例えば、心拍数、呼吸パターン、各種ホルモン濃度などを調べたデータはほとんどなく、運動やその所要時間など挙動面に関するデータもほとんどない。これらはすべて、過剰な採血を行うと変化する可能性があるが、そのような変化を検討するにはかなりの努力と財源が必要になる。しかし、血液学的検査パラメータであれば、容易に測定することができるため、小規模なプロジェクトにおいて各種血液量採取後の赤血球数、ヘモグロビン値、ヘマトクリット、平均赤血球容積、及び赤血球分布幅が測定された。具体的には、動態試験を模倣するため、Sprague Dawley 系雌雄ラット（体重約 250 g）より循環血液量の 7.5%、10%、15%、及び 20%容量を 24 時間かけて採取し、その後最長 29 日間、これらのラットの追跡調査が行われた。

その結果、上記パラメータのいずれをみても、採血前の値（ベースライン値）に回復するのに要する期間にはかなりのばらつきがあること（及び循環血液量の 15%及び 20%容量採血群では採血後 29 日後も一部のパラメータは採血前の値に回復しないこと）が明らかとなった。従って、反復採血（multiple sampling）時に設ける回復期間は、特定容量採血群のすべてのラットが正常（各動物毎にみた採血開始時の値 $\pm$ 10%）に回復するのに要する期間とすることを推奨する。通常の毒性試験で必要とされる循環血液量の 15%を超える血液量を 1 回に採取すると、非常に緩徐に採血を行わなければ、循環血液量減少性ショックを発現するおそれがある。少量採血を反復する場合には、急性作用は生じない。

表 4 に採血許容量限界及び適切な回復期間についての指針を、表 4 の値に基づき正常な生理に著明な障害を与えない採血許容量を表 5 に示す。これらの指針は反復採血によるストレスはもとより、それ以外の操作手順によるストレスも考慮に入れて、動物に与える全般的な苦痛・過酷さを評価したものである。なお、毒性試験では血液学的検査パラメータを批判的な目で評価しなければならないため、そのような毒性試験に用いる動物については、回復期間をさらに延長することを提案する。

トキシコキネティクス及び薬物動態試験では、少量の採血を反復しなければなら

ず、採血量が多くなる(循環血液量の 20%)が、大量の血液を採取すると血行動態に重大な影響が生じ、半減期の算出にも大きく影響する。

消失半減期は、動物を致死させる前 24 時間以内に最終の血液検体を採取すれば算定できるが、表中の数値には動物を最終的に安楽死させる際に採取可能な血液検体は含まれていない。介入処置を行うべきではないとの見解から、提案の採血量については血液の補充は考慮していない。

表 4：採血許容量限界と回復期間

単回採血（毒性試験等）		反復採血（トキシコキネティクス試験等）	
採血量の循環血液量に対する割合（%）	およその回復期間	24 時間で採血する量の循環血液量に対する割合（%）	およその回復期間
7.5 %	1 week	7.5 %	1 week
10 %	2 weeks	10 – 15 %	2 weeks
15 %	4 weeks	20 %	3 weeks

表 5：各種動物種の総血液量及び推奨最大採血量（表示体重を基準とする）

種(体重)	血液量(mL)	7.5%(mL)	10%(mL)	15%(mL)	20%(mL)
マウス(25g)	1.8	0.1	0.2	0.3	0.4
ラット(250g)	16	1.2	1.6	2.4	3.2
ウサギ(4kg)	224	17	22	34	45
イヌ(10kg)	850	64	85	127	170
アカゲザル(5kg)	280	21	28	42	56
カニクイザル(5kg)	325	24	32	49	65
マーモセット(350g)	25	2.0	2.5	3.5	5
ミニブタ(15kg)	975	73	98	146	195

採血部位

これまでに静脈穿刺部位及び静脈切開部位の検討が行われているのは主に齧歯類とウサギである(First Report of the BVA/FRAME/RSPCA/UFAW 1993)。この情報について、採血方法の技術的進歩に重点をおいて概説するとともに、各動物種の採血部位の利点と欠点を表 6 に、推奨される反復採血部位を表 7 に示す。

表 6：各種採血法の利点と欠点

採血経路・静脈	全身麻酔	組織損傷(1)	反復採血の可否	採血量	動物種
頸静脈	不要	軽度	可	+++	ラット、イヌ、ウサギ
橈側皮静脈	不要	軽度	可	+++	マカク属、イヌ
伏在静脈／外側足根静脈	不要	軽度	可	++(+)	マウス、ラット、マーモセット、マカク属、イヌ
耳介周囲静脈	不要 (局所麻酔)	軽度	可	++ +	ウサギ ミニブタ
大腿静脈	不要	軽度	可	+++	マーモセット、マカク属
舌下静脈	必要	軽度	可	+++	ラット
外側尾静脈	不要	軽度	可	++(+) +	ラット マウス、マーモセット
耳介中心動脈	不要 (局所麻酔)	軽度	可	+++	ウサギ
前大静脈	不要	軽度	可	+++	ミニブタ
尾の先切断(<1~3 mm)	必要	中等度	制限有	+	マウス、ラット
眼窩静脈叢	必要	中等度/ 高度	可	+++	マウス、ラット
心臓(2)	必要	中等度	不可	+++	マウス、ラット、ウサギ

(1) 組織損傷の可能性は、組織損傷の発現率および後遺症の重症度に基づいている

(2) 全身麻酔下での終末採血としてのみ実施

表 7：推奨される反復採血部位

動物種	推奨部位
マウス	伏在静脈、外側尾静脈
ラット	伏在静脈、外側尾静脈、舌下静脈
ウサギ	耳介周囲静脈、耳介中心動脈、頸静脈
イヌ	橈側皮静脈、頸静脈、伏在静脈
マカク属サル	橈側皮静脈、伏在静脈、大腿静脈
マーモセット	大腿静脈、伏在静脈
ミニブタ	前大静脈

異なった部位から採血した検体では臨床病理学的検査値に差を生じることがあり、また、データベースと比較する場合もこの点に留意すべきである。

伝統的な採血経路については、標準的文献に採血方法が記載されている。しかし、その他の採血方法については特筆すべき事項があるため、以下に概説した。

a. 外側足根静脈（伏在静脈）

ラット、マウス、ハムスター、スナネズミ、モルモット、フェレット、ミンク

(Hem et al 1998)から、これより大型の動物まで、多くの実験動物に適用されており、循環血量の 5%まで採血が可能である。麻酔を行う必要がないため、薬物動態試験のように繰り返し採血しなければならない試験に適している。伏在静脈は足根関節の外側にあり、剃毛後アルコールでその部分を拭くだけで容易に見ることが出来る。動物をプラスチック製の筒のような保定器に入れ後ろ足を伸ばす。関節の上を軽く圧迫すると、静脈が浮き上がり、一番細い規格の針で静脈穿刺することにより溶血することなく十分速やかに血液を採取することが出来る（例えば、ラットやマウスには 25G～27G の針を使用する）。少量の採血を行う場合には、穿刺部位に単に針を突き刺すことによって血液の滴を形成し、ヘマトクリット測定用微小管を用いて標準量を回収することもできる。採血後、採血部位を圧迫しておけば止血できる。また、痂皮を除去すれば一連の採血が可能となる。

持続性の（微量）出血以外に合併症は報告されておらず、また、この方法は麻酔を必要としないという点でも優れている。動物愛護に関わる問題を体重増加や日内リズム、行動等の点から検討した試験は行われていないが、それでもこの採血経路は動物の健康状態に重大な影響を及ぼすものではないと思われる。

補足：本手引きでは眼窩静脈叢からの採血の代替として伏在静脈からの採血を推奨しており²⁾、確立された技術の詳細が写真入りで以下にも掲載されている。

http://www.uib.no/vivariet/mou_blood/Blood_coll_mice_.html

b. 耳介周囲静脈／耳介中心動脈

ウサギやモルモットでは耳介周囲静脈からの採血が一般である。この採路はミニブタに適用可能であり、その際には静脈内カニューレを用いることが多い。動物を確実に保定することが重要であり、採血の 20～30 分前に局所麻酔用クリームを耳介の皮膚に塗布しておく、針が皮膚を貫通する際に動物が頭を振ることを防げる。また、耳介周囲静脈を被っている皮膚表面にワセリンを塗布した後に静脈穿刺して血液を採血用試験管に採取する方法もある。大量の採血を行う場合、ウサギの耳介中心動脈より採血することもできるが、採血後は、出血の持続や血腫の形成を防ぐため、採血部位を 2 分間以上圧迫する必要がある。さらに、採血の 5 及び 10 分後に、出血が持続していないかどうかをチェックする必要もある。耳介中心動脈にカニューレを留置すれば反復採血も可能になり、それによって、8 時間に及ぶ薬物動態検討用の血液採取も容易に行うことができる。

c. 舌下静脈

この採血方法はラットなどの齧歯類で容易に実施することができ、採血量の制限及び反復麻酔が不可欠であるという制限はあるものの、それ以外の点では大量（0.2～1 mL）の採血にも適している。改良法（Zeller et al 1998）により、過去に認められた欠点の一部は改善され、反復採血にも適用できるようになっている。この採血方法を具体的に述べると、ラットを麻酔し、採血補助者がラットを仰臥位に保定する。次いで、頸部の弛緩した皮膚をつまみ上げて、頭部から戻る静脈を部分的にうっ血させる。別の採血補助者が綿棒で舌を徐々に引き出し、親指と人差し指でしっかりつかむ。次いで、舌下静脈の一つ（正中線の両側に 1 本ずつ走行）を 23～25G の皮下注射針で穿刺する。その際、可能な限り舌の先端に近い部位を穿刺する。採血用試験管に血液を滴下できるようにラットを逆さにし、必要量の採血が終了した後、頸部の圧迫を緩めラットを仰臥位にする。舌をもう一度引き伸ばし乾いた綿棒で止血する。なお、通常止血薬は不要である。

この方法で採血した場合、麻酔を施した未採血コントロールラットと比較して、採血したラットの摂餌・摂水量や体重増加に有意差は無かった。さらに、眼窩静脈叢からの採血と比較して病的変化を認めることも少ない（Mahl et al 2000）。

d. 外側尾静脈

この採血経路は外側足根静脈と類似しているが、少量の血液しか採取できない（マウスでは 0.1～0.15 mL、温めたラットでは最高 2 mL まで）。採血は、外側尾静脈より針付き注射筒を用いて行うか静脈穿刺する。麻酔は不要であるため反復採血に適している。血管を拡張させる必要がある場合には、動物を 37℃ の状態に 5～8 分間放置するか、あるいは尾を局部的に温める。動物の健康状態に影響を及ぼすような不都合なことはほとんど生じないが、加温する場合には苦痛の徴候を示していないかどうか注意する必要がある。

e. 前大静脈

ミニブタの場合、吊り網に入れて保定する方法や、仰向けにして前脚を尾の方向に引っ込めて保定する方法が用いられる。この他に畜産業で使用されている保定法（鼻先をくくりつける方法、両手両足を縛る方法、後ろ足で吊す方法）は動物へのストレスが大きく、また、科学研究に悪影響を及ぼす可能性もあるため、実験動物には不適切である。迷走神経を傷つけないようにするため、頸部の右側

から、胸骨柄側方、30～45°の角度で左肩に向かってまっすぐ採血針を挿入する。採血針が静脈に入ると、採血者は針先が急に動くような感覚をおぼえる。この感覚が得られれば、その後は血液を容易に採取することができる。この方法は連続静脈穿刺にも使用することができるが、採血針を抜いた箇所には血腫が形成される。そのため、この方法は、1週間に1回以上の頻度で採血針を抜く操作が必要な採血には適さない (Swindle 1998)。

f. 尾先端の切断

ラット及びマウスで頻繁に使用されており、採血量は0.1～0.2 mLである。切断は、尾の先端から0.5～1 mmの部分に限定すべきであるが、経時的に最大5 mmまで切除可能であり、凝血塊を除去すれば、短期間の反復採血も可能である。但し、連続的に切断したために尾が著しく短くなる（すなわち、短縮部位が5 mmを超える）ようなことがあってはならない。この方法は成熟しすぎた動物には適さない場合もある。麻酔を施すことが推奨される。

g. 心臓穿刺

必ず全身麻酔下で行うべきである。過去には代替採血経路がないため、小型の齧歯類で使用され回復をみていたが、現在では別の採血法が適用できる。苦痛を伴う可能性や心膜出血や心臓タンポナーデなどの致死的后遺症を生じる可能性があるため、動物を致死せしめる際の採血時（終末採血）のみに使用すべきである。

h. 眼窩静脈叢

眼窩静脈叢を採血経路とする方法は過去に頻用されていたが、その一方で、有害な作用を引き起こすことが認められており、これらの有害作用は苦痛を伴う可能性もあることから、この方法は問題視されるようになってきている。従って、最近では科学研究上の要件を満たし、動物愛護の面も向上させる別の方法が開発されている。しかし、この新しい採血法を考慮した上で、眼窩静脈叢からの採血の利点と欠点の一部を詳細に見直すことは価値があるとの考えを示した。

眼窩静脈叢からの採血はいずれの動物種でも必ず全身麻酔下で行う必要があり、一部の国では麻酔の実施が規則で定められている。この方法については多くの報告がある (Stone 1954; Waynforth & Flechnell 1992; Van Herck 1999) が、この方法の改良に関する公表文献はほとんどない。組織損傷を最小限に押さえる最適な方法としては、結膜を貫通する方法が論じられている (First Report of the

BVA / FRAME / RSPCA / UFAW 1993)。同一部位での採血については、2 週間の間隔をおけば、大抵の場合、損傷した組織は修復されるはずである（van Herck et al 1992）が、完全に治癒する前の初期段階に動物が苦痛を感じていないとは断定できず、眼窩静脈叢からの反復採血を懸念する声がある。研究の中には、眼窩静脈叢からの反復採血は動物の日内リズムに影響を及ぼさず（Beynen et al 1988; van Herck et al 1997）、長期的にみた眼窩組織の組織病理学的検査所見にも影響を及ぼさない（Krinke et al 1988; van Herck et al 1992）ことを示した研究もあれば（すなわち、組織損傷はすべて治癒することを示している）、一方では、組織学的変化、一般症状の異常所見、及び苦痛の痕跡が認められ、そのために動物を安楽死せざるを得なくなり、データが得られなかったとする研究（McGee & Maronpot, 1979; Beynen et al 1988 ; Le Net et al 1994; van Herck et al 1998）もある。この他にも、下記に示すような重篤な有害作用を生じる可能性がある。

- ・眼球後出血により血腫が形成され、過度の圧力が眼に加わって、動物にほぼ確実に苦痛を与える。
- ・持続性出血を止めるために圧力を加えたり、血腫の形成によって圧力が加わると、角膜潰瘍、角膜炎、パンヌス形成、眼球破裂、微小眼炎を生じることがある。
- ・視神経をはじめとする眼窩内組織が障害されると、視力低下（視野欠損）を生じることがあり、失明の原因にもなる。
- ・マイクロピペットにより脆弱な眼窩内骨の骨折及び神経損傷および硝子体液の消失を伴う眼球貫通がおこる。

上記の後遺症の多くは眼窩内の深部におこるため、見過ごされている可能性がある。望ましくない副作用の発生率は1～2%の間であると考えられる（Krinke et al 1988）が、採血者の技量によっては、たとえ経験を積んでいたとしても、さらに高率になる可能性もある（van Herck et al 1998 の Table 1 参照）。

穿刺頻度

針穿刺の回数を最小限に押さえることが重要である。また、反復する場合、静脈に沿って部位を変えて穿刺する等、同一の穿刺部位を使用すべきではない。

カニューレ挿入 (cannulation)

カニューレ挿入は反復採血を行う際に重要な手技である。短期間（実験当日のみの使用）であれば、翼付針や套管針などの一時的なカニューレを用いることができるが、長期間使用する場合には、生体適合カニューレの外科的留置が必要となる。このような方法を用いることで、動物の苦痛や不快さを最小限にとどめつつ反復採血できる。皮下静脈アクセスポートの使用も、そのポートを埋め込んだ動物を群から隔離せずに一緒に飼育できるという点で有用だが、下記のように取り組まなければならない問題も多数存在する。

- ・外科的手術の技量が不可欠であり、感染症などの合併症を避け、長期間にわたり良好な結果を得るため（Popp & Brennan 1981）には、無菌的に外科的処置を行わなければならない。血液凝固が頻発すると採血及び持続注入の妨げるになる。
- ・動物がカニューレを抜いたり噛み切ったりしないように、動物の拘束や群からの隔離が必要であり、長期間使用する場合に皮下静脈アクセスポートが好ましいのはこのためである。
- ・長期間カニューレを挿入しておくと、血管を貫通することがあり、また動物が成長しすぎてカニューレを使用できなくなるおそれもある。

麻酔

BVA/FRAME/RSPCA/UFAW の最初の報告（1993）に、各種麻酔薬が脾臓被膜の筋細胞にどのような影響を及ぼすかについて幾つかコメントが示されており、この他に、止血を促進する点についても述べられている。実験用小動物からの採血に関して、注目すべきことに、midazolam（Hypnovel）併用下もしくは非併用下で fentanyl と flunazone（Hypnorm）を併用すると、いずれの動物種においても著明な末梢血管拡張が生じる。この末梢血管拡張により採血が一層容易になるが、その一方で、採血後の出血も生じやすくなる。そのため、確実に止血するよう特に注意を払わなければならない。局所麻酔薬の使用を考慮すべきである。

結論及び推奨事項

現在では、すべての動物種、特に以前は採血が困難であった小型齧歯類からも採血できる様々な代替法が存在する。更に採血法の中には、麻酔薬を要する方法

や、反復採血の場合には動物愛護に重大な影響を及ぼす副作用を高率に発現する方法もあるので、下記の事項を推奨する。

- ・すべての齧歯類に推奨される採血経路は外側尾静脈、舌下静脈、及び伏在静脈であり、ウサギでは耳介周囲静脈、耳介中心静脈、及び頸静脈が推奨される。
- ・回復をみながら眼窩静脈叢より採血する方法は、他の経路からの採血が不可能な場合に限り使用する。
- ・心臓採血は全身麻酔下で動物を致死せしめる最終処置としてのみ実施する。

動物を用いるすべての実験操作と同様、組織の損傷を最小限に抑えて確実に採血を行うには実験担当者の熟練と能力がきわめて重要であり、動物の健康と愛護のためにも不可欠である。

以上、採血に関する手引きを紹介したが、本書では眼窩静脈叢からの採血は有害作用が多いため可能な限り避けるという見解である。しかし、米国では眼窩静脈叢からの採血に対する見解はやや異なる。例えば、以下は米NIHの Animal Research Advisory Committee(ARAC)が出しているマウス、ラットの採血に関するガイドライン³⁾の中の眼窩静脈叢からの採血に関する記載を翻訳したものであるが、熟練した技術があれば有用な手段であることも記載されている。

眼窩静脈叢からの採血(NIH ARAC Guidelines より)

- ・マウス、ラット(ラットでは常用手段ではない)において用いる方法で、眼窩静脈叢よりキャピラリーチューブで採血する。
- ・熟練した技術者による処置では人道的な方法であり、痛みも一過性である。
- ・迅速な採血方法であり、短時間で一度に多数の個体の採血ができる。
- ・採血量は中等量から大量。
- ・血液の質はよい。局所麻酔を行った場合は麻酔剤の混入の可能性がある。
- ・同じ場所からの頻回採血は薦められない(最低10日から2週間あける)。
- ・採血者が未熟な場合は、他のルートからの採血よりも誤った結果を招きやすい。
- ・血管叢が多いという解剖学的特性により、ラットの方がマウスに比し組織損傷が大きい。
- ・マウスでは覚醒状態で採血できるが、眼科用の局所麻酔を処置前に使用すべきである。局所麻酔が実験系に支障をきたす場合は代用として全身麻酔下で採血を実施するのがよい。
- ・ラットでは全身麻酔下で採血する。
- ・マウス、ラットともに採血後の止血には十分に配慮する。

また、この投与と採血に関する手引きでは、日本では安全性試験でも汎用されているモルモットに関する記載がない。これは、欧米では安全性試験の中でモルモットが汎用される抗原性試験が義務付けられていないためであり、実験動物と

してモルモットが使用されていないわけではない。モルモットは実験動物の中で特に採血や静脈内投与がしにくい動物種であるが、これらの一般的な推奨部位は伏在静脈、中足静脈、耳介静脈などである⁴⁾。

本書は、ヨーロッパ各国の大学や製薬企業の研究者など、多彩なメンバーによりまとめられたもので、ヨーロッパに限らず、世界中の知識と経験を集積し作成されたものである。従って、現在この手引き書はヨーロッパだけではなく、米国も含め世界中で活用されているが、本文にも記載されているとおり、これで全て完成というわけではなく、更にデータの充実や改良や工夫が必要な部分もある。従って、この事を念頭に置いた上で本手引き書に記載されている知識と経験を参考に動物実験を行うことにより、動物実験の信頼性が向上するとともに動物実験の重複が避けられ、動物福祉の観点からも意義があるものと考えられる。

参考文献

1) Diehl K-H, Hull R, Morton D, Pfister R, von Rabemampianina Y, Smith D, Vidal J-M, van de Vorstenbosch C. J. (2001) A Good Practice Guide to the Administration of Substance and Removal of Blood, Including Routes and Volumes. *Appl. Toxicol.*, 21, 15-23

注：本書は投稿に先駆け、2000年2月にドラフト版が ESLAV (The European Society of Laboratory Animal Veterinarians) のホームページに公開された (<http://www.eslav.org/efpia.htm>)

2) Hem A, Smith AJ & Solberg P (1998): Saphenous vein puncture for blood sampling of the mouse, rat, hamster, gerbil, guineapig, ferret and mink. *Laboratory Animals* 32: 364-368

3) ARAC GUIDELINES 26. Guidelines for Survival Bleeding of Mice and Rats, Approved 2/14/01.

4) 日本実験動物協会編 (1989) 実験動物の基礎と技術 II 各論

注：本文中に著者名と西暦で記載されている参考文献に関しては、参考文献 1) 末尾の REFFERNCES を参照のこと。

〈第80回研究会（平成15年12月5日）〉

〈記念フォーラム〉 動物実験の明日を考える

1. 動物実験と実験動物施設が抱える明日への問題点

池田 卓也（グラクソ・スミスクライン(株)）

2. ポストゲノム時代と産官学連携時代における実験動物学

北田 一博（北大・先端科学技術共同研究センター）

3. 国際的実験動物、動物実験の法規制の趨勢そして国立大学の
独立行政法人化

黒澤 努（大阪大・医・動物実験施設）

〈特別講演〉

重点先端分野（BT、IT、NT）の融合という名の研究推進

鳥居 宏次（奈良先端科学技術大学院大学）

〈特別シンポジウム〉 実験動物の大いなる活用

1. プラナリアに再生の秘密を学ぶ

阿形 清和（理研、発生・再生科学総合研究センター）

2. 生命医科学における脊椎動物モデルとしてのメダカ

古谷一清木 誠（科学技術振興財団、近藤誘導分化プロジェクト）

3. 滑らかな運動制御のための脳による情報処理

河野 憲二（京都大院・医・認知行動脳科学）

動物実験と実験動物施設が抱える明日への問題点

池田 卓也 グラクソ・スミスクライン（株）

いま、実験動物学および動物実験とその基盤となっている実験動物施設は、大きな変革に直面している。これは実験動物を用いた研究内容その物の変化と方向性が大きく変化してきているだけでなく、実験動物を取巻く国内外の社会環境も大きな転換期を迎えている。

このような転換期に実験動物施設は、実験動物と施設を取巻く大きな環境変化に、どのように対応しているのか、問題点を含めて考えてみたい。

1. 実験動物施設を取巻く社会環境の変化への対応

動物実験と実験動物を取巻く社会環境は、大きな転換期を迎え、特に来年の動物愛護法の改正を控えて、動物愛護団体の活動が盛んになると伴に、動物福祉と倫理に対する議論も活発となり、社会の関心も一段と高まっている。

我国の大学や企業の多くは、以前より実験動物施設を中心として、動物実験の自主管理や実験動物の福祉の向上に取り組んできた。しかし、一部の研究機関や企業の不祥事などにより、研究機関等に対する情報公開と説明責任及び倫理の遵守に対する世論の厳しさは増している。同時に動物実験に対する社会の見方は、今まで以上に厳しくなり、実験動物施設は動物福祉と倫理の観点からの、動物実験の自主管理の推進だけでなく、社会に対する説明責任を如何に進めるかと言う課題にも直面している。さらに実験動物施設では、遺伝子操作動物の増加や、新技術の導入、企業においては同業他社との競争激化等により、知的財産の保護に対する対応の強化が求められている（図1）。

一方、人口の増加や高齢化、長寿への期待などから、動物実験を通じた生命科学領域の研究に対する、社会の期待も日々強くなってきている。そのため動物実験を行う研究基盤としての、実験動物施設の社会的な重要度は日増に高くなっている。

しかし、今日まで我国では実験動物施設の運営管理に携わる者の地位は必ずしも高くなかった。そのために実験動物施設の運営管理や動物飼育に携わる人材の層が薄く、実験動物を用いた研究を取巻く周辺環境の急激な変化に、必ずしも十分に対応出来ていない現状がある。

2. 医薬品開発研究に見る実験動物と研究手法の変化

近年、多くの製薬企業では定型的な動物試験を外部に委託し、自から実施する試験研究数を減らしてきている。また各種のガイドラインの日米欧による受入や、GLP規範の日欧間での相互承認が行われ、医薬品研究開発における国際的なハーモナイゼーションが進展した。このような世界的レベルでの動物試験の標準化や簡素化が計られたことにより、海外での動物試験データ等が、我国でも医薬品承認申請データとして使用することが可能となった。また医薬品研究開発の手法も大きく変化してきたことから、製薬企業で使用する実験動物数が減少してきた。特に医薬品の探索研究における培養細胞を用いたハイスループットスクリーニング法や、ヒト細胞等を用いた代替試験法の導入により、旧来の定型的な病態モデルを用いた動物実験は激減してきている。このような要因により、製薬企業で使用する実験動物数は劇的に減少しつつある。

一方、ゲノムサイエンスやプロテオミクス等の医療分野における革新的な新技術の急速な進歩により、製薬企業は創薬研究においてもこれら新技術を研究手法として取入れ、遺伝子レベルの解析を実験動物にも多用するようになってきた。その結果、従来の実験動物に代わって、新たに遺伝子を操作した実験動物が多用されるようになり、ここ数年でその数は飛躍的に増加してきている（図2）。このような飼育実験動物種と数の急激な変化は、製薬企業の実験動物施設のみならず、大学などの試験研究機関に付属する実験動物施設においても、顕著な傾向として認められている。そのため飼育する動物種だけでなく施設の役割も、近年大きく変化してきている。すなわち従来の系統化された実験動物を、研究用に安定的に供給する事が実験動物施設の主要な責務であった時代から、遺伝子操作動物などを中心とした特殊な実験動物の飼育管理や、国内外の外部機関との動物や胚の授受や、遺伝子解析技術等の多様化した研究ニーズに応え得る動物施設が、強く求められるようになってきた。

3. 実験動物施設と機能の分業化

我国の実験動物施設は、実験動物の飼育管理および実験技術や研究のレベルでは、高い水準を保持してきた。しかし、欧米と比較して多くの点で歴史が浅く、実験動物施設の運営管理では、経験と感に頼る部分が多々あり、システム化や分業化が不十分な事などに起因すると考えられる問題を抱えている。さらに研究のために良好な実験環境を提供するという観点からも、実験動物を用いる研究を直接あるいは間接的に補助する系統的なシステムや組織の整備が、欧米に比して未だ不十分な点が多い。

そのため、高いレベルにある個々人の経験や技術が必ずしも有機的に結びつかず、動物実験を行う基盤としての施設が必ずしも十分に機能していない。

実験動物は動物実験を行う研究者が、自ら実験用に繁殖・飼育を行っていたが、時代と共に専門的に実験用動物を繁殖して、実験者に供給する仕組みが出来てきた。さらに時代を経るに従って、実験動物の繁殖や飼育は、飼育管理を専門とする技術者に委ねる様になり、研究者は実験そのものに従事することが出来るようになって来た。特に近年、多くの実験動物施設において、実験動物の飼育管理を生業とする企業に業務を委託するアウトソーシングが盛んになっている。

一方、実験動物を飼育管理する施設においても、実験動物種の多様化やSPF動物や無菌動物などに代表される微生物学的に高度な管理を必要とする実験動物の増加に伴い、動物を飼育する実験動物施設においても高度な設備と、高いレベルの維持管理が要求されるようになって来た。このような背景から、多くの実験動物施設では、施設を専門に管理する専任の施設管理者を配置するようになってきた（図3）。

このような実験動物施設における分業化は、欧米ではかなり以前から顕著となり、この分業化した機能を有機的に結びつけることにより、実験動物施設と動物実験を支えてきた。その代表的な例として、

- 1) 欧米を中心として、実験動物福祉と倫理に基づいた飼育管理を行うために、いわゆる獣医学的管理を実践する、実験動物学専門の獣医師を含む機能が実験動物施設内に組織されるようになってきた。
- 2) 英国などのヨーロッパ諸国を中心に、動物を使う実験者に対しては様々な法的規制があり、動物実験や実験者にはライセンスや、特別な教育が必要である。そのため、外科手術、投与、麻酔などを専門的に行うことが出来るライセンスを有する技術者の存在が不可欠となってきた。
- 3) 動物実験に用いられる技術の多様化や、高度な研究機器が動物実験分野にも導入されるようになってきた。そのために一人の研究者が、その高度な技術を短期に修得したり、あるいは専門的な研究機器を自ら操作することが、時間的にも物理的にも困難となってきた。そこで研究を補助する専門的な技術を有する技術者が実験現場を支えるようになってきた。
- 4) 国際的に競争の激しい分野において、利潤を追求する製薬企業等は、多くの試験研究を効率的に行うための、実験動物施設における一つの解決策として分業化による生産性向上を推し進めている。

このような、実験動物施設における分業化は、研究の為の良好な実験環境を提供するという観点から、有用である。しかしながら、研究を直接あるいは間接的に補

助する上記のような分業化と系統的な組織の整備は、我国においては欧米に比して未だ不十分な点が多い。しかし、昨今の我国においても、ようやく一部の実験動物施設で研究ニーズに合致した施設環境の整備が進みつつあるが、まだその端緒にすぎないばかりである。

4. 実験動物学と実験動物施設

我国の実験動物学は、今まではその中心が実験動物の繁殖、感染症、飼育管理や、これらの項目の実行をするための周辺技術が中心であった（図4）。しかし今日、実験動物学及び動物実験とその基盤となっている動物施設に対しては、非常に多くの要素が期待されている。今日、実験動物学は、極めて基礎的な学問分野から、工学や建築学、そして応用学としての産業までも包含する、非常に幅広い学問分野を含んでいる。これを大別すると

- 1) 基礎実験動物学：極めて学問的な基礎分野
- 2) 実験動物管理学：施設の構造、建築や飼育や施設管理を包含する分野
- 3) 実験動物社会学：実験動物福祉や法規制及び特許も含む分野
- 4) 応用実験動物学：医薬、食品、農薬などの産業と直結する分野

の、大きく4つの分野からなると考えられる（図5）。

以前は、基礎実験動物学及び応用実験動物学の2分野が実験動物学の中心をなしていたと考えられる。しかし今日、実験動物管理学や実験動物社会学と称することができる領域においても、実験動物施設には期待されている。

しかしながら、動物実験を行う環境と言う点で、現在の実験動物施設は多くの問題を残し、産官学連携の促進や国際的な競争あるいは国際化への対応等の、社会的な要請に対して必ずしも十分な対応が出来ないばかりか、時には残された多くの問題が障害ともなっている。そのために実験動物を用いた研究の急激な変化と、実験動物学を取巻く社会的な変革に、必ずしも適切に対応出来ていない現状がある。

このような状況に対して、実験動物施設は施設の運営管理に関する周辺技術や知識の拡充と共に、実験動物の倫理や福祉、安全衛生、獣医学的管理等を含めた諸々の事項を体系的に整理し管理していくことが求められている。そのために、実験動物管理学や実験動物社会学を包含する「実験動物施設管理学」と言えるようなマネジメントの手法の確立が望まれる。また同時に、これらの領域を担い時代と社会の要請に応じて、実験動物施設や動物実験を支えるための人的資源の育成と教育が急務である。

5. おわりに

今多くの研究機関は、生き残るために合理化等を行っている。生命科学研究の主要な機能の一つである、実験動物施設も例外ではなく、動物実験及びその基盤となる動物実験施設に対しても、生産性の向上や効率の改善に対する強い圧力がある。そして一部では、実験動物施設その物の存在価値が問われ、施設が研究におけるコアであるかが問われ、議論が行われるようになってきた。

今後、我国の実験動物施設が、生命科学分野における主要な要素として生き残って行くために、実験動物と施設の運営管理に関する周辺技術や知識の拡充に努めなければならない。また同時に、高いレベルにある個々人の経験や技術を有機的に結びつけ、動物実験を行う基盤としての施設機能を充実させる必要がある。さらに社会的な要請に応え国際的にも高い評価を受けるためには、実験動物の倫理や福祉の実践、知的財産保護、安全衛生管理、獣医学的管理等を積極的に推し進めていく事も重要と思われる。そのためにも、業務を体系的に整理し、分業化やシステム化を急ぐ事が必要不可欠である、

さらに、実験動物と実験動物施設を取り巻く構造的な問題とし、実験動物および施設に携わる者の社会的地位と人材層の問題がある。今後の課題として、実験動物施設を支える有能な人材の確保と地位向上を計ると同時に、この領域を担う人材の育成が急務であると考ええる。

これらの事により実験動物施設の原点である実験動物飼育管理等の質的向上を計り、さらに動物実験の研究環境基盤を整備する事が重要である。その結果、実験動物施設において、より質の高い実験研究が行なわれることとなり、その事は同時に実験動物学に携わる我々が期待されている、社会的なニーズに答える事にもなると考える。

図1. 実験動物学を取巻く環境

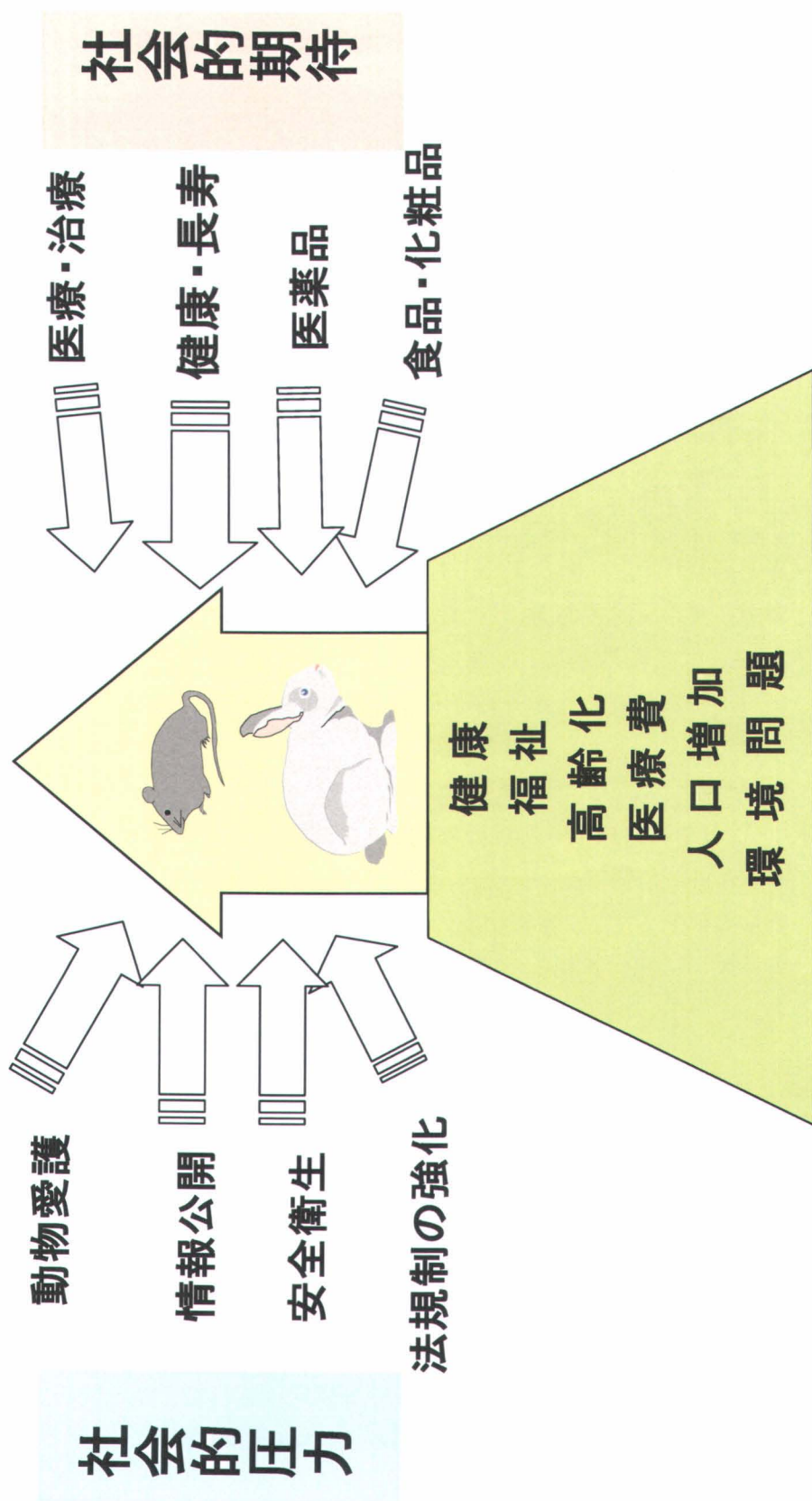


図2. *In vivo* から *In vitro* そして *In vivo*

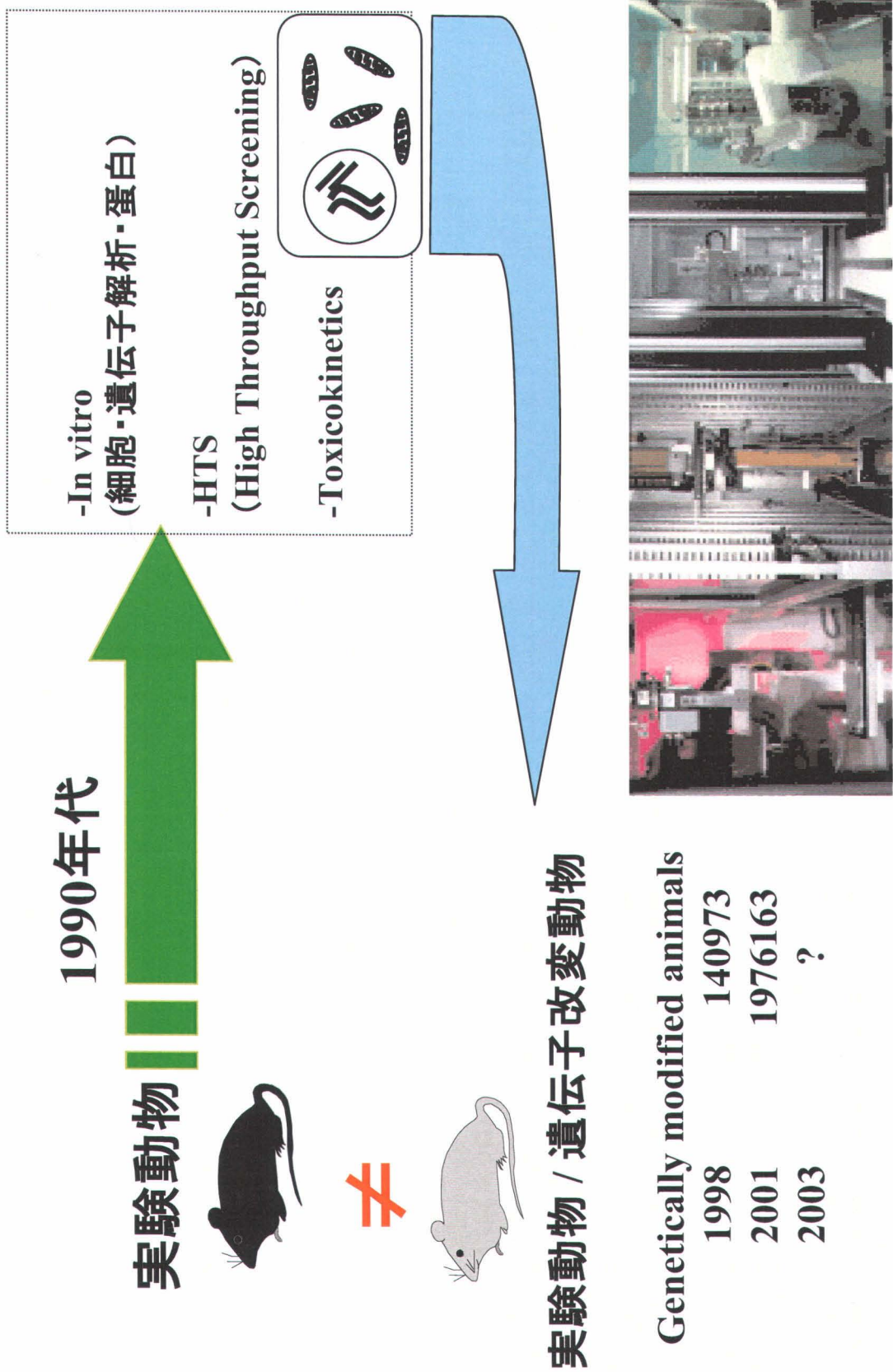


図3. 実験動物の分業化

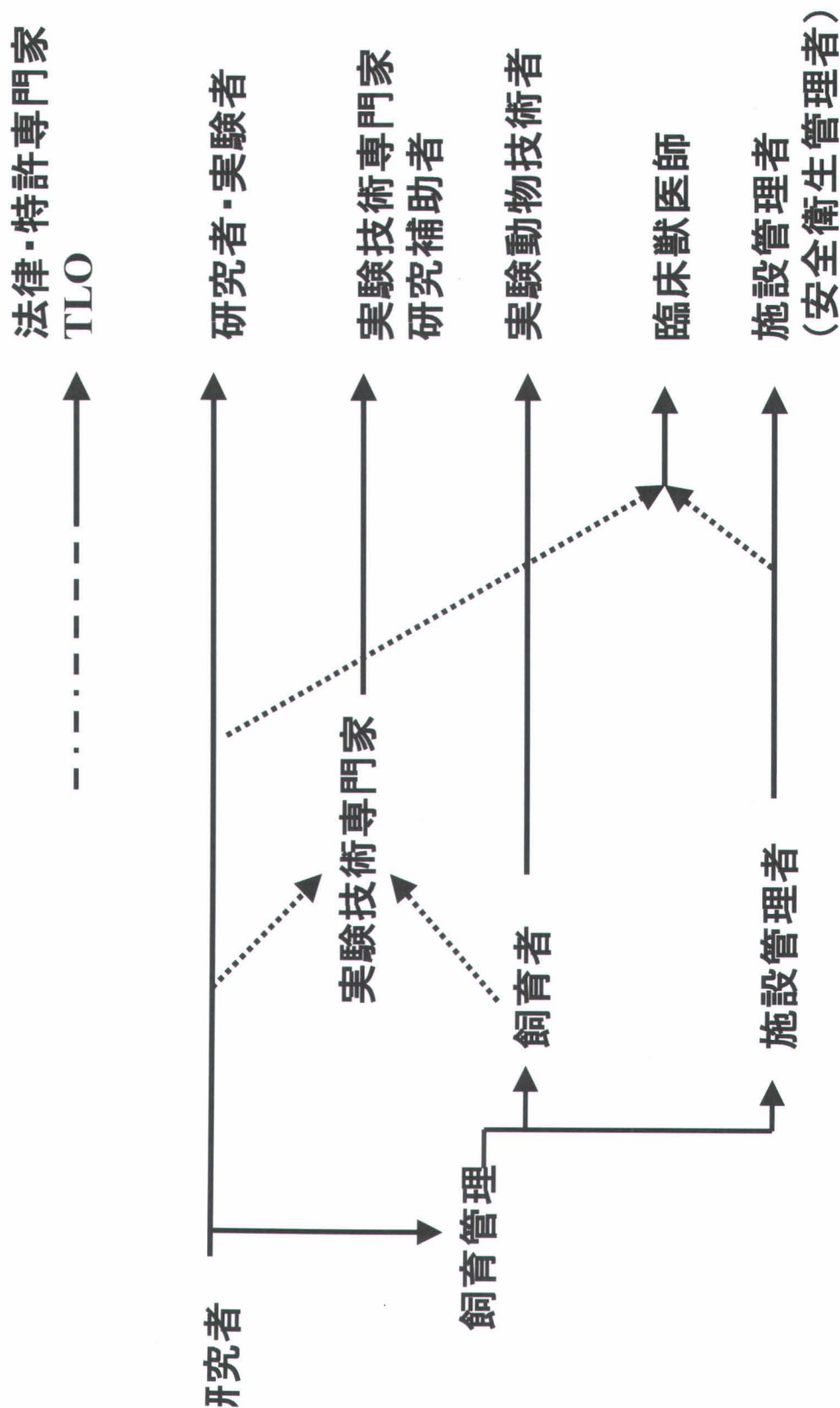


図4. 実験動物学？

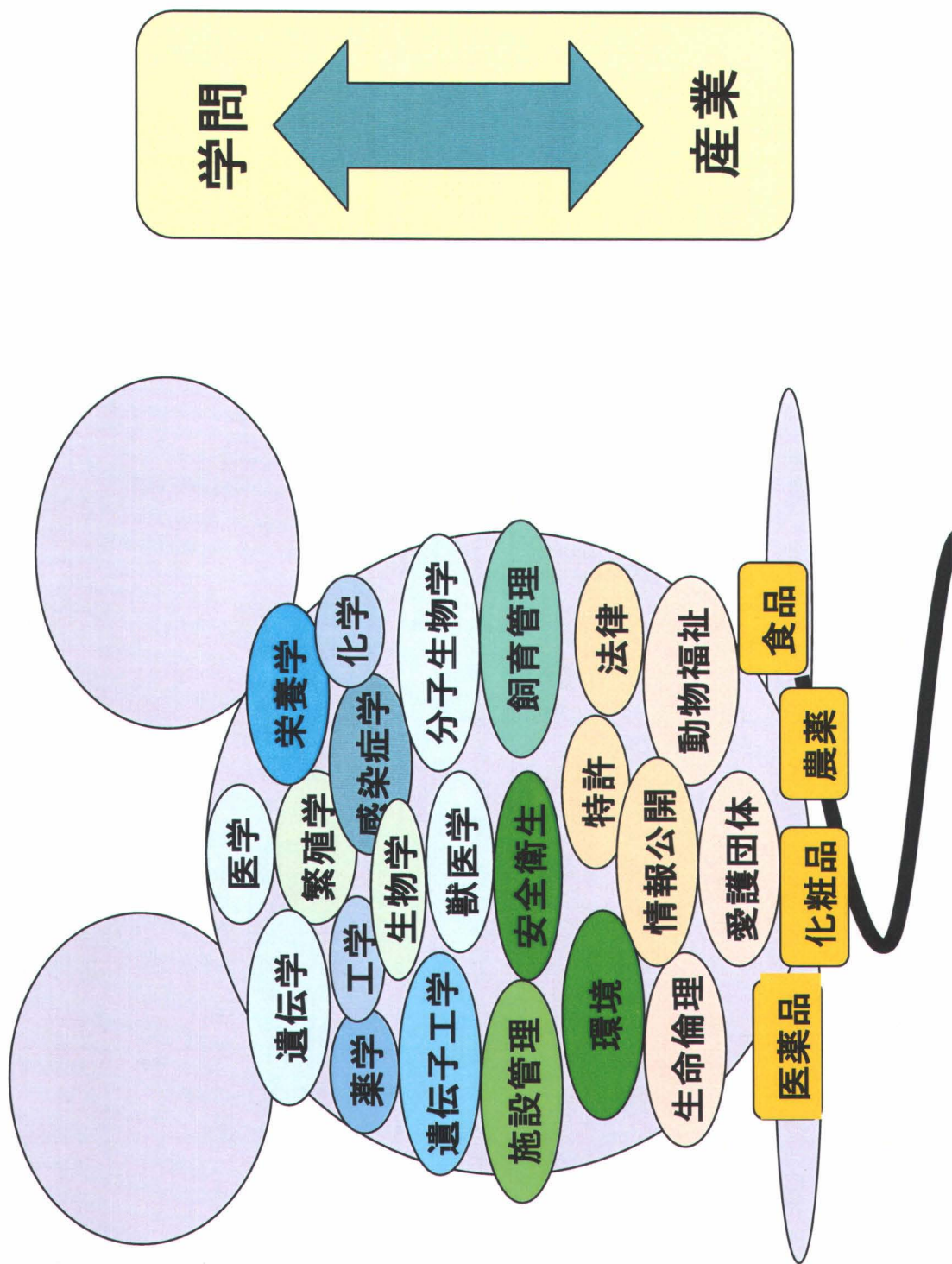
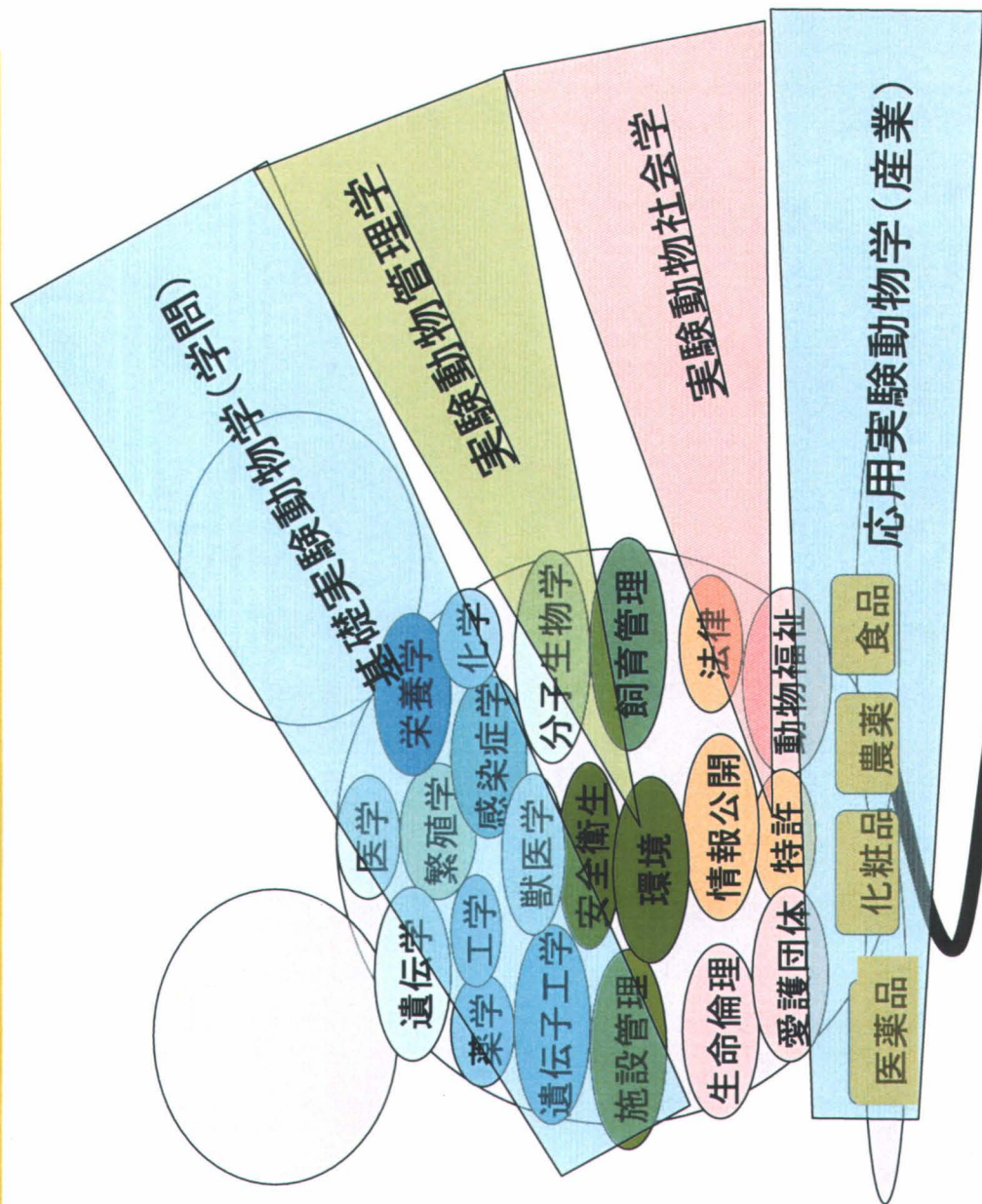


図5. 変わる実験動物学とその多様性



ポストゲノムシーケンス時代を迎え、創薬研究に大きな変化が起こっている。創薬研究の前半の段階であるターゲット分子の探索やバリデーション段階における実験動物の有用性についての議論は重要である。一方で、創薬研究の後半の段階（育薬研究）である前臨床試験におけるイノベーションが、トキシコゲノミックスとしてのみ語られるのは、実験動物学の立場からはいささか勿体無い気がする。そこで、大学人として実験動物学に携わっている立場から、以下の点について議論したい。遺伝子改変ラットの重要性、疾患モデル動物のレパトリーの重要性、クローズドコロニーvs 交雑群。（例、欠けているところ、もしくは置き換えたほうが良いと思われるもの：遺伝子改変ラットや遺伝子改変イヌもしくはブタ、患者一人一人に対応した疾患モデル動物のレパトリー、遺伝学者から見たクローズドコロニーの問題点）

また、実験動物学は、バイオ産業の進展を支援する、実学としての性格を持つ総合的学問である。現在の動物実験を大所高所からながめ、欠けているところ、補足すべきところ、全く置き換えたほうが良いと思われるものを指摘してくれるのが、実験動物学である。「実学としての性格を持つ総合的学問」であるが故、実験動物学の発展は、大学サイドのみの力で達成されず、産業界、行政を巻き込んだ産官学連携を強力に推し進める必要がある。大学内に埋もれたシーズをニーズへ育成するには、大学発ベンチャーの創生が大きな力となるため、実験動物学分野においても大学発ベンチャーが多大な貢献をする可能性がある。産官学連携、特にベンチャーが果たす役割について、考えたい。（例、補足すべきところ：産業界における新たな実験動物の開発パワー、新たな解析技術をスピーディーに取り込む必要性）

ポストゲノム時代と産官学連携時代における 実験動物学

私の疑問:

学問としての実験動物学は
今後も存在するのか

本日の内容:

- ・遺伝子改変ラットの重要性
- ・疾患モデル動物のレパートリーの重要性
- ・クローズドコロニーvs交雑群の論争

北海道大学先端科学技術共同研究センター
北田一博

本日の内容:

1. 遺伝子改変ラットの重要性
2. 疾患モデル動物のレパートリーの重要性
3. クローズドコロニーvs交雑群の論争

(産学連携、特に大学発ベンチャーが果たす役割)

なぜ、ラットなのか

ほど良い大きさ

豊富なゲノム情報、リソース

遺伝学的、微生物学的コントロール

日本の伝統

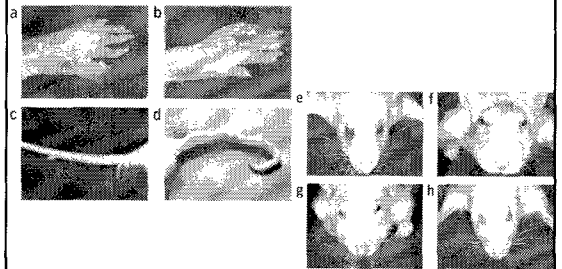
弱点: ES細胞が存在しない

ES細胞を介せず遺伝子改変動物を作出する技術

ウィスコンシン大学でのプロジェクト

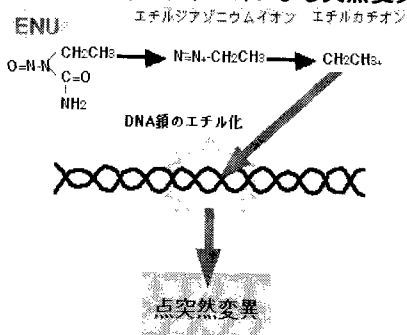
Production of knockout rats using ENU mutagenesis
and a yeast-based screening assay

Yunhong Zou^{1,2}, Jia D. Jiang^{1,2}, Kai-Shun Chen¹, Laurie A. Shepel¹, Don Wigginton¹, Yu-Rong Wang¹, Rong Hui¹, Christine C. Lopez-Gonzalez¹, Heidi E. Reese¹, Katherine J. Porter¹, Rachel A. Leonard¹, Andrew A. Hirtl¹, Stacy J. Schumner¹, Ann F. Elghebaie¹ & Michael N. Gould¹



疾患モデルラットの網羅的開発について

エチルニトロソウレア (ENU) による突然変異誘発



われわれのコンソーシアムにおける

疾患モデルラットの網羅的開発について

エチルニトロソウレア (ENU) による突然変異誘発

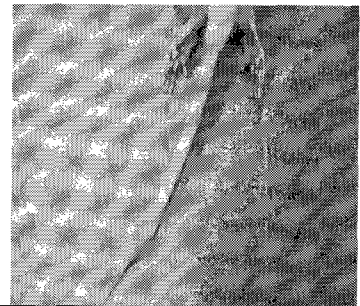


Figure 1. Histological sections of the ovary of a female rat. **A:** Low-magnification view of the ovary showing the corpus hemorrhagicum (CH) and corpus luteum (CL). **B:** Higher magnification view of the corpus luteum (CL) and corpus hemorrhagicum (CH). **C:** High-magnification view of a corpus luteum (CL) and corpus hemorrhagicum (CH). **D:** High-magnification view of a corpus luteum (CL) and corpus hemorrhagicum (CH).

なぜ、ラットなのか

ほど良い大きさ

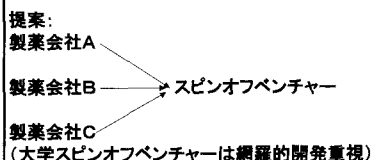
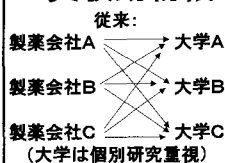
豊富なゲノム情報、リソース

遺伝学的、微生物学的コントロール

日本の伝統

ES細胞が存在しない弱点が
克服された！

実験動物領域における構造改革



われわれのコンソーシアムにおける 遺伝子破壊ラットバンクとは

- ・破壊遺伝子に関するリソースもしくはデータベース
破壊遺伝子と遺伝子破壊ラットの対応付け
契約企業(製薬会社、健康機能食品会社)へ公開
- ・遺伝子破壊ラットを用意するための精液バンク
- ・ヒト型モデルラット作製のための発生工学受託部門
ラット内在性遺伝子を破壊した上でヒト遺伝子を付加

本日の内容:

1. 遺伝子改変ラットの重要性
2. 疾患モデル動物のレパートリーの重要性
3. クローズドコロニーvs交雑群の論争

(産学連携、特に大学発ベンチャーが果たす役割)

なぜ、今疾患モデルなのか

ポストゲノム時代

第1相創薬研究の時代

いち早いリード化合物からの新薬開発

疾患モデルリソースの整備

(テーラーメイド医療時代への対応)

ENUによる突然変異誘発による 疾患モデルラットの開発

Gene-drivenとphenotype-drivenのスクリーニング



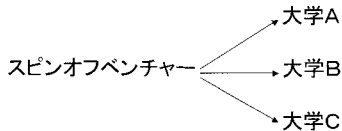
糖尿病や高血圧を示す複数の
疾患モデルラット系統を作出



新規の疾患モデルラットの開発
新規の疾患遺伝子の発見

ポストゲノム時代と産官学連携時代

実験動物学も個別研究のみならず、
網羅的開発を！



本日の内容:

1. 遺伝子改変ラットの重要性
2. 疾患モデル動物のレパートリーの重要性
3. クローズドコロニーvs交雑群の論争

(産学連携、特に大学発ベンチャーが果たす役割)

クローズドコロニー系 (outbred strain):

5年以上外部から種動物を導入することなく一定の集団内のみで維持され、常に実験供試用動物が繁殖されている系統

(近交系に由来するクローズドコロニー系)

非近交系に由来するクローズドコロニー系

個体群レベルで同一の遺伝子頻度を再現

問題提議:

本当に同一の遺伝子頻度を再現？

本当に多型性が高いのか？

国際ハーモナイゼーションに適應？

交雑群 (hybrid strain):

異なる2つ以上の系統間の交配により作出される系統

雑種強勢 Hybrid vigor

特定の系統間の交配による新たな表現型の出現

環境要因に対する安定性

ヘテロ性、多型性の保障

国際ハーモナイゼーションに適應する

本日の提議のまとめ:

・遺伝子改変ラットの重要性

・疾患モデル動物のレパートリーの重要性

・クローズドコロニーvs交雑群の論争

実験動物領域における網羅的開発能力の必要性

大学スピノフベンチャーの重要性

私の疑問:

学問としての実験動物学は

今後も存在するのか

私の答え: 存在する

国際的実験動物、動物実験の法規制の趨勢 そして国立大学の独立行政法人化

大阪大学医学部
黒澤 努

実験動物の利用そしてその目的である動物実験に関して世の中の人々がニュースメディアを通して知る機会が増えている。それまでは一部の熱狂的な動物愛好家あるいは思想的な動物権利論に基づく動物実験反対運動過激派は当然動物実験に関して極めて関心がたかかった。しかし、最近ではpositiveな動物実験の成果だけでなく、動物虐待に関するニュースも増え、動物実験が再度一般人の意識に上ることが増えた。

これまで学問の自由を謳歌してきた国立大学も国際的な流れの中で、実験動物福祉あるいは動物実験代替法に関して留意する必要があるが出始めてはいた。当初これに気づいた研究者も当時のあまりの研究費の貧困さから国際的な水準で実験動物福祉を考えることは現実的でないとして十分な配慮をこななかった。

インターネットの発達により国際的な情報がよりきめ細かく、また自分の関心事については即時的に情報が入手できるようになったことから、世の中の人々が国際的な情報を容易に判断できるようになった。これまでは一部の国際通の学者だけが占有してきた国際情報が容易に誰でもが入手できることとなったのである。これまでもおそらく学者達はもしかかったとしても自分達に不都合な情報はわざわざ世の中のひとに伝える必要はないと判断して、自分たちに好都合な情報だけを世の中に喧伝してきたのかもしれない。こうして科学全体とりわけ動物実験に関わる情報に関しては世の中の人々の国際的認識と学者の認識にずれが生じてきていたのかもしれない。

欧米先進国ではバイオメディカルサイエンスの重要性は我が国よりも先に認識されていたようで、研究費の比重は高かった。とはいっても研究費の大本は税金であるから、それほど潤沢なはずはなく、できるだけ経費のかからぬ研究方法を選択していた。実験動物で言えば、それほど経費のかからない手近なペット動物、あらかじめ処分される運命にあった都市型ゲッシドウブツ、そして家畜が経費的に手頃なものとして用いられた。しかし、都市化が始まると世の中の人々の動物観が変化してきた。一般的に目にするあるいは接触する動物の多くがペットだけとなり、ペット自体の意義すら変化し、家族の一員と認識する人々が増えると、研究者が経費的に容易に入手できると考えていたペット、たとえそれが遺棄され、処分される運命であったとしても、家族の一員の同族を実験に利用することに否定的な雰囲気我が国より先に蔓延していた。したがって動物実験に関しても徐々に法規制が始まっていたものと思われる。

我が国では戦後、経済的に疲弊していたことから、実験動物の運命に気を遣う余裕すらなく、人々は自分の生存にもっとも重きをおいた生活をしていた。

ところが我が国の経済活動が活発となり衣食足りると、ペットの社会的地位が上昇しただけでなく、欧米と同様に都市化生活によりペット以外の動物を体感する機会が減ってしまった。科学活動も同時期に我が国では相当の研究費が投入されるようになり、活発となったが研究者のモラルにまではなかなか言及されなかった。現在でも我が国では研究者のモラルに関しての明確な規範がないように思われる。

こうして我が国では世の中の人々の動物実験に対する批判が続々と顕在化した。その論理的根拠は諸外国では法規制を受けているのに、なぜ我が国では野放しであるのかと言った批判であった。これには動物実験だけでなく研究者一般のモラルおよび閉鎖性もからみ、明快な答えを準備できなかったに違いない。世の中の人々が国際的情報を獲得し、諸外国における動物実験の法的規制の内容を熟知したにもかかわらず、動物実験を行う研究者は法的規制の存在こそ知っていたが、その内容に関する真摯な検討と理解は必ずしも十分ではなかった。

そこへ我が国の多くの国民は民主主義における納税者の意味を国際的に理解するようになった。その一方動物実験をもっとも多く行う国立大学の研究者は、自分たちが税金を用いて研究活動をしているという意識が希薄で、それまでの”お上”感覚から脱出できず、国民の批判をまともに聞くことに時間をかけてこなかった。実際、研究費の配分においても半自動的な支給と極めて閉鎖的な環境の中での審査による配分がほとんどである。これらはいずれも欧米では20年くらい前までに起こった事象であり、現在は大幅に改善されている。そこへ国立大学の独立行政法人化が行われることとなった。

動物実験に関する欧米における多くの法規制は実験動物の福祉を願う納税者と、自由に研究を行いたい研究者の間に行政機関が入り、長い時間をかけて改善を積み重ねてきたものである。場合によっては立法により動物実験経費が急騰することもあったものと想像できるが、それを適正に行うためにも、行わせるためにも研究費の増額などで対処してきた。したがって、その関係は極めて成熟したものとなり、法規制があったとしても、それを遵守しながらでも動物実験が行える土壌が準備されたのである。

しかし、今回の我が国の国立大学独立行政法人化はいかにも唐突に訪れ、動物実験などより先に一般の民間企業ではすでに熟知していた法規制が研究一般において”お上”の決まり事（人事院規則）とは大きく異なっていることが明らかとなってしまった。もう少し緩やかに変革して行くのであれば混乱は少ないと思われるが、あれだけの俊才を擁していたはずの国立大学も、官僚機構もこうした予測はできず、予算的にも人員的にも期限までに法規制をいかにclearするかで大混乱に陥っている。はなはだしい見解は、もう所詮、期限までに法を遵守するすべがないので努力はしないとまで”お上”的発想で公言するものがでる始末である。

ましてやこれまでほとんど整備されなかった、あるいは整備を拒んできた動物実験の法規制に関して、とりわけ国際的比較において人々、納税者が求める

ようなことを突然、新制独立行政法人ができることはほとんどないのではないと思われる。もし、国立大学がこれまで民間で行われていた動物実験に関しても少しは関心をもち、たとえ適用されていなかったとしても、仮定の話としてでも民間での遵法精神を発揮するとどのような事となるかを検討し、欧米先進国の法規制についての確な情報を獲得していればもう少しなんとかなったかもしれない。

欧米の大学とりわけ先進的な米国の大学の多くは私立大学であり、厳しい法規制があったとしても遵守しないことには研究活動自体ができなかった。実際動物実験が不適切であるとして国の研究費を差し止められた一流私立大学すらあったのである。彼らが一樣にいうのは、“適切な馴致期間をおいての法規制であれば遵守するのはさほど困難ではない”。当然動物実験の経費は高騰するだろうが、それでも本当に必要な研究は行うのである。また突然、遵守が困難な法規制を防御する態勢およびそれに要する経費の手当もすでにシステムとしてできあがっているのである。逆に欧米の多くの研究者はルールもないところで適切な動物実験をやれと言われても何をどこまでやれば許容されるのかわからず、あらぬ動物実験反対運動の対象とされることがや、不必要と思われる設備、システムのために不要な経費を必要とするのは我慢ならんとしてきた。したがって自主的に様々な指針を研究者自身が作り上げるというシステムもすでにできあがっている。

さて我が国の動物実験はいったいどのようなこととなるのであろうか？一歩間違えばこれまで実験動物福祉の抵抗勢力であった国立大学の独立行政法人化にともない、為すすべもなく、法外な規制が作られてしまう可能性もある。このときの混乱は独立行政法人だけでなく、これまで健全に遵法精神で動物実験を行ってきた民間企業に及ぶことになりはしないかと心配である。また関連法規制も思わぬ方面からも来始めた。たとえばカルタヘナ条約批准に伴う遺伝子改変生物の規制に関する法律の適用である。欧米ではこれまで実験動物は施設から逃亡できないよう法規制されていたので、遺伝子改変実験動物に関してはなんらの新たな法規制は不要なのかもしれない。しかし、我が国ではこれまでこうした法規制がなかったがために、姑息的にネズミ返しを形式的に設置することでお茶を濁してきた。遺伝子改変実験動物の逃亡防止の法規制に対して国際的整合性をもって対応するためには巨額の設備投資が必要となるが、その投資ができないあいだは著しく関連の研究を縮小せざるを得ないかもしれない。

とするならばわれわれ動物実験に携わる関係者は動物実験反対運動家よりもお一層欧米の法規制を勉強し、具体的に我が国の現状に適合する自主規制を速やかに開始してはいかがだろう。さらには国際的なルール作りに積極的に参加して、我が国でも実現可能な国際ルールの構築に汗を流してはどうだろう。

[要約]

アメリカの経済学者である J. シュンペーターの言葉に、「イノベーションはノイエルコンビナチオンからなる」というのがある。既存研究の世界から全く新しい研究テーマに挑戦するときとか、新しい接近法を模索するときには、誰でも知らないうちに、複数の異なる概念からヒントを得ようとしている。学際、先端、など新しい挑戦のきっかけを示す言葉もあるが、「融合」という言葉も新しい方向を探るとき頻繁に使われる。融合は他の言葉と違って、先ず自らが「溶けた」上で「合う」わけであって簡単に自らの城を明け渡すのが苦手な研究者にはかなりの意識改革が必要である。本稿では、この融合について見直し、個人のみならず組織としても新たな挑戦への一つのきっかけになると思っていることから、分析を試みる。ちなみに、平成18年度から始まる予定の第三期科学技術基本計画ではこの融合が一つの柱になると見られている。

1. NAISTの紹介

筆者の所属している奈良先端科学技術大学院大学（以下、Nara Institute of Science and Technology: NAISTと略する）には情報科学研究科（通称IS/IT）、バイオサイエンス研究科（通称BS/BT）、物質創成科学研究科（NS/NT）の3研究科がある。科学技術基本計画における重点4分野のうちの三つであり、四つ目が環境である。（実は環境も研究課題として取り組んでいるが、外部から見える形にはなっていない。）

NAISTの歴史は浅く、1991年創設でわが国では例の無い構想としての学部のない大学院のみの国立大学である。当然、創設に携わる教官は多くの異なる組織からの異動である。彼らの経歴でいえば、国公立大学からの異動者を中心にして、民間企業、国立研究所などから集められた、いわゆるヘテロな教官集団である。学生とえば、学部がないことから出身大学は全国通津浦々から集まっている。

先端を目指し元気さ以外に特に学風があるわけでもなく、大学院生しか居ないという未体験教育への挑戦である。学長として、平素使う言葉としては、「あるべきようは」、および「温故“創”新」である。前者は、明恵上人のあるべき姿を追求すること、後者は、温故知新を「知る」から「創る」に変えたわけである。

大学の規模にかかわらず、大学には教育、研究、社会貢献の三つの使命がある。教育は言うまでもないが、研究成果でも伝統ある大学に挑戦して勝機がなくてはならない。NAISTは2研究科で開設されその後3研究科になったが、1991年の創設から10年を経過して、さらなる躍進を図るためには新たな挑戦の継続が必須である。そこで、学長として具体的戦略として提唱している一つが融合研究である。以下では、ITを話題の中心にして融合研究というものの分析を試みる。

2. 3研究分野の具体的テーマ

先ず、どのようなことがそれぞれの研究科のキーワードになっているかを、簡単に列挙してみる。

(ア) IT (情報通信技術)

- (1) コンピュータとコミュニケーション
- (2) 画像処理、自然言語処理、音声処理、ネットワーク、ソフトウェア、データベース

(イ) BS/BT (バイオ・生命科学)

- (1) 動物、植物、微生物、
- (2) 遺伝子、タンパク質、細胞、固体、環境

(ウ) NT (ナノテクノロジー)

- (1) 物性、化学、材料
- (2) 分子・原子・量子(電子)レベル
- (3) 無機、有機、生体、金属の分析、計測、加工、合成

次に、これらの個々の専門分野から新しく融合される研究分野として実現されているとか、今後の発展の可能性がありそうな具体的テーマや特徴を列挙してみる。

(ア) バイオナノ；

- (1) ゲノムや分子レベルで共通点；人工皮膚・人工骨など

(イ) ナノインフォ；

- (1) X線レベルの微細加工など

(2) I T側はハード中心

(ウ) バイオインフォーマティックス；

- (1) データマイニング
- (2) コンピューティングパワーの利用
- (3) シミュレーション
- (4) 統計確率の知識と計算能力
- (5) I T側はソフトウェア中心

さらなる例として、1999年度と2000年度とに、バイオインフォーマティックスについて、国際高等研究所で当時副所長をされていた松原謙一先生が国内の優秀な先生方をボランティアで集められ、実習付きの講義をおやりになった報告書が「情報生物学講義目録（国際高等研、監修）」として出版されている。各先生方の講義内容は、

(エ) 配列情報の科学

(オ) タンパク質構造と情報科学

(カ) 生命のふるまいと情報科学

(キ) 相互作用と制御の情報生物学

(ク) 多様性と進化情報生物学

(ケ) 生命情報の大規模化とその科学

であるが、ここでの情報科学側ではハードウェアは皆無で、アルゴリズム、解析、情報抽出、機能予測、概念の議論が中心である。

3. 融合の切り口

融合と一口に言ってもいろいろな切り口がある。

例えば、アプローチの違いとして、基礎と応用、基礎と基礎、基盤と先端、など二つのものを意識して使う場合が多い。

同様に二つのことでも、科学と工学の融合の場合には、前者は発見であり、後者

は発明という基本的な違いがある。発見された原理を使って新しいものを発明できれば理想的である。単に科学として研究を目指すのではなく、その応用まで意識することの効果は大きく、研究テーマとしての説得力はある。それぞれの定義を眺めると次のような内容である。

(ア) 科学とは、対象を組織的・系統的に研究して、(自然の) 普遍的な原理・法則を求める学問

(イ) 工学とは、物理学・化学・生物・数学などの基礎的科学を工業生産に応用するための学問

(ウ) 技術とは、科学の利用の有無にかかわらず一定の手順でものや仕組みを作る技法

さらに、「匠」の世界があって、常識的な理解としては高度なスキルを持つテクニシャンとでもいいえようか。

二つの概念が補完関係にあることも望ましい融合の形である。バイオインフォマティクスでは、バイオとしてはナマモノを扱うボトムアップにデータを収集するのに対して、情報系としてはドライな物事をシステム(系)として観察することが前提であって言わばトップダウンである。この二つは相互に補完関係にあるといえよう。

一方、現実には融合の切り口が必ずしも明確でない場合も少なくない。言い換えれば、違いがあるはずであるにもかかわらず、すでにボーダーレス化が進んでいるとも理解できる例である。生物物理や物理化学はそれぞれ生物、物理、化学のアプローチが一人でも理解しなくてはならない時代であって、融合といえるだろう。

液晶という概念は、一昔前には存在しなかった。個体、液体、気体の3相では不十分であるということである。将来はもっと多くの相が提案されるのであろう。

ついでに言うなら、本研究会の先生方のご専門であるはずの「生命」と「生物」の定義もさだかではないらしい。

3. 融合のレベル；個人から文化まで

NIASTは教員200人、学生数1100人程度であるから互いの情報交換は容易である。言い換えれば、人と人との触れ合いの場を提供するキャンパスレベルでの融合の機会は非常に多い。

人という個人の触れ合いレベルから集団の触れ合いに発展することにより、歴史が作られてきたと理解できる。新しい文化はそれまでの文化の融合の結果生まれると言われる、異なる人種や集団の考え方・習慣がから新しい文化が生まれることは歴史が証明している。

日本人は縄文時代に北方系と南方系の人種からなり、中国からの仏教文化が伝えられたにもかかわらず、日本独自の天の命令による皇帝ではなく、神の子孫の天皇が存在した。日本人は受容・集積型の文化特性を持っており、多文化の時代への適応性が大きい人種と言えよう。その中であって、仮名文字を発明するという独創的をも持ち合わせている。

4. まとめに代えて

知的財産権の価値について、最近の裁判で青色発行ダイオードの発明者に対して200億円の会社からの支払いが命じられた。一昔前なら門前払いであったことが、堂々と裁判の争点になり、判断結果も最近の実情を反映することになる。

研究においては、日本人の考え方と海外の人との考え方を意識することにより、補完できる場合もあるし、共同研究がうまく進まないこともあるだろう。国民性とか企業文化などとも言われてきたが、むしろ最も大切なことは文化として割り切るのではなくて、社会の変化とともに価値基準が変化することも十分に理解しておかなくてはならない。

平成18年度から第三期科学技術基本計画が発足するが、そこには融合が大きな柱になると目されている。個々の閉じた世界や環境に安んじているのではなくて、何があるかは見えない新しい融合の世界に一人でも多く挑戦され、人類の繁栄に貢献されることを期待している。

プラナリアに再生の秘密を学ぶ

理化学研究所
発生・再生科学総合研究センター
進化再生研究グループ
阿形清和

[はじめに]

プラナリアは19世紀から再生能力の高い生き物として研究されてきた。しかし、細胞培養や遺伝学的解析ができないことや、分子レベルでの研究が難しいことから実験動物として重宝されることなく細々と20世紀を過ごしてきた。1991年に新設の姫工大の理学部に移るとき、教授の渡辺憲二先生とプラナリアの復活をめざして、プラナリア研究の近代化を精力的に進めてきた。渡辺先生が樹立したクローン株(GI)を使いながら、初期段階においては、各種遺伝子マーカー、分子マーカーをとって、再生実験や移植実験を行っては細胞レベル・分子レベルでの解析を進め、いくつかの新しい仮説を提唱した16,17。次段階として、遺伝子の配列データ2、発現パターンのデータベース化、DNAチップの整備、ゲノムプロジェクト(2004年終了予定)、HiCEP解析などの実験動物としての環境整備を進め、一方でRNA干渉法による遺伝子機能解析や、セルソーターを用いた幹細胞精製を行い、再生に関与する遺伝子群の同定を行ってきた18-30。ここでは、それらの結果を整理して報告したい。

[目的]

プラナリアは成体になっても全身に全能性の幹細胞を持っているために高い再生能力を保持していると考えられている。そこで、われわれは、このプラナリアの再生を可能にしている全能性の幹細胞に焦点をあわせ、全能性幹細胞の精製、全能性幹細胞を全能性たらしめている分子基盤の解析、全能性幹細胞を制御する分子システム・遺伝子の解明を中心に解析を進めている。

[結果と考察]

1. 全能性幹細胞の精製とその分子基盤の解析

プラナリアの全能性幹細胞を理解するためには、全能性幹細胞をプラナリアの解離細胞から精製することが不可欠である。旧来はガーゼでこして小型の細胞を集めて濃縮していたが、われわれはセルソーター(FACS)を用いて幹細胞の精製する方法の開発を行った。残念ながら、血液細胞の分取のときに用いる細胞種に特異的な細胞表面抗体がないので、細胞表面抗体無しで細胞を選別する方法を開発した。われわれは、幹細胞がX線照射に対して感受性が高いことに着目し、解離細胞をヘキスト(核染色)やカルセイン(細胞質染色)といった蛍光色素で染色した後に、X線照射によって特異的に消失する2つの細胞集団(X1とX2と命名)をセルソーターで集めた。それらの細胞について、電子顕微鏡で形態観察したり、細胞増殖関連遺伝子や幹細胞関連遺伝子の発現を調べたところ、X1が増殖過程にある幹細胞、X2が休止期にある幹細胞で占められていることが明らかとなった。現在、それらの細胞の培養条件を探るとともに、プラナリアの全能性幹細胞の全容解明にむけて網羅的な遺伝子解析を行っており、近い将来、プラナリアがなぜ成体になっても全能性幹細胞を保持できているのかの謎が明かになることが期待され

る。

2. 全能性幹細胞の増殖・分化制御に関与する遺伝子の解析

次にプラナリアはどのような遺伝子システムによって全能性幹細胞を制御して必要なところに必要な細胞を分化させることができるのだろうか。われわれは、脳に着目し、全能性幹細胞からプラナリアの脳を再生することに関与する遺伝子を中心に解析を進めている。今までに、プラナリアが再生芽と切断された古い断片との間でインタカレーションを起こして、体の領域性を再編成し、獲得された新たな体の領域性に応じて全能性幹細胞がその体領域にあった細胞を分化させていることを明らかにしている。そこで、インタカレーションを引き起こす分子を探すために、頭部領域で特異的に発現している遺伝子を DNA チップを作って探索し、それらを RNA 干渉法で機能阻害して脳の再生を引き起こさなくなるような遺伝子のスクリーニングを行った。候補遺伝子のひとつだった#721 遺伝子を阻害したところ、われわれの期待とは全く逆の表現型が得られた。#721 遺伝子は頭部領域に特異的に発現しながら、機能阻害すると、何と、体中に脳が異所的にできたのである。われわれは、この遺伝子を *nou-darake* 遺伝子と命名し、なぜこの遺伝子を機能阻害すると<脳だらけ>の表現型となるかを解析した。その結果、この遺伝子が天然の FGF 受容体のドミナントネガティブ分子として機能する分子をコードしており、頭部から脳の形成を促進する分子を補足して、頭部以外に脳ができないようにしていることが明らかとなった。

[おわりに]

プラナリアは古くから多くの研究者の魂を揺さぶってきた生物である。20 世紀において細々と展開してきた研究は、21 世紀になって、実験動物としての環境整備が進み、幹細胞研究や脳の機能解析、脳の進化といったユニークな分野において新たな知見をもたらす動物として期待されるようになってきた。これからのプラナリア研究に着目してもらいたい。

[参考文献]

1. Regeneration and gene regulation in planarians
K. Agata
Curr. Opin. Genet. Dev., 13, 492-496 (2003)
2. Origin and evolutionary process of the CNS elucidated by the comparative genomic analysis of planarian ESTs
K. Mineta, M. Nakazawa, F. Cebrià, K. Ikeo, K. Agata and T. Gojobori
Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 100, 7666-7671 (2003)
3. Search for the evolutionary origin of a brain; Planarian brain characterized by microarray.
M. Nakazawa, F. Cebria, K. Mineta, K. Ikeo, K. Agata and T. Gojobori
Mol. Biol. Evol., 20, 784-791 (2003)
4. The expression of planarian brain factor homologs, *DjFoxG* and *DjFoxD*
S. Koinuma, Y. Umesono, K. Watanabe and K. Agata
Mech. Dev., 3, 21 – 27 (2003)

5. Intercalary regeneration in planarian
K. Agata, T. Tanaka, C. Kobayashi, K. Kato and Y. Saito
Dev. Dyn., 226, 308-316 (2003)
6. Medio-lateral intercalation in planarians revealed by grafting experiments.
 Y. Saito, S. Koinuma, K. Watanabe and K. Agata
Dev. Dyn., 226, 334-340, (2003)
7. Cultivation and characterization of planarian neuronal cells isolated by fluorescence activated cell sorting (FACS).
 M. Asami¹, T. Nakatsuka, T. Hayashi, K. Kou, H. Kagawa and K. Agata
Zool. Sci., 19, 1257-1265 (2002)
8. FGFR-related gene *nou-darake* restricts brain tissues to the head region of planarians
 F. Cebrià, C. Kobayashi, M. Nakazawa, K. Mineta, K. Ikeo, T. Gojobori, M Ito, M. Taira, A. Sánchez Alvarado, and K. Agata
Nature, 419, 620-624 (2002)
9. Induction of a *noggin*-like gene by ectopic D-V interaction during planarian regeneration.
 K. Ogawa, S. Ishihara, K. Mineta, M. Nakazawa, K. Ikeo, T. Gojobori, K. Watanabe and K. Agata
Dev. Biol., 250, 59-70 (2002)
10. The body margin of the planarian *Dugesia japonica*: characterization by the expression of an intermediate filament gene.
 A. Tazaki, K. Kato, H. Orii , K. Agata, and K. Watanabe
Dev Genes Evol., 212, 365-73 (2002)
11. The expression of neural-specific genes reveals the structural and molecular complexity of the planarian central nervous system
 F. Cebrià, T. Kudome, M. Nakazawa, K. Mineta, K. Ikeo, T. Gojobori and K. Agata
Mech. Dev., 116, 199-204 (2002)
12. Planarian FGFR homologues expressed in stem cells and cephalic ganglions
 K. Ogawa, C. Kobayashi, T. Hayashi, H. Orii, K. Watanabe and K. Agata
Dev. Growth Differ., 44, 191-204 (2002)
13. Dissecting planarian CNS regeneration by the expression of neural-specific genes.
 F. Cebria, M. Nakazawa, K. Mineta, K. Ikeo, T. Gojobori and K. Agata
Dev. Growth Differ., 44, 135-146 (2002)
14. Planarian Cytochrome b(561): Conservation of a Six Transmembrane Structure and Localization along the Central and Peripheral Nervous System.
 A. Asada, T Kusakawa, H. Orii, K. Agata, K. Watanabe and M. Tsubaki
J Biochem., 131, 175-182 (2002)

15. Dorsal and ventral position cues residing in differentiated cells are required for the onset of planarian regeneration
K. Kato, H. Orii, K. Watanabe and K. Agata
Dev. Biol., 233, 109-121 (2001)
16. Planaria *FoxA* (*HNF3*) homologue is specifically expressed in the pharynx-forming cells
S. Koinuma, Y. Umesono, K. Watanabe and K. Agata
GENE, 259, 171-176 (2000)
17. Organization and regeneration ability of spontaneous supernumerary eyes in planarians- Eye regeneration field and pathway selection by optic nerves
F. Sakai, K. Agata, H. Orii and K. Watanabe
Zool. Sci., 17, 375-381 (2000)
18. Ectopic pharynx arise by regional reorganization after anterior/posterior grafting in planarians
C. Kobayashi, T. Nogi, K. Watanabe and K. Agata
Mech. Dev., 89, 25-34 (1999)
19. Molecular and cellular aspects of planarian regeneration
K. Agata and K. Watanabe
Semin Cell & Dev. Biol., 10, 77-83 (1999)
20. Neural network in planarian revealed by an antibody against planarian synaptotagmin homologue
A. Tazaki, S. Gaudieri, K. Ikeo, T. Gojobori, K. Watanabe and K. Agata
Biochem. Biophys. Res. Commun., 260, 426-432 (1999)
21. The process of pharynx regeneration in planarians
C. Kobayashi, K. Watanabe and K. Agata
Dev. Biol., 211, 27-38 (1999)
22. The planarian *HOM/HOX* homeobox gene (*Plox*) expressed along anterior-posterior axis
H. Orii, K. Kato, Y. Umesono, K. Agata and K. Watanabe
Dev. Biol., 210, 456-468 (1999)
23. The role of dorso-ventral interaction in the onset of planarian regeneration
K. Kato, H. Orii, K. Watanabe and K. Agata
Development, 126, 1031-1040 (1999)
24. Expression of *vasa* (*vas*)-related genes in germline cells and totipotent somatic stem cells of planarians
N. Shibata, Y. Umesono, H. Orii, T. Sakurai, K. Watanabe and K. Agata
Dev. Biol., 206, 73-87 (1999)

25. Distinct structure domains in the planarian brain defined by the expression of evolutionarily conserved homeobox genes
Y. Umesono, K. Watanabe, and K. Agata
Dev. Genes Evol., 209, 18-30 (1999)
26. Immunohistochemical detection of opsins in tubellarians
H. Orii, T. Katayama, T. Sakurai, K. Agata, and K. Watanabe
Hydrobiologia, 383, 183-187 (1998)
27. Identification of two distinct muscles in the planarian *Dugesia japonica* by their expression of myosin heavy chain genes
C. Kobayashi, S. Kobayashi, H. Orii, K. Watanabe and K. Agata
Zool. Sci., 15, 855-863 (1998)
28. Molecular cloning of bone morphogenetic protein (BMP) gene from the planarian *Dugesia japonica*.
H. Orii, K. Kato, K. Agata, and K. Watanabe
Zool. Sci., 15, 864-870 (1998)
29. Identification of a receptor tyrosine kinase involved in germ cell differentiation in planarians
K. Ogawa, A. Wakayama, T. Kunisada, H. Orii, K. Watanabe and K. Agata
Biochem. Biophys. Res. Commun., 248, 204-209 (1998)
30. Structure of the planarian central nervous system (CNS) revealed by neuronal cell markers
K. Agata, Y. Soejima, K. Kato, C. Kobayashi, Y. Umesono and K. Watanabe
Zool. Sci., 15, 433-440 (1998)
31. A planarian *orthopedia* homolog is specifically expressed in the branch region of both the mature and regenerating brain
Y. Umesono, K. Watanabe, and K. Agata
Dev. Growth Differ., 39, 723-727 (1997)

ヒトの疾患の遺伝的要因を明らかにするモデル動物として、ショウジョウバエ、線虫の果たしてきた役割は大きい。細胞内シグナル伝達や、組織間相互作用に関わる基本的な分子機構が一举に明らかにされた。これは、ランダムにゲノム遺伝子を破壊した変異体を作成し、特定の生命過程に異常を示す変異体を系統的に収集することにより(変異体の genome-wide スクリーニング)、ゲノム遺伝子の全てについて機能を調べ上げることが可能であるためである。

脊椎動物のモデル動物の中で、ブラフィッシュとメダカ(併せて小型魚類と呼ぶ)は、変異体の genome-wide スクリーニングだけでなく、母体外で発生が進行し、胚が透明なため、受精直後から臓器ができるまで、細胞の分裂、移動などの細胞の振る舞いを連続して観察できるといった詳細な細胞生物学的解析の両方を行えるユニークなモデル動物系である。また機能低下型の実験をアンチセンスオリゴヌクレオチドを使うことにより、1週間余りで行うことが出来る。

脊椎動物においてはじめての変異体の大規模スクリーニングは、ゼブラフィッシュを用いてマサチューセッツ総合病院とマックスプランク研究所で行われた。見出された7000余りの変異体の中から1700が解析されそれが500余りの遺伝子の異常であることが示され、ヒト疾患モデルとなる変異体も多く見出された。しかしながら、脊椎動物のような高等動物では、機能を重複した遺伝子が複数存在するために、変異体を作成してもその遺伝子の機能を表現型として見る事が出来ないことが問題になり、例えば神経系の前後軸に沿った領域化に必要な遺伝子は20余りしか見つからなかった。

メダカは、ゲノムサイズがマウス、ヒトの4分の1(ゼブラフィッシュの半分、脊椎動物で最も小さいゲノムを持つといわれるフグの倍)であり、XY染色体による性決定、6-35度の広い温度域での発生など、ゼブラフィッシュにはない特性を持っており、純系統も作られているなどの特性を持つ。

われわれはメダカを用いた初めての変異体の genome-wide スクリーニングを行った。ゲノムの80%を調べることにより見出した2200余りの胚性致死変異体のうち、356の変異体は特異的な異常を示した。特筆すべきことに、例えば神経系の前後軸に沿った領域化に必要な53遺伝子のうち、ゼブラフィッシュで見出されていない表現型を示す変異体が約半数を占めた。このことから、ゼブラフィッシュとメダカを併用することにより、より多くの遺伝子に関する変異体を得ることが出来ると考える。現在、変異体データベースをオレゴン大学のゼブラフィッシュのものと統合する計画を進めている。1997年より日、独の6研究室でコンソーシアム(Medaka Genome Initiative (MGI))を組織してメダカゲノムプロジェクトを進めてきた。全ゲノム塩基配列決定も2-3年後には終了する。1930年代より日本人研究者の努力により育まれてきたメダカが、これから国際的にも広く実験動物として用いられるように整備していくことが重要である。

【はじめに】

私たちは、日常、いとも簡単に眼を動かして興味を惹かれた物に視線を向けたり、手を伸ばして欲しいものをつかんだりすることができる。このような、ヒトあるいは動物の運動は、脳が神経信号を筋肉に送り、筋肉を収縮、あるいは弛緩させることで行なわれている。ところがこの筋肉や、関節、眼球などには摩擦や慣性などがあり、また一つの運動を行うためには複数の筋肉が連携して動かなければならない。神経科学の進歩とともに、一見簡単に行なわれているように見える、このような運動制御の背後に、脳の中で複雑で膨大な情報処理計算が実行されていることが明らかになってきた。

運動制御のメカニズムについて、近年の計算論的神経科学の研究により、運動は脳の中にある制御対象（筋肉等）の内部モデルを使って運動指令を構築す

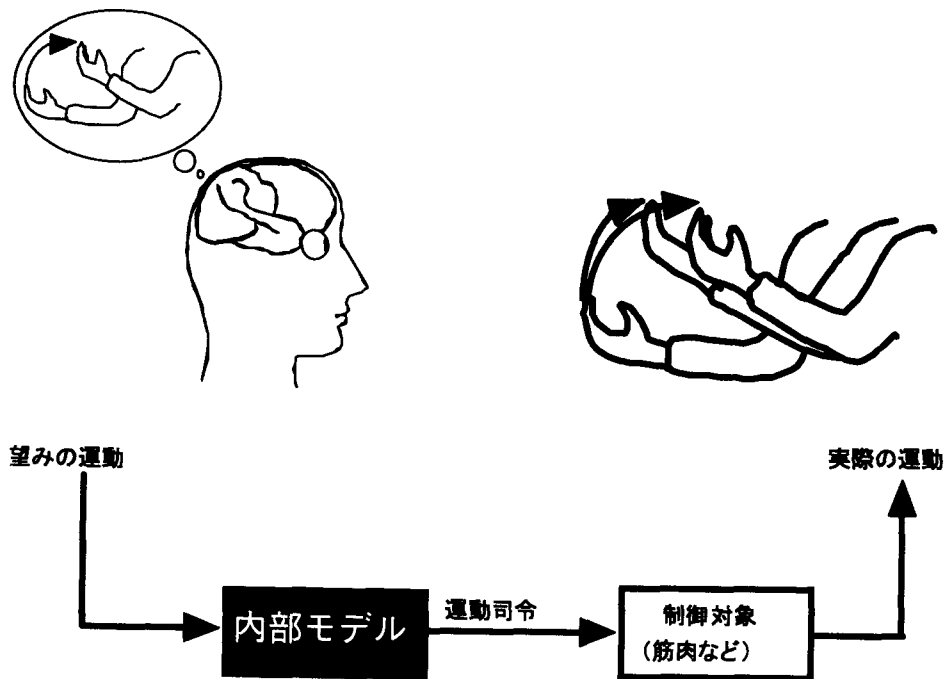


図1 脳におけるモデルを使った運動制御の模式図

ることで実現されている、という仮説が提唱されている（図1）。この仮説によると、例えば、ボールを投げる時、脳は、ボールがキャッチャーのミットに入るために、自分とキャッチャーミットとの空間内での関係、制御対象である関節や筋肉の特性等を理解し、どういう運動指令を出すとボールがどのように飛ぶかを計算し、最も適切な指令を出してボールを投げていることになる。もし脳がこのような内部モデルを持っているとすると、運動をフィードフォワード制御することができ、滑らかで素早い動きが容易に行なわれていることを説明することができる。

私たちの研究グループでは、サルを用いた電気生理学的な実験と計算論に基づく解析を組み合わせることによってこの仮説を検討し、眼球運動系の内部モデルが小脳に実在することを示した。

【追従眼球運動の制御機構】

広い視野の視覚刺激が動くと、眼は非常に短い潜時（約 50 ミリ秒）でその動きを追いかけるように動く（図2）。この眼の動きは追従眼球運動と呼ばれ、視界のブレを防ぎ、良好な視覚を保つのに重要な役割を持っている。私たちの研

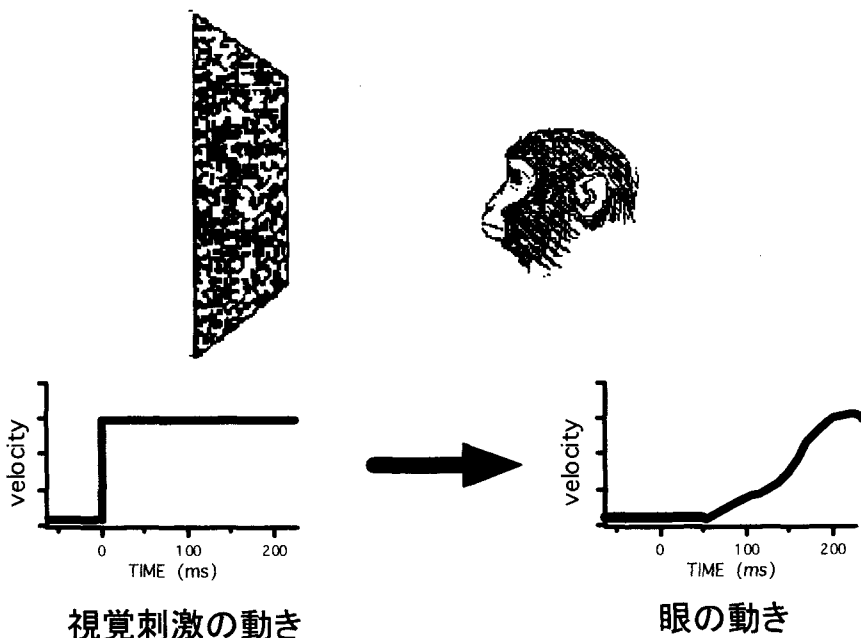


図2 追従眼球運動の実験

究グループでは、この眼球運動を行っているサルの様々な脳部位から単一ニューロン活動を記録し、またこの眼球運動に関連したニューロン活動が記録でき

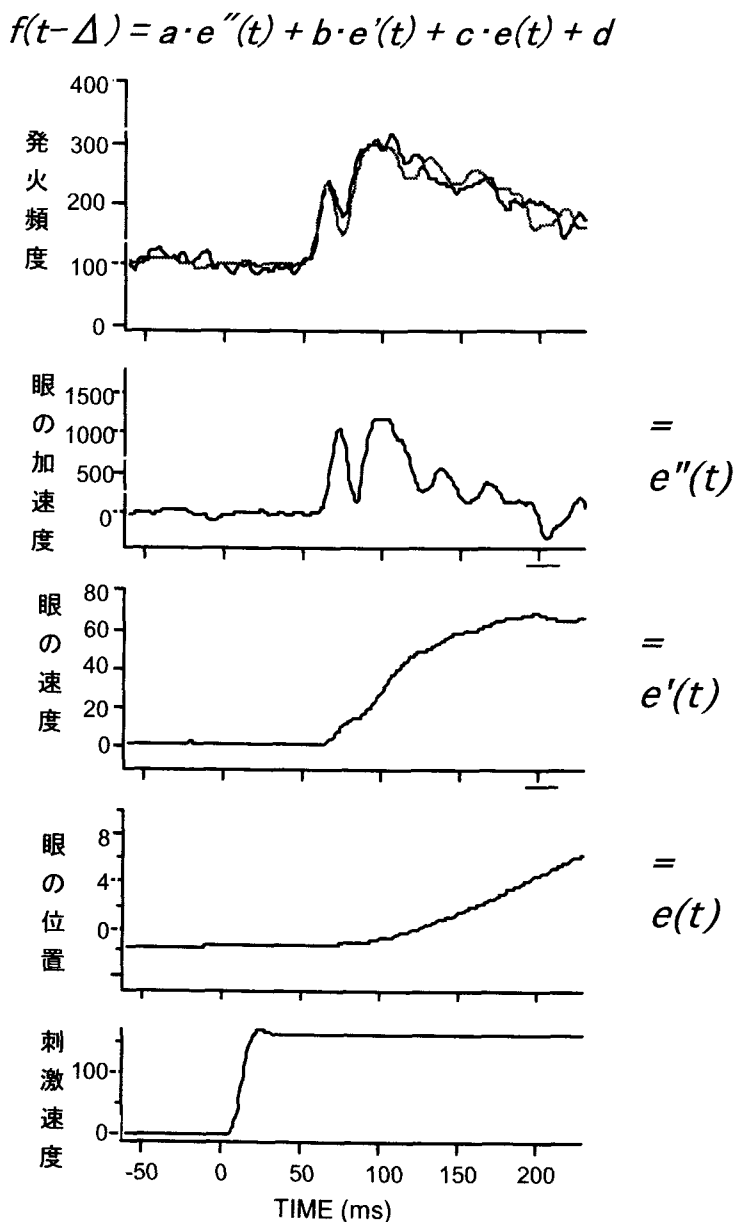


図3 一番上のパネル：小脳腹側傍片葉のプルキンエ細胞単純スパイクの発火パターン（細い線）と眼球運動を使ったモデルによる発火パターンの再構成（太い線）。下のパネル：上のモデルに使われた眼球運動の成分（眼球加速度、眼球速度、眼球位置）。一番下のパネル：視覚刺激の速度。

た脳部位を局所的に破壊する実験を行い、この追従眼球運動の発現に、大脳MST (Medial Superior Temporal) 野から橋核を経て小脳腹側傍片葉を通る神経経路が関与していることを明らかにしてきた。

そこでこの眼の動きの位置・速度・加速度等の最適なダイナミクス（動特性）が、脳内でどのような過程を経て筋肉への運動指令として出力されているかを調べるため、様々な部位から記録されるニューロン活動が、同時に観察された眼球運動の逆ダイナミクス表現で表わすことができるか、いいかえるとニューロンの発火頻度が次の式で表わされる眼球運動の加速度、速度、位置の成分の線形加算で近似できるか調べた。

$$F(t-\Delta) = a \cdot e''(t) + b \cdot e'(t) + c \cdot e(t) + d \quad (i)$$

この式で、 $F(t)$ は、モデルによって再構成された、あるニューロンの時刻 t における平均発火頻度を、 $e''(t)$ 、 $e'(t)$ 、 $e(t)$ はそれぞれ、時刻 t における眼球運動の平均加速度、平均速度、平均位置を、そして、 a 、 b 、 c 、 d はそれぞれ加速度感受性係数、速度感受性係数、位置感受性係数、定数項を表し、 Δ が時間遅れを表している。(i) 式で再構成された発火頻度と実際に記録されたニューロンの発火頻度との累積二乗誤差が最小になるように、 a 、 b 、 c 、 d 、 Δ を求めた。その結果、小脳腹側傍片葉から記録されたプルキンエ細胞の単純スパイク活動については、(i) 式のモデルで、良いフィッティングが得られることが多いことがわかった(図3)。これらのプルキンエ細胞の単純スパイク活動について得られた各感受性係数を外眼筋運動ニューロンでの値と比較すると、加速度感受性係数と速度感受性係数の比は近い値をとるが、位置感受性の係数は値も符号も一致しなかった。したがって、プルキンエ細胞の単純スパイク発火頻度は、加速度と速度というダイナミック（動的）な成分をコードしているといえる。さらに、小脳への入力であると考えられるMST野や橋核から記録されたニューロン活動についても同様の解析を試みたところ良いフィッティングが得られなかった。この結果は、MST野や橋核からの小脳への入力は、運動指令というよりは感覚情報に近く、視界の動きをコードし、小脳皮質では、この感覚情報から制御対象である外眼筋に与えるべき運動指令を作っていると考えられる。眼窩の中で眼球を意図した通りに動かすには、その動きにふさわしい慣性力（加速度）、粘性力（速度）、弾性力（位置）を外眼筋に出力する必

要がある。小脳のプルキンエ細胞の単純スパイク発火頻度が、眼球運動の加速度と速度をコードしているということは、運動指令のうち、慣性力、粘性力に相当する部分が構成されて出力しているということになる。ここで、MST野や橋核から小脳への入力、眼の動くべき目標軌道をコードしているとする、小脳の追従眼球運動制御における役割は、小脳皮質にある眼球運動の逆モデル（逆ダイナミクスモデル）を使って、入力されてくる目標軌道にふさわしい運動指令を、プルキンエ細胞の単純スパイク発火頻度にコードして出力することにあるといえる。

次に、小脳がどのような情報を使い、どのようなプロセスで逆モデルを構築し、逆ダイナミクスを出力しているかを調べるため、同じプルキンエ細胞の複雑スパイク活動について調べてみた。複雑スパイクの活動が盛んになると単純スパイクの活動が弱くなり、複雑スパイクの活動が弱くなると、単純スパイクの活動が盛んになり、複雑スパイクと単純スパイクはちょうど鏡像関係となるような反応をしていることがわかった。また、複雑スパイクは、単純スパイクとは反対の方向選択性を示すが、単純スパイクと同じように眼の位置、速度、加速度に適当な係数を掛けて足し合わせると非常に良く再現できることもわかった。複雑スパイクはその発火頻度が非常に低いことと、その発火の方向選択性が実際にそのプルキンエ細胞によって起る眼球運動とは逆であることから、実際に発火しているその時点では、行動あるいは眼球運動に関係しているとは考えにくい。以上の解析の結果は、複雑スパイクの発火は ON-LINE で機能しているのではなく、その発火の長期的な影響が単純スパイクの活動を調整している、つまり逆モデルの構築に使われている可能性があることを示唆している。

【関連文献】

1. Gomi, M. Shidara, A. Takemura, Y. Inoue, K. Kawano, M. Kawato : Temporal firing patterns of purkinje cells in the cerebellar ventral paraflocculus during ocular following responses in monkeys I. simple spikes. J. Neurophysiol. 80:818-831, 1998

2. Kawano K. Ocular tracking: behavior and neurophysiology. *Current Opinion in Neurobiology*, 9:467-473, 1999
3. Kawano, K., Shidara, M., and Yamane, S. Neural activity in dorsolateral pontine nucleus of alert monkey during ocular following responses. *J. Neurophysiol.* 67: 680-703, 1992.
4. Kawano, K., Shidara, M., Watanabe, Y., and Yamane, S. Neural activity in cortical area MST of alert monkey during ocular following responses. *J. Neurophysiol.*, 71: 2305-2324, 1994.
5. Kobayashi, Y., Kawano, K., Takemura, A., Inoue, Y., Kitama, T., Gomi, H., Kawato, M.: Temporal firing patterns of purkinje cells in the cerebellar ventral paraflocculus during ocular following responses in monkeys II. complex spikes. *J. Neurophysiol.* 80:832-848, 1998
6. Shidara, M., Kawano, K.: Role of Purkinje cells in the ventral paraflocculus in short-latency ocular following responses. *Exp. Brain Res.* 93: 185-195, 1993.
7. Shidara, M., Kawano, K., Gomi, H., and Kawato, M. Inverse dynamics model eye movement control by Purkinje cells in the cerebellum. *Nature*, 365: 50-52, 1993.
8. Takemura, A. Inoue, Y. Gomi, H. Kawato, M., and Kawano, K.: Change in neuronal firing patterns in the process of motor command generation for the ocular following response. *J. Neurophysiol.* 86: 1750-1763, 2001

〈第81回研究会（平成16年3月5日）〉

テーマ：糖尿病モデル動物の開発、解析、そして応用へ

1. KDPラット：1型糖尿病モデルの特性と解析

横井 伯英（神戸大院・医・細胞分子医学）

2. 糖尿病モデルマウス—Akita mouseの特性 —何が面白いのか—

小泉 昭夫（京都大院・医・環境衛生学）

<糖尿病>

糖尿病は「インスリンの作用の不足による慢性高血糖を主徴とする代謝疾患群」と定義される。現在、日本では患者が740万人、予備軍が880万人と推計されている。糖尿病は特に血管性の合併症が重篤で、糖尿病性網膜症による失明は後天性の失明原因の第1位であること、糖尿病性腎症は人工透析導入原因の第1位であること、さらに、高血圧、心筋梗塞、脳血管障害などの循環器疾患の発症や増悪にも糖尿病性血管合併症が関与するなど、糖尿病関連医療費は膨大な額に上る。

現在、糖尿病はその成因によって分類されており、インスリンを分泌する膵β細胞が破壊されることによるものを1型、インスリン分泌不全あるいはインスリンの標的臓器におけるインスリン抵抗性またはこの両方によるものを2型という。従来インスリン依存性糖尿病（IDDM）と呼ばれたものの多くは1型に、またインスリン非依存性糖尿病（NIDDM）と呼ばれたものの多くは2型に相当する。

ほとんどの糖尿病は遺伝素因に環境要因が加わり発症すると考えられている。糖尿病の家族歴が濃厚な場合は発症頻度が高く、家族歴の無い場合は発症頻度が低いことは、遺伝素因が関与することを示唆するものである。糖尿病を遺伝学的な観点からみると、単一の遺伝子異常により発症する単一遺伝性のものと、複数の遺伝子における変異あるいは多型の総和として疾患感受性が規定される多因子遺伝性のものに分けられる。単一遺伝性の糖尿病については MODY と呼ばれるタイプやミトコンドリアの遺伝子異常、インスリン遺伝子異常、およびインスリン受容体遺伝子異常によるものなど、その原因遺伝子がいくつか同定されている。一方、糖尿病の大部分を占める多因子遺伝性の糖尿病に関わる遺伝子本体はほとんど明らかにされていない。

<1 型糖尿病>

1 型糖尿病については次のような発症モデルが考えられている。何らかの原因（ウイルス感染など）が引き金となり、膵β細胞の抗原が MHC クラス I 分子によって、あるいは抗原提示細胞を介して MHC クラス II 分子によって免疫系の細胞に対して提示される。すると、CD4 陽性の T 細胞（ヘルパー T 細胞）が抗原を認識し活性化する。活性化した T 細胞は CD8 陽性の T 細胞（細胞障害性 T 細胞）やマクロファージを活性化し、これらによって膵β細胞が障害される。膵β細胞全体の 90%以上が破壊されると絶対的なインスリン欠乏に至り、糖尿病を発症するというモデルである。1 型糖尿病の多くはこのような自己免疫の機序により膵β細胞が破壊され、糖尿病を発症する自己免疫疾患と考えられている。

1 型糖尿病は多因子疾患の代表的なものであり、その発症には複数の遺伝因子と環境因子が関与する。多因子疾患であることの根拠としては、双生児や同胞における発症の一致率が挙げられる。欧米のデータによると、1 卵性双生児では一方が 1 型糖尿病である場合、他方が発症する頻度は約 40%である。2 卵性双生児または兄弟姉妹の場合の一致率は約 6%で、これらの値は一般の有病率である 0.4%という値と比較して明らかに高く、このことは 1 型糖尿病の発症に遺伝因子が関与することを示唆している。一方、1 卵性双生児の一致率が 100%でなく 40%ということは、遺伝以外の因子、つまり環境因子が関与することを示唆するものである。

1 型糖尿病のような多因子遺伝性疾患に関わる遺伝因子を解析する方法としては候補遺伝子アプローチ、全ゲノムスキャンによるアプローチ、そして動物モデルからのアプローチの 3つが挙げられる。ヒト 1 型糖尿病に関わる遺伝因子としては IDDM1 から 18 までが報告されている。発症への寄与が大きい主要遺伝子として同定されているのは主要組織適合性複合体 MHC（ヒトでは HLA と呼ばれる）のみである。発症への寄与が小さい遺伝子としてインスリン遺伝子の上流にある VNTR と呼ばれる繰り返し配列や T 細胞を抑制するシグナル伝達に関わる CTLA-4 が同定されている。その他については遺伝子座として染色体上にマップされているだけであり、遺伝子本体は同定されていない。個人のレベルでは遺伝因子の組み合わせやその寄与率は様々であると考えられる。動物モデルとはこうしたある特定の個人を代表するものと捉えることができる。

<1 型糖尿病モデル>

NOD マウスは 1 型糖尿病のモデルとして最もよく利用されており、これまでの解析から Idd1 から 18 と名付けられた 18 個の遺伝子座が報告されている。Idd1 が MHC であることが明らかにされているが、その他について遺伝子本体はほとんど明らかでない。BB ラットはラットにおける代表的なモデルであり、Iddm1 から 6 までの遺伝子座が報告されている。Iddm1 と 2 という 2 つの主要な遺伝子座が存在し、Iddm1 は MHC、Iddm2 は胸腺での T 細胞の成熟過程に関与すると考えられている Ian4l1 (Immuno-associated nucleotide 4 like sequence 1) における 1 塩基の欠失変異である。このように 1 型糖尿病は多因子疾患の中でも早くから遺伝解析が行われているが、発症に関わる遺伝子本体はほとんど明らかにされていない。

これまで報告されている自然発症の 1 型糖尿病モデルは、マウスでは NOD のみ、ラットでは BB、LETL、KDP、LEW. 1AR1-iddm の 4 系統が存在する。全てのモデルに共通することは膵臓へのリンパ球浸潤像である膵島炎が認められること、遺伝因子として MHC が関与することである。ラットでは MHC 遺伝子座を RT1 と呼ぶが、1 型糖尿病モデルは全て u ハプロタイプと呼ばれる共通の型を有する。各系統の特性をみると、NOD では発症に性差があること、BB ではリンパ球減少が認められるなどの特徴がある。KDP は LETL から作出された系統であり、発症率を除いて両系統はほぼ同じ特性を示す。LEW. 1AR1-iddm という系統は最近報告されたもので、コロニー全体としての発症率は低い、MHC 以外の主要な遺伝子座が存在しないことなど、これまでのラット系統とは特性が異なる。

<KDP ラットの確立>

Komeda diabetes-prone (KDP) ラットは東京医科大学の米田博士 (2003 年 1 月逝去) によって確立された 1 型糖尿病の動物モデルである。大塚製薬の河野博士らから 1 型糖尿病の動物モデルとして Long-Evans Tokushima Lean (LETL) ラットが報告されていたが、その糖尿病発症率は約 30% と低かった。米田博士はこのままではモデルとして使用できないと考え、このラットを起源として糖尿病を高率で発症するように交配をくり返して KDP ラットを開発した。KDP ラットではほとんどの個体に膵島炎が認められ、220 日齢時における糖尿病の発症率

は約 80%である。

＜遺伝学的解析＞

KDP ラットの糖尿病の遺伝性を明らかにするため、まず我々は KDP ラットの 1 型糖尿病について遺伝学的解析を行った。KDP ラットの MHC は u ハプロタイプであり、これが 1 型糖尿病に関与することが考えられた。そこで、交配実験の対照系統として同じ MHC ハプロタイプをもつ系統を 2 種類 (LETO と TM ラット) と異なる MHC ハプロタイプをもつ系統を 1 種類 (BN ラット) 用いた。これら 3 種類の系統と KDP ラットを交配して F1 個体を作出し、さらにそれと KDP ラットを交配して N2 個体を作出した。F1 個体には糖尿病が全く認められず、N2 個体の中に糖尿病を発症するものが認められたことから、劣性の遺伝子座に関わることが示唆された。

N2 個体における 120 日齢での糖尿病発症率は、KDP ラットでは約 70%、LETO および TM との交配による N2 個体ではその半分の 30 数%、BN との交配による N2 個体ではさらにその半分の 16%であった。このことは KDP ラットと同じ MHC 型の系統との交配では 1 つの劣性の遺伝子座が、また KDP ラットと異なる MHC 型の系統との交配では 2 つの劣性の遺伝子座が糖尿病の発症に関与することを示唆している。後者の場合、劣性遺伝子座の 1 つは MHC であると考えられた。

まず、TM との交配から得られた N2 個体を用いて全ゲノムスキャンを行った。その結果、第 11 染色体上に劣性の遺伝子座をマップし、KDP ラットの 1 型糖尿病に関わる遺伝子座という意味から *Iddm/kdp1* と名づけた。糖尿病を発症した 65 匹の第 11 染色体の *Iddm/kdp1* 領域は全て KDP アレルのホモ型であったことから、この遺伝子は完全な劣性の遺伝形式をとることがわかった。TM を用いた解析の結果を確認するため、残り 2 つの交配系について解析したところ、いずれの交配系においても第 11 染色体上に劣性の遺伝子座 *Iddm/kdp1* が存在することが確認された。また、MHC 型が異なる BN との交配系では予想通りもう 1 つの劣性遺伝子座として第 20 染色体上にある MHC の関与が確認できた。以上のことから、KDP ラットの糖尿病には *Iddm/kdp1* と MHC という 2 つの主要な遺伝子座が関与すること、そしてこれら 2 つの遺伝子座で糖尿病に対する遺伝的感受性の大部分が規定されることがわかった。

Iddm/kdp1 領域についてラット、マウス、ヒト間の比較遺伝子地図を作成したところ、Iddm/kdp1 領域と相同な染色体領域はマウスの第 16 染色体上およびヒトの第 3 染色体上の領域であることが明らかになった。これまで、これらの領域に 1 型糖尿病遺伝子座は報告されていないので、Iddm/kdp1 は新規の 1 型糖尿病遺伝子座であると考えられた。そこで、ポジショナルクローニングの手法によってこの遺伝子本体を同定することにした。

<原因遺伝子の同定>

ラット第 11 染色体上の Iddm/kdp1 の遺伝子座領域についてラットおよびマウスの YAC あるいは BAC クローンを用いて物理地図を構築し、シーケンス解析などを行ったところ、この領域に Alcam (Activated leukocyte cell adhesion molecule) と Cb1b (Casitas B-lineage lymphoma b) という 2 つの既知遺伝子を見出した。これらの遺伝子を Iddm/kdp1 の候補遺伝子として解析したところ、Alcam 遺伝子に変異は認められなかった。

一方、Cb1b では KDP ラットにおいて C から T への変異を発見した。この変異は、アミノ酸レベルでは 455 番目のアルギニンコドンがストップコドンになるというナンセンス変異であった。この Cb1b におけるナンセンス変異が探し求めていた Iddm/kdp1 の本体ではないかと考えられたので、Cb1b について詳細に検討することにした。

Cb1b は機能ドメインとして、チロシンキナーゼ結合ドメイン、リングフィンガードメイン、プロリンに富む領域、ロイシンジッパードメインを持ち、ユビキチン連結酵素として機能する。KDP ラットの変異では C 末端側の約半分の領域が欠損することになるが、この部分は Cb1b がその標的分子と結合するのに必要な領域である。

我々が KDP ラットで Cb1b の変異を同定した 2000 年に Cb1b 欠損マウスについて報告があった。このマウスには T 細胞の異常な活性化が認められ、病態としては様々の臓器へのリンパ球浸潤や自己抗体が認められるなど自己免疫の症状を呈していたが、糖尿病の発症は認められなかった。このように Cb1b 欠損マウスの病態は自己免疫という点では KDP ラットと類似するが、糖尿病を発症しないことなど相違が認められた。

我々は Cb1b の変異が KDP ラットの原因かどうかを確かめることが重要だと考え、トランスジェニックの手法を用いて表現型回復実験を行った。全身性の発現を導くマウスの H-2Kd 遺伝子のプロモーターの下流に野生型の Cb1b 遺伝子の cDNA を接続したコンストラクトを作製し、トランスジェニックの手法で KDP ラットに導入して糖尿病の発症が抑えられるか否かについて観察した。2つのトランスジェニック系統 (Tg 1 および Tg 2) が得られ、脾臓において内因性の Cb1b に加えてトランスジーンが発現が認められたが、Tg 1 は Tg 2 に比較してトランスジーンが発現量が多かった。120 日齢における糖尿病の発症を調べると、Tg 1 では糖尿病を発症するものが無かった。Tg 2 では糖尿病を発症するものがみられたが、KDP ラットに比較して有意にその発症が抑制されていた。このことから、KDP ラットの病態に Cb1b が関与することが明らかになった。

Cb1b 欠損マウスの解析などから現在考えられている T 細胞における Cb1b の機能的役割は次のようなものである。T 細胞が活性化するためには T 細胞抗原受容体を介する抗原特異的シグナルを受けると共に、CD28 を介する補助シグナルを受ける必要がある。刺激を受ける前の静止期において、Cb1b は CD28 を介するシグナル伝達に重要な分子である PI3 キナーゼをユビキチン化してその機能を抑制している。刺激が入ると、CD28 を介するシグナルによって今度は Cb1b 自身がユビキチン化されて機能が抑制される。これによって PI3 キナーゼの抑制が解けて活性化することでシグナルが下流に伝わり、最終的に T 細胞が活性化する。このように Cb1b は T 細胞が異常に活性化しないようにブレーキをかける役割を担っている。

Cb1b の変異によって T 細胞が異常に活性化し、自己免疫の症状になることは説明できるが、これだけでは KDP ラットが糖尿病になることは説明できない。そこで、KDP ラットの病態を明らかにするために詳細な組織学的解析を行った。KDP ラットでは脾臓に重度のリンパ球浸潤像が認められるばかりでなく、甲状腺、顎下腺、腎臓などに軽度から中程度のリンパ球浸潤が認められた。Cb1b 欠損マウスとの相違は重度のリンパ球浸潤が脾臓にみられることであり、このために KDP ラットは膵β細胞が破壊されて糖尿病を発症すると考えられる。つまり、KDP ラットではリンパ球浸潤の組織特異性がみられるということであり、これには KDP ラットにおけるもう 1 つの遺伝因子である MHC の関与が強く示唆さ

れる。ラットにおいては自然発症およびインターフェロンアルファ誘導剤 Poly IC による誘発モデルを含めて 1 型糖尿病を発症する系統の MHC クラス II の遺伝子座は全て u ハプロタイプである。これらの系統は全て膵島炎を伴って 1 型糖尿病を発症する。このことはラットにおいて MHC クラス II の u ハプロタイプがリンパ球浸潤の組織特異性を規定することを示唆するものである。

以上のことから、KDP ラットにおける糖尿病発症モデルが考えられる。KDP ラットの 1 型糖尿病の発症には 2 つの主要な感受性遺伝子、Cb1b と MHC が関与する。Cb1b の変異は T 細胞の異常な活性化を導き、様々の臓器にリンパ球浸潤を引き起こすなど、自己免疫反応を規定する。一方、KDP ラットの MHC クラス II 分子はおそらくある特定の膵 β 細胞抗原に対する結合特性をもち、そのため膵 β 細胞抗原に反応する T 細胞の活性化を導く。よって、MHC は膵 β 細胞に対する組織特異性を規定すると捉えることができる。KDP ラットではこれら 2 つの要因が揃ったため、膵 β 細胞に対する自己免疫反応である膵島炎が引き起こされ、その結果、膵 β 細胞が特異的に破壊されて 1 型糖尿病を発症すると考えられる。MHC クラス II 分子が 1 型糖尿病に関わることは知られていたが、我々は MHC と Cb1b の 2 因子による発症モデルを示した。

<分離型近交系 KDP ラット>

KDP ラットは病態発症に関与する主要な遺伝子が明らかにされたことから、今後、1 型糖尿病の発症メカニズムを解明するためのモデルとして利用されることが期待される。しかしながら、糖尿病発症個体の繁殖性が悪く、KDP ラットを維持・繁殖し、実験に使用することは極めて困難であった。この問題を解決するため、我々は KDP ラットを分離型近交系として確立することを試みた。

原因遺伝子の同定に向けての研究過程で、第 11 染色体上に作製した DNA 多型マーカーについて KDP コロニーを検索したところ、少なくとも Cb1b 遺伝子から D11Yok1 というマーカーを含む領域がヘテロ型になっている個体を発見した。これらヘテロ型の個体同士を交配すると、期待される通りに KDP アレルのホモ型、ヘテロ型および野生型の個体を得られ、ホモ型個体のみが糖尿病を発症した。ヘテロ型の個体同士の交配では繁殖性に問題がなかったことから、ヘテロ型同士の交配によって系統維持を 8 世代に渡って行い、KDP ラットを分離型近交系と

して確立した。

210 日齢までに、ホモ型個体は約 80%が糖尿病を発症したのに対して、ヘテロ型および野生型の個体は全く糖尿病を発症しなかった。ホモ型個体の糖尿病発症率、発症日齢、膵島炎の程度など、分離型近交系におけるホモ型個体の特性はこれまでの KDP ラットと同様であった。分離型近交系 KDP ラットの確立によって系統維持と生産の問題が解決された。今後、本系統は 1 型糖尿病を含む自己免疫疾患の研究において極めて有用な動物モデルになると考えられる。

<ヒト 1 型糖尿病の遺伝子解析>

現在、我々はヒト 1 型糖尿病における CBLB の遺伝子解析を行っている。ヒト CBLB 遺伝子は 19 個のエクソンから構成され、100kb 以上のゲノム領域を占める。この領域について実際にシーケンスして SNP 等を調べたところ、これまでに SNP を含む 20 個以上の多型を同定した。このうちの一部の SNP を用いて欧米人の 1 型糖尿病について解析したところ、その集団においては 1 型糖尿病との関連は認められなかった。一方、日本人の 1 型糖尿病患者においては 6 つのアミノ酸置換を伴う変異を同定している。今後、これらの変異タンパクについて機能解析を行うとともに、正常対照者における頻度との比較から 1 型糖尿病との関連を明らかにしたい。

<今後の応用>

最後に KDP ラットから得られた知見の応用について 1 例を紹介したい。我々は Cb1b 変異と MHC ハプロタイプの組み合わせによる新たな自己免疫疾患モデルの開発を試みている。疾患としては慢性関節リウマチ、全身性エリテマトーデスや自己免疫性甲状腺炎などが想定される。MHC が自己免疫疾患の組織特異性を規定するということから、MHC を取り換えることによって全身性や膵臓以外の臓器特異性の自己免疫疾患が発症するのではないかと考えに基づくものである。

<謝辞>

ここで紹介した研究は、京都大学の芹川忠夫先生、清野 裕先生、東京医科

大学の故米田嘉重郎先生、千葉大学（現神戸大学）の清野 進先生および各研究室の多くの方との共同研究として行われたものであり、ご指導ならびにご協力に心より感謝致します。

＜参考文献＞

KDP ラットの確立

- ・Komeda, K. et al. Establishment of two substrains, diabetes-prone and non-diabetic, from Long-Evans Tokushima Lean (LETL) rats. *Endocr. J.* 45: 737-744, 1998.

KDP ラットの遺伝解析と原因遺伝子の同定

- ・Yokoi, N. et al. A non-MHC locus essential for autoimmune type I diabetes in the Komeda diabetes-prone rat. *J. Clin. Invest.* 100:2015-2021, 1997.
- ・Yokoi, N. et al. *Cblb* is a major susceptibility gene for rat type 1 diabetes mellitus. *Nature Genet.* 31:391-394, 2002.

分離型近交系 KDP ラットの確立

- ・Yokoi, N. et al. Establishment and characterization of the Komeda diabetes-prone rat as a segregating inbred strain. *Exp. Anim.* 52:295-301, 2003.

ヒト1型糖尿病の遺伝子解析

- ・Kosoy, R., Yokoi, N. et al. Polymorphic variation in the *CBLB* gene in human type 1 diabetes. *Genes Immun.* 2004 (in press).

1. はじめに

秋田マウス（アキタマウス）は、1996年にC57BL/10マウスのコロニーより分離された常染色体優性遺伝形式で発症する糖尿病モデルマウスである。本マウスは、秋田大学医学部衛生学在籍中に筆者等により開発された（Yoshioka, kyo）。米国では、秋田犬は極めて有名で犬としてのブランドを確立していることを意識し、世界的に広く使われることを期待して、当時筆者とともに開発を手伝ってくれた大学院学生（限秋田大学）の吉岡政人君（現秋田大学）、助手の嘉陽毅君（現在米ヴェンチャー企業勤務）らと相談のうえ秋田マウスと命名した。

本モデルマウスは、当初若年発症および常染色体優性遺伝形式で発症することから、**Mody (Maturity Onset Diabetes of the Young)** として報告された(1,2)。しかし、その後の遺伝解析の結果プロインスリンA鎖B鎖間のA7-B7のSS結合が形成できない変異であるC96Y変異が見つかった(3)。しかし、変異から糖尿病にいたる過程があらたななぞとして浮上してきた。糖尿病にいたるメカニズムに関与するものとして、**proteinopathy** が想像され、一つのパラダイムを提供するものとして注目され現在に至っている(Ron)。

本稿では、秋田マウスの臨床像、合併症、糖尿病発症のメカニズムについてのべてみたい。

2. 糖尿病の臨床像

秋田マウスにおける糖尿病は、生後雄では6-7週齢で高血糖を示し、500-600 mg/dlに達する (Figure 1)。雄での生存は、1年で約50%程度であるが雌ではほぼ対照群とほぼ同じである。この一方雌では、血糖の上昇は著明ではなく200-300 mg/dlにとどまる。糖尿病を発症する雄においても、肥満は伴わず、インスリンの抵抗性も観察されない(4)。膵臓の病理所見で **Insulinitis** は認められない。しかしベータ細胞の萎縮は著明であり、膵臓のインスリン含量は少ない (Table 1)。分離されたランゲルハンス島からの分泌を見たところ、インスリン、プロインスリンともに分泌は抑制されている(Figure 2)。

以上から、秋田マウスにおける糖尿病は、**Primary b-cell dysfunction** であり、ランゲルハンス島における **b-cell** の特異的萎縮と言える。雌でこれらの変化が少ない理由については現在まで原因は不明である。

3. 合併症

秋田マウスにおいてヒトの糖尿病と同様に腎症、神経障害の報告がなされている。

雄の秋田形質を示すマウスにおいては、20週頃では、主として腎臓の近位尿細管の中

心とした変化が起こる。近位尿細管では、尿細管上皮に再吸収されたグルコースがグリコーゲンとして尿細管上皮に貯蔵される像が観察される。この時期に、腎臓の近位尿細管において、Glutathione S-transferase μ および α が特異的に誘導され、この領域で **Oxidative stress** が生じていることが推測される (5)。

さらに、40週頃では、ヒト同様に糖尿病性腎症が観察される。メサンギウム基質の鼻慢性増加とそれに伴う目参議有無細胞増殖が生じる。また同時に糸球体小葉のメサンギウムからなる芯の中心に基質が沈着する (6)。

糖尿病性腎症ではこれらのメサンギウムへの沈着物を免疫抗体法で染色すると抗 IgG 抗体で染まることが多いが秋田マウスでは抗 IgA 抗体で強く染まり、IgA 腎症の像を呈する (6)。

しかし、以上の形態変化が、microalbuminuria を伴うかどうか検討されておらず今後マウスに特異的な抗体で明らかになるものと思われる。

さらに、秋田マウスでは、尿量が非常に多く、解剖時に膀胱に大量の尿の存在が確認される。堀内等の検討によると (未公表) 水腎症が認められ、加齢とともに腎臓の皮質の皮薄化が進行する (Figure 3)。

神経症の合併症に関する検討では興味ある知見が報告されている。秋田マウスの検討では、末梢神経に著明な変化は認められないが、神経系の免疫組織学的検索で、alphaB-crystallin の発現が脳の白質のオリゴデンドロサイトとくに corpus callosum で32週以降増加することが報告されている。これたのことから、長期の高血糖が中枢神経系にストレスを起し、オリゴデンドロサイトの alphaB-crystallin の発現増加として観察されることを示唆しており、糖尿病であり知られていない中枢神経系での合併症の解明のヒントになる可能性がある (7)。

4. 秋田マウスの遺伝子変異—Ins 2 の C96Y—は Folding を妨げる

秋田マウスにおける遺伝解析は、C57BL/6 系統と C3H/He 系統の交配でまず行われた。これにより約 20 cM の解像度で連鎖解析が行われた、その結果 11 番染色体のテロメア領域 70 cM 以降に Mapping された (1)。C3H/He と C57BL/6 マウスは遺伝的に近いあまり多くのマイクロサテライトマーカーが利用できず、さらに詳細な連鎖解析には、C57BL/6 とカスタネウスとの交配が行われた。カスタネウスは、約 100 万年まえにマウスから分離された亜種であり、多くのマーカーが利用できる。しかし、雄のカスタネウスに対してメスのマウスの交配のみ可能であり、雌マウスの形質確定のため経口的糖負荷試験を行い選別した。交配の結果得られた子孫を用いて 1 cM の解像度で連鎖解析を 7 番染色体テロメアに焦点を当てて検討したところ Ins2 近傍 1 cM 以内に存在することが明らかになった (2)。

その後、泉等との共同研究の結果 Insulin gene において C96Y の変異がみいだされた (3)。A7 の cystein は、A7-B7 の SS 結合に関与し、プロインスリンからその後の分泌顆粒の形成に重要な役割を果たしている (Figure 4 and Figure 5)。

インスリンには3つのSS結合が存在するが、そのうちの一つの形成不全が何故b-cellの機能不全を生じ糖尿病を引き起こすのであろうか。

マウスにおけるインスリン遺伝子はIns 1およびIns 2の2つの遺伝子座が存在する。従って合計で4つのアレルが存在することになる。また4つのアレルは同等に発現することが知られており、秋田マウスにおける変異では高々25%のインスリンの減少を引き起こすに過ぎない。即ち、単純なLoss of Functionでは秋田マウスに見られるb-cellの萎縮や早期の糖尿病の発症は説明できない。そこでならかのgain of functionがあるものと考えられた。

インスリンは、遺伝子発現から、小胞体での折りたたみ、ゴルジ体でのpacking、その後のProinsulinからC peptideの除去と引き続く濃縮、結晶化の過程を経て応答性に分泌される (Figure 5)。これらの一連の過程がスタートするためには正しくFoldingされる必要がある。InsulinはFigure 6に示すように内部に疎水基を親水性の基で包み込んだ形態をしている。疎水基を内部に折りたたむためには3つのSS結合は重要な働きをしており、C96Y変異により、正常なFoldingができず生理的に安定なConformationを保てないものと思われる。

5. ER—ストレスと糖尿病のメカニズム

ペプチドのFolding異常は細胞内に様々な生理的応答即ちER-Stressという一連の応答を引き起こす。

まず、正しくFoldingされないペプチドあるいは蛋白については、生体はfoldingを手助けするためGRP78、Bipなどの分子シャペロンを動員する。Folding capacityの増大で対応できない場合には次の遺伝子発現の抑制というメカニズムが発動される。この応答でも対応しきれない場合にはプロテアゾームにおける蛋白分解の反応が誘導される。さらにこれらの反応で対応できない場合には、最後の手段としてApoptosisが引き起こされる (Figure 7)。

これらの反応については、大学院生の野崎（現兵庫医科大学助手）が京都大学医学研究科再生医学研究所の永田教授のおよび久保田助手の指導のもとに詳細な検討を行い (8)、XBP1によるER-Stress応答系をConstitutiveに発動することが証明された。またOyadomari et al(9)は、CHOP knock outマウスを用いてCHOPの破壊により糖尿病の発症が遅延することおよびb-cellのapoptosisが抑制されることをみいだした。しかし、CHOP knock outマウスにおいても遅延するのみで糖尿病の発症は抑制されないことからより複雑な機構が働いているものと考えられる。

6. 今後の展望

秋田マウスは極めて単純なモデルである。単一遺伝子で生じる糖尿病モデルマウスである。しかし、糖尿病発症のメカニズムは極めて複雑である。従来ER-Stressの生理的意義については不明であったが、秋田マウスは最近の分子生物学の手法を駆使した実験動物学によりER-Stressを介する糖尿病のメカニズムが明らかにされつつある。

ランゲルハンス島は、血糖を制御するため常に大量のインスリンの遺伝子発現を行っており、生理的条件下においてもうまく Folding されないインスリンが生じることが知られている。これら“おしゃかな”インスリンは、ER-stress を介する機構で処理されると考えられる(10,11)。

加齢により耐糖能が低下することはよく知られている。糖尿病にいたる過程には大まかに 2 つの経路が考えられる。肥満によるインスリンの抵抗性の増大の結果インスリンの需要が亢進し、インスリンの生産が加速され b-cell の疲弊を来す経路である。もう一つの経路は、肥満が引き金とならない加齢による primary b-cell の異常である。この経路により糖尿病にいたる糖尿病のケースはわが国では多いと考えらる。このいずれにおいても、ER-stress を介する可能性が考えられ、現在精力的に形態および機能面からの研究が進行している。今後糖尿病のメカニズムの解明に新しい視点を提供するモデルマウスと考えられる。

謝辞

以下の方々が本研究の共同研究者である。

Akita University : Dr. Yoshioka M, Dr. Kayo T, Dr. Ikeda T, Dr. Haseyama T, Dr. Fujita T, Prof. Ito S, Dr. Horiuchi T

Kumamoto University : Graduate School of Medicine : Dr. Oyadomari S

Kyoto University, Institute for frontier Medical Sciences : Prof. Nagata K, Dr. Kubota H, Dr. Naito Y

Kyoto University, Graduate School of Medicine : Mr. Nozaki J, Mr. Nakadome Y, Dr. Yoshinaga T

引用文献

1. Yoshioka M, Kayo T, Ikeda T, and Koizumi A (1997) A novel locus, Mody 4, distal to D7Mit189 on chromosome 7 determines early-onset NIDDM in nonobese C57BL/6 (Akita) mutant mice. Diabetes 46: 887-894

2. Kayo T and Koizumi A. (1998) Mapping of murine diabetogenic gene *Mody* on chromosome 7 at D7Mit258 and its involvement in pancreatic islet and β cell development during the perinatal period. J. Clin. Invest. 101: 2112-2118

3. Wang J, Takeuchi T, Tanaka S, Kubo S-K, Kayo T, Lu D, Takata K, Koizumi A, and Izumi T (1999) A mutation in the insulin 2 gene induces diabetes with severe pancreatic β -cell dysfunction in the Mody mouse. J Clin Invest 103:

27-37.

4. Mathews CE, Langley SH, Leiter EH. New mouse model to study islet transplantation in insulin-dependent diabetes mellitus. *Transplantation*. 2002 Apr 27;73(8):1333-6.

5. Fujita H, Haseyama T, Kayo T, Nozaki J, Wada Y, Ito S, Koizumi A. An Increased Expression of Glutathione S-Transferases in the Renal Proximal Tubuli in the Early Stage of Diabetes: a Study in a Mouse Model of Type 2 Diabetes, Akita Mouse. *Exp Nephrol*. 2001;9:380-386

6. Toshiyuki Haseyama, Yasuhiko Wada, Toshiki Fujita, Fujiko Hirasawa, Mikako Tsukada, Hideki Wakui, Atsushi Komatsuda, Hiroshi Ohtani, Akira Miura, Hirokazu Imai, Jun-ichi Nozaki Akio Koizumi. Complication of IgA nephropathy in a non-insulin-dependent diabetes model, the Akita mouse. *Tohoku.J.Exp.Med*. 2003,198,233-244

7. Yaguchi M, Nagashima K, Izumi T, Okamoto K Neuropathological study of C57BL/6Akita mouse, type 2 diabetic model: enhanced expression of alphaB-crystallin in oligodendrocytes. *Neuropathology*. 2003 Mar;23(1):44-50.

8. Nozaki J, Kubota H, Yoshida H, Naitoh M, Yoshinaga T, Mori K, Koizumi A, Nagata K Point mutation of insulin Cysteine 96 stimulate endoplasmic reticulum stress response through the activation of transcription factors ATF6 and XBP1 in ins+/Akita pancreatic b cell lines *Genes Cells*. 2004;9 :261-70.

9. Oyadomari S, Koizumi A, Takeda K, Gotoh T, Shizuo A, Araki E, Mori M. A targeted disruption of The CHOP gene protects mice against ER stress-induced diabetes. *J Clin Invest*. 2002, 109; 525-532

10. Ron D. Proteotoxicity in the endoplasmic reticulum: lessons from the Akita diabetic mouse. *J Clin Invest*. 2002;109:443-5.

11. Araki E, Oyadomari S, Mori M. Impact of endoplasmic reticulum stress pathway on pancreatic beta-cells and diabetes mellitus. *Exp Biol Med* (Maywood). 2003;228:1213-7.

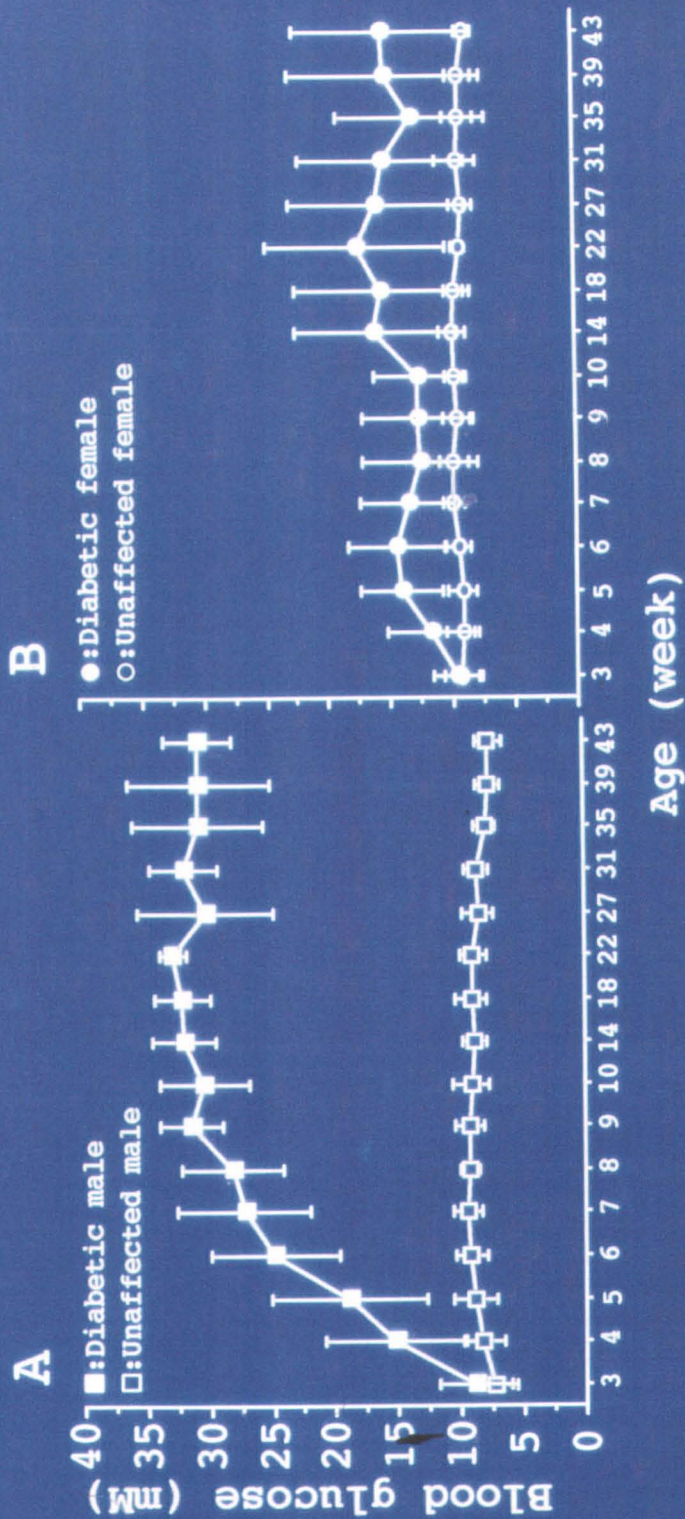
Table 1

Insulin contents and Insulin to Glucagon ratios in wild, heterozygous and homozygous mice at birth

	Homozygous	Heterozygous	Wild
Blood glucose (mM)	4.3+2.1	5.3+1.6	4.1+2.5
Insulin (pmol/pancreas)	15.6 (2.6)	32.4 (2.0)	114(1.6)
Glucagon (pmol/pancreas)	72.4 (1.9)	77.4 (1.5)	97.7 (1.5)
I-to-G ratio	0.21	0.42	1.17

Figure 1

Changes blood glucose levels during aging



-Yoshioka et al. Diabetes 1997-

Figure 2

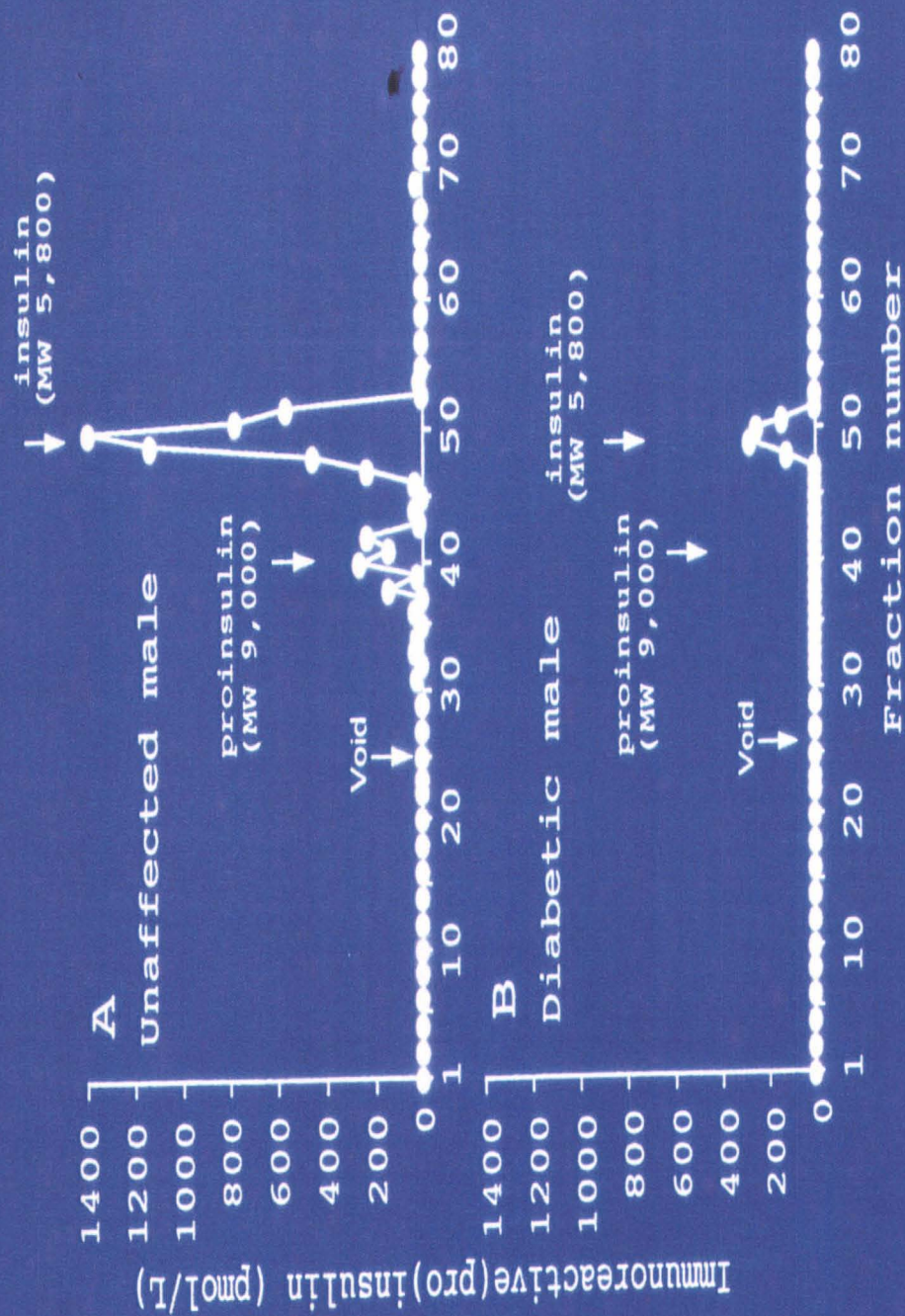
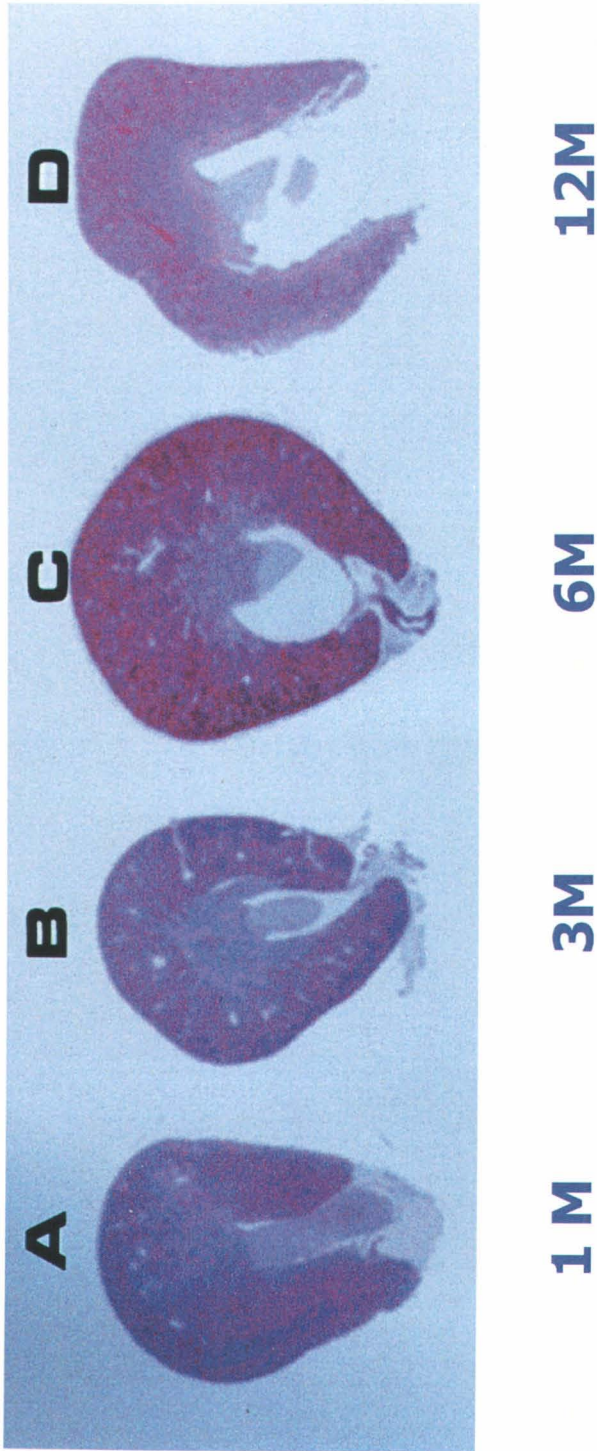


Figure 3

Hydronephrosis as uro-genital complication



-Horiuchi et al. Unpublished data-

Processing of Insulin



-Wang et al. JCI 1999-

Figure 5

Processing of insulin and interorganella trafficking

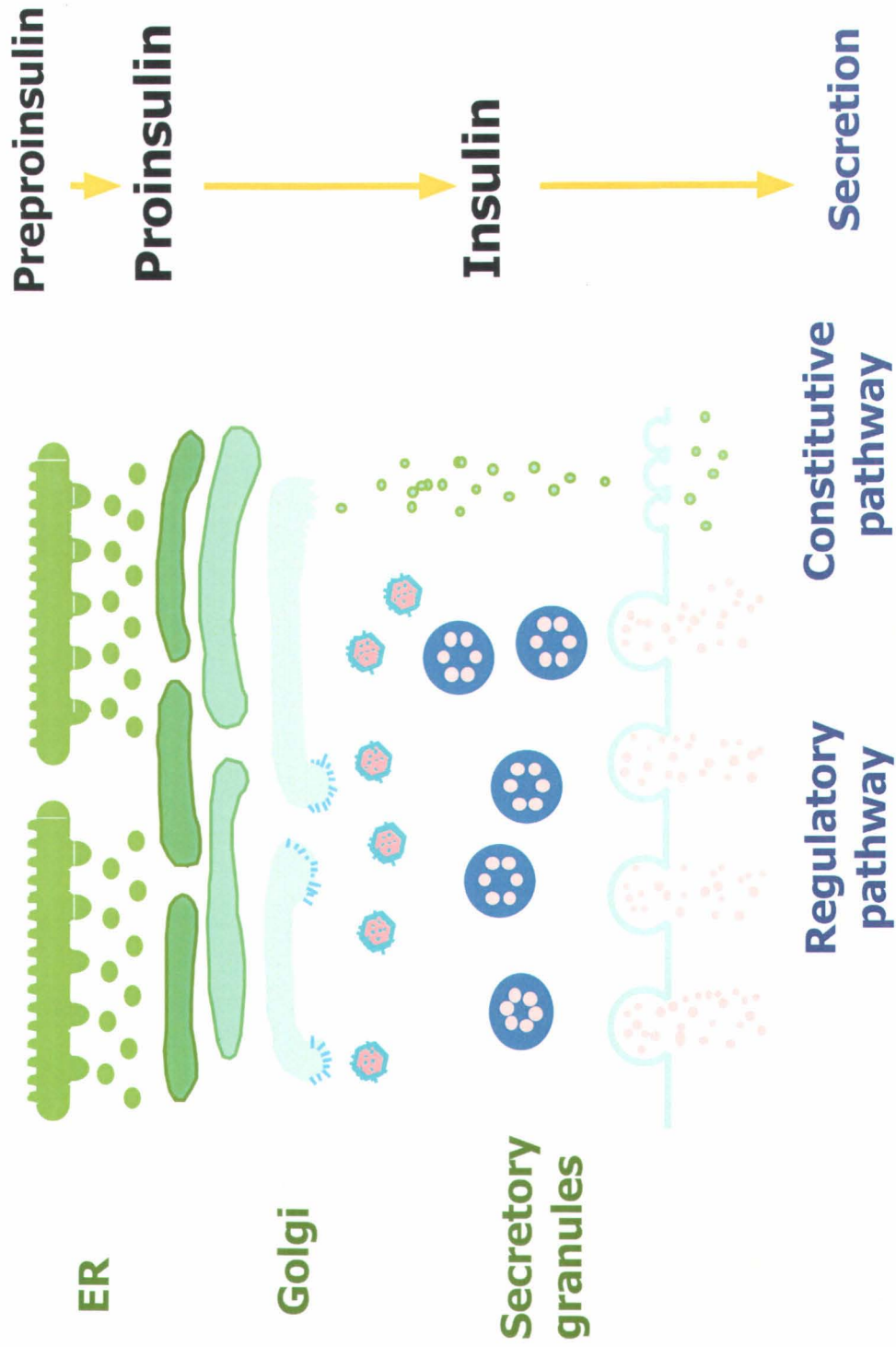


Figure 6

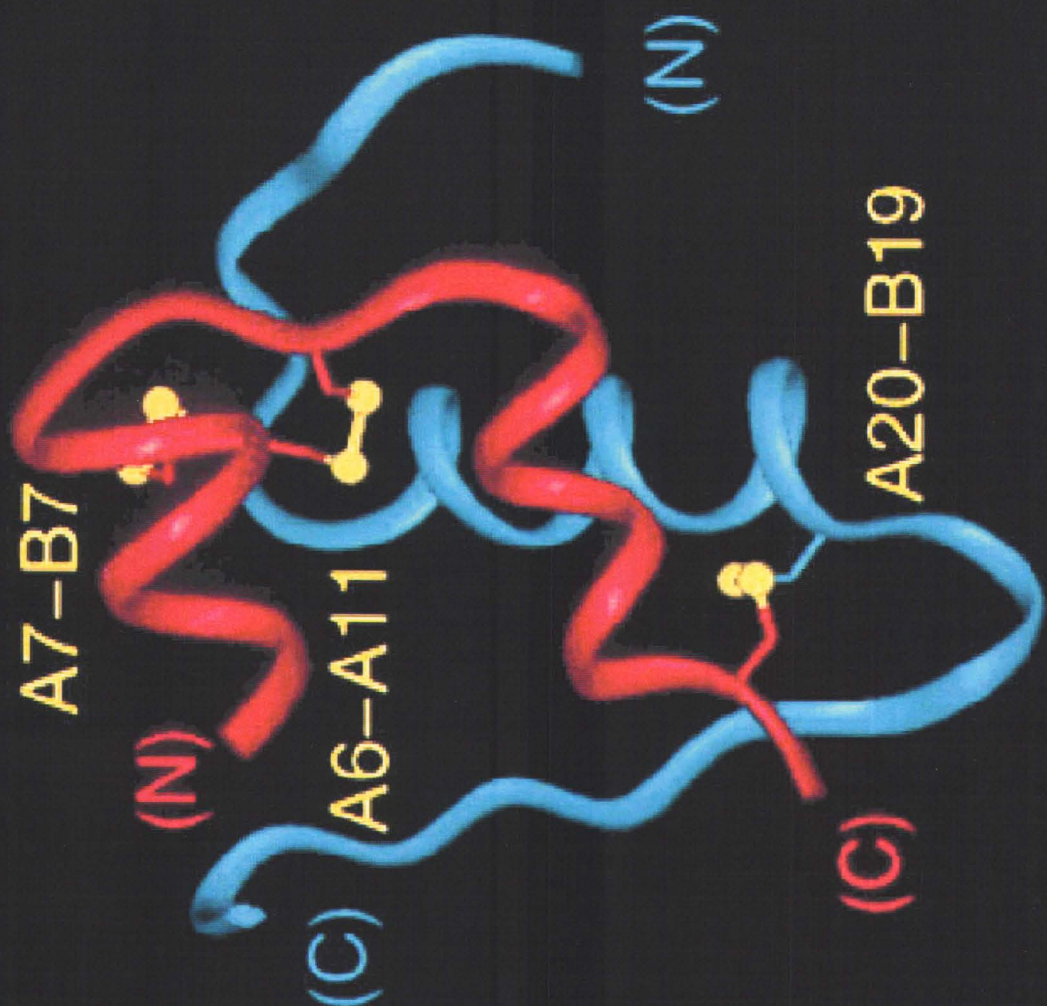
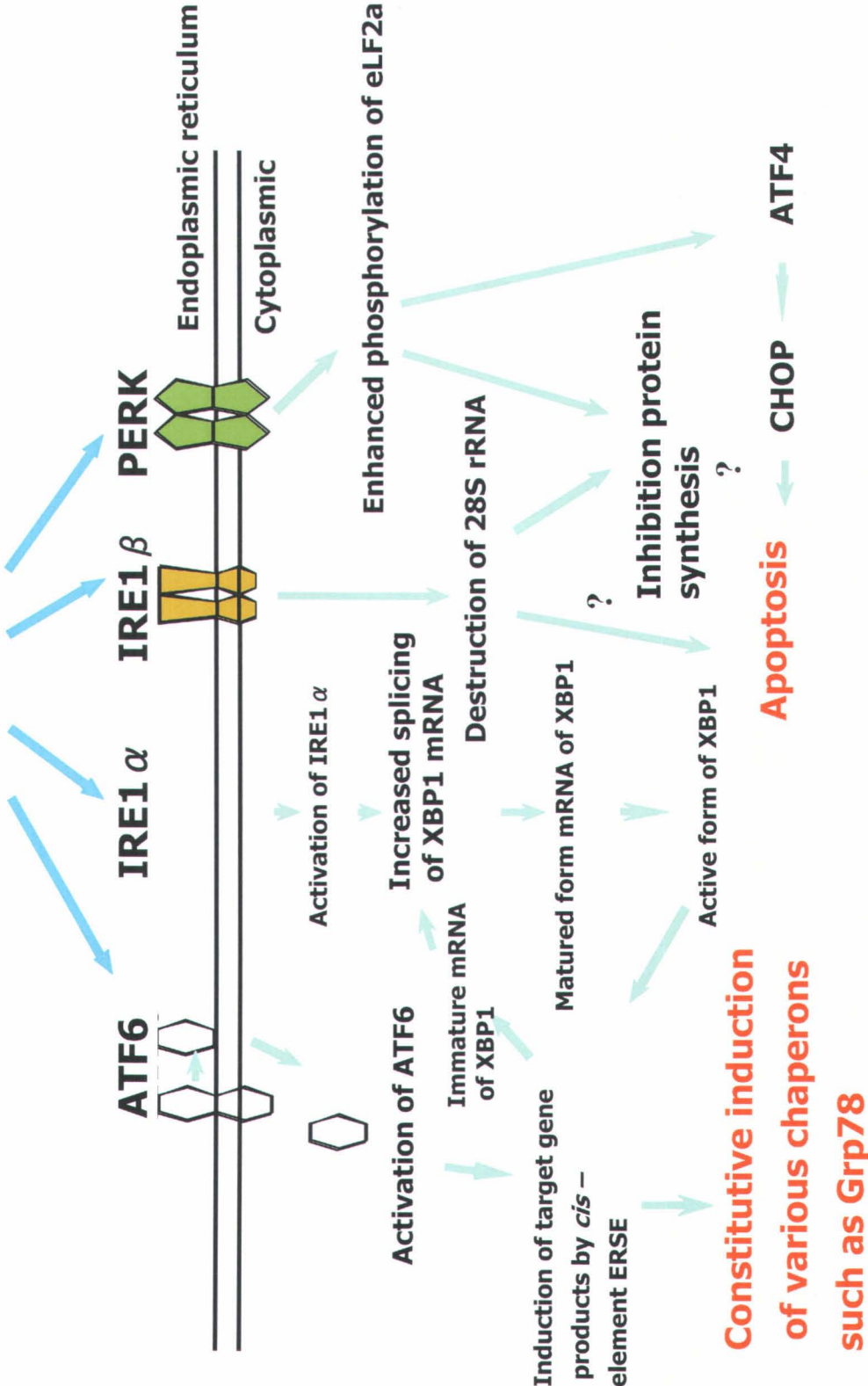


Figure 7

Unfolded protein responses: ER stress



〈第82回研究会（平成16年6月25日）〉

テーマ：再生医療を支える基礎研究のトピックス

1. ES細胞分化の試験管内誘導

西川 伸一（理化学研究所・CDB）

2. 生殖細胞系列におけるゲノムインプリンティング研究の

最新のトピックス

石野 史敏（東京医科歯科大・難治疾患研・エピジェネティクス分野）

幹細胞と再生医学

理化学研究所発生再生科学総合研究センター

西川 伸一

細胞の新陳代謝をつかさどる幹細胞システム

幹細胞システムとは、細胞のレベルで新陳代謝を維持するためのシステムと考えられます。生命が生きていくためには物質・エネルギーの不断の新陳代謝がないと、細胞あるいは個体という外界から独立した生命体を維持できません。物質やエネルギーだけではなく、私たちのような多細胞動物になると、すべてではありませんが、細胞レベルでも新陳代謝をして個体を維持するメカニズムが発展しています。そのことに私自身は最も興味を持っています。生物学ではいろんなレベルの「部分と全体」を考えます。なかでも、最も基礎的な「部分と全体」である個体と細胞を、幹細胞システムを調べることによって、発生学などとも違った形で考えられるのではないかと思います。研究をしています。

◎幹細胞システムのルーツ

幹細胞システムがどのように進化してきたかは、今ある生物から考えるしかないわけですが一番大切なことは、細胞のレベルでの新陳代謝は、多細胞生物で初めて生まれたシステムだということです。

単細胞では細胞と個体が一致しています。細胞が個体であり個体が細胞であるというシステムでは、生殖というプロセスで細胞が増えることはすなわち個体が増えることですから、わざわざ幹細胞システムを考える必要はいりません。しかし、多細胞体制になってくると個体と細胞が乖離し始めます。最もわかりやすい例を挙げると、細胞の死、あるいは個体の死を考えると、乖離について理解できます。すなわち多細胞体制では、一部の細胞は死んでいるのに個体は生きている、逆に、個体は死んでも一部の細胞が生きているという状況が生まれてきます。

最初が多細胞体制では細胞の役割分担はありません。しかし、多様な細胞を作る方向へと役割分担が進み始めた最初に起こる役割分担が幹細胞システムの誕生です。これは私たちの目から見ると幹細胞と言えます。そういうわけで、幹細胞システムは、かなり早い時期、個体の中に細胞の役割分担が始まった時に始まると考えられます。

役割分担が見られる生物のルーツと言えそうなのが、ボルボックス (volvox) です。ボルボックスより前の多細胞生物ユーグレナ (uroglena) では、細胞同士の協力関係はあっても細胞の役割分担はまだ進んでいません。一方、ボルボックスには、体を構成する細胞以外に、ゴニジアという細胞をつくり出す装置のような生殖細胞があります。私たちは哺乳動物の色素細胞を使って幹細胞システムを研究しているのですが、このボルボックスから学ぶところは非常にたくさんあります。

例えば、幹細胞システムとは細胞の供給装置ですから、たくさんの細胞を生み出すと同時に供給装置自体を維持する必要があります。つまり、供給装置を常に維持しながら分化したものをつくり上げていく仕組み、即ち幹細胞システムができています。さて、幹細胞研究は、不等分裂の研究と気っても切り離せません。自分自身を維持しながら分化したものをつくっていくことをごく単純化して数学的なイメージに置き換えると、1つの細胞から、分化したものと自分自身と同じものの2種類の細胞が生み出されることになる。これが不当分裂です。

ボルボックスについてカーク（Kirk）という人がたくさんの論文を発表しており、ある転写因子がオンになると分化が始まることがわかっています。オンにならないければ幹細胞であるゴニジアの自己再生だけが起こる。ですから、私たちが研究している不等分裂のモデルがもうここにあるわけですが、面白いことに、ゴニジアは、最初から不等分裂をするのではなく、32細胞期まで自己再生を続けた後、不等分裂をするという点も、私たちが哺乳動物の幹細胞系で見ているものとよく似ています。

プラナリアはボルボックスに比べるとかなり進んだ体制で、まず1つの幹細胞から体のすべての細胞ができることがわかっています。個体が新しい細胞によって受け継がれているわけで、私にとっては驚きであり、このような個体と細胞の関係を哺乳動物のような動物でも実現できないだろうかというのが私の興味です。個体というのは全体です。そこに幹細胞という機能を持った部分が新しいもので置き換わり、置き換わった細胞は個体の体制を読み取って個体の体制の中に組み込まれていくことで、もう一度個体を維持する。しかも、細胞が置き換わった後でも個体の体制は一見全く変わっていないように見える。この意味で、幹細胞システムを研究することは細胞と個体の関係を考える上で面白い例になるのではないかと期待しています。

さらに、もう少し文化的な側面からこの現象を見てみると、究極の問いへと導かれます。先ほど多細胞体制においては個体と細胞の死が乖離すると言いましたが、もし個体の死の基礎に細胞の死があるとする、細胞の新陳代謝を人為的に繰り返すことによって個体の生を永続できるのではないかとこの究極の問いを発することができるわけです。きわめてナイーブな問いですが、これを、例えばヒトやマウスで問えるかどうか。できないとも言えないし、できるとも言えない状態だと思いますが、一度底まで踏み込んで考えてみるのも重要だと思っています。

幹細胞とニッチ

それでは、今はどういう研究をしているか、簡単にまとめます。私たちは、様々な細胞を使って、幹細胞とそれを支える微小環境、ニッチを研究しています。なかでも現在最も興味を持って研究しているのは、色素細胞です。色素細胞は、幹細胞システムですが、他の幹細胞システムにはない多くの特徴があります。まず、静止期にある幹細胞と増殖している細胞の場所が違います。もう一つユニークな特徴は、多くの幹細胞システムでは、幹細胞とそれ以外の細胞は常に接していることが普通ですが、色素細胞の肝細胞の周りには他の種類の細胞しかありません。幹細胞を支える微小環境を考えたい場合、周りに自分と同じ系列の細胞が存在すると、考えなければならな

い環境要素が複雑になります。このように、色素細胞システムはニッチを考えるうえで最適のモデルといえます。

色素細胞の増殖を止める処理をすると、真っ白なマウスができます。ところが、次に毛が生え変わると、再び黒くなってくる。ということは、どこかに幹細胞が残っていて、増殖せずにじっと待っているわけです。わかってきたのは、基本的には幹細胞は毛根の上部に存在し、次の活性化が起こるまでそこで冬眠するかのようにじっとしている細胞であろうと考えられます。即ち、どのような条件で細胞を冬眠状態で維持できるのかを研究しています。

この目的のために、現在は冬眠中の幹細胞を採取して、活性化された細胞と比べることを行っています。実際、これまでこのことを実現するための実験系の確立を進めてきました。従って、それについて述べます。一本の毛の上部にあるバルジ領域には 1-数個の色素細胞があるのですが、これを他の細胞や、毛根下部に存在する細胞と区別してとるためには、先ず色素細胞だけが強く蛍光を発するマウスを作る必要がありました。幸い、様々な方法を組み合わせて色素細胞が特異的に強い蛍光を発するマウス系統を作ることが可能になりました。この結果、毛根上部に存在する幹細胞をマトリックス部に存在する活性化細胞から区別して採取することが可能になりました。次に、こうして集めた一個一個の幹細胞から cDNA ライブラリーを作成する新しい方法を開発しました。こうして得られた single cell cDNA library を使って、現在幹細胞特異的遺伝子を同定し、その機能について検討中です。現在得られた知見を簡単にまとめると、

- 1) 幹細胞では他のコンパートメントと比べ転写全体の活性が著しく低下している。
 - 2) 一方、P o l C に依存しない転写は正常であること、
 - 3) 多くの遺伝子の転写が低下している中で、W n t 阻害遺伝子は発現している、
- これら以外にも、幹細胞特異的に発現している遺伝子が明らかになってきており、転写が抑制されている遺伝子と、その中でも活性化されている遺伝子が幹細胞システムにとってどのような意味があるか調べるべく研究を続けています。

究極の問いに答える鍵、ES 細胞

私たちが今取り組んでいるもうひとつの研究テーマは、ES 細胞です。もちろん様々な医学的な応用のためでもあるのですが、マウスやヒトといった高等動物において、新陳代謝によって個体の生命を変え得るかどうかという究極の問いに答え得る唯一の細胞システムが ES 細胞ではないかと思っているのです。

現在、ES 細胞が最も注目されている 1 つの理由は、様々な再生医療への可能性が期待されるからです。

例えば、I 型の糖尿病は、膵臓のベータ細胞が壊されていく病気ですが、脳死患者の方の膵臓からベータ細胞をつくる細胞だけを取り出して、ほかの消化酵素などを出す危険な細胞を全部除いて肝臓に注射すると、膵臓でなくてもこの細胞は肝臓に居ついてインシュリンをつくってくれます。このように細胞を注射することで、人為的に新陳代謝を誘導することができるわけです。

脳死患者の方や死体の臓器の場合は限界があるので、どんどんこの細胞を注射し続けるというわけにはいきませんが、試験管の中でどんどん培養できる ES 細胞からつくるのであれば際限がありませんし、また ES 細胞自体を新陳代謝に使っていくことが可能になるかもしれません。私たちの体のすべてになり得る新陳代謝を、初めて実験として可能にしてくれているのが ES 細胞ではないかと私たちは思っています。

あらゆる細胞に分化できると入っても、しかしこの分化を人為的にコントロールするのは容易ではありません。臨床応用を考えると、無血清培地を用いて培養を行うことも必要です。私たちの教室では、これを実現するための研究を行っています。これまでの研究を以下に箇条書きにまとめました。まだまだ道半ばですが、ようやく ES 細胞の分化をコントロールできるのではないかとこの気持ちになってきたところです。

結果のまとめ

- 1) goosecoid (GSC) 標識 ES 細胞を用いて、中胚葉と definitive 内胚葉の両方に分化能を持つ中内胚葉細胞が存在することを始めて証明しました。また、activin を含む無血清培地を使って、ほぼ全ての細胞を GSC 陽性細胞へ誘導できることを明らかにしました。この中内胚葉細胞からは E-cadherin 陽性の内胚葉が分化してきます。これにより始めて、内胚葉の分化をコントロールする方法を示すことができました。
- 2) 同じように様々なラベルを入れた ES 細胞を用いて、activin と BMP の濃度を変えるだけで、様々な中胚葉、内胚葉系列を区別して誘導できるようになりました。
- 3) 骨や筋肉などに分化できる中胚葉と、血管血液へ分化する中胚葉への分化の道筋を明確に定義し、それぞれがもう一度他の系列へとリプログラムできる可塑性があることを示しました。
- 4) 成体に存在する間質幹細胞の存在が注目されていますが、この細胞の由来は全く明らかではありません。間質幹細胞の由来を明らかにする目的で、私たちは ES 細胞から脂肪細胞へ分化が誘導される経路を詳細に検討し、多能性の成体幹細胞の一部が神経管から分化してくることを始めて明らかにしました。

以上、幹細胞ニッチと ES 細胞を研究することで高等動物でも人為的に細胞レベルの新陳代謝を起こせるかを今後も調べていきたいと思っています。

生殖細胞系列におけるゲノムインプリンティング研究の 最新のトピックス

東京医科歯科大学難治疾患研究所エピジェネティクス分野
石野史敏

1. ゲノムインプリンティングと哺乳類の個体発生

哺乳類の個体発生には、父親・母親由来のゲノムインプリンティングの記憶が必須であるため、雌性単為発生（parthenogenesis）や雄性（雄核）発生（androgenesis）といった発生様式は不可能である。これは、父親・母親のゲノムに由来した時にのみ発現するインプリンティング遺伝子群（Paternally expressed genes; *Peg* と Maternally expressed genes; *Meg*）の存在によって説明できる。現在までに、ヒトおよびマウスでこのような遺伝子は70個以上発見され、おそらく哺乳類ゲノムには200個近く存在していると予想されている。実際、雌性単為発生胚ではすべての *Peg* が発現していず、*Meg* に関しては発現量が2倍になっている。逆に、雄性発生胚ではすべての *Meg* の発現がなく、*Peg* が2倍量発現している。このため、両者の表現型は大きく異なり、形態的に全く異なる異常を示して初期胚致死となる。

最近、雌性単為発生胚が生まれたと大きく報道されたが、正確に言うと、この実験は、ゲノムインプリンティング情報を操作することにより、卵子由来の2つのゲノムを用いて、正常受精胚の遺伝子発現パターンに近いものを作り出した実験であり（後述）、母親型のゲノムインプリンティング情報のみをもつ本来の雌性単為発生胚が生まれた訳ではない。この実験もまた、哺乳類の個体発生には、父親型・母親型の異なる2つのゲノムインプリンティング情報が不可欠であるというこれまでの結論を再確認するものであった。

それでは、なぜ哺乳類は、父親型・母親型の2つのゲノムインプリンティング情報を必要とする個体発生様式を採用したのであるか？一般に、遺伝子が、両親由来のアリルから発現することは、劣性遺伝病の発症を防ぐ意味で、大きなメリットを有している。それにも関わらず、なぜ個体発生に重要な遺伝子に片親性発現制御をかけているのか？これは、ゲノムインプリンティングを巡る問題の中で、最も基本的な重要問題である。これに対する答えは、ゲノムインプリンティングが哺乳類にのみ存在すること、そして哺乳類には広く保存され

ていることを同時に説明することが望まれる。

従来、ゲノムインプリンティングの由来を説明するためにコンフリクト仮説（競合仮説）が広く受け入れられて来た。これは、「母親の体内で次世代の子供を養育するような発生様式を採用した生物では、母親の栄養の胎児への供給を巡って父親由来のアリルと母親由来のアリルに競合が生じる。そのため、胎児の成長促進効果のある遺伝子は前者から優先的に発現するように、胎児の成長抑制効果のある遺伝子は後者から優先的に発現するように進化上の圧力がかかる。その結果として、父親性発現、母親性発現のインプリンティング遺伝子が誕生した。」というものである。

これまでに発見されたインプリンティング遺伝子の多数が、まだ未解析であるのだから、それでも機能解析された遺伝子は多い。その結果、この仮説に良く合う遺伝子数もかなり存在することがわかっている。しかし、この仮説で説明できない遺伝子も同様に多く存在する。われわれは、この仮説は、ゲノムインプリンティングの本質の一部を説明しうる可能性の高い、非常に魅力的なものであると考えているが、一方で、片親性発現の意味やゲノムインプリンティングの意味を説明する別の仮説が必要であるとも感じている。

2. ゲノムインプリンティングの制御機構

この問題へアプローチするために、われわれはゲノムインプリンティングの制御機構の全貌を把握する必要があると考えた。これは、生殖細胞と体細胞における2段階の制御であり、前者ではゲノムインプリンティング記憶のリプログラミング（消去と再成立）が、後者では前者で成立した記憶に基づいて、*Peg*と*Meg*の遺伝子発現パターンが成立する。

生殖細胞におけるゲノムインプリンティング記憶のリプログラミングは、始原生殖細胞（Primordial germ cells; PGC）をドナーとして体細胞クローン技術をもちいて作製したクローンマウス胚の解析により行った。これによって、胎児期11.5日目に、PGCのもつ両親由来のゲノムインプリンティングの記憶の消去が始まり、胎児期12.5日目以降に記憶が完全に消えた（初期化された）状態になることが明らかになった（図1と図2）。また、より後期のPGCや精原細胞をドナーとして用いたクローン胚の同様の解析から、雄性生殖細胞系列では出生前後の時期に父親型の刷り込みが完了することもわかった。

初期化された状態では、インプリンティング遺伝子は両親性発現または発現

抑制されている（図1と図2）。この時、同じインプリンティング遺伝子クラスター（領域）に含まれる *Peg* と *Meg* の挙動は逆になる。そして、*Peg* と *Meg* のどちらが発現抑制されるかは、領域ごとに決まっている。ここで、初期化状態で *Peg* が抑制される領域を父親性インプリンティング領域、*Meg* が抑制される領域を母親性インプリンティング領域とする。なぜなら、その遺伝子の発現には父親性・母親性刷り込みが必要とされるからである。そして、この記憶は同時に、前者では *Meg* の後者では *Peg* の発現抑制を引き起こす。

体細胞系列では、この記憶に従って *Peg* と *Meg* の発現が制御される。この制御機構は、ゲノム配列に存在するプロモータ、エンハンサ、Differentially methylated region (DMR)、インスレータ等のシス配列（これをゲノム機能単位と呼ぶ）の組み合わせによって自動的に決定され、DMRのメチル化によって発現状態が逆転するよう制御される。これは *Peg*・*Meg* のレシプロカルな ON-OFF スイッチ機構と呼ぶことができる。インプリンティング領域とは、哺乳類ゲノムに存在する奇妙な性質を持った領域、すなわちこのような機構が内在する染色体領域であると言い換えることが出来るかもしれない。

。

3. ゲノムインプリンティングの片親性遺伝子発現機構の意味

ゲノムインプリンティングの初期化状態の解析から明らかになった重要なことは、この状態では約半数のインプリンティング遺伝子の発現が抑制された状態になっているという事実である。これは、もしも刷り込みがなければ、これらの遺伝子は、個体発生の間で発現する機会を持たないことを意味する。そして、抑制されたインプリンティング遺伝子に個体発生に必須なものが含まれていれば、当然、その個体は致死となる。

これらの遺伝子の発現誘導のために、父親性・母親性の刷り込みが必要であることこの時、それまで発現していた残り半分のインプリンティング遺伝子の発現が抑制されることを前述した。そして、こちらのグループの遺伝子にも個体発生に必須なものが含まれていれば、両方のアレルに同時に刷り込みを入れた個体も致死性を示すことになる。すなわち、刷り込みは、父親側か母親側のどちらか一方にのみ入れるべきものであることがわかる。その結果として、父親・母親由来のアレルのインプリンティング領域の遺伝子発現パターンは逆となり、異なるゲノム機能を持つことになる。そして、必然的にこの領域の遺伝子は片親性発現をしめす *Peg* と *Meg* という形になるのである。

すなわち、ゲノムインプリンティングの片親性遺伝子発現には必然性があるのである。そして、このシステムに従わない個体発生は、哺乳類では不可能なのである。これは、ゲノムインプリンティングがなぜ哺乳類に広く保存されているかという理由にも明快な解答を与えている。それでは、なぜ、このような状態が生じたのか？それは最後に触れたように、哺乳類のゲノム配列自身の問題と考えられる。すなわち、現在生きている哺乳類のゲノム配列には、特定の領域（インプリンティング領域）に含まれる一部の遺伝子が不活性化してしまうような、ゲノム配列上の変化が生じているからである。それを DNA メチル化によって補償しているのが、ゲノムインプリンティング機構と言える。

ここで問題となるのは、個体発生に必須なインプリンティング遺伝子とは何かということであるが、これについては次の機会に説明させていただきたいと考えている。われわれは最近、このような遺伝子を 2 つ同定することに成功している。そして、これらの遺伝子の由来と機能を考えることによって、哺乳類の進化において哺乳類ゲノムに何が起きたのかを明らかにできる可能性が高くなったと考えている。

参考文献

1. Surani, M.A., S.C. Barton and M.L. Norris (1984) Development of reconstituted mouse eggs suggests imprinting of the genome during gametogenesis. *Nature* 308:548-550.
2. McGrath, J. and D. Solter (1984) Completion of mouse embryogenesis requires both the maternal and paternal genomes. *Cell*, 37:179-183.
3. Lee, J., K. Inoue, R. Ono, N., Ogonuki, T. Kohda, T. Kaneko-Ishino, A. Ogura and F. Ishino (2002) Erasing genomic imprinting memory in mouse clone embryos produced from day 11.5 primordial germ cells. *Development*, 129: 1807-1817.
4. Obata, Y. and T. Kono (2002) Maternal primary imprinting is established at a specific time for each gene throughout oocyte growth. *J. Biol. Chem.* 277: 5285-5289.
5. Kaneko-Ishino, T., T. Kohda and F. Ishino (2003) The regulation and biological significance of genomic imprinting in mammals. *J. Biochem. (Review)* 133:699-711.

図の説明

図1 母親性インプリンティングに制御される遺伝子群

PGC でのゲノムインプリンティング記憶の消去過程の解析から、胎児期 12.5 日目には、インプリンティング遺伝子の発現は完全に初期化されることがわかった。この図に示した遺伝子は、*Peg* が両親性発現（白）に変化し、*Meg* の発現がなくなるものである。これらは複数の、母親性インプリンティング領域に存在するという共通性をもつ。

図2 父親性インプリンティングに制御される遺伝子群

父親性インプリンティング領域に存在するインプリンティング遺伝子は、初期化状態での *Peg* と *Meg* の発現パターン変化は、図1と逆になる。

このように、体細胞における *Peg* と *Meg* の発現パターンは、父親性・母親性インプリンティングの2つに制御された発現パターンを合わせたものを見ていることになる。

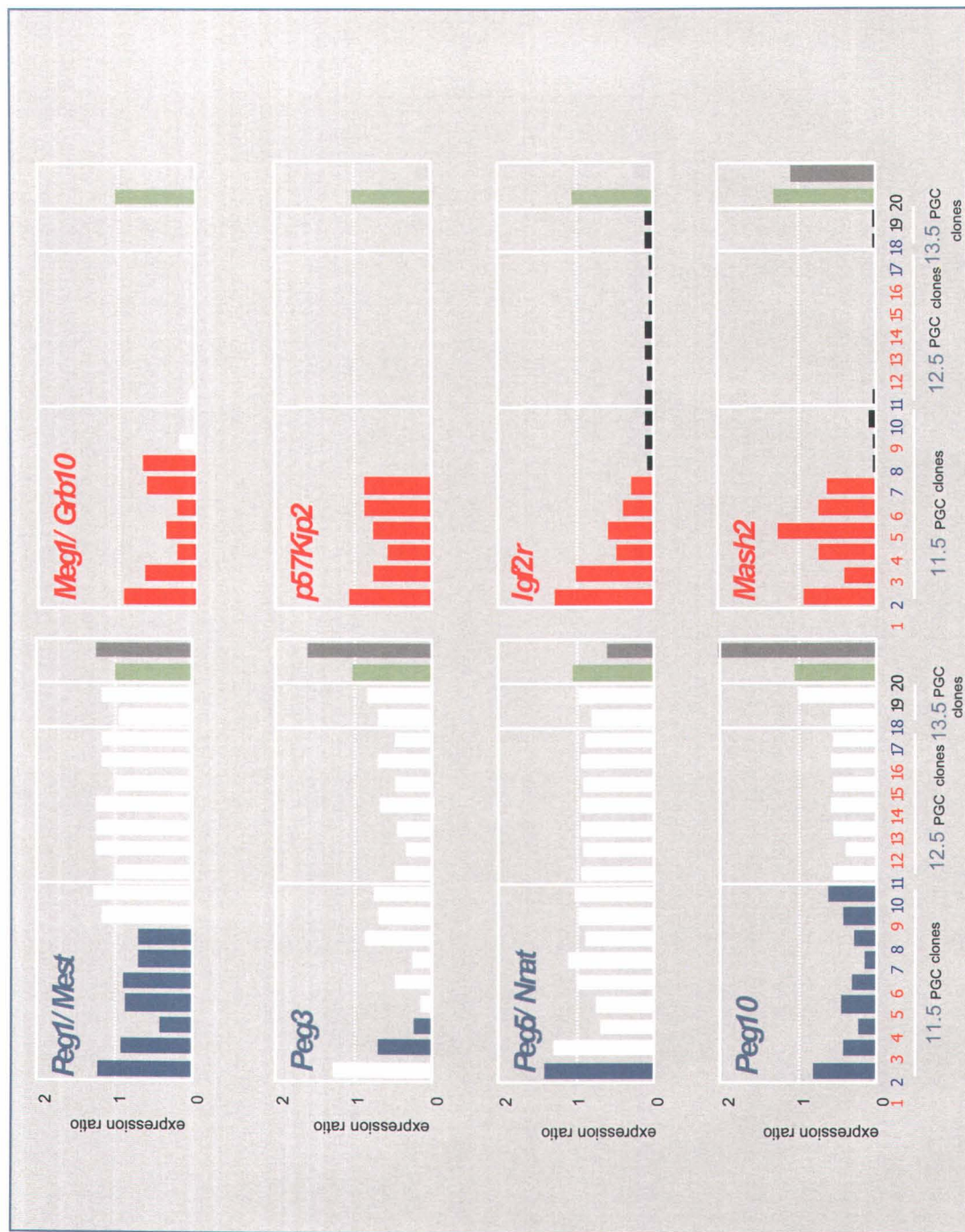


図 1 母親性インプリンティングに制御される遺伝子群



図2 父親性インプリンティングに制御される遺伝子群

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 24 号に掲載した第 79 回研究会以後、以下の研究会が開催された。

1) 第 80 回研究会（平成 15 年 12 月 5 日 於京都市勧業館「みやこめっせ」）

＜記念フォーラム＞ 動物実験の明日を考える

池田卓也（グラクソ・スミスクライン（株））

動物実験と実験動物施設が抱える明日への問題点

北田一博（北大・先端科学技術共同研究センター）

ポストゲノム時代と産官学連携時代における実験動物学

黒澤 努（大阪大・医・動物実験施設）

国際的実験動物、動物実験の法規制の趨勢そして国立大学の独立行政法人化

＜特別講演＞

鳥居宏次（奈良先端科学技術大学院大学）

重点先端分野（BT、IT、NT）の融合という名の研究推進

＜特別シンポジウム＞ 実験動物の大いなる活用

阿形清和（理研、発生・再生科学総合研究センター）

プラナリアに再生の秘密を学ぶ

古谷-清木 誠（科学技術振興財団、近藤誘導分化プロジェクト）

生命医科学における脊椎動物モデルとしてのメダカ

河野憲二（京都大院・医・認知行動脳科学）

滑らかな運動制御のための脳による情報処理

2) 第 81 回研究会（平成 16 年 3 月 5 日 於京大会館）

＜講演会＞ テーマ：糖尿病モデル動物の開発、解析、そして応用へ

1. KDP ラット：1 型糖尿病モデルの特性と解析

横井伯英（神戸大院・医・細胞分子医学）

2. 糖尿病モデルマウス－秋田マウスの特性

小泉昭夫（京都大院・医・環境衛生学）

＜維持会員ニュース＞

三協ラボサービス（株）：実験動物技術者の育成を考える

3) 第 82 回研究会（平成 16 年 6 月 25 日 於神戸臨床研究情報センター（TRI））

＜講演会＞ テーマ：再生医療を支える基礎研究のトピックス

1. ES 細胞分化の試験管内誘導

西川伸一（理化学研究所 CDB）

2. 生殖細胞系列におけるゲノムインプリンティング研究の最新のトピックス

石野史敏（東京医科歯科大学 難治疾患研究所 エピジェネティクス分野）

<維持会員ニュース>

（株）ワイエス研究所：遺伝子改変動物関連の支援技術開発

<特別企画：神戸医療産業都市構想（ツアー）>

4) 第 83 回研究会（平成 16 年 9 月 24 日 於琵琶湖ホテル（浜大津））

<講演会>テーマ：非侵襲的生体内細胞追跡法、MR I による細胞トラッキングと
PET による分子イメージング

1. 実験動物のMR画像－生体内移植幹細胞の無侵襲追跡を例にして

犬伏俊郎（滋賀医大・MR医学総合研究センター）

2. PET を用いる分子イメージング

古川高子（福井大・高エネルギー医学研究センター分子イメージング部門）

<維持会員ニュース>

1. （株）オリエンタルバイオサービス：オリエンタルバイオサービスの神戸レンタル
ラボ紹介

2. 高塚薬品（株）：ハイポックウォーターの消毒消臭効果とその応用

幹事会、評議員会、総会の議事録

1) 幹事会の概要（平成 15 年 11 月 28 日 於 京大・医・動物実験施設）

1. 出席：浅田、阿部、池田、海野、岡田、喜多、久保、庫本、塩見、芹川、新谷、宮嶋、森本、山中、山本、山口（16 名）

2. 議事

(1) 第 80 回研究会（創立 20 周年記念大会）の開催について

特別講演は奈良先端科学技術大学院大学長 鳥居宏次先生。

記念フォーラム「動物実験の明日を考える」と特別シンポジウム「実験動物の大いなる活用」のプログラムと進行が決定された。

(2) 第 81 回研究会の開催について

平成 16 年 3 月に京大会館（担当：芹川）にて開催予定。テーマは糖尿病モデル。演者は、小泉先生（京都大学大学院教授）と横井先生（神戸大学特任助教授）。

(3) 第 82 回研究会の開催について

平成 16 年 6 月に神戸市（担当：浅田、塩見）にて開催予定。

(4) 第 83 回研究会の開催について

平成 16 年 9 月に大津市（担当：鳥居、山本）にて開催予定。

(5) 第 21 回日本疾患モデル学会との共催について

芹川会長から第 21 回日本疾患モデル学会（芹川会長）と第 84 回関西実験動物研究会の共催の打診があり、開催概要が説明された。

会費と演題内容の相違等から、共催は困難と判断された。

第 84 回研究会は例年通り、特別講演、会員の発表、懇親会を京都で行う。

関西実験動物研究会は、後援という形で参加する。

2) 幹事会の概要（平成 16 年 2 月 23 日 於 京大・医・動物実験施設）

1. 出席：浅田、阿部、海野、岡田、久保、塩見、芹川、新谷、森本、山中、山本、山口（12 名）

2. 議事

- (1) 平成 15 年度の事業報告について話し合わせ、平成 15 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 24 号の発行（平成 15 年 12 月）が報告された。
- (3) 平成 15 年度の決算報告について話し合わせ、平成 15 年度決算報告が作成された。
- (4) 平成 16 年度の事業計画について話し合わせ、平成 16 年度事業計画案が作成された。
- (5) 平成 16 年度の機関紙発行計画について話し合わせ、関西実験動物研究会会報第 25 号の発行を決定した。
- (6) 平成 16 年度の予算について話し合わせ、平成 16 年度予算案が作成された。
- (7) 第 81 回研究会を 3 月 5 日に京都市で、第 82 回研究会を神戸市で、第 83 回研究会を大津市で、第 84 回研究会を京都市で開催することが決定された。

3) 第 22 回評議員会の概要（平成 16 年 3 月 5 日 於 京大会館）

1. 出席：浅野、阿部、飯田、池田克、稲垣、新比恵、内海、及川、岡田、岡本、喜多、北田、庫本、黒澤、久保、塩見、芹川、高島、千葉、坪田、鳥居、中井、新谷、橋本、平川、平沢、古河、前田、増岡、宮寫、宮嶋、森岡、森島、森本、安田、山添、山中、山本博、吉田、横井（40 名）

2. 議事

- (1) 平成 15 年度事業報告：阿部幹事（集会）より平成 15 年事業報告が行われ、承認された。
- (2) 平成 15 年度機関紙発行報告：山本幹事（編集）より、関西実験動物研究会会報第 24 号が発行されたこと報告され、承認された。
- (3) 平成 15 年度決算報告：喜多幹事（庶務）より、平成 15 年度収支決算報告が報告された。芹川会長から、監事による監査の結果、繰越金決算書が適正であったことが報告され、平成 15 年度決算報告が承認された。
- (4) 平成 16 年度事業計画案：阿部幹事（集会）より平成 16 年度事業計画案が説明され、承認された。
- (5) 平成 16 年度機関紙発行報告：山本幹事（編集）より、関西実験動物研究会会報第 25 号の発行を予定している旨説明され、承認された。

- (6) 平成 16 年度予算案:喜多幹事(庶務)より平成 16 年度の予算案が説明され、承認された。
- (7) 宮脇幹事の幹事退任、中井評議員の幹事就任、横井神戸大学助教授の評議員新任が、承認された。
- (8) その他
 - 芹川会長より、新規維持会員の勧誘について要請があった。
 - 芹川会長より、会報のサイズ変更について意見が求められた。
 - 遺伝子組換え生物等の使用等の規制による生物の多様性の確保に関する法律動物愛護法改正について情報交換がなされた。

4) 第 21 回総会の概要(平成 16 年 3 月 5 日 於 京大会館)

- (1) 岡田幹事が議長に選出された。
- (2) 阿部幹事より平成 15 年度事業報告が行われ、承認された。
- (3) 山本幹事より関西実験動物研究会会報第 24 号会報の発行について報告された。
- (4) 喜多幹事より平成 15 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。
- (5) 阿部幹事より平成 16 年度の事業計画(案)が説明され、承認された。
- (6) 山本幹事より関西実験動物研究会会報第 25 号の発行を予定していることが説明され、承認された。
- (7) 喜多幹事より平成 16 年度予算(案)が説明され、承認された。
- (8) 芹川会長より、幹事の交代(宮脇幹事の幹事退任と、中井評議員の幹事就任)について報告があった。
- (9) 芹川会長より、新評議員就任(横井神戸大学助教授)について報告があった。
- (10) 芹川会長より、関西実験動物研究会が、平成 16 年 11 月京都で開催される第 21 回日本疾患モデル学会(会長: 芹川忠夫)の後援を行う旨、報告があった。

《会員の異動》

(平成15年11月～平成16年10月)

入会者	橋本 岩雄	ヒューマンリソシア
	星野 雅行	星野試験動物飼育所
	白石 弘之	マルホ (株) 京都 R&Dセンター
	鶴田 恵三	(株)新日本科学
	米川 幸秀	京都大学医学部附属病院移植外科
	横井 伯英	神戸BTセンター3F 清野研究室
	内田 克則	住化テクノサービス (株)
	鳥取 潤一	(株)ジャパンファーム クラウン研究所
	日下部 健	大阪医科大学・第一解剖
	藤沢 公忠	日本チャールス・リバー (株) 大阪営業所
	林 千尋	神戸BTセンター3F 清野研究室
	土屋 英明	滋賀医科大学 動物生命科学研究センター
	森 正人	日本製薬(株)大阪研究所
	高田 達之	滋賀医科大学・動物生命科学研究センター
	西森 司雄	(株)環境バイリス研究所
	山本 英明	日本チャールス・リバー (株) 大阪営業所
退会者	渡辺 信介	近畿大学ライフサイエンス研究所
	久保 武	東レ(株)安全性研究室
	高橋 恵子	塩野義製薬(株)油日ラボラトリーズ
	根縫 弘子	塩野義製薬(株)油日ラボラトリーズ
	山下 浩文	塩野義製薬(株)実験動物研究センター
	日高 隆義	鐘淵化学工業(株)高砂研究所
	堀江 良一	島根医科大学第2病理学教室
	玉田 尋通	大阪府立大学農学部獣医学科
	原園 景	国立医薬品食品衛生研究所大阪支所
	竹下 崇	
	丁畑 勇一	(株)ケーエーシー
	飯塚 三喜	日本ベーリンガー・インゲルハイム(株)
	千葉 博喜	塩野義製薬 (株) 実験動物研究センター
	栃倉 匡文	
	金城 義明	日本製薬(株)大阪研究部
	河井 祥一郎	丸石製薬(株)中央研究所
	秋山 潔	愛知医科大学附属動物実験施設
	吉田 豊彦	塩野義製薬(株)新薬研究所
	中根 良文	京都大学大学院医学研究科附属動物実験施設

関西実験動物研究会(個人会員名簿) 2004年10月現在

(五十音順)★は会長、☆は名誉会員、○は評議員、◎は幹事、△は監事

	氏名	〒	住所	所属
あ	赤川 利加寿	532-0011	大阪市淀川区西中ノ島7-14-35-303	ハムリー(株)大阪営業部
	秋元 博一	520-3241	滋賀県甲賀郡甲西町北山台1丁目 18-9	
	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	650-0047	神戸市中央区港島南町2-2	(財)先端医療財団事業化推進部 推進課
◎◎	浅野 裕三	419-0101	静岡県田方郡函南町桑原三本松1308-125	(株)ボソリサーチセンター函南研究所
	東 文男	640-1473	和歌山県海草郡美里町毛原宮 486	(株)紀和実験動物研究所
	足立 民子	532-8505	大阪市淀川区加島 3-16-89	田辺製薬(株)安全研
	鎧 友成	564-0043	吹田市南吹田 4丁目 4-1	オリエンタル酵母工業(株)大阪バイオ営業所
◎◎	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	162-0814	東京都新宿区新小川町6-36 S&Sビル	エルエスジー(株)
	荒木 宏昌	536-0025	大阪市城東区森ノ宮 2-3-3	扶桑薬品工業(株)研究開発センター
	荒木 しおり	522-0052	滋賀県甲賀郡水口町大字宇川字稲場555	(株)環境パリス研究所
	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) 薬剤安全性センター
い○◎	飯田 晶敏	541-0044	大阪府中央区伏見町4-1-1明治安田生命ビル	(株)三菱化学安全科学研究所
◎◎	池田 卓也	300-4247	茨城県つくば市和台43番地	グラクソ・スミスクライン(株)筑波研究所動物管理部
○	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33-94	大日本製薬(株)総合研究所
	伊藤 隆康	532-8686	大阪市淀川区十三本町 2-17-85	武田薬品工業(株)開発研究センター
	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	滋賀県草津市西洪川 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	
○	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	321-0973	栃木県宇都宮市岩岩町1198-4	(株)ワイエス研究所
	内田 克則	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)
○	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	530-0003	大阪府北区堂島1-6-20堂島アバンザ14F	日本オルガノン(株)事業統括部開発事業部
え○◎	江馬 真	158-8501	東京都世田谷区上用賀1-18-1	国立医薬品食品衛生研究所 総合評価研究室
お○	及川 弘	525-0028	滋賀県草津市上笠 2-1-8-1	
	大島 洋次郎	743-8502	山口県光市光井字武田 4720	武田薬品工業(株)薬剤安全性センター
	大島 五紀	520-3423	滋賀県甲賀郡甲賀町五反田 1405	塩野義製薬(株)実験動物研究センター
	大槻 重信	620-0802	京都府福知山市宇興 493	
	大坪 義和	535-0004	大阪市旭区生江 1-8-14	沢井製薬(株)大阪研究所
	大野 民生	466-8550	名古屋市中区鶴舞町65	名古屋大学医学部附属動物実験施設
	岡 智通	604-8444	京都市中京区西ノ京月輪町38	京都ヘルスケア(株)
	岡崎 彰亮	107-0052	東京都港区赤坂1丁目11-28 森ビル5F	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・院・農学生命科学研・実験動物医学
	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	560-0082	豊中市新千里東町2丁目5番25-1018号	
○	岡本 宗裕	680-8553	鳥取市湖山町南4-101	鳥取大学農学部獣医学科実験動物機能学講座
	沖本 一夫	564-0053	吹田市江の木町 33-94	大日本製薬(株)総合研究所
	小木 曾 敬吉	464-0044	名古屋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 荘一郎	565-0871	大阪府吹田市山田丘 2-2	大阪大学医学部附属動物実験施設
	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
	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
	金田 平八郎	677-0032	西脇市中畑町 338	ラビトン研究所
	鎗木 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	573-1134	枚方市養父丘 1-12-17	
	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
	喜田 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	横浜市中区戸塚区粕尾町560	ポーラ化成工業(株)医薬品開発研究部動物管理室
	木村 国雄	426-8646	静岡県藤枝市源助301番地	科研製薬(株)研究開発本部信頼性保証部
く	日下部 健	569-8686	高槻市大学町 2-7	大阪医科大学・第一解剖
	久世 博	541-8505	大阪府中央区道修町3-2-10	田辺製薬(株)医薬情報センター

関西実験動物研究会(個人会員名簿) 2004年10月現在

	氏名	〒	住所	所属
〇◎	国友 一朗	580-0016	大阪府松原市上田8-1-20	奈良県立医科大学 動物実験施設 京都大学大学院医学研究科附属動物実験施設 岡山大学医学部附属動物実験施設 大阪大学医学部附属動物実験施設 大阪府立大学・農・獣医療理
	久保 薫	634-8521	橿原市四条町 840	
	庫本 高志	606-8501	京都市左京区吉田近衛町	
〇◎	倉林 譲	700-0914	岡山市鹿田町 2-5-1	大阪府立大学大学院農学生命科学研究科 近畿大学ライフサイエンス研究所 日本新薬(株) 田辺製薬(株)安全性研究所 科研製薬(株)中央研究所薬理研究部 田辺製薬(株)先端医学研究部 田辺 R&D サービス 千寿製薬(株) 大阪大学歯学部中央研究室 (株)新日本科学 薬物代謝分析センター
	黒澤 努	565-0871	吹田市山田丘 2-2	
	桑村 充	599-8531	大阪府堺市学園町1-1	
〇	小泉 清	240-0012	横浜市保土ヶ谷区月見台 33-8-201	日本チャールズリバー(株) 神戸大学医学部附属動物実験施設 武田薬品工業(株)医薬開発本部開発戦略部 日本チャールズリバー(株) 武田薬品工業(株)研究推進部 (株)ケーエーシー 清水実験材料(株) (株)日本バイオリサーチセンター羽島研 マルホ(株)京都 R&Dセンター パストゥールビル京都イメリタスクラ (株)ケーエーシー 営業本部 鹿児島大学医学部動物実験施設 三重大学医学部附属動物実験施設 塩野義製薬(株) (株)武田ラビックス 技術教育担当 京都大学大学院医学研究科附属動物実験施設 塩野義製薬(株)新薬研究所 日本エス・エル・シー(株) ハムリー(株)国際事業所 大阪出張所 滋賀医科大学・動物生命科学センター 国立精神神経センター神経研究所
	甲田 彰	665-0817	兵庫県宝塚市平井山荘5-24-303	
	小谷 猛夫	599-8531	堺市学園町 1-1	
〇	小林 嘉代	589-0014	大阪狭山市大野東 377-2	大阪大学医学部附属実験動物施設 田辺製薬(株)安全性研究所 科研製薬(株)中央研究所薬理研究部 田辺製薬(株)先端医学研究部 田辺 R&D サービス 千寿製薬(株) 大阪大学歯学部中央研究室 (株)新日本科学 薬物代謝分析センター
	小林 忍	605-8550	京都市南区西大路八条下ル	
	小林 欣滋	532-8505	大阪市淀川区加島3-16-89	
〇	小森 彰	607-8042	京都市山科区四宮南河原町14	日本チャールズリバー(株) 神戸大学医学部附属動物実験施設 武田薬品工業(株)医薬開発本部開発戦略部 日本チャールズリバー(株) 武田薬品工業(株)研究推進部 (株)ケーエーシー 清水実験材料(株) (株)日本バイオリサーチセンター羽島研 マルホ(株)京都 R&Dセンター パストゥールビル京都イメリタスクラ (株)ケーエーシー 営業本部 鹿児島大学医学部動物実験施設 三重大学医学部附属動物実験施設 塩野義製薬(株) (株)武田ラビックス 技術教育担当 京都大学大学院医学研究科附属動物実験施設 塩野義製薬(株)新薬研究所 日本エス・エル・シー(株) ハムリー(株)国際事業所 大阪出張所 滋賀医科大学・動物生命科学センター 国立精神神経センター神経研究所
	近藤 靖	532-8505	大阪市淀川区加島 3-16-89	
	坂田 太二	532-8505	大阪市淀川区加島 3-16-89	
〇	坂本 雄二	651-2241	神戸市西区室谷 1-5-4	大阪大学医学部附属実験動物施設 田辺製薬(株)安全性研究所 科研製薬(株)中央研究所薬理研究部 田辺製薬(株)先端医学研究部 田辺 R&D サービス 千寿製薬(株) 大阪大学歯学部中央研究室 (株)新日本科学 薬物代謝分析センター
	佐藤 良夫	565-0871	吹田市山田丘 1-8	
	佐藤 雅樹	642-0017	海南市南赤坂 16-1	
〇	鮫島 秀暢	890-0011	鹿児島市玉里団地1丁目 22-19	日本チャールズリバー(株) 神戸大学医学部附属動物実験施設 武田薬品工業(株)医薬開発本部開発戦略部 日本チャールズリバー(株) 武田薬品工業(株)研究推進部 (株)ケーエーシー 清水実験材料(株) (株)日本バイオリサーチセンター羽島研 マルホ(株)京都 R&Dセンター パストゥールビル京都イメリタスクラ (株)ケーエーシー 営業本部 鹿児島大学医学部動物実験施設 三重大学医学部附属動物実験施設 塩野義製薬(株) (株)武田ラビックス 技術教育担当 京都大学大学院医学研究科附属動物実験施設 塩野義製薬(株)新薬研究所 日本エス・エル・シー(株) ハムリー(株)国際事業所 大阪出張所 滋賀医科大学・動物生命科学センター 国立精神神経センター神経研究所
	澤浦 雅人	550-0005	大阪市西区西本町 1-6-2	
	塩田 恒三	520-0016	大津市比叡平1-36-30	
〇◎	塩見 雅志	650-0017	神戸市中央区楠町 7-5-1	大阪大学医学部附属実験動物施設 田辺製薬(株)安全性研究所 科研製薬(株)中央研究所薬理研究部 田辺製薬(株)先端医学研究部 田辺 R&D サービス 千寿製薬(株) 大阪大学歯学部中央研究室 (株)新日本科学 薬物代謝分析センター
	柴生田 正樹	541-0045	大阪市中央区道修町 2-3-6	
	島 朋絵	550-0005	大阪市西区西本町1-6-2	
△	嶋川 幸三	532-8686	大阪市淀川区十三本町2-17-85	日本チャールズリバー(株) 神戸大学医学部附属動物実験施設 武田薬品工業(株)医薬開発本部開発戦略部 日本チャールズリバー(株) 武田薬品工業(株)研究推進部 (株)ケーエーシー 清水実験材料(株) (株)日本バイオリサーチセンター羽島研 マルホ(株)京都 R&Dセンター パストゥールビル京都イメリタスクラ (株)ケーエーシー 営業本部 鹿児島大学医学部動物実験施設 三重大学医学部附属動物実験施設 塩野義製薬(株) (株)武田ラビックス 技術教育担当 京都大学大学院医学研究科附属動物実験施設 塩野義製薬(株)新薬研究所 日本エス・エル・シー(株) ハムリー(株)国際事業所 大阪出張所 滋賀医科大学・動物生命科学センター 国立精神神経センター神経研究所
	清水 大	604-8423	京都市中京区西の京西月光町 40	
	清水 英男	606-8304	京都市左京区吉田下阿達町 37	
〇	清水 雅良	501-6251	羽島市福寿町間島 6-104	大阪大学医学部附属実験動物施設 田辺製薬(株)安全性研究所 科研製薬(株)中央研究所薬理研究部 田辺製薬(株)先端医学研究部 田辺 R&D サービス 千寿製薬(株) 大阪大学歯学部中央研究室 (株)新日本科学 薬物代謝分析センター
	白石 弘之	600-8815	京都市下京区中堂寺栗田町93	
	菅原 努	606-8225	京都市左京区田中門前町 103	
〇	杉井 学	576-0031	大阪府交野市森南 2-27-3	大阪大学医学部附属実験動物施設 田辺製薬(株)安全性研究所 科研製薬(株)中央研究所薬理研究部 田辺製薬(株)先端医学研究部 田辺 R&D サービス 千寿製薬(株) 大阪大学歯学部中央研究室 (株)新日本科学 薬物代謝分析センター
	鈴木 秀作	890-0073	鹿児島市宇宿町 1208-1	
	鈴木 昇	514-8507	三重県津市江戸橋 2-174	
〇	鈴木 稔	520-3423	滋賀県甲賀郡甲賀町五反田1405	大阪大学医学部附属実験動物施設 田辺製薬(株)安全性研究所 科研製薬(株)中央研究所薬理研究部 田辺製薬(株)先端医学研究部 田辺 R&D サービス 千寿製薬(株) 大阪大学歯学部中央研究室 (株)新日本科学 薬物代謝分析センター
	角井 正義	532-8686	大阪市淀川区十三本町2-17-85	
	芹川 忠夫	606-8501	京都市左京区吉田近衛町	
〇◎	菅我 正彦	561-0825	大阪府豊中市二葉町3-1-1	大阪大学医学部附属実験動物施設 田辺製薬(株)安全性研究所 科研製薬(株)中央研究所薬理研究部 田辺製薬(株)先端医学研究部 田辺 R&D サービス 千寿製薬(株) 大阪大学歯学部中央研究室 (株)新日本科学 薬物代謝分析センター
	高木 貞明	601-8151	京都市南区上鳥羽塔森東向町 93-8	
	高島 俊行	532-0011	大阪市淀川区西中島7-14-35-303	
〇	高田 達之	520-2192	大津市瀬田月輪町	大阪大学医学部附属実験動物施設 田辺製薬(株)安全性研究所 科研製薬(株)中央研究所薬理研究部 田辺製薬(株)先端医学研究部 田辺 R&D サービス 千寿製薬(株) 大阪大学歯学部中央研究室 (株)新日本科学 薬物代謝分析センター
	高橋 明男	187-0031	東京都小平市小川東町4-1-1	
	竹之下 誠	648-0003	橋本市隅田町山内 514	
〇◎	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 田辺製薬(株)安全性研究所 科研製薬(株)中央研究所薬理研究部 田辺製薬(株)先端医学研究部 田辺 R&D サービス 千寿製薬(株) 大阪大学歯学部中央研究室 (株)新日本科学 薬物代謝分析センター
	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	
〇	谷本 純一	583-0872	羽曳野市はびきの 4-15-4	大阪大学医学部附属実験動物施設 田辺製薬(株)安全性研究所 科研製薬(株)中央研究所薬理研究部 田辺製薬(株)先端医学研究部 田辺 R&D サービス 千寿製薬(株) 大阪大学歯学部中央研究室 (株)新日本科学 薬物代謝分析センター
	多根 昌孝	604-8423	京都市中京区西の京西月光町 40	
	田畑 一樹	550-0005	大阪市西区西本町1-6-2	
〇	田畑 信子	743-0011	山口県光市光井宇武田 4720	大阪大学医学部附属実験動物施設 田辺製薬(株)安全性研究所 科研製薬(株)中央研究所薬理研究部 田辺製薬(株)先端医学研究部 田辺 R&D サービス 千寿製薬(株) 大阪大学歯学部中央研究室 (株)新日本科学 薬物代謝分析センター
	千葉 薫	569-1125	高槻市柴町 1-1	
	塚原 清志	520-3423	滋賀県甲賀郡甲賀町五反田 1405	
〇	辻 嘉昭	650-0033	神戸市江戸町85-1	大阪大学医学部附属実験動物施設 田辺製薬(株)安全性研究所 科研製薬(株)中央研究所薬理研究部 田辺製薬(株)先端医学研究部 田辺 R&D サービス 千寿製薬(株) 大阪大学歯学部中央研究室 (株)新日本科学 薬物代謝分析センター
	土屋 英明	520-2192	大津市瀬田月輪町	
	都築 政起	739-0046	東広島市鏡山1-4-4	
〇	蝶良 愛郎	570-0074	守口市文園町10-15	大阪大学医学部附属実験動物施設 田辺製薬(株)安全性研究所 科研製薬(株)中央研究所薬理研究部 田辺製薬(株)先端医学研究部 田辺 R&D サービス 千寿製薬(株) 大阪大学歯学部中央研究室 (株)新日本科学 薬物代謝分析センター
	坪田 裕司	641-0012	和歌山市紀三井寺 811-1	
	津村 秀樹	514-0001	三重県津市江戸橋 2-174	
〇	鶴田 恵三	642-0017	和歌山県海南市南赤坂16-1	大阪大学医学部附属実験動物施設 田辺製薬(株)安全性研究所 科研製薬(株)中央研究所薬理研究部 田辺製薬(株)先端医学研究部 田辺 R&D サービス 千寿製薬(株) 大阪大学歯学部中央研究室 (株)新日本科学 薬物代謝分析センター
	土井 清弘	604-8423	京都市中京区西の京西月光町40	
	堂前 嘉代子	663-8558	西宮市池開町6-46	
〇◎	鳥取 潤一	895-2701	鹿児島県伊佐郡菱刈町前目字池田 3504-157	大阪大学医学部附属実験動物施設 田辺製薬(株)安全性研究所 科研製薬(株)中央研究所薬理研究部 田辺製薬(株)先端医学研究部 田辺 R&D サービス 千寿製薬(株) 大阪大学歯学部中央研究室 (株)新日本科学 薬物代謝分析センター
	鳥居 隆三	520-2192	滋賀県大津市瀬田月輪町	
	中井 健史	520-3423	滋賀県甲賀郡甲賀町五反田 1405	
〇◎	中井 伸子	601-8550	京都市南区西大路八条下ル	大阪大学医学部附属実験動物施設 田辺製薬(株)安全性研究所 科研製薬(株)中央研究所薬理研究部 田辺製薬(株)先端医学研究部 田辺 R&D サービス 千寿製薬(株) 大阪大学歯学部中央研究室 (株)新日本科学 薬物代謝分析センター
	中井 洋一	503-0628	岐阜県海津郡海津町福江290	
	長井 寛明	599-8531	大阪府堺市学園町 1-1	
〇	中川 和年	771-0132	徳島市川内町平石字夷野 224-2	大阪府立大学・院・農学生命科学研究・実験動物学 大鵬薬品(株) 科研製薬(株) (株)ケアリー
	中川 昭文	125-0041	東京都葛飾区金町3-5-13	
	長澤 久充	610-0121	京都府城陽市寺田深谷 7-76	
〇	中島 健博	531-0072	大阪市北区豊崎 4-12-1	大阪府立大学・院・農学生命科学研究・実験動物学 大鵬薬品(株) 科研製薬(株) (株)ケアリー

関西実験動物研究会(個人会員名簿) 2004年10月現在

	氏名	〒	住所	所属
	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	650-0047	神戸市中央区港島南町5-5-2	カルナバイオサイエンス(株)標的分子研究部
	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)
に○◎	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
	新谷 聰	565-8565	吹田市藤白台 5-125	国立循環器病センター研究所
	西川 健志	601-8550	京都市南区吉祥院西ノ庄門口町13	日本新薬(株)安全性研究部
	西川 哲	431-3192	浜松市半田山 1-20-1	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)環境バイロス研究所
	西村 友成	532-8505	大阪市淀川区加島 3-16-89	田辺製薬(株)安全研
	西村 正彦	466-0065	名古屋市昭和区鶴舞町65	名古屋大学医学部附属動物実験施設
	西村 弘道	597-0061	貝塚市蒲田 172-12	(株)ケーエーシー
	西森 司雄	528-0052	滋賀県甲賀郡水口町大字宇川字稲場555	(株)環境バイロス研究所
	西山 秀志	532-8686	淀川区十三本町 2-17-85	(株)武田ラビックス
ねは○	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
	橋本 岩雄	542-0081	大阪市中央区南船場4-3-2	ヒューマンリソシア(株)
	橋本 正晴	532-0031	大阪市淀川区加島 2-1-6	藤沢テクニクス(株)
	連間 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	
	林 千尋	650-0047	神戸市中央区港島南町1-5-6	神戸BTセンター3F 清野研究室
	原口 心雄	561-0825	豊中市二葉町3-1-1	塩野義製薬(株)新薬研究所
	原田 正史	545-0051	大阪市阿倍野区旭町	大阪市立大学医学研究科動物実験施設
	原田 延行	220-8146	横浜市西区みなとみらい2-2-1ランドマークタワー46F	日本農産工業(株)バイオ部バイオ第1グループ
ひ○	東 稔広	611-0021	宇治市宇治蓮華67	
	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	523-2324	滋賀県野洲郡野洲町近江富士3丁目1-13	
	平井 誠	410-2321	静岡県田方郡大仁町三福632-1	旭化成ファーマ(株)開発研究所
	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
	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	大阪市此花区春日出中3-1-98	住友化学工業(株)生物環境科学研究所
	福西 克弘	892-0871	鹿児島県鹿児島市吉田町宮之浦 2438	(株)新日本科学
ふ○	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
	藤沢 公忠	550-0005	大阪市西区西本町1-6-2 阿波堀ビル8F	日本チャールスリバー(株)大阪営業所
	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
	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実験動物室
	星野 雅行	340-0801	埼玉県八潮市八条4035	(株)星野試験動物飼育所
	干場 純治	700-0914	岡山市鹿田町 2-5-1	岡山大学自然生命科学研究支援センター動物資源部門
	細江 和典	676-8688	高砂市高砂町宮前町1-8	鍾淵化学工業(株)ライフサイエンス研究所
	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
ま○◎	堀江 信一	541-0044	大阪市中央区伏見町 2-1-1住友銀行高麗橋ビル	(株)新日本科学
	前田 勝弘	564-0053	吹田市江の木町 33-94	大日本製薬(株)研究管理部動物室
	前田 敏宏	564-0053	吹田市江の木町 33-94	大日本製薬(株)安全性研究所
	真壁 恭子	641-0012	和歌山市紀三井寺 811-1	和歌山県立医科大学 第2生理学教室
	牧野 進	520-3001	滋賀県栗東市東坂91	(株)ケー・イー・シー 生物科学センター
	真下 知士	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
	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	滋賀県栗東市栗東町東坂 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
み○	松尾 公平	554-0022	大阪市此花区春日出中3-1-98	住友製薬(株)研究業務動物管理グループ
	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
	三日月 勝見	520-3405	滋賀県甲賀郡甲賀町隠岐 2235	
	神子田 武	532-8686	大阪市淀川区十三本町 2-17-85	(株)武田ラビックス
	水内 博	335-8505	埼玉県戸田市川岸2-2-50	田辺製薬(株)創薬研究所
	水野 信哉	565-0081	吹田市山田丘 2-2	大阪大学医学部バイオメディカル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	
	三野 将城	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
	三原 達子	410-0866	静岡県沼津市市道町 13-4 本山方	
	宮嶋 宏彰	565-0821	大阪府吹田市山田東4-41-4-310	
☆○	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	601-8550	京都市南区吉祥院西ノ庄門口町14	日本新薬(株)知的財産部
	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

関西実験動物研究会(個人会員名簿) 2004年10月現在

	氏名	〒	住所	所属
も	村本 泰一	605-0976	京都市東山区泉涌寺東林町2	
	森 正人	598-8558	大阪府泉佐野市住吉町26	日本製薬(株)大阪研究所
○	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	大阪市生野区箕西 1-8-1	ロート製薬(株)生物臨床研究部開発支援G
	森島 英喜	532-8686	大阪市淀川区十三本町 2-17-85	武田薬品工業(株)薬物機能第二研究所
○◎	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	大阪薬科大学動物関連研究施設
	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)創薬第一研究所 病態モデルG
	柳本 行雄	550-0005	大阪市西区西本町 2-5-19	生活化学研究所
	山北 修	771-0132	徳島市川内町平石字夷野 224-2	大鵬薬品工業(株)信頼性保証部 QAU課
	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
	山手 丈至	599-8531	大阪府堺市学園町1-1	大阪府立大学・農・獣医病理
	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
○◎	山中 久	399-4501	長野県伊那市西箕輪2148-188	(株)イナリサーチ 営業本部
	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 英明	550-0006	大阪市淀川区西三国 1-7-38 403号	
	山本 博	930-0152	富山市杉谷 2630	富山医科薬科大学生命科学センター
○◎	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
	よ○ 横井 伯英	650-0047	神戸市中央区港島南町1-5-6	神戸BTセンター3F 清野研究室
○	吉岡 勝	532-8686	大阪市淀川区十三本町2-17-85	武田薬品工業(株)薬剤安全性センター
	吉田 元信	541-0045	大阪市中央区道修町 2-6-8	大日本製薬(株)アニマルサイエンス部
わ	米川 幸秀	606-8507	京都市左京区聖護院川原町54	京都大学医学部附属病院移植外科
	余野 清香	520-3423	滋賀県甲賀郡甲賀町五反田1405	塩野義製薬(株)油日ラボラトリーズ
	若狭 芳男	399-4501	長野県伊那市西箕輪 2148-188	(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
	渡邊 雄造	540-0003	大阪市中央区森ノ宮中央1-19-16	白井松器械(株)
	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:kansajim@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16年10月現在)

No.	社名	〒	住所
1	(株)アイセイ	594-1151	大阪府和泉市唐国町1丁目6-1
2	(株)イナリサーチ大阪支所	541-0045	大阪府中央区道修町2-2-6道修町後藤ビル3F
3	エルエスジー(株)	162-0814	東京都新宿区新小川町 6-36 S&Sビル
4	(株)大塚製薬工場・鳴門研究所	772-8601	徳島県鳴門市撫養町立岩字芥原 115
5	オリエンタル酵母工業(株)大阪バイオ営業所	564-0043	吹田市南吹田 4-4-1
6	(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
7	(株)環境バイリス研究所	528-0052	滋賀県甲賀郡水口町大字宇川字稲場 555
8	北山ラベス(株)	396-0021	長野県伊那市荒井区川北 3052
9	(株)ケアリー	531-0072	大阪府北区豊崎 4-12-1
10	(株)ケー・エー・シー	604-8423	京都市中京区西の京西月光町 40
11	(株)サンブラネット 川島事業本部	501-6024	岐阜県羽島郡川島町竹早町 2-1
12	参天製薬(株)研究開発センター	630-0101	生駒市高山町 8916-16
13	三協ラボサービス(株)	132-0023	東京都江戸川区西一之江 2-13-16
14	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
15	清水実験材料(株)	606-8304	京都市左京区吉田下阿達町 37
16	白井松器械(株)	540-0003	大阪府中央区森ノ宮中央 1-19-16
17	(株)ジャパンファーム クラウン研究所	895-2701	鹿児島県伊佐郡菱刈町前日字池田 3504-157
18	(株)新日本科学 大阪支社	541-0044	大阪府中央区伏見町2-1-1三井住友銀行高麗橋ビル
19	(株)精研	542-0066	大阪府中央区瓦屋町2丁目11-16
20	双日マシナリー(株)	103-0022	東京都中央区日本橋室町3-2-15 日本橋室町センタービル9F
21	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
22	高塚薬品(株)	700-8577	岡山市国体町1番13号
23	田辺製薬(株)安全性研究所	532-8505	大阪府淀川区加島 3-16-89
24	(株)夏目製作所	113-0034	東京都文京区湯島 2-18-6
25	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
26	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
27	日本新薬(株)研究開発本部	601-8550	京都市南区吉祥院西ノ庄門口町 14
28	日本チャールスリバー(株)	550-0005	大阪府西区西本町 1-11-7
29	日本ベーリンガーインゲルハイム(株)	666-0193	兵庫県川西市矢間 3 丁目10-1
30	ハムリー(株)大阪営業所	532-0011	大阪府淀川区西中島 7-14-35-303
31	藤沢テクニス(株)	532-0031	大阪府淀川区加島 2-1-6
32	丸石製薬(株)中央研究所	538-0042	大阪府鶴見区今津中 2-2-18
33	三浦工業(株)メディカル西日本営業部	533-0011	大阪府東淀川区大桐 2-7-12 三浦ビル
34	(株)三菱化学安全科学研究所大阪支店	541-0044	大阪府中央区伏見町4-1-1(大阪明治生命館7F)
35	(株)美濃ラボ	503-0321	岐阜県海津郡平田町今尾 1195-1
36	(株)ラビトン研究所	677-0032	兵庫県西脇市中畑町 338
37	(株)ワイエス研究所	321-0973	栃木県宇都宮市岩曽町1198-4

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: kansajim@anim.med.kyoto-u.ac.jp)

入会

(株)ワイエス研究所

退会

(株)共生 カルモア事業部

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	(財) 先端医療財団 事業化推進部推進課
浅野 裕三	(株) ポゾリサーチセンター 函南研究所
阿部 敏男	(株) 武田ラビックス 系統管理部
飯田 晶敏	(株) 三菱化学安全科学研究所
池田 卓也	グラクソ・スミスクライン (株) 筑波研究所動物管理部
池田 克巳	武庫川女子大学 生活環境学部
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) 薬事統括部開発薬事部
江馬 眞	国立医薬品食品衛生研究所 総合評価研究室
及川 弘	
岡田 利也	大阪府立大学大学院農学生命科学科実験動物医学
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部門
北田 一博	北海道大学先端科学技術共同研究センター
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	ハムリー (株) 国際事業所 大阪出張所
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	JT クリエイティブサービス 理化学関連事業本部
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学
鳥居 隆三	滋賀医科大学動物生命科学研究センター
中井 伸子	日本新薬(株) 安全性研究部
新谷 聰	国立循環器病センター研究所
橋本 正晴	藤沢テクニス (株)
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 薬物代謝分析センター
平沢 勉	塩野義製薬 (株) 創薬研究所
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

氏名	所属
前田 敏宏	大日本製薬（株）安全性研究所
牧野 進	（株）ケーエーシー生物科学センター
増岡通夫	（株）ケーエーシー生物科学センター
宮脇 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）知的財産部
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	大阪薬科大学動物関連研究施設
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	富山医科薬科大学生命科学センター
山本 好男	滋賀医科大学法医学教室
横井 伯英	神戸BTセンター3F 清野研究室
吉田 元信	大日本製薬（株）アニマルサイエンス部

上記評議員名簿に追加、訂正等があれば

事務局（TEL：075-753-4489, FAX：075-753-4409,

e-mail：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 16 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部門
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 (株) ボゾリサーチセンター 函南研究所 池田 卓也 ガラク・ミスクリン(株) 筑波研究所 動物管理部 海野 隆 日本オルガノン (株) 薬事統括部開発薬事部 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 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) 安全性研究所 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 (財) 先端医療財団 事業化推進部推進課 飯田 晶敏 (株) 三菱化学安全科学研究所 鳥居 隆三 滋賀医科大学動物生命科学研究センター 中井 伸子 日本新薬(株)安全性研究部 動物管理課 新谷 聡 国立循環器病センター研究所 山中 久 (株) イナリサーチ 営業本部
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16年12月15日 印 刷
平成16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25号
Kansai Journal of Laboratory Animals

平成16年12月

第79回研究会：腎疾患モデルと投与採血の指針

- 岩野 正之：線維芽細胞を中心とした間質線維化の発症機構について 3
武曾 恵理：純系高IgA血症マウス（HIGA）の開発と病態解析 7
中井 伸子：被験物質の投与（経路と容量を含む）及び採決に関する手引き 9

第80回研究会

＜記念フォーラム＞ 動物実験の明日を考える

- 池田 卓也：動物実験と実験動物施設が抱える明日への問題点 29
北田 一博：ポストゲノム時代と産官学連携時代における実験動物学 39
黒澤 努：国際的実験動物、動物実験の法規制の趨勢そして国立大学の独立行政法人化 44

＜特別講演＞

- 鳥居 宏次：重点先端分野（BT、IT、NT）の融合という名の研究推進 47

＜特別シンポジウム＞ 実験動物の大いなる活用

- 阿形 清和：プラナリアに再生の秘密を学ぶ 52
古谷-清木 誠：生命医科学における脊椎動物モデルとしてのメダカ 57
河野 憲二：滑らかな運動制御のための脳による情報処理 58

第81回研究会：糖尿病モデル動物の開発、解析、そして応用へ

- 横井 伯英：KDPラット：1型糖尿病モデルの特性と解析 65
小泉 昭夫：糖尿病モデルマウス-Akita mouseの特性 ―何が面白いのか― 74

第82回研究会：再生医療を支える基礎研究のトピックス

- 西川 伸一：ES細胞分化の試験管内誘導 87
石野 史敏：生殖細胞系列におけるゲノムインプリンティング研究の最新のトピックス 91

＜関西実験動物研究会だより＞ 99

- 幹事会、評議員会、総会の議事概要 101 会員の異動 104
個人会員名簿 105 維持会員名簿 109 評議員名簿 110
会長、幹事、監事名簿 112