

関西実験動物研究会会報

Kansai Journal of Laboratory Animals

平成17年12月 26号

関西実験動物研究会

Kansai Laboratory Animal Research Association

目 次

〈第83回研究会（平成16年9月24日）〉

テーマ：非侵襲的生体内細胞追跡法、MRI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）----- 3
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）----- 16

〈第84回研究会（平成16年12月10日）〉

＜特別講演＞

1. 身体の時間を刻む時計遺伝子
岡村 均（神戸大・医・脳科学・分子脳科学）----- 19
 2. 遺伝的変異体の作成とその形態形成機構解明への応用
横山 尚彦（京府医大・生体機能形態科学）----- 24
- ＜会員の発表 16題＞ ----- 29

〈第85回研究会（平成17年3月4日）〉

テーマ：腸内フローラについて学ぶ

1. 腸内フローラと生体反応
伊藤喜久治（東京大学院・農・獣医公衆衛生学）----- 45
2. 腸内フローラとToll-like receptor
竹田 潔（九州大生体防御医学研・発生工学）----- 51

〈第86回研究会（平成17年6月10日）〉

テーマ：受精機構の神秘を解く

1. アンギオテンシン変換酵素(ACE)の新機能：

GPIアンカー型蛋白質遊離と受精への関与

近藤 玄（京都大学再生医科学研究所）----- 67

2. 精子が卵子と出会うまで

馬場 忠（筑波大学生命環境科学研究科）----- 70

3. 遺伝子操作動物を通して見る受精のメカニズム

岡部 勝（大阪大学微生物病研究所）----- 74

〈関西実験動物研究会だより〉----- 79

〈幹事会、評議員会、総会の議事概要〉----- 81

〈会員の異動〉----- 85

〈個人会員名簿〉----- 86

〈維持会員名簿〉----- 90

〈評議員名簿〉----- 91

〈会長、幹事、監事名簿〉----- 93

〈第83回研究会（平成16年9月24日）〉

テーマ：非侵襲的生体内細胞追跡法、MRI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）

要約

再生医療や細胞治療で用いるES細胞などの治療用細胞を生体内で可視化する技術が切望されている。その一つの方法として、移植細胞に常磁性の標識を取り込ませ、核磁気共鳴(MR)法を利用して移植細胞の無侵襲追跡が可能になってきた。本稿では、MR法が細胞識別を可能にする原理から、MRのための標識法、実験動物における標識細胞の長期無侵襲追跡などを紹介するとともに、あわせて、MR細胞追跡法の課題や展望についてまとめた。

1. はじめに

今日、核磁気共鳴(Nuclear Magnetic Resonance; NMR)法は一般の人にも身近な存在になっている。例えば、我々が病院を訪れるとさまざまな臨床検査が待ち構えている中で、しばしばMRI(MR画像)による検査が含まれる。この検査方法は臨床診断にはもはや欠かすことができない手法にまで到達している。一方で、古くから大学や研究所で活躍してきたNMRスペクトロスコピー法(古い呼び方では核磁気共鳴分光法)は、化学の研究室を飛び出し、いまや核酸やタンパク質の構造解析や、それらの機能の究明に活躍するとともに、さらにヒト・ゲノムの解析が終わった今日、プロテオーム研究の一翼を担うまでになっている。このNMR法の二つの潮流が合流するとその流れは一体どこへ向かうのであろうか?

医療や医学の分野でも大きな変化が起こりつつある。ことに遺伝子の情報を駆使した医療はもはや実行段階に達し、さらにES細胞や幹細胞を利用する再生医療が目前に迫りつつある。このような急速に発展しつつある分野で、遺伝子発現の画像化、あるいは、移植細胞、ことに万能細胞と呼ばれるES細胞の体内追跡(これらはまとめて分子イメージングと呼ばれている)は、これからMR法が取り組まなければならない新しい課題であろう。本稿では、狭い意味では分子イメージングに入らないが、MR画像法による生体内の移植幹細胞追跡の現状をまとめながら、MR分子画像法の一端を紹介し、その将来についても概観する。

2. 動物実験用7テスラMRI装置の概要

MRによる細胞トラッキングを詳述する前に、我々が平成15年度から使用を開始した磁場強度7テスラの動物実験用MR装置について簡単に紹介しておこう。本装置には、直径40センチの開口部を持つ、高さ約2メートル(冷媒補充用のサービスポートや上部に設

置された冷凍機を含めると2メートル50センチになる)、長さ1メートル80センチの超伝導磁石 (JASTEC 社製) が付備されている (図1)。この磁石にはアクティブ・シールド用の磁石が取り付けられ、主コイルで発生する外向きの磁場を打ち消す方向に磁場がつけられているため、磁石側面での遺漏磁場は十ガウス程度に抑えられる。したがって、ここではほとんど磁場の影響を受けない領域が得られている。また、この磁石には、ウサギやサルなどの中型動物のMR画像計測用に傾斜磁場コイル (内径26cm) とマウス・ラットなどの小型動物用の傾斜磁場コイル (内径12cm) を取り付けることができる。

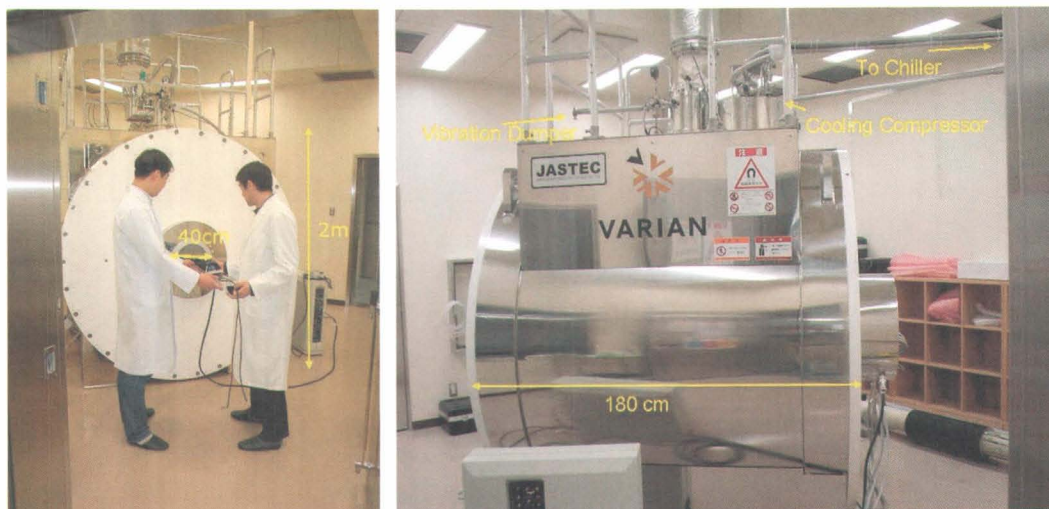


図1 滋賀医科大学、MR医学総合研究センターに整備された動物実験用7テスラMR装置の磁石 遺漏磁場を抑制するアクティブ・シールド型磁石を装備する。また、冷凍機の作動を制御して、超伝導磁石の冷媒である液体ヘリウムが気化した分だけを液化して戻すシステムを持ち、冷媒の補充を必要としない (ゼロボイルオフ)。ただし、冷凍機は常時運転させるため、1-2年で交換する必要がある。

MRのコンソールは Varian 社製 Inova 300 で、 ^{15}N (共鳴周波数: 30MHz) から ^1H (300MHz) までのあらゆる核種に対応し、例えば、 ^{13}C 、 ^{19}F 、 ^{23}Na 、 ^{31}P 、などの他核のMRが観測できる。そして、これら核種のMR画像 (MRI) とNMRスペクトル (MRS) の両方が計測できる。信号検出用のRFコイルとして、直径19cmと6cmの市販体積コイルが装備され、それぞれ、サルやラットなどのMR画像撮像に使われる。MRコイルは対象とする動物の大きさや計測する部位、例えば、頭部 (脳)、腹部 (心臓、肝臓)、下肢 (骨格筋) 等に対応して、その大きさや形が異なり、さらに、計測する核種によっても共鳴周波数を得る同調回路のパラメータが違うため、それぞれの対象に応じてコイルを作製する事になる。このために必要な、非磁性体電子素材や高周波回路の計測機器などが我々のセンターには整備されている。

ちなみに、本学動物生命科学研究センターの鳥居教授のご協力により本7テスラMR装置で撮像した、カニクイザルの脳とその摘出標本のデータを図2に示した。



図2 7テスラMR装置によるカニクイザルのMR画像。 T_1 -強調画像（上段）と T_2 -強調画像（下段）

3. MR法の特徴とMR標識剤

MR画像は生体中の水分子の水素原子核に由来するMR信号を検出し、その強度を平面の位置情報に対応して表示し、画像にしたものである。このことからMR信号の強度は、元々の水分子の数、即ち、その濃度に比例することは明らかである。実は、MR信号は緩和時間と呼ばれる、信号の生成や消滅過程に関連するパラメータにも依存する。MR画像法で、病巣の明瞭なコントラストが得られ理由は、病巣に含まれる水分子のMR信号が持つ緩和時間が、辺縁の正常な組織中の水分子の緩和時間と異なることによる。このMR信号の緩和時間に、縦緩和時間（ T_1 ）と横緩和時間（ T_2 ）が含まれ、MR画像診断では、 T_1 -強調画像や T_2 -強調画像が一般的に使われている。

MR画像で病巣をさらに鮮明に浮かび上がらせようとすると、病巣と正常組織の間で緩和時間の差をより大きくする必要がある。MR画像法では造影剤と呼ばれ、病巣部の水分子と選択的に相互作用をして、そのMR信号の緩和時間を短縮させる常磁性の試薬（MRでは造影剤と呼ばれる）を採用する。一般に常磁性金属イオンはMR信号の緩和時間の短縮効果を持つが、中でもその効果が際立つ緩和試薬としてガドリニウム・イオンのキレート剤が臨床では造影剤として利用される。ただし、ガドリニウム・イオン自体は猛毒であるため、キレートに強固に配位したまま、体外に排出されるように分子設計がなされている。このような造影剤は、白黒のMR画像ではあたかも白か黒の絵の具のように働く。例えば、MR信号の強度が減少すれば、MR画像では黒く見え（主として T_2 -強調画像）、逆に、信号強度が相対的に増強するとMR画像では白く見える画像コントラストが得られる。また、このような造影剤を血管内に導入すると、血液とともに造影剤が流れ込み、水

の流れが絵の具の色で捕らえられるように、造影剤の画像に及ぼす一過性の変化を観測し、血流の速度や容量の変化も計測することができる。

4. これまでの成果

MRの造影剤は上述のような使われ方以外に、分子認識に応用することが可能である。特定のタンパク質に対する抗体にMR造影剤を担わせ、目的のタンパク質に結合した部位にコントラストを与えて画像化する、タンパク質の画像化法が試みられてきた¹⁾。中でも、細胞膜に局在するタンパク質に対する抗体を用いれば、タンパク質を介して細胞が特定できることになる。このようなMR造影剤を使った手法は80年代の後半から始められたものの、タンパク質の濃度が低い上、造影剤自身の緩和時間短縮効果も限られていたため、これまでは注目されるほどの目覚ましい成果は上げられてこなかった。しかし、最近になって超常磁性酸化鉄 (Super Paramagnetic Iron Oxide: SPIO) と総称される非常に強力な造影剤が開発され、これまでの障壁のひとつが乗り越えられ、まさに細胞に絵の具で色をつけ、その色をMR画像で追跡できることが可能となった。

最近、Bulte 等²⁾は高分子化合物であるデンドリマーに常磁性金属を担わせた新しい造影剤を開発した。この造影剤は細胞表面のタンパク質を標的とせず、細胞膜の中へ直接挿入することを狙ったMR造影剤である。その後、市販の遺伝子導入剤がこれもまた市販のMR造影剤である SPIO (肝臓用の陰性MR造影剤) を細胞内へ導入できることが分かり、細胞標識がさらに容易になってきた。実際、神経幹細胞に USPIO (Ultra small SPIO) を導入し、ラット脳の虚血モデルで、標識された移植幹細胞が虚血によりダメージを受けた部位に移動することが MRI で確認されている³⁾。しかし、MR造影剤は酸化鉄とそれを包むデキストランで構成されており、通常負の電荷を持つとは予想されない。陽イオン性の遺伝子導入剤が、遺伝子の様に陰イオンではない常磁性鉄粒子を細胞内へどのようにして移送するのかは、まだ解答が得られていない。このことから、標識試薬の性質に左右されない、さらに効率の良い細胞への導入技術が開発されるであろうと推察された。つい最近、これまでの細胞の標識化やMRによる細胞追跡のまとめが、これまでの経緯がまとめられているので参照されたい⁴⁾。

5. 効率的な細胞の磁氣的標識法

ここからは、我々が採用している細胞標識法を紹介しておこう⁵⁾。標識剤には MRI の陰性の造影剤として普及している超常磁性酸化鉄 (Super Paramagnetic Iron Oxide: SPIO) の、フェリデックス (田辺製薬) とレゾビスト (日本シェーリング) を使用した。一方、これらの標識剤を細胞内へ移送する方法として、大阪大学遺伝子治療教室 (金田教授) で開発された、遺伝子導入のための膜融合活性を持つセンダイウイルスのベクター・エンベロープ (Hemagglutinating Virus of Japan, HVJ-E: Genom One、石原産業)⁶⁾を使用した。このベクターは元々遺伝子導入のために開発されたものであるが、たんぱく質

や薬物の細胞内への輸送にも優れた効果を発揮する。

我々はES細胞への常磁性標識を試みる前に、一般の培養細胞を用いて、HVJ-Eによる標識の細胞内同移入効率を検討した。標識を施す細胞には、ニューロンの代表としてラット副腎由来のPC12細胞と、グリアの代表としてマウスのアストロサイトを選び、標識導入の条件を探索した。

これまでに国外の施設では、我々が使用したのと同様の常磁性鉄製剤をMR標識に、そして、遺伝子導入剤(transfection reagent)として市販されている試薬を用いた。まず、遺伝子導入剤について簡単に触れておこう。元来、遺伝子は負の電荷を帯び、電気的には負の電荷を持つ標的の細胞膜と親和性が乏しいため、そのままでは膜内へ遺伝子を導入することが難しい。従って、一般の遺伝子導入剤は、陽イオン性のポリマーや、タンパク質、あるいは脂質などからなり、容易に遺伝子との複合体を形成して、その正の電荷を利用して細胞膜を通過させることになる。ところが、MR標識に用いられる鉄製剤は負の電荷を持つものでなく、市販の遺伝子導入剤との間に強い相互作用を持つとは考えにくい。その点、HVJ-Eは遺伝子のみならず、タンパク質や薬物など電荷に関係なく、多様な化学物質を取り込み、標的細胞の膜内へと移送することができる。従って、MR画像の標識に用いる鉄製剤に対しては遺伝子導入剤よりもHVJ-Eの方が効率のよいことが期待される。実際、マウスのアストロサイトを用いて、フェリデックスの細胞内への導入効率をHVJ-Eと遺伝子導入剤Superfectとで比較してみた。図3に種々の条件で鉄製剤を作用させ、培養したアストロサイトを培養液中に懸濁させ、MR画像(T₂-強調画像)を撮像した結果を示した。この図の試料2に見られるように、鉄製剤とHVJ-Eの組み合わせが、Superfect(試料4, 5, 6)をはじめ他の全ての条件よりも、MR画像信号の強度を減弱させ、常磁性鉄の導入効率が高いことが分かる。もちろん、鉄製剤のみを細胞に作用させた場合(試料3)は、無処理の細胞(試料1)とほとんどMR信号の強度が変わらず、アストロサイト自身がこの標識を貪食することはない。また、この鉄製剤はアストロサイトの増殖には影響を及ぼさず、標識導入後も、無標識の細胞と同等の増殖性を示した。そして、鉄染色の結果も、細胞内にこの標識が取り込まれていることを確認した。

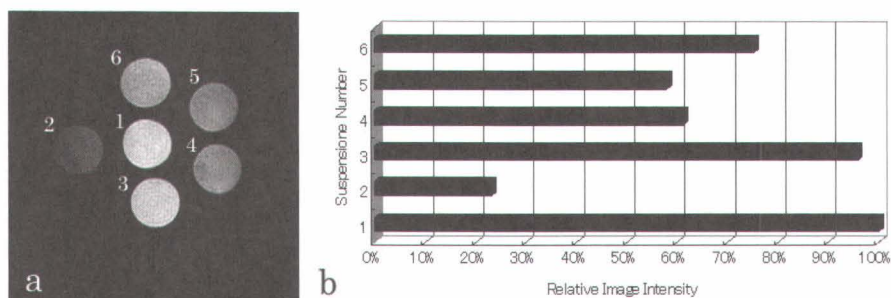


図3 超常磁性酸化鉄剤を用いた、HVJ-E と Superfect によるアストロサイトの磁氣的細胞標識。

T₂*強調画像 (2000/80) (a) とMR信号強度のグラフ表示 (b)。1. 無処理、2. フェリデックス／HVJ-E、3. フェリデックスのみ、4. フェリデックス (11.6mg)／Superfect、5. フェリデックス (5.8mg)／Superfect、6. フェリデックス (2.8mg)／Superfect。

このようにして調整した標識細胞を動物に移植し、MR画像による生体中からの検出を試みた。ここでは、標識 PC12 細胞をラット脳の線条体へ移植した例を示している (図4)。この実験では、線条体に移植された細胞が T₂*-強調画像により、3分程度のMR画像撮影時間で、画像コントラストから明瞭に識別される。さらに、この細胞の一部はおよそ9週間の間に、脳梁に沿って再分布していることが分かる。従って HVJ-E は比較検討した市販の遺伝子導入剤に比べ、きわめて効率よくMR標識剤を細胞内に移動させることができるため、生体内での標識細胞の部位を示すMRI の画像コントラストも顕著になり、標識細胞を長期にわたって継続的に観察することができるようになった。もちろん、本方法における HVJ-E と造影剤の組み合わせでは、細胞に対する毒性も少なく、MR標識を施した後も、無標識の細胞と同様の増殖性を示し、また、脳組織の中でも細胞の機能を失うことはなかった。継続観察の最後に脳を固定して標本を作製し、鉄染色を行ったところ (図4、右図)、MR画像ときわめて良い一致を示した。このことから、この常磁性標識が生体内での細胞の位置を正確に反映し、実験動物を犠牲にすることなく、長期間継続して移植細胞を観察できるようになった。



図4 ラット脳内のMR標識 PC12 細胞。

T₂*-強調画像 (200/30、45) (左) と Prussian Blue による鉄染色 (右)。標識 PC12 細胞は線条体へ移植し、61 日後にMR画像を撮像した (左)。その後、脳組織を固定して鉄染色の後、写真 (右) を得た。

6. ES細胞の生体内追跡

マウス ES 細胞においても前述の細胞と同様にMR造影剤と HVJ-E の組み合わせで、きわめて効率よくMRの常磁性標識が可能であった。実験ではマウスの神経幹細胞をレゾビストで標識し、事前にカイニン酸を投与しててんかんモデルを作成したマウス脳の海馬へ移

植することにした。ちなみに、これらの細胞は標識後も、無処理の神経幹細胞と同様の増殖性を示したばかりか、ニューロンやグリアへの分化にもほとんど差異が認められなかった。このことから、培養の段階では常磁性鉄標識剤が神経幹細胞に対して毒性を持たないことを示唆する。

このようにして磁気的な標識を施した神経幹細胞をマウス脳に移植した。図5には、マウス頭部における移植細胞を含む断面の T_1 -強調画像（左）と T_2^* -強調画像（右）を示している。ここで T_2^* -強調画像とは T_2 -強調画像よりもさらに常磁性の効果を強調することができる撮像法である。右側の T_2^* -強調画像では、移植幹細胞の部位に著しい信号強度低下によるコントラストが得られた。このMR画像撮像条件は T_2^* を強調としているとはいえ、かなり穏やかな条件である。この撮像条件にもかかわらず、きわめて強いコントラストが環状のアーチファクトを伴って表示されたことは、標識の効率が極めて高いことを意味する。また、この断面を T_1 -強調で撮像すると、標識された幹細胞の位置が、 T_2^* -強調画像と同様に低信号領域として観測される。解剖学的構造が良く分かるこの画像から、標識細胞の脳内での部位が正確に同定できるようになり、撮像画像の枚数を増やしたり、これと直交する断面（MR画像では任意の断面で撮像ができる）での撮像を行うことで、これら標識細胞の分布と周辺組織との関連を観察できるようになった。

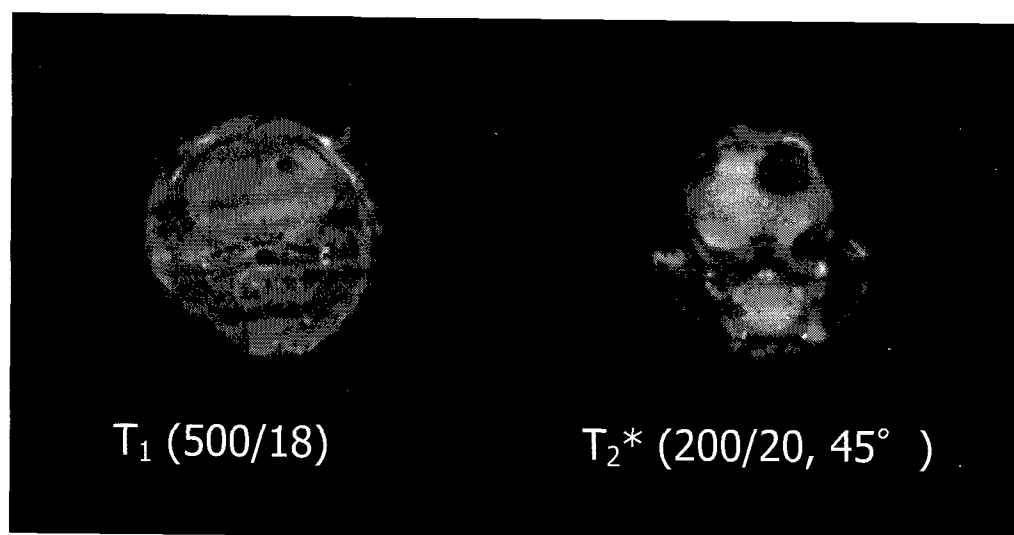


図5 マウス脳内のMR標識神経幹細胞

測定には動物実験用2テスラMR装置を用い、 T_1 -強調画像（左）と T_2^* -強調画像（右）を撮像した。FOV（関心領域）を35mm×35mmに設定し、撮像時間はそれぞれ、約4分と6分であった。 T_1 -強調画像（左）は頭部全体の描出に優れ、一方、 T_2^* -強調画像（右）は脳、特に、常磁性Feの影響を受けた部位の描出に際立った特徴がある。

図6では、ラット脳の線条体に移植した標識神経幹細胞をMR画像法で長期間追跡した結果を示している。本図での最上段は、脳内への移植直後の標識細胞が線条体に位置していることを示している。しかし、13日後には移植部位からやや後方表層の皮質付近へ標識細胞が移動していることが認められた。このことは、細胞を移植した際の刺入創（外傷）に向かって神経幹細胞が移動したと考えられる。20日後、55日後と観察を続けると、コントラストの強さは漸減するものの、同じ部位でMR標識が観察される。このことから、本標識法は移植細胞の部位を見極めるのみならず、脳内での移動をも経時的に追跡できることが明らかになった。

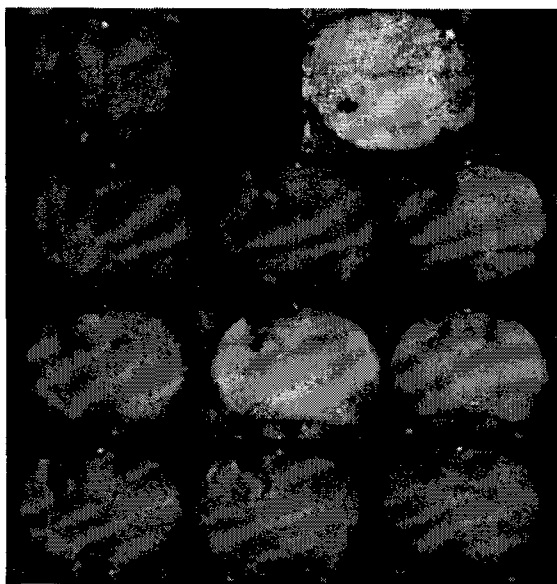


図6 ラット脳内の神経幹細胞の追跡。1日後（最上段）、13日後（中上段）、20日後（中下段）、55日後（最下段）。本図の左側はラット脳の前方、右側は後方の断層画像を示す。

MR標識を施した神経幹細胞をラット線条体に移植した。移植直後のMR画像（最上段）では、神経幹細胞が線条体に移植されていることがわかる。13日目（中上段）では移植された線条体から、後上方の皮質へと移動している。この傾向は、20日目と55日目にも観測されている。

今回のMR測定は2テスラの磁場強度を持つ装置で撮像している。この磁場強度は、今日臨床で画像診断に用いられている装置が0.5～1.5テスラに近いことから、臨床用の装置でもこのような細胞の追跡が可能であることを示唆している。

7. 応用性の展望

今日、幹細胞を識別する一般的な手法として、遺伝子標識を用い、緑色蛍光を発するタンパク質を生成させるGFP (Green Fluorescent Protein) や、放射性同位元素を標識に用いる核医学的手法が一般に用いられている。前者は、遺伝子に手を加えることの上に、生体、ことにその深部組織からは観測が難しく、試料を体外に取り出して観察するしかない。一方、後者は、MR画像法に比べ、画像解像度の点で劣る上に、放射線を用いるため、長期にわたって何度も計測を繰り返すことができない。これらの点を一挙に解決するのがMR法である。無侵襲画像診断法として知られるMR法は、生体の深部組織から高解像度の画像が得られる上に、何度でも繰り返し計測ができ、幹細胞を使う治療期間中、継続して痛みを伴わず検査できる利点を併せ持っている。従って、さらに有効なMR標識法が開発されれば、直ちに臨床応用に結びつく、最短距離に位置する計測法と考えられる。また、我々が手がけてきた細胞追跡法は、市中の病院に広く普及しているMR画像診断装置を用いることができ、新しい装置の開発は必要がない。

では、幹細胞の無侵襲追跡技術がどのような臨床例に適用されるであろうか？例えば、脳内の局所に起こる梗塞や出血、外傷等の障害は、その病巣部分に治療用細胞を移植すればよく、目的の部位に細胞が存在するかどうかを見極めることが治療成功のかぎとなろう。一方、アルツハイマーやMSのように、脳内全体に障害が起こる場合も、局所への移植では対応できず、脳室や血管から治療用細胞を導入し、脳全体にこの治療用細胞を分散させる必要がある。この場合も、治療細胞が脳内にどのように分布するかを調べるのが、治療の進行を把握でき、治療成績の向上の助けになることは間違いない。どちらの場合にも、治療目的の細胞の体内における位置を特定する必要が生じ、この位置情報が幹細胞治療の成否を左右するといっても過言ではあるまい。さらに、ES細胞による治療は脳神経に止まらず、脊髄、心臓、肝臓、骨、など現在では治療が困難な臓器を含む、全身のあらゆる臓器に応用できることが知られている。

その上、本方法は、幹細胞のみならず、現在すでに進行している細胞治療の細胞にも本法の応用が期待される。また、生きた細胞のみならず、生体内の小さなデバイス、例えば、薬物輸送のためのナノカプセルやナノ治療デバイスの体内追跡にも使用できるかも知れない。MR法が持つ無侵襲性の特徴を生かすことから、細胞のみならず生体中の様々なデバイスを可視化する汎用性を秘めている。

8. 克服されるべき課題

上述した、常磁性鉄粒子によるMR標識は、細胞培養の段階ではこれまで毒性が検知されていない。果たして鉄粒子を内包した幹細胞が生体内で正常な機能を発揮するであろうか？例えば、生体内に多量に存在する酸素を活性化させる危険があるとの指摘もある。この問題はこれから調べなければならない。

また、標識細胞が万一体内で死滅した場合、鉄粒子だけが残ることになる。この残存す

る鉄粒子が最終的に体外へ排出されることを見極めなければならない。いずれにしても、MR造影剤として一般に用いられるガドリニウムをはじめとする常磁性金属イオンに比べて、長期にわたって体内に留置する場合には、常磁性鉄剤のほうが生体にとってはるかに安全であると推察される。

一方、この細胞標識を計測するMR装置を考えると、臨床現場ではすでに多数のMR装置が市中の病院にまで普及しているので問題はないが、実験動物を用い研究室レベルで本方法を利用する場合、MR装置の図体の大きさ（もちろん、装置の価格）が問題になる。残念ながら、実験台の隣で簡便に測定できるわけではない。その反面、画像の高解像度の点では、他の画像法を凌駕し、しかも、生体を傷つけることなく、何度も繰り返し計測できることから、これらの欠点を補っても余りがあるほどである。

さらに、改良点を考えると、この標識法が黒い絵の具のように振る舞い、MR画像が元々白黒画像であることから、本来の解剖学的情報（特に微小な血管など）を表示させるコントラストと区別がつかない点である。MR画像で信号減弱によるコントラストを使う限り、この制約からは逃れられない。もし、白黒ではなく、カラーで標識細胞が表示できれば、元のMR画像との識別が容易になり、細胞追跡の精度も向上すると考えられる。さらに、弱点をもう一つ上げると、常磁性の緩和試薬を使った本方法は、MR画像信号の強度を減弱させてしまう。これは、水のMR画像信号を減少させるばかりでなく、本来MR法で検出できるはずの代謝産物のMR信号まで減衰させてしまう。将来、常磁性を使わないMR標識法が開発されれば、移植細胞の部位特定に引き続き、文字通り細胞の代謝産物のMR分子画像が可能になり、細胞の機能をMR法で評価できるようになる。このように、MRによる細胞追跡方はまだまだ多くの問題点を克服しなければならない。

9. MR以外の計測法との融合 — マルチ・モダリティー画像法

上述のように、細胞イメージングや細胞トラッキングに対してMR法には他の手法（モダリティー）には無い長所が具わるが、逆に致命的な短所も併せ持つ。特に、分子イメージングとして重要な細胞の機能評価がPETや蛍光イメージングでは容易であるのに対し、MRでははなはだ難しい。そこで、複数の計測手段を融合した計測法が考えられる。

近年、臨床画像診断の分野でPET（Positron Emission Tomography：陽電子放射断層撮影装置）の普及が際立っている。ことに最近、X線CTと組み合わせたPET-CTが開発され、その普及にさらなる拍車がかかってきた。元々、FDGをはじめとする様々なPET試薬が開発され、脳機能のような生理的情報を画像化することに威力を見せる。さらに、X線CTによる解剖学的情報を加味することで、癌の有無やその正確な形状と体内での位置を一度に診断できるようになる。このことから、がん検診からアルツハイマー型痴呆症や心筋梗塞の診断にも期待が寄せられている。PET-CTのように、二つの画像計測手法を組み合わせることで、個別の手法では得られない卓越した生体画像情報を引き出すことが可能になる。

X線CTに比べ、MR画像法は軟部組織の描出能に優れ、PETで得られる分子情報を重ね合わせる解剖画像としてはより好ましい。こうした考えから、現在はPET-MRIの開発が海外で急ピッチに進められている。MR装置では強力な磁石を使用するため、PETの検出用管球を強力な磁界内に収める事が難しいが、英国ケンブリッジ大学ではMagnex社と協同してスプリット型の磁石を開発し、管球をはさみ込むことから、この問題の解決を図っている。また、PETとMRの2台の装置を並べて設置し、対象動物を移動させて計測する組み合わせも報告されている。さらには、磁場内で動作するダイオード式のPET検出器（浜松フォトニクス）が試作され、独国チュービンゲン大学では7テスラの動物用MR装置への組み込みが終わっている。また、この方式を採用する人体用のMR装置（シーメンス社）への組み込みも始まっている。比較的早い時期に、臨床用PET-MRIが登場するかも知れない。すでにこのような装置の開発を見越して、PETとMRI兼用の分子イメージング用プローブの開発が始まっている。

一方、PETの装置に比べ、簡便に構成できる光学系の生体計測装置もMRIと組み合わせれば、それぞれの短所を補い合い、長所を生かすことができそうである。元々、分子生物学や細胞生物学の発展に寄与してきた顕微鏡下で観察するための様々な色素プローブは、その波長を可視光から近赤外へ伸ばすことで、マウスなどの小動物ではその体内からでも検出が可能になる。但し、生体内での光の散乱や吸収により、深部組織からの計測は難しく、しかも、画像の解像度にも難点がある。一例として、図7にラット脳で計測した近赤外蛍光画像のデータを示した。この弱点をMRの解剖画像で補えば、蛍光色素で表示される、細胞の機能や遺伝子発現など分子レベルの情報が、より精密になると期待される。

分子イメージングが注目される昨今、マイクロ・イメージング用のCTやPETなど小動物用の画像計測機器が盛んに導入されるようになってきた。これらの装置を並べて、次から次へと装置を代えて、測定してゆく実験風景は想像しただけでも気が滅入ってくる。それよりは、一回の計測で、異なった角度から多次元の情報を一気に得る方が、動物にとっても負荷が小さく、多くの情報を収集できる点ではるかに得策であろう。分子イメージングの研究では、やがてはPETやMRなどを融合した、複合機器が活躍しそうだ。

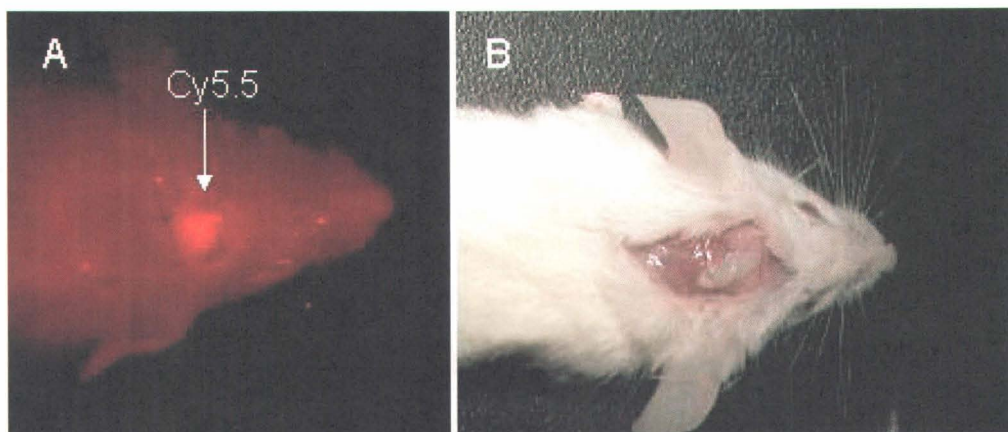


図7 ラット頭蓋骨に移植した直後の蛍光標識を持つ骨芽細胞。A. 標識剤として合成ペプチドに Cy5.5 (アマシャム) を担持させ、励起光：660 nm、蛍光：700nm で計測した移植細胞。B. 頭蓋骨を剥離後、標識細胞を移植し、ゲルで包埋したラット頭部の写真。

10. おわりに

これからの医療では、患者への負担を軽減するための無侵襲画像診断や低侵襲治療が主流になるであろう。この中で、患者さんの体の中の透視や、目には見えない化学物質あるいは生理・生化学的な情報の可視化技術はますます必要性が高まるであろう。しかし、今日の医療で用いられる放射線や放射性同位元素を含む画像診断やトレーサー技術は、大型の診断装置を用い、患者への肉体的な負担はもとより、結果的には社会・経済的負荷も必ずしも小さいとはいえない。これまでに述べてきたMR法の特徴から、今後の医療で予測される再生医療での遺伝子発現の画像化、あるいは、移植細胞、ことに万能細胞と呼ばれるES細胞の体内追跡など、新世紀の“患者に優しい”医療に貢献できる手法になるとを期待している。

本稿で解説した磁気的標識によるMR細胞追跡法が臨床に応用されるまでには、まだかなりの時間を要するかも知れない。しかし、今日用いられている細胞標識法の、蛍光色素や遺伝子標識を利用した方法は生体内での画像化が難しく、一方、核医学的手法にも侵襲性や画像解像度、あるいは、長期間の継続的な観察に問題が残る。この点、MR画像による細胞追跡法は、標識の無害化が達成されると、再生医療や細胞治療を推進する重要な画像法になると期待される。まさに、MR法は生体内での移植細胞の居場所を特定し、その機能が代謝画像で計測できる一石二鳥のポテンシャルを秘めている。

謝辞

本稿で紹介した研究は、滋賀医科大学における「再生医療とMR医学研究会」のグループによって得られた共同研究の成果の一部である。ことに、神経幹細胞の研究に携わる、遠山育夫教授（分神経科学研究センター）、鳥居隆三教授（動物生命科学研究センター）、鈴木文夫講師（脳神経外科学講座）、加藤雅也博士（石原産業、中央研究所）、近藤靖博士（田辺製薬、先端医学研究所）とその共同研究に謝意を表したい。

文献

- 1) W.S. Enochs, P.G. Bhide, N. Nossiff *et al.* *Exp Neuro* 123: 235(1993).
- 2) J.M.W. Bulte, S.-C. Zhang, P. Gelderen *et al.* *Proc Natl Acad Sci USA* 96, 15256(1999)
- 3) M. Hoehn, E. Kustemann, J. Blunk *et al.* *Proc Natl Acad Sci USA* 99, 16267(2002)
- 4) M. Modo, M. Hoehn and J.W.M. Bulte *Molec. Img.* 4, 143-164(2005)
- 5) K. Toyoda, I. Tooyama, M. Kato, et al., *Neuroreport*. 15, 589(2004).
- 6) Y. Kaneda, T. Nakajima, T. Nishikawa *et al.* *Molec Therapy* 6, 219 (2002).
- 7) 島村宗尚、里直行、青木元邦、森下竜一、 *Bio Industry* 20(9), 5(2003).

PET を用いる分子イメージング

福井大学 高エネルギー医学研究センター

分子イメージング部門 古川高子・藤林靖久

分子イメージング (molecular imaging) は、分子そのものの姿をとらえて画像化しようとする、“一分子イメージング”とは異なり、分子レベルでの生体イメージングを意味する。すこし言葉を換えて言うと、分子イメージングとは、核医学をはじめとする医用生体画像技術のなかで、その画像が得られるメカニズムが、分子レベルで明らかな生命現象に還元しうる“分子生物学の手法によって説明可能な、生理・生化学・薬理学情報からなる医用生体イメージング”と、これまで分子生物学・細胞生物学の分野で用いられてきた、主に細胞や固定組織で、遺伝子の発現や生体分子間の相互作用を研究するための技術を、生きた個体、whole body でのイメージングへと展開しようとする“分子生物学・細胞生物学の技術に基づいて開発された in vivo イメージング”の2つを合わせたものと捉えることができる。前者には、mRNA のレベルでの遺伝子発現を捉えようとするアンチセンスイメージング、タンパクの発現をその存在として捉えようとする標識抗体を用いるイメージング、タンパクのうち酵素や受容体など特異的な機能を持つものを、その基質やリガンドの標識体を用いて機能として捉えてイメージングしようとする方法などがあげられる。また、遺伝子治療や再生医療の研究進展に伴って注目を集めている in vivo reporter gene imaging は、これまで GFP や luciferase などを reporter として分子生物学、細胞生物学の分野で広く用いられてきた研究手法を in vivo に展開した後者の一例である。In vivo reporter gene imaging では生体内で用いるため in vitro や in situ とは異なった制限がかかるが、細胞の体内動態、導入遺伝子の発現、promoter 活性などのモニタリングが可能である。

分子イメージングの大きな利点として、非侵襲的に、同一個体で経時的にデータを収集できることがあげられる。これにより、実験に必要な個体数の低減や、データの信頼性の向上を期待することができる。また、全てのイメージング手法において可能なわけではないが、生きているヒトにおける情報を直接得ることができ、これは大変大きな利点である。分子イメージングは PET、SPECT、MRI、optical、ultrasound など様々な modality において試みられている。それぞれの modality には特徴があり、長所短所があるが、検出感度、定量性、安全性などの問題から、現在、ヒトに対しては PET、SPECT の使用を考える

のが適当であろうと思われる。

近年分子イメージングが大きく取り上げられている背景には、人やマウスでの全遺伝子配列の解明、種々の疾患の原因遺伝子の究明など、急速に進歩してきた基礎生命科学をさらに発展させるとともに、その成果をより直接的にヒトの“健康”につなげたいという要請があると思われる。生命現象や疾患の理解には、これまで *in vitro* や細胞レベルで得られてきた知見を、個体レベルにおいて検証することが必須であり、特に **knockout mouse** などモデルの豊富な小動物のイメージング技術の開発が、今後ヒトの健康に大きく貢献するであろうと考えられ、米国では、このような目標を実現するため小動物のイメージングを、動物モデルの作成から、撮影機器の開発、イメージング用薬剤の開発まで広くサポートできる拠点の形成が積極的に計られている。今後日本においても、分子イメージングの重要性に対する認識が高まり、一つの研究分野として成長していくことを期待したい。

分子イメージングには、臨床の場において、診断、治療方針の決定、治療効果の判定に役立つ、より高度な情報の提供、医薬品開発における前臨床試験の迅速化とコストの低減、また、これまで *in vitro* の単純化された系で解明されてきた生命現象のメカニズムを、生きた個体という現実の、複雑な系の中でとらえ直す手段となるなど、多方面での貢献が期待されている。

〈第84回研究会（平成16年12月10日）〉

＜特別講演＞

1. 身体の時間を刻む時計遺伝子

岡村 均 （神戸大・医・脳科学・分子脳科学）

2. 遺伝的変異体の作成とその形態形成機構解明への応用

横山 尚彦 （京府医大・生体機能形態科学）

身体の時間を刻む時計遺伝子

神戸大学大学院医学系研究科脳科学講座分子脳科学分野

岡村 均

はじめに

地球は46億年前誕生し、海は38億年前にできたとされる。最初の生命は35億年前海に発生した後、激変する外部環境にも耐え、現在まで進化してきた。今や生命は、地球誕生以来最大の種類と生存領域を誇っている。サーカディアンリズム機構は、地球上に現れた生物が、地球の自転により起こる昼夜変化に適応するため獲得した基本形質であり、現存の大部分の生物に認められる。以前より、睡眠覚醒、体温、ホルモン分泌（メラトニン、コルチゾール）などの生理現象が日周変動を示すことは知られていたが、この現象はごく一部の特殊な現象と見られてきた。しかし、最近のDNAチップを使った解析で数百以上の遺伝子が24時間振動していることが明らかになり、地球の自転という物理現象が、遺伝子に広く組み込まれ、全身の細胞活動に反映され、サーカディアンリズムとして哺乳類の生命の裏に潜むことが明らかとなった。

哺乳類においては、他の生物に見られないほど体内の時間機構を司る生物時計（Biological Clock）が高度に発達しているが、これはリズムセンサーとしての視交叉上核が脳内に出現したことで大いに関係がある。その名のごとく、この視床下部深部に有るこの一対の神経核は、光情報を眼球から伝達する左右の視神経が交叉する視交叉の直上にある。鳥類以下の生物では光を感受する機能と発振する機能は同一の部位で行われることが一般的だが、哺乳類では、光を感受する網膜と光の届きにくい脳深部の発振センターが完全に分離されることにより、外界の変化に容易に影響されない安定した調律が可能となった。視床下部の視交叉上核から発信された時間情報は、神経性と体液性の両方の経路で末梢臓器に伝えられ、末梢のほとんどの細胞に存在する細胞時計を調律する。

2 4 時間周期は時計遺伝子の転写制御によって生み出される

では、この体内リズムはどのようにして生まれるのであろうか？体内時計の発振が遺伝子レベルで規定されていることは、検索されたほとんどの種で明らかとなっている。時計遺伝子の発振機構で注目されるのは、転写から行動まで、地球上の生物で共通する法則があることである。それは、時計遺伝子が転写・翻訳後産生された時計蛋白質が、自分自身の転写制御を抑制するというオートフィードバックループによる発振分子機構である。哺乳類では、発振の中心となる振動子は、*Per1* と *Per2* の2つの遺伝子である。*Per1*, *Per2* の転写は、bHLH-PAS 蛋白である CLOCK と BMAL1 のヘテロダイマーが *Per1*, *Per2* のプロモーターの E-box にポジティブ因子として結合して促進される。続いて、*Per1*, *Per2* の転写によって産生された *Per1* mRNA, *Per2* mRNA から、PER1 蛋白質、PER2 蛋白質ができる。これが、細胞質から核の中へ入って CRY 蛋白と結合して、ポジティブ因子の転写を押さえる。これでループが閉じ、転写減少に続く PER1、PER2 蛋白減少にともなう抑制効果の減少により、*Per1*, *Per2* 時計遺伝子の転写が再開される。

時計蛋白質の細胞内での時間的・空間的位置変化により、転写は制御される

上記の単純なフィードバックループでは、リズム発現は説明できても、「なぜ24時間なのか？」という疑問には答えられない。これには、時計蛋白質、特に、ポジティブ因子を制御するネガティブ因子を構成する PER1, PER2, CRY1, CRY2 の蛋白質レベルの制御が主役となる。

まず初めは、リン酸化による分解制御である。まず、できた PER1, PER2 蛋白質モノマーは、細胞質中に存在する casein kinase Iε (CKIε)によりリン酸化され、リン酸化された PER1, PER2 は分解される。この蛋白質分解にはユビキチン・プロテアソームが関与している。従って、転写のはじめの段階では、RNA はできても、蛋白質は次々に分解されて、いっこうに貯まらないという状態が続く。ところが、*Per1*, *Per2* の転写は刻々と増大し、PER1, PER2 蛋白質もたくさんできてくると、CKIεは一日中一定であるので、蛋白質をリン酸化し分解しきれない状態となる。リン酸化が時計ループの周期を決定する重要な過程であることはヒトでも示されている。最近米国の家系調査により、PER2 のリン酸化部位の

変異により、体内時計の周期が短い家系が報告され、時計遺伝子の転写フィードバックループの存在とリン酸化反応の重要性が劇的に証明された。

分解されなかった PER1 と PER2 は、PER3 等とダイマー形成し、自身の NLS (nuclear localization signal) および NES (nuclear export sequence) によるシャトリング機構により PER1, PER2 蛋白質の核内濃度は調節される。この核・細胞質間の平衡状態を打ち破るのが、核蛋白 CRY1, CRY2 である。CRY1, CRY2 の核内出現は厳密に時間によりコントロールされているが、これが核内に多量になると、PER2 と結合し、安定な PER2-CRY1 及び PER2-CRY2 複合体を形成し、これがポジティブ因子に結合して引き剥がし、*Per1*, *Per2* の転写を阻害する。これで時計発振のフィードバックループが閉じると考えられる。この PER2, CRY1, CRY2 による抑制はユビキチン・プロテアゾームにより解除され、抑制因子の分解により転写は再開される。

時計シグナルは多くの遺伝子の転写を制御し、細胞活動にリズムを引き起こす

時計のコア振動体からの時計シグナルは、多くの遺伝子 (clock controlled genes: ccg) を制御し、その時間的発現をコントロールする。この ccg が想定されているよりもはるかに多く少なくとも数百の遺伝子にのぼることは、最近のジーンチップ解析から明らかである。このような多数の遺伝子のリズム的な制御は、細胞活動のリズムを引き起こす。サーカディアンリズムのさらに驚くべき特質は、この細胞レベルのリズムを超えて、遺伝子の転写リズムがほぼ完璧な形で行動リズムに反映している事である。具体的に述べると、リズムセンターである視交叉上核の各細胞におけるコア・ループによる遺伝子レベルの時計発振は、視交叉上核という神経核レベルで同期・増幅され、全脳に伝播し、ついには睡眠覚醒・ホルモン分泌など個体レベルのサーカディアンリズムを生み出す。最近我々は、先に述べた *Per1* プロモーター・ルシフェラーゼを導入したトランスジェニックマウスを開発し、細胞組織レベルで mPer1 の転写発現を可視化することで長時間リアルタイムで観察することに成功した。また、リズムセンターである視交叉上核に微小光ファイバーを挿入し、連続的に数日間時計遺伝子発現をリアルタイムで発光量としてモニターする事に成功した。このような検出システムは、細胞内の遺伝子振動がいかにしてトータルとしての脳・生体機能である行動にまで至るかを解析する有力な実験系として、今後サーカディアン

リズムの研究に広く用いられて行くであろう。

末梢組織の時計：細胞周期の制御

以上、サーカディアンセンタースとされる視交叉上核の数万個の細胞は、各々がリズム発振能を持ち、細胞レベルの相互作用で、視交叉上核一体となった強力なリズム発振を行っており、個体の行動を制御していると考えられる。ところが最近、時計遺伝子が全身の大部分の細胞に発現する事、その多くがリズムミックスに発現している事が明らかとなった。すなわち、従来リズム発振機能が全く無いとされてきた肝臓や胃腸などの末梢臓器にも、食餌に同調する、基本的な時計発振機構が備わっている可能性を示唆している。さらに驚くべき事に、皮膚などにある線維芽細胞に血清処置を行うと、時計遺伝子が少なくとも数周期にわたって振動を起こす事が最近明らかになった。我々は、このリズムが、視交叉上核と全く同じ時計遺伝子のコア・フィードバックループの仕組みによることを明らかにした。このことにより、遺伝子異常が予測されるリズム疾患の診断を、なにも直接視交叉上核を調べなくとも、皮膚組織からでもできることを示している。では、末梢組織の時計はどんな機能を担うのであろうか？最近我々は、肝の部分切除系を用いて、細胞周期が細胞時計の発振ループで制御されていることを見つけた。CLOCK/BMAL1 は細胞周期の M 期への流入を抑制する *wee1* 遺伝子の 5'UPR の E-box を介して転写促進させ、これが *cdc2* の活性変化を引き起こす。マウスにおいて、一日のうち *wee1* 活性の最も低い朝方に、多くの組織で M 期があるのはこのためだと思われる。この細胞周期以外の、エネルギー代謝、膜蛋白の機能など多くの必須の細胞機能に時計シグナルは利用されていると考えられるが、未だその機序は解明されていない。

おわりに

最近、JR 山陽新幹線で居眠り運転した運転士は、昼間の活動時に強い眠気を催す重症の「睡眠時無呼吸症候群」(SAS; Sleep apnea syndrome) であった。これをきっかけに、日本でも睡眠障害と事故の関係が注目されている。世界を震撼させる大事故であった、1) 1979 年スリーマイル島原発事故、2) 1986 年スペースシャトル「チャレンジャー」爆発事故、3) 1986 年チェルノブイリ原

発事故などがいずれも、深夜・早朝に起こっていることは注目される。また、生体リズムの研究の進展により、これまでアプローチが困難であったヒトの時差症候群（ジェットラグ）、老人の睡眠障害、睡眠相遅延症候群、鬱病などのリズム異常と関連の深い疾患の原因解明および診断、治療の新しい道も見いだされる可能性が近いのではないかと予測される。また、昼夜不規則な生活が強いられる現代社会や、地球の裏表で同時に活動する国際社会における Quality of Life (QOL) の維持、睡眠覚醒障害などのリズム異常にたいする予防や治療の薬物の有力な発見手段ともなるであろう。

遺伝的変異体の作成とその形態形成機構解明への応用

京都府立医科大学 大学院医学研究科 生体機能形態科学

横山尚彦

はじめに：

我々の身体は、ひとりひとり微妙な差はあるが基本的形態は共通している。また、この基本的形態は、500年前の人も現在の人も共通している。そして、遺伝学、分子生物学の進歩は、遺伝子がこのような基本的形態を伝える担い手であることを明らかとした。また、この遺伝子の本体がDNAであることも明らかとなっている。すなわち、我々の身体を建物に例えるならば、遺伝子は設計図に当たると考えられる。したがって、設計図である遺伝子を変えれば、できあがってくる建物すなわち形態も変化させることが出来るわけである。また、発生工学の進歩により、われわれはこの遺伝子を自由に改変する手段を手に入れることとなった。このような技術の進歩により、形態形成の遺伝的機構解明のために遺伝子改変動物を利用することが可能となった。また、逆に形態異常をしめす遺伝的変異体からその原因遺伝子をクローニングすることが可能となってきている。

現在このような考え方の基に、現在多くの変異体が作成され、さらにその原因遺伝子の同定が進んでいる。脊椎動物では、マウスにおいてゲノム解読がなされたことから、体系的に突然変異体を作製し、その表現型を詳細に解析して遺伝子機能を明らかにしようという大規模プロジェクトが世界各国で立ち上がっている。また、これらの変異体はヒトの疾患原因の解明にも大きな威力を発揮することが期待されている。

このような大規模なプロジェクトが進む中で、一つの研究室単位において形態形成機構の解明をどのようにするのか。すなわち、「限られたスペースで、如何に安く効率的に脊椎動物の変異体を作成・スクリーニングそして解析するか」という問題に対する我々のアプローチを紹介することが本小論のテーマである。

変異体作成から原因遺伝子に至る過程：

遺伝的変異体作成からその原因遺伝子同定までの過程として図1のように以下の

3つのステップが考えられる。(1) 変異体作成、(2) 変異体同定、(3) 原因遺伝子同定である。それぞれの過程において、飼育スペース・飼育費に関して考えてみる。

(1) 変異体作成

変異体作成において、考慮すべきこととしては、変異を作成する動物を何にするか。また、どのように変異を導入するのかと言うことである。変異体作成の動物種としてはショウジョウバエなど様々あるが、脊椎動物を対象とすると、現在マウスおよび小型魚類 (zebrafish と medaka) が主として用いられている。マウスは哺乳動物であり、ヒトに近いヒト疾患のモデル動物として扱いやすい。しかしながら、問題点は飼育場所と飼育費である。それに対して、小型魚類は人とは離れるが、飼育場所・飼育費がマウスに比べると格段に節約できる。

次に、変異体作成法であるが、以下のことを考慮する必要がある。

1) ランダムに変異体作成が可能

効率よく変異が導入

変異体同定が簡単

2) 変異体より原因遺伝子同定

また、ゲノムに変異を導入する手法としては1) Chemical mutagenesis (ENU などによる)、2) 挿入変異、3) 遺伝子トラップ・エンハンサートラップ、などがある。

(2) 変異体同定

様々な手段によりゲノムに変異を導入した場合、動物が変異を持っているかどうかを知る方法を持たなければならない。方法としては、野生型とは異なった表現型を持つかどうか、もしくは、挿入変異などの場合では挿入された DNA 断片を持つかどうかを検討する。化学変異と異なり、挿入変異や遺伝子トラップ・エンハンサートラップでは後者の手法が使えると共に、挿入する DNA として、GFP (Green fluorescent protein) などを用いることで、変異体同定を簡便にすることが可能である。

(3) 原因遺伝子クローニング

原因遺伝子のクローニングは、まず、変異が起こったゲノム上の部位を突き止め

なくてはならない。変異を起こした部位にタグがなければ、表現型を基にポジショナルクローニングを行う以外にない。挿入変異などでは挿入遺伝子をタグとして挿入部位の同定が可能である。さらに、遺伝子トラップ・エンハンサートラップでは直接トラップされた遺伝子の同定が可能となる。

以上をまとめ、比較して表とした。ENU を用いた変異作成は、効率よく変異を生じ、かつ、ランダムに変異を作成できる。しかしながら、変異体のスクリーニング（同定）のためには表現型に頼らざるを得ない。さらに、原因遺伝子の同定はポジショナルクローニングを行わざるを得ず、ゲノムのマーカーが整っている必要がある。挿入変異、遺伝子トラップ・エンハンサートラップはゲノムに DNA を挿入する必要があり、変異形成の効率は悪い。しかしながら、挿入する DNA として、GFP (Green fluorescent protein) などを用いることで、変異体同定を簡便にすることが可能であり、また、遺伝子トラップ・エンハンサートラップでは原因遺伝子同定も短期間でできる。

これらの変異導入法を比較すると、効率よく変異を導入するといった面からは ENU による方法が最もすぐれているが、その後の変異体同定や原因遺伝子同定の過程に関しては挿入変異や遺伝子トラップ・エンハンサートラップが勝っている。

ENU による変異体作成は、変異体同定およびポジショナルクローニングによる原因遺伝子同定のために多くの動物を飼育する空間を必要とする。例えば、図 2 のように F₀ で変異を入れたとする。ENU による変異は効率がよいので 100% の F₁ で変異を持つと仮定する。次に、F₁ と野生型を交配させ F₂ を作成する。さらに、F₂ 同士を掛け合わせて変異導入による表現型が出現するかどうかを検討する。しかし、どの F₂ が変異を持つかは ENU による変異体作成ではわからないため、どの F₂ の掛け合わせからホモ変異体が生じるかは掛け合わせてみないとわからない。実際に必要なのは表の F₃ の四角で囲んだ交配のみだが、確率的にはそのような交配は 1/4 しか起こらない。残りの 3/4 は不必要な場所を占有することとなる。しかし、変異体が GFP などの変異マーカーを用いれば変異体が同定できる。このことにより、変異を生じていない動物を飼育する必要がないため、場所・飼育費の削減が可能である。

変異導入効率の向上：

挿入変異や遺伝子トラップ・エンハンサートラップの問題は、変異効率が悪いことである。変異効率向上の手法として、トランスポゾンが提唱されており、マウスでは実際に機能することが報告されている。小型魚類においても、トランスポゾンの使用が可能となれば変異導入効率向上が出来る可能性がある。

まとめ：

遺伝的変異体を用いて形態形成機構解明を目指すというアプローチは、非常に強力な手法であり、各地で行われている。しかし、問題は変異動物を飼育するスペースであり、費用である。我々は小型魚類を用いて遺伝子トラップそしてトランスポゾンを利用した変異体作成を目指している。

スペースの問題は実験動物施設を運営するものにとっては頭痛の種と思う。限られた場所で、出来るだけ効率よく変異体作成を行っている工夫として、大学の一研究室が行っていかうとする方法として聞いていただけたら幸いである。

図1. 遺伝的変異体から原因遺伝子への過程

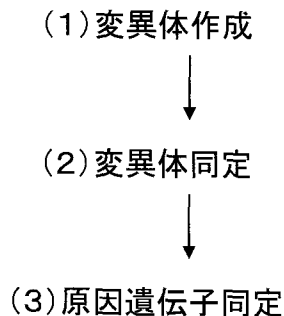
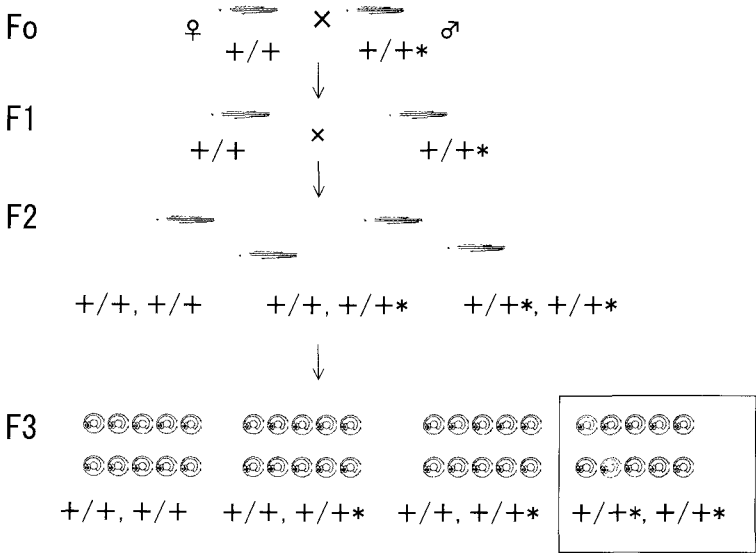


表. 変異体作成法とその長所・短所

	変異導入 効率	変異体同 定	原因遺伝 子同定
Chemical mutagenesis	良い	悪い	悪い
挿入変異	悪い	良い	良い
遺伝子トラップ・エ ンハンサートラッ プ	悪い	良い	良い

図2. ENUを用いた変異体作成とスクリーニング



〈第84回研究会（平成16年12月10日）〉

会 員 の 発 表

1. SPFラット室のラットから検出されたグラム陰性短桿菌
鍵山壮一郎、桂智映子、愛原勝巳、田島 優、黒澤 努（大阪大・医・動物実験施設）
2. SPFラット室のラットに見られた間質性肺炎
田島 優、鍵山壮一郎、桂智映子、愛原勝巳、岡本 明、黒澤 努（大阪大・医・動物実験施設）
3. 脳虚血時のスナネズミに関する形態観察ならびに行動解析
片岡雄介、森岡宏至、岡田利也（大阪府大・実験動物医学）
4. ddY系白内障マウスに関する研究：形態観察と遺伝解析
近藤友宏、石賀直子、森岡宏至、岡田利也（大阪府大・実験動物医学）
5. ウサギ心臓液の生理値に関する基礎的検討
浅野裕三、溝口靖基、水口浩康、松岡哲也、芹沢光太郎、石倉寿一（ボゾリサーチセンター・函南研究所）
6. シリアンハムスター2例にみられたRenal Dysplasia（腎形成異常）
飯田晶敏、熊野 篤、菅野 剛、土谷 稔（三菱化学・安科研）
7. 慢性腎不全モデルマウスの24時間尿解析
小沢康彦^{1,2}、加藤貴史¹、磯部治子^{1,2}、原田亜矢^{1,2}、寺坂勝利^{1,2}、岡本 明¹、田島 優¹、黒澤 努¹（¹阪大・医・動物実験施設、²三協ラボサービス株）
8. 長期喫煙による自然発症高血圧ラットにおける循環動態の変化と脳内エンドセリンおよび末梢エンドセリン受容体の変動
久保 薫¹、喜多大三²、田中 健²、大野則和²、高橋正裕²、中嶋敏勝²（奈良県立医科大学・¹動物実験施設、²薬理学教室）
9. ウサギ心筋の死後変化
伊藤 隆、山田悟士、田村敏昌、塩見雅志（神戸大・医・動物実験施設）
10. 超音波診断によるカニクイザルにおける主席卵胞直径と回収卵子の成熟率の関係
大田 聖¹、川辺敏晃²、藤浪菜穂子²、細井美彦²、竹之下 誠¹（¹、（株）ケアリー和歌山研究所²、近畿大学 生物理工学部）
11. カニクイザル始原生殖細胞の検出と培養の試み
土屋英明¹、中川佳子²、岡田浩典³、下澤澤浩³、高田達之¹、鳥居隆三¹、桑名 貴²、山海 直³（¹滋賀医大・動物センター、²国立環境研・環境研究基盤ラボ、³国立感染研・霊長類センター）

12. 電位依存性Ca²⁺チャンネル α 1A蛋白質ノックダウンによる運動失調マウス
齋藤浩充、津村秀樹、鈴木 昇（三重大・生命科学研究支援センター動物実験施設）
13. Groggy ラットにおける原因遺伝子の同定と欠神様発作の発現
徳田智子¹⁾、庫本高志¹⁾、郷間宏史¹⁾、笹 征史²⁾、芹川忠夫¹⁾（京大院・医・動物実験施設¹⁾、渚病院²⁾）
14. ラットフェノームプロジェクト：既存系統における新たな特性の発見
真下知士¹、直井国子¹、Birger Voigt¹、山崎賢一¹、庫本高志¹、芹川忠夫¹、左近上博司²、西森司雄²（¹京大院・医・動物実験施設、²㈱環境バイリス研究所）
15. NBRP-Ratで収集されたラット系統のゲノムプロファイル
鶴見東志子、真下知士、Birger Voigt、中西 聡、庫本高志、芹川忠夫（京大院・医・動物実験施設）
16. NBRP-Rat収集系統におけるAgouti とRed-eyed dilution のプロファイル
庫本高志、中西 聡、山崎賢一、直井国子、Birger Voigt、真下知士、芹川忠夫（京大院・医・動物実験施設）

SPF ラット室のラットから検出されたグラム陰性短桿菌

鍵山壮一朗、桂智映子、愛原勝巳、田島 優、黒澤 努
大阪大学医学部附属動物実験施設

【背景】当初、大阪大学医学部附属動物実験施設では *Pasteurella pneumotropica*(P.p)の検査法は、咽喉頭 swab を液体培地で増菌培養したものから菌の DNA を抽出し、Wang らの P.p 特異プライマーを用いて PCR を行い、特異的な DNA 産物の有無によって判定を行っていた。この方法で当施設のラットから特異的な DNA 産物がしばしば検出され、P.p 感染が示唆された。しかし、血液寒天を用いて菌の分離を試みたが、コロニーを得ることはできなかった。その後チョコレート寒天培地を分離用培地として試験的に用いたところ、ラットの咽喉頭から高率に灰白色のコロニーが分離され、Wang のプライマーにも反応した。また、生化学試験を行ったところ、コード表から P.p であるとの判定結果が得られた。この菌は、血液寒天に増殖しない場合があるなど、典型的な P.p とは言えないことから、同定するためにはより詳細な検討が必要であると考え、従来からの方法に加え遺伝子学的な手法を用いて検討した。

【材料と方法】使用した菌株は標準株として ATCC 由来 35149,12555,13669,33391,33392, 実中研由来 N8, 被検株としてラットからの分離株数株を用いた。培養にはチョコレート寒天培地と 5% ヒツジ血液寒天培地を用い、37℃ 好気培養した。生化学試験はニッスイの ID テストを用いた。栄養要求試験にはヘモフィリス ID 4 分画培地(BD)を用いた。PCR のプライマーは PPN-1(Wang ら 1996)、PPF-1(Nozu ら 1999)、peace (Bootz ら 1998)を用いた。塩基配列は peace で増幅した 16SrDNA494bp を 3100 Genetic Analyzer (Applied BioSystems)を用いて測定した。

【結果と考察】コロニーの形状は灰白色の光沢のある直径約 3mm の大きさであり、菌体はグラム陰性の小短桿菌で P.p に類似していた。増殖に第 V 因子を要求する株があったが、生化学試験ではコード表から P.p と判定された。ATCC35149 と OR71 の塩基配列は、不一致率が 1.6%、OR151 との間では 2.23%であり、P.p と同種と判定しても矛盾がないことが示された。このことから、本菌は現行の分類における P.p の可能性が高いと思われた。

SPFラット室のラットに見られた間質性肺炎

田島 優、鍵山壮一郎、桂智映子、愛原勝巳、岡本 明、黒澤 努

大阪大学医学部附属動物実験施設

【背景】実験動物生産施設で *Pasteurella pneumotropica*(P.p)様細菌による汚染事故が発生したことが報告された。この P.p 様細菌の病原性を確認するため、本菌による汚染が確認されたコロニーから大阪大学医学部附属動物実験施設に導入していた WKY ラットを用い、菌分離と病理組織学的検索を行った。その結果、この菌は肺からは分離されなかった。しかし、同時に行った肺の病理組織学的検索では感染症を示唆する血管周囲に細胞浸潤を伴う炎症像が認められた。そこで、本症の原因病原体を検索したので報告する。

【方法】用いた動物は日本チャールスリバー社から3週齢で当施設の SPF ラット室に導入し、2ヶ月以上飼育した♂の WKY ラット 10 匹を用いた。菌の分離にはチョコレート寒天培地を用い右上葉の割面を培地に直接スタンプし、48 時間好気培養した。ウイルスやマイコプラズマに対する血清反応は 10 倍希釈血清を検査機関に送付し検査を依頼した。肺の病理組織標本は左葉を 10 % 中性ホルマリンで固定し、当施設で定法に従って H&E 染色後、鏡検した。PIV-Ⅲ型ウイルスに対する抗体検査は日本チャールスリバー社に依頼した。*Pneumocystis carinii* (P.c) 検出のための PCR は当施設で実施し、プライマー pAZ102-E、pAZ102-H を用い、テンプレートとして肺右上葉の乳剤から UltraClean Microbial DNA Isolation Kit (MO BIO Laboratory Inc.) を用いて抽出した DNA を使用した。

【結果と考察】肺の肉眼所見はどの個体も異常は認められなかったが、病理組織学的には細胞浸潤を含む炎症像は 7 匹に認められた。肺からは P.p 様細菌を含む菌は分離されなかった。抗体検査では、M.p、HVJ、SDAV、HFRS、*Clostridium piliforme*、PIV-Ⅲのいずれに対する抗体も検出されなかった。P.c に対する PCR の結果、10 匹中 8 匹から 346bp の特異産物が検出された。

P.c は免疫学的に正常な動物には感染しないとこれまでは考えられていた。しかし、今回の PCR の結果から、観察された血管周囲への細胞浸潤は P.c 感染による可能性が示唆された。

脳虚血時のスナネズミに関する形態観察ならびに行動解析

○片岡雄介、森岡宏至、岡田利也
(大阪府大・実験動物医学)

【目的】スナネズミ(*Meriones unguiculatus*)は、脳底動脈の解剖学的特異性から脳虚血モデルとして用いられる。脳虚血時には神経細胞の変性、消失および神経膠細胞の増殖、浸潤が認められる。また、脳虚血時に見られる神経細胞死に対する FGF の保護作用が報告されている。さらに、この神経細胞死に伴い、学習・記憶能力(作業記憶および参照記憶)の障害が生じると考えられる。本研究はスナネズミに一時的な脳虚血を引き起こし①海馬における神経細胞死と神経膠細胞(アストロサイトおよびミクログリア)の出現を調べることならびに②学習・記憶能力を調べることを目的とした。【材料と方法】①スナネズミの両側総頸動脈を5分間結紮した。手術後1、3、5、10日目に脳を採取し、HE染色に加えてFGF-2およびそのレセプター(FGFR-1、2)、アストロサイトおよびミクログリアの局在を調べた。②2および6ヶ月齢のスナネズミの雄に結紮・開放手術あるいは偽手術を施し、8方向放射状迷路による学習・記憶検査を行った。5日間の検査の後、翌日に両側総頸動脈結紮・開放手術および偽手術を行った。7日間の休息後、さらに10日間の検査を行った。【結果】①虚血後の日数経過とともに海馬CA1領域の錐体細胞が変性、消失した。CA1錐体細胞におけるFGF-2およびレセプターの発現は虚血後1日で減少した。虚血後の日数経過とともにアストロサイトの増殖が見られた。虚血後3~5日でミクログリアの錐体細胞層への浸潤が見られたが、10日ではほぼ消失していた。②作業記憶のエラーは休息明けの検査初期において2ヶ月齢、6ヶ月齢ともに虚血群の方が偽手術群に比べて有意に高く、6ヶ月齢では検査終盤にも高い傾向にあった。検査期間の終盤における虚血群の参照記憶のエラーは、2ヶ月齢では偽手術群と同程度となったが、6ヶ月齢では偽手術群に比べて有意に高かった。【考察】以上のことから、虚血後の日数経過とともに、海馬CA1錐体細胞はFGF-2とそのレセプターの減少を伴って消失していくこと、アストロサイトは錐体細胞の変性に伴って増殖し、錐体細胞の消失後も増殖を続けるのに対し、ミクログリアは錐体細胞の変性後には消失することおよび6ヶ月齢は虚血による学習記憶能力の障害を受けやすいことが示唆された。

ddY 系白内障マウスに関する研究：形態観察と遺伝解析

○近藤友宏、石賀直子、森岡宏至、岡田利也
(大阪府大・実験動物医学)

【緒論】本研究室で系統維持されている ddY 系遺伝性白内障マウスは、常染色体劣性の遺伝様式をとり、6～8 週齢で肉眼的に水晶体混濁が認められる。成熟個体では水晶体上皮細胞の空胞化と線維の膨化が観察される。本研究では、週齢を追って白内障発症に伴う水晶体の病変を調べるとともに、遺伝解析によって原因遺伝子の位置を明らかにすることを目的とした。【材料と方法】(1) 2～6、10、15 週齢の ddY 系白内障マウスの眼球の HE 染色標本および水晶体の走査型電子顕微鏡 (SEM) 標本を作製した。(2) 日本産野生マウス (MSM/Ms) との戻し交配世代 {ddY 系白内障マウス × (ddY 系白内障マウス × MSM 系マウス)} の発症個体 60 例について、連鎖解析を行い、原因遺伝子の存在する染色体を決定した。さらに、戻し交配世代の発症個体 332 例について、マイクロサテライトマーカー D2Jpk4 とその近傍に位置する 24 のマーカーを用いて連鎖解析を行った。【結果】(1) HE 染色標本において 4 週齢では、後極皮質線維の膨化が認められた。5 週齢では、水晶体線維の膨化と配列の乱れが水晶体皮質領域全体に観察された。6 週齢の肉眼的発症後では、水晶体核がエオジンに染まり、核領域の線維の膨化が認められた。SEM 標本において 3～5 週齢で、水晶体線維の膨化が認められた。6 週齢では、線維の膨化がさらに顕著であった。(3) 原因遺伝子は第 2 番染色体上に位置していることがわかった。第 2 番染色体での連鎖解析において、戻し交配世代 332 例全例で ddY 白内障ホモを示すマーカーは認められず、D2Mit84～D2Mit467 及び D2Mit515 全てにヘテロを示す個体が 1 例存在し、この個体は D2Mit320 及び D2Mit368 ではホモを示した。また、D2Mit320 及び D2Mit368 とともにヘテロを示す個体は 12 例存在し、これらの個体は D2Mit84～D2Mit467 及び D2Mit515 ではホモを示した。【考察】以上のことから、本白内障マウスは皮質型白内障であり、生後 3 週齢から水晶体線維の膨化が始まることおよびその原因遺伝子は D2Mit515 および D2Mit467～D2Mit320 及び D2Mit368 の 3.91cM の領域に位置していることが明らかになった。

ウサギ心囊液の生理値に関する基礎的検討

○ 浅野 裕三, 溝口 靖基, 水口 浩康, 松岡 哲也, 芹沢 光太郎,
石倉 寿一 (ボゾリサーチセンター・函南研究所)

【緒言】心囊は通常少量の液体を含み、その潤滑性によって心膜の円滑な動きが果たされている。心囊液は心筋病変から量的或いは質的な変化を生じ(イヌ)、うっ血性の心疾患、リンパ腫、感染症或いは稀に腎疾患により二次的に反応するとも言われている(ラット、ネコ)。著者らは日常のウサギの剖検において、心囊液量或いは色調に大多数のものと異なる例を経験しているが、ウサギの心囊液量及び色調に関し、参照すべきデータはほとんどない。今回、我々は日常生殖発生毒性試験に用いているウサギ2系統について、心囊液の量、色調及び臨床パラメータを測定して、性差、加齢、系統及び妊娠の有無による差を検討したので報告する。

【材料と方法】Kbl:JW 雄及び非妊娠(14、20週齢)、同系妊娠ウサギ(39～43週齢)、Kbl:NZW 非妊娠ウサギ(23週齢)及び同妊娠ウサギ(21～23週齢)の各12匹について、心囊液の量と色調を観察記録した。さらに、Kbl:NZW 及び Kbl:JW の妊娠ウサギ(21～23週齢)の各9匹を用い、臨床パラメータとして、心囊液の細胞数、比重及びタンパク量を検査した。

【結果およびまとめ】心囊液の色調はいずれのウサギの場合も無色であった。JW の液量には性差はみられず、非妊娠ウサギと妊娠ウサギの系統内比較でも JW および NZW とともに差はみられなかった。JW の妊娠ウサギでは週齢の進んだ動物で液量が多かった。系統間の比較では非妊娠ウサギで液量の差はみられなかったが、妊娠ウサギでは NZW に比べ JW で多かった。検討した臨床パラメータの系統間比較では、比重およびタンパク量で差がみられなかったが、JW に比べ NZW で細胞数の多い傾向が認められ、液量の差による影響が示唆された。

シリアンハムスター 2 例にみられた Renal Dysplasia (腎形成異常)

○飯田晶敏、熊野 篤、菅野 剛、土谷 稔 (三菱化学安科研)

Renal dysplasia (腎形成異常) は分化の異常による腎実質の発育異常で、ヒト、豚、馬、牛、羊、犬および猫では数多くの報告例があるが、小型げっ歯類 (マウス、ラット、ハムスター) では発生は極めて稀とされている。今回、我々はシリアンハムスター 2 例に renal dysplasia 病変を認めたので報告する。

【材料と方法】シリアンハムスター (5 週齢) 雌雄各 25 匹を購入して、無処置のまま剖検し、全例の腎臓について病理組織学的検査を行った。また、一部の動物について電顕的検査を行った。

【結果および考察】肉眼的検査により、雄 2 例に片側性に小型の腎臓が発見された。2 例とも、淡桃色で不規則な表面をもつ小型腎臓が左側にみられた。組織学的、電顕的検査により、小型腎臓では皮質外帯から腎乳頭に至る全腎組織に未成熟、未分化組織を特徴とする dysplasia 病変がみられた。糸球体は小型で、小型・円型の核を有する細胞より構成され、血管腔の狭小化がみられた。皮質領域の尿細管は小型で円形あるいは卵円形の核と淡明な細胞質を持つ上皮から成り、管腔は狭小・不明瞭であった。髓質領域では、尿細管の上皮は扁平で、小型・円形の核を有し、管腔の拡張がみられた。間質には、皮質・髓質領域ともに線維芽細胞の増殖とリンパ系細胞の浸潤がみられた。

本ハムスターにおける renal dysplasia の報告は極めて少ないが、これはその病理学的背景データが未だ十分に蓄積されていないことも一因と考えられる。今後、病理学的背景データが蓄積されれば、本症例の増加が予測され、疾患モデルとしての可能性も期待される。

慢性腎不全モデルマウスの 24 時間尿解析

○小沢 康彦^{1,2}、加藤 貴史¹、磯部 治子^{1,2}、原田 垂矢^{1,2}、寺坂 勝利^{1,2}、岡本 明¹、田島 優¹、黒澤 努¹ (¹ 阪大・医・動物実験施設、² 三協ラボサービス(株))

はじめに

自然発症慢性腎不全モデルマウス(NEP 系統)は、単一の劣性遺伝子を原因としてホモ個体(*nep/nep*)は慢性腎不全を発症する。すなわち、出生直後より、アルブミン尿を発現し、徐々に尿細管間質の線維化を起こし、腎機能不全を引き起こす。これまで 4 週齢での spot 尿を採取し、SDS-PAGE 解析を行い、尿中アルブミン濃度が高い個体をホモ個体と定義しているが、その尿中のアルブミン量には、日内変動があることが明らかにされている。しかし、臨床的には、24 時間尿のデータが腎症の診断に使われている。そこで、*metabolic cage* を用いて、このマウス系統の 24 時間尿の解析を行った。

材料および方法

温度 23±2℃、湿度 70% 以下に環境をコントロールした。飼料は、MF(オリエンタル酵母)を用い、給水は、逆浸透圧膜で濾過した水を用いた。

15 週齢のオスの NEP 系統のホモ個体、ヘテロ個体(*nep/+*)、およびワイルド個体(*+/+*)をガラス製の *metabolic cage* (杉山元医理器)に 24 時間収容した。採尿は、明時、暗時 12 時間ずつに分け、さらに明時を 2 時間ずつに分けて行った。排尿量は、ピペット操作と重量で測定した。尿中アルブミンを解析するため SDS-PAGE を行い、さらに ALB-G(デンカ生研)で濃度を測定した。

結果

- 1) 24 時間あたりの尿量比(排尿量/体重)は、ホモ個体では、ヘテロ、ワイルド個体と比較して、統計学的に有意に高かった。
- 2) 24 時間あたりの飲水量比(飲水量/体重)は、ホモ個体では、高い傾向がみられた。
- 3) ホモ個体では、明時の尿量が多い傾向がみられた。
- 4) 明時 12 時間を 2 時間毎に分け採尿した際に、100μl 以上採尿された頻度が、ホモ個体では、統計学的に有意に高かった。

考察

自然発症の慢性腎不全モデルマウスである NEP 系統のホモ個体は、ヘテロ、ワイルド個体と比較して、尿中アルブミン濃度が高いが、尿量も有意に多いことが明らかとなった。さらに、ホモ個体では、ヘテロ、ワイルド個体と比較し明時の尿量が多く、ヒト慢性腎不全での夜間多尿のモデルともなることが示唆された。

長期喫煙による自然発症高血圧ラットにおける循環動態の変化と脳内エンドセリンおよび末梢エンドセリン受容体の変動

○ 久保 薫¹、喜多 大三²、田中 健²、大野 則和²、高橋 正裕²、
中嶋 敏勝²

(奈良県立医科大学・¹動物実験施設、²薬理学教室)

【緒言】喫煙習慣の循環動態に及ぼす影響は数多く報告されているが、高血圧症における長期喫煙の影響についてはまだ十分には解明されていない。我々は自然発症高血圧ラット (SHR) と Wistar-Kyoto (WKY) ラットを用いて長期喫煙の循環動態への影響と、さらに脳内エンドセリン量および末梢エンドセリン受容体発現の変動と血中ニコチン濃度について調べた。

【材料と方法】ハンブルグⅡ喫煙装置にて、喫煙 (30 本/20 分/日) を 5 回/週 (月から金曜日) 8 週間行った。血圧と心拍数は尾動脈圧測定装置で測定し、木曜日の喫煙終了後 15～55 分間、金曜日の 125～165 分間と土曜日の 24 時間後の値を各々初期、後期、24 時間後の値とした。8 週間喫煙後に脳内エンドセリン (ET) 量を ELISA で測定した。最終喫煙後、2 時間と 24 時間で副腎および腎臓を摘出し、ET 受容体を免疫染色した。血漿中ニコチン濃度は HPLC 法で測定した。

【結果および考察】WKY ラットの心拍数は初期で増加し、24 時間後には回復した。SHR では 24 時間後の心拍数低下と初期と後期の収縮期血圧の低下を観察した。非喫煙群における大脳皮質、線条体と視床下部の ET 量は、WKY ラットに比べて SHR で高値であったが、8 週間の長期喫煙により、SHR で有意に低下した。延髄と中脳の ET 量は、喫煙処置により両系統で増加したが、差はなかった。非喫煙群の副腎髄質における ETA 受容体の染色強度は、WKY ラットに比べて SHR では明らかに弱かったが、喫煙により増加し、WKY ラットでは変化はなかった。喫煙後 24 時間における遠位尿細管の ETB 受容体の染色強度は、SHR の非喫煙群、WKY ラットの喫煙、非喫煙群で減弱したが、SHR の喫煙群のみが染色性を残した。1 回の喫煙後の血漿中ニコチン濃度は、両系統間で差はなく、喫煙開始後 2、3 時間で急激に減少した。以上より、長期喫煙は本態性高血圧に対して、脳内 ET 量と末梢 ET 受容体の発現を変動させることによって、血圧と心拍数を制御する可能性が示唆された。また、SHR と WKY ラットの血圧と心拍数への影響の相違は、血中ニコチン濃度によるものではないと考えられる。

ウサギ心筋の死後変化

伊藤 隆, 山田 悟士, 田村 敏昌, ○ 塩見 雅志

(神戸大学医学部附属動物実験施設)

【緒言】 演者らは心筋梗塞を自然発症する WHHLMI ウサギを開発した。ヒト心筋梗塞の場合、心筋組織間隙への炎症性細胞の浸潤が特徴的であるが、WHHLMI ウサギでは心筋虚血イベントが発生した後短時間で死亡するため炎症性細胞の浸潤が少ない。そのため、ヒトで観察される虚血による急性期の特徴的な心筋病変を確認することが困難な場合が多い。突然死した WHHLMI ウサギの心筋所見が死後変化によるものかどうかを確認する目的で、正常ウサギの心筋組織の死後変化を経時的に観察した。

【材料および方法】 23 匹の正常ウサギをケタラルールの過剰投与で安楽死させ、安楽死直後あるいは一定時間 (30 分, 1 時間, 1.5 時間, 2 時間, 4 時間, 8 時間, 12 時間, 24 時間) ケージ内に静置した後に心臓を摘出した。心臓を心底部に平行に 3 分割し、ホルマリン固定後、パラフィン切片を hematoxylin and eosin 染色した。心筋組織の変化については、心筋梗塞の急性期に観察されるエオジン濃染、心筋線維の波状走行、心筋細胞内の空胞形成、横紋の消失、心筋線維間の浮腫、収縮帯壊死および心筋束の間隙について観察した。

【結果および考察】 心筋束の間隙、エオジン濃染、心筋線維の波状走行は死後 30 分から認められた。心筋束間隙は死後時間とともに拡大したが、エオジン濃染と波状走行は死後時間との間に一定の関係を認めなかった。これらの所見の観察された部位はランダムであり、核の萎縮や消失、心筋線維間の浮腫、心筋細胞の伸張等の心筋梗塞急性期に同時に観察される所見は認められなかった。心筋内の空胞形成は乳頭筋の表層に認められたが、心室壁内の心筋細胞には認められなかった。横紋の消失は死後 24 時間まで認められず、心筋線維間の浮腫、収縮帯壊死も認められなかった。心筋の死後変化として心筋束の間隙の拡大が特徴的であり、他の心筋細胞／心室壁の所見は心筋梗塞で認められる所見とは異なっていた。

超音波診断によるカニクイザルにおける主席卵胞直径と回収卵子の成熟率の関係

○大田 聖¹、川辺 敏晃²、藤浪 菜穂子²、細井 美彦²、竹之下 誠¹
(¹、(株)ケアリー和歌山研究所 ²、近畿大学 生物理工学部)

【目的】カニクイザルの従来の過剰排卵誘起方法では、回収卵子の成熟率が一定でない。ヒトでは、過剰排卵誘起処理時に主席卵胞直径が採卵の目安となっていることに着目し、カニクイザルに対する適用の可能性を検討した。本研究では、過剰排卵誘起処理によって成熟卵子（MⅠ・MⅡ期）をより多く回収するために主席卵胞直径と卵子の成熟率との関係を検討した。

【実験.1】PMSG を用いて過剰排卵誘起処理を行った。処理 7 日後、処理 9 日後、採卵直前に超音波診断を行い、主席卵胞の直径を測定した。採卵は、腹腔鏡下で行った。回収成熟卵子は、直ちに ICSI を行い、胚盤胞期胚への発生率を調べた。

【結果および考察.1】処理 9 日後に主席卵胞直径が 5mm 以上の個体においては、回収卵子の多くが成熟卵子であり、胚盤胞期胚への発生率も高く、質の良い卵子だと言える。また、処理 9 日後に主席卵胞直径が 5mm 以上に達するためには、処理 7 日後に主席卵胞直径が 4.5mm 以上必要であることが判明した。

【実験.2】実験.1 の結果を踏まえ、処理 7 日後の診断で主席卵胞直径が 4.5mm 未満の個体について、投与量を増量して過剰排卵誘起処理を行った。実験.1 と同様に診断し、採卵後に ICSI を行った。

【結果および考察.2】投与量を増量した個体からは、平均 45% で成熟卵子を回収できたが、桑実胚までは発生するが胚盤胞期胚への発生は見られなかった。増量したため卵子に負荷がかかっていると考えられる。この場合では、卵子への負荷を軽減する受精法の検討が必要であると考えられる。

カニクイザル始原生殖細胞の検出と培養の試み

○土屋英明¹、中川佳子²、岡田浩典³、下澤律浩³、高田達之¹、鳥居隆三¹、
桑名 貴²、山海 直³ (¹滋賀医大・動物センター、²国立環境研・環境研究基盤ラボ、³国立感染症・霊長類センター)

【目的】

哺乳動物の始原生殖細胞 (primordial germ cell ; PGC) に関する研究はマウスにおいてはいくつかの報告がなされている。PGC は遺伝子保存、個体作出技術としての利用だけではなく、ヒト胎児に由来する PGC を用いた研究は遺伝子治療、再生医療等の医療分野での応用が期待されている。しかし、ヒト胎児を用いて生殖細胞の基礎的研究を行うことは困難であり、ヒトにもっとも近縁な哺乳動物であるサル類を用いた研究が重要であると考えられる。本研究を遂行するためには、発生ステージが明確な胎児を用いることが重要である。そこでカニクイザルを用いて、妊娠日の判定、妊娠診断について検討し、さらに 30、33 および 36 日齢のカニクイザル胚を用いて胚中の PGC を採取することが可能か否かについて検討を加えた。

【材料および方法】

性成熟メスカニクイザルのメンス出血確認初日から数えて 10~14 日目までの 3 日間に性成熟オスカニクイザルと同居交配を行った。交配期間の前後 5~7 日間にメス血液中の estradiol-17 β (E2) の濃度を測定し排卵日を推定した。推定排卵日から 21 および 28 日目に血液を採取し beta-subunit of macaque chorionic gonadotropin (β -mCG) の血中濃度測定により妊娠診断を行った。妊娠個体の推定排卵日から 30、33 および 36 日に胚を摘出し胚中の PGC を採取し体外培養することが可能か否かについて検討を行った。

【結果および考察】

同居交配を実施した個体について排卵日を推定した。これらの個体において排卵日から約 3 週目に妊娠診断を実施したところ妊娠個体を確認し、胚の摘出を行った。36 日齢胚では左右の生殖巣が形成されていたため、右生殖巣を短期培養後アルカリフォスファターゼ染色し、左生殖巣をロスマン固定後 PAS 染色した。その結果、生殖巣の細胞がアルカリフォスファターゼ活性陽性、PAS 染色陽性を示すことが確認された。30 日齢胚では生殖隆起が形成されていなかったため、予定生殖巣部域と腸間膜および尿膜基部腸管を培養した。33 日齢胚では生殖隆起が形成されており、生殖隆起と腸間膜を採取して培養した。30 日齢胚の尿膜基部腸管の細胞を約 2 ヶ月培養した場合と 33 日齢胚の生殖隆起と腸間膜を約 1 ヶ月培養した場合において、SSEA1 弱陽性、AP 活性陽性、PAS 染色陽性を示す細胞の存在が確認できた。このことから、カニクイザル PGC が体外培養で維持できる可能性が示唆された。

電位依存性 Ca^{2+} チャンネル $\alpha 1A$ 蛋白質ノックダウンによる運動失調マウス

○齋藤 浩充、津村 秀樹、鈴木 昇

三重大学生命科学研究支援センター動物実験施設

はじめに：電位依存性 Ca^{2+} チャンネルは、神経系における神経伝達物質の遊離、長期抑圧、発火パターン形成、興奮収縮連関など Ca^{2+} を介した情報伝達に関わる分子である。電位依存性 Ca^{2+} チャンネルには機能的多様性があり、膜電位が 0 mV 近くまで脱分極しないと開かない高電位活性型で、 ω -アガトキシン-IV に感受性を示す Ca^{2+} チャンネルは、P/Q 型として分類されている。P/Q 型電位依存性 Ca^{2+} チャンネルは、小脳プルキンエ細胞、顆粒細胞、大脳の海馬、に特に多く存在し、神経伝達物質の放出、小脳での長期抑圧に関わっていると考えられている。現在、P/Q 型電位依存性 Ca^{2+} チャンネルの分子的な実体は、チャンネルポアを形成する $\alpha 1$ サブユニット A であることが明らかにされている。そこで、P/Q 型電位依存性 Ca^{2+} チャンネルの領域特異的な機能解析のため $\alpha 1A$ 遺伝子の条件的ノックアウトマウス作製を試みた。その過程で新たなタイプの P/Q 型電位依存性 Ca^{2+} チャンネル変異マウスを得たので紹介する。

方法：ES 細胞へのノックインにより、 $\alpha 1A$ 遺伝子 1st エクソンの非翻訳領域中に存在する Eco 47 III 制限酵素部位、及び 1st イントロン中の Apa 1 制限酵素部位に 34bp の loxP 配列を挿入したマウスを作製した。得られたヘテロマウスの掛け合わせによりホモマウスを作製した。

結果：得られたホモマウスは、ローリング歩行を伴う運動失調を示した。

また、生後 6 週における小脳は正常との差が観察されなかったが、生後 6 ヶ月における小脳において畏縮とプルキンエ細胞の減少が観察された。そこで、RT-PCR、ノーザンハイブリ、ウエスタンハイブリによる発現量の解析をおこなった。その結果、小脳、大脳での RNA 発現量は正常マウスと変わらないが、タンパク量が減少していた。これまでマウスにおいて、tottering、leaner、rocker、Rolling Nagoya など $\alpha 1A$ 遺伝子変異を持つミュータントが報告されているが、いずれも個々の Ca^{2+} チャンネル活性の低下を原因とする異常である。今回新たに作製されたミュータントは、正常なチャンネルの発現量低下によるノックダウンタイプであり、P/Q 型 Ca^{2+} チャンネル機能の解析に有用であると考えられる。

Groggy ラットにおける原因遺伝子の同定と欠神様発作の発現

徳田智子¹⁾, 庫本高志¹⁾, 郷間宏史¹⁾, 笹征史²⁾, 芹川忠夫¹⁾

(京大院・医学研究科・動物実験施設¹⁾, 渚病院²⁾)

Groggy ラットは、愛知県心身障害者コロニー発達障害研究所で維持されていた Wistar ラットコロニーから発見され、後肢の伸展と歩行異常、運動失調を特徴とする。これらの表現型は常染色体性劣性の遺伝形質であることが知られていた。今回、Groggy ラットについて、(1) 原因遺伝子の同定、(2) 行動と脳波の検査、および (3) 検出された欠神様発作の抗てんかん薬による抑制効果試験を行ったので、報告する。

(1) 原因遺伝子の同定

gry 遺伝子の連鎖地図上の位置を決定することを目的に、Groggy × (Groggy × BN) F₁ 戻し交配を行った。全てのラット染色体をカバーする 100 個のマイクロサテライトマーカーを用いた遺伝解析を行い、次いで候補遺伝子のシーケンス解析を行った。戻し交雑子 766 個体による遺伝解析の結果、*gry* 遺伝子はラット第 19 染色体上の *D19Rat122* と *D19Rat120* の間にマップされ、この領域には、電位依存型 P/Q タイプカルシウムチャネルの Cav2.1 サブユニットをコードしている Calcium channel $\alpha 1A$ subunit (*Cacna1a*) 遺伝子があった。*Cacna1a* の遺伝子変異は、*tottering*、*rolling Nagoya*、*rocker* マウスでみられる歩行異常と運動失調、欠神様発作の原因であることが知られている。シーケンス解析により、Groggy ラットの *Cacna1a* 遺伝子のコーディング領域にミスセンス変異を発見した。このミスセンス変異は、CACNA1A タンパクの第 251 番目のメチオニンをリジンに置換し (Met251Lys)、置換部位はカルシウムチャネルのポアを形成する P-loop の細胞外領域に相当していた。

(2) 行動と脳波の検査、および (3) 抗てんかん薬による抑制効果試験

7 ヶ月齢 Groggy ラットの大脳皮質に電極を埋め込み、60 分間の脳波記録と行動観察を行った。試験中に Groggy ラットは突然動作を停止し、この時脳波上 7-8Hz の棘徐波複合が観察された。この発作回数は 60 分間に平均 28.8 ± 15.4 回 ($n=5$)、総持続時間は平均 279.1 ± 187.5 秒であった。さらにこの発作は、ヒトの欠神発作の治療薬であるエトスクシミド (200mg/kg, i. p.) により抑制されたが、強直発作の治療薬であるとフェニトイン (20mg/kg, i. p.) では抑制されなかった。

ヒト CACNA1A 遺伝子の異常は、家族性片麻痺性片頭痛、発作性運動失調症 2 型および脊髄小脳運動失調症 6 型の神経疾患の原因とされ、またてんかんの成因としても考えられている。従って、Groggy ラットは、P/Q タイプカルシウム異常による新たなてんかんモデルラットとして利用価値がある。

ラットフェノームプロジェクト：既存系統における新たな特性の発見

○真下知士¹、直井国子¹、Birger Voigt¹、山崎賢一¹、庫本高志¹、芹川忠夫¹、
左近上博司²、西森司雄²

(¹京都大学大学院医学研究科附属動物実験施設、²株環境バイリス研究所)

ラットは、1) 疾患モデル、2) 生理・移植・行動実験、3) 薬理・毒性試験、4) コンジェニックやトランスジェニックなど遺伝子解析モデルとして、医学・薬学・生物学上重要な実験動物である。京都大学医学研究科附属動物実験施設は、ナショナルバイオリソースプロジェクト「ラット」(NBRP-Rat) の中核機関として、日本で開発されたさまざまなラット系統や、諸外国も含めた収集・保存・提供事業を展開している。これまで国内 40 機関、264 系統をこえるラット系統が収集されている。

集められた系統については、その利用価値を高めるために、体系的・網羅的に特性を解析する「ラットフェノームプロジェクト」を行っている。この特性検査は環境バイリス研究所で行われており、均一の条件下で、各系統雄 6 匹が、8-10 週齢の間に、1) 機能観察総合評価 (FOB)、2) 行動解析 (自発運動量 受動的回避学習など)、3) 血圧、心拍数、4) 血液生化学的検査、5) 血液学的検査、6) 尿量、尿中電解質、7) 解剖検査 (体重、臓器重量)、など合計 109 項目を検査している。また、370 の遺伝多型マーカーを用いたゲノム検査も行っている【鶴見らにより報告】。

これまでに得られた 54 系統における特性プロファイルは、すでに NBRP-Rat ホームページ上 (www.anim.med.kyoto-u.ac.jp/nbr) で公開されており、「系統特性ランキング」として、特性値ごとに系統をならべかえることができる。研究者はこの特性プロファイルを利用することで、1) 平均 (基準) 値、はずれ値の評価、2) 系統間の特性比較、3) 新たなモデルラットの発見、4) QTL 解析の親系統として利用、5) 自分の研究にあったラット系統を NBRP-Rat から利用することが可能である。驚いたことに、一般的に利用されている既存の系統の中にも、高血圧、糖尿病、高脂血症などの新たな疾患モデル候補としての特性が見出されている。

ラットフェノームプロジェクトは NBRP-Rat の一環として行われており、2007 年 3 月までに 200 系統について広範な特性検査が行われる。NBRP-Rat は、バイオメディカルサイエンスの基礎研究、新薬探索・先端医療の開発研究に新たな可能性を提示できると期待する。

NBRP-Rat で収集されたラット系統のゲノムプロファイル

○鶴見東志子、真下知士、Birger Voigt、中西聡、庫本高志、芹川忠夫
(京都大学大学院医学研究科附属動物実験施設)

実験用ラットは、医学、薬学、栄養学、生理学、行動学等の分野で古くから利用されており、日本においても高血圧、糖尿病、がん、てんかんなどの貴重な疾患モデルラットが数多く開発されている。京都大学医学研究科附属動物実験施設はナショナルバイオリソースプロジェクト「ラット」(NBRP-Rat)の中核機関として、これらラット系統の収集・保存・提供事業を推進しており、これまで 264 以上のラット系統が収集、保存されている。それぞれの系統について、再評価およびその利用価値をさらに高めるために、一般特性、行動、血圧、血液、尿、臓器などの特性検査【真下らにより報告】、および遺伝多型マーカーを用いたゲノム検査を行っている。本総会では、これまで調べられた 49 系統におけるゲノムプロファイルについて、その利用方法や新たな知見を報告する。

NBRP-Rat で収集されたラット系統の中から、出来るだけ遺伝的背景、由来の異なる 49 系統を選抜し、それぞれの系統において、脾臓からゲノム DNA を抽出した。Rat Genome Database において公開されているマイクロサテライトマーカーの中から、系統間多型率、PCR 産物の系統間サイズ差、および染色体上の分散状況を考慮して、370 マーカーを選抜した。ABI3700 シークエンサーを用いて遺伝子型を決定した。

作成されたゲノムプロファイルは、NBRP-Rat ホームページ上 (www.anim.med.kyoto-u.ac.jp/nbr) で公開されており、系統あるいはマーカー順に遺伝子型を見ることが、複数の系統間の遺伝的多型を比較することができるようになっている。研究者は、このゲノムプロファイルを利用することで、1) ラット系統の遺伝検査、2) 各系統における遺伝的背景の比較検討、3) 遺伝解析の研究材料として利用することが可能である。また NBRP-Rat で得られた特性検査プロファイルと比較することで、QTL 解析の親系統としても利用することができる。

2007 年 3 月までに、200 系統についてのゲノム検査を行い、ホームページ上で順次公開する。NBRP-Rat が、バイオメディカルサイエンスの基礎研究、新薬探索・先端医療の開発研究に新たな可能性を提示できると期待している。

NBRP-Rat 収集系統における Agouti と Red-eyed dilution のプロフィール

○庫本高志、中西 聡、山崎賢一、直井国子、Birger Voigt、真下知士、芹川忠夫
(京大院・医・動物実験施設)

ナショナルバイオリソースプロジェクト「ラット」(NBRP-Rat)では、ラット系統の収集、保存、提供を行っている。平成16年10月1日現在、264系統のラットが収集された。これらの系統では、アルビノ、アグーチ、ブラック、ブラウンなどのよく知られた毛色に加え、pink-eyed tan (RCS ラット)、fawn-hooded (TM ラット)、dilute brown (ALB ラット)、cinnamon-like (LEC ラット)、dilute gray (DOP ラット) など様々な毛色を観察することができる。

個々のラット系統がどのような毛色遺伝子を保有しているかを遺伝子レベルで明らかにし、体系的に整理することは、ラット系統の特徴や由来などを明確にする上で重要である。今回、我々は、114のラット系統について、non-agouti (*a*) 変異と red-eyed dilution (*r*) 変異の有無を検査し、そのプロフィールを作成した。

【材料と方法】

NBRP-Rat で収集された87系統、市販系統など20系統、7つのアウトブリードについて、それぞれ1匹の脾臓からDNAを抽出し検体とした。Non-agouti 変異はアグーチ遺伝子コーディング領域の19塩基欠失である(Kuramoto et al., 2001)。この欠失を検出するプライマーを用いたPCRを行い、non-agouti 変異の有無を判定した。Red-eyed dilution 変異はRab38 遺伝子のMet11le 変異である(Oiso et al., 2004)。このミスセンス変異をPCR-RFLP法により検出し、Red-eyed dilution 変異の有無を判定した。

【結果と考察】

A, R 遺伝子プロフィールにより、A, R 遺伝子に関してラット系統を体系的に整理できた。Cinnamon-like 毛色と記載される LEC ラットは、*AA, rr*であった。Fawn 毛色の TM/Kyo と FH/HamSlc は、*aa, rr*であった。また pink-eyed dilution と記載される LE/Stm とその子孫系統の LEXF1C, LEXF11 もまた *aa, rr*であった。実際、LE/Stm, LEXF1C, LEXF11 の眼の色は、ピンクアイと言うよりはむしろ TM/Kyo や FH/HamSlc と同色のルビー色であった。また、驚くことに、dilute brown 毛色と呼ばれる ALB も、*aa, rr*であった。このように同じ毛色遺伝子を持つにもかかわらず、様々な毛色で表示されていたのは、毛色の比較が文献の記載によるところが多く、直接比較することが困難であったためと思われる。NBRP-Rat では、ラット系統を中核機関に集約し保存しているので、様々な表現型についてラット系統を直接比較できる。

〈第85回研究会（平成17年3月4日）〉

テーマ：腸内フローラについて学ぶ

1. 腸内フローラと生体反応

伊藤喜久治（東京大学院・農・獣医公衆衛生学）

2. 腸内フローラとToll-like receptor

竹田 潔（九州大生体防御医学研・発生工学）

腸内フローラはヒトや動物の腸管内に生息する細菌の集団で、宿主との間に共生関係を維持して一定のバランスを保っている。腸内フローラは腸管内に生息しているがあくまでも外部環境であり、生体のホメオスタシスとは異なるシステムを維持する。腸内フローラと生体との関係は生体の生理状態や病態に深く関与していることは明らかであるが、あくまでもアクセサリーファクターとしての機能であると考えられてきた。しかし、実験動物の世界から新たな腸内フローラ研究のテーマが示された。それは病態モデル動物としての遺伝子改変動物の出現である。通常環境では観察された病態が無菌化、SPF化することにより病態の発現がみられない事例が報告され、腸内フローラの存在が生体の遺伝子発現にも影響を与えることが明らかになってきた。

1. 腸内フローラ

腸内に生息する細菌は100～200種、100兆個と言われており、糞便体積の1/3～1/2は細菌である。その99%以上が酸素存在下では発育できない嫌気細菌で占められている(図1)。そのため腸内細菌の培養にはロールチューブ法、プレートインボトル法、嫌気性チャンバー法など(図2)の高度の嫌気度を維持できる装置が必要となる。嫌気性グローブボックスはきちんと管理すれば酸素濃度が4ppm以下となるように設計されている。

腸内フローラは健康な成人や成熟動物では一定の構成を維持している。これを正常腸内フローラ(ノーマルフローラ)という。腸内フローラ構成は各種要因によりコントロールされている。図3に示すように大きく3つの要因があげられる。生物学的要因は人工的にコントロールできない要因である。動物種や年齢(図4)、消化管部位(図5)で大枠はきめられている。またヒトの場合 *Bifidobacterium* の菌種が成人と乳幼児で大きく異なることも報告されている。(図6)遺伝的背景はヒトの場合、人種と考えると、腸内フローラの違いが遺伝的背景によるものか生活習慣、特に食生活の違いによるかの判断がつかない。マウスでは実験的にマウス系統により腸内フローラの違いが報告されているが、SPF化にともない強固なBarrier Systemを導入することでマウス系統を超えて施設ごとの特徴もみられる。

腸内フローラの外的要因は人工的にコントロールできる範囲である。腸管生理、特に腸管の運動能、消化管ホルモン、消化酵素の分泌により腸内フローラ構成は影響をうける。食餌成分、例えば高繊維、高糖質な食餌と高蛋白、高脂

質な食餌では腸内フローラ構成は異なる。腸管運動や食餌成分の影響は腸内フローラ構成ばかりでなく、腸内代謝への影響が強く、腸管運動の減退や高蛋白、高脂肪食では、腸内腐敗産物、発がん物質などの有害物質の産生が増加する。

生活環境による腸内フローラへの影響ではストレスとの関係が明らかにされている。絶食によるストレス、怒り、不安、恐怖などの精神的ストレス（例えば宇宙飛行、自殺者など）、乳児の母子分離によるストレス、過密や灼熱による物理的ストレスによる腸内フローラの変動が今までに報告されている。ストレスによる腸内フローラへの影響は主に腸管運動の変化を介して行われると考えられる。

以上のような腸管生理の異常、高蛋白・高脂質の食餌、老化ストレスさらには各種病態における異常腸内フローラでは一定の変化を示す。つまり小腸部での大腸菌、腸球菌などの好気性菌の増殖、動物では乳酸菌の減少がみられ、大腸部では乳酸菌やビフィズス菌の減少、*Clostridium perfringens* などの腐敗菌の増加がみられる。

腸内フローラは生物学的要因、フローラの外的要因でコントロールされさらに腸内フローラ構成菌の相互関係により最終的に決定される（図7）。腸管は激しい運動により腸内容物を移動させ、腸内特に大腸では細菌にとっては栄養欠乏状態となっており、しかも嫌気状態のため酸化的にエネルギーを取得できない。そのため腸内の定着の場として腸管上皮細胞を被う粘液層での発育の場と栄養素の競合が起こり、環境に適応ものが腸内に一定の菌数を維持できる。外来の病原菌に対しても同様である。

2. 腸内フローラの研究の歴史

腸内フローラの研究は大きく二つの流れがある。一つは腸内フローラの構成、生態に関する研究、もう一つは腸内フローラの機能、つまりヒトや動物の生理、病態にどのような関係を持っているかというものである。前者は1681年オランダの *Leevenhoeg* が手製の顕微鏡で糞便中の細菌を観察したことに始まる。1800年代細菌学の基礎が *Pasteur* や *Koch* により確立し、1886年から腸内の重要な菌である大腸菌、*Bifidobacterium bifidum*、*Lactobacillus acidophilus* が発見された。1935年 *Eggerth* と *Gagnon* により成人の腸内は大部分が嫌気性菌で占められていることが明らかになった。これにより1950年代からは絶対嫌気性菌を培養するための方法（ロールチューブ法、グローブボックス法、プレート-イン-ボトル法など）が考案された。そして1990年代になって細菌が共通に保有する 16S rDNA のシークエンスを基礎とする分類体系がスタートし、多くのデータが蓄積されてきた。それを利用した分子生物学的手法が開発され、FISH 法、プライマー法、クローニング法、マイクロアレイ法のほか、多様性を定量化する方法として DGGE 法、TGGE 法、

T-RFLT 法などが腸内フローラ解析にも用いられるようになってきた。

一方、腸内フローラの機能に関する研究は、1885年の Pasteur による「腸内フローラ不可欠論」が初めと考えられる。これは腸内に生息する腸内細菌はヒト動物の生存には不可欠で腸内フローラなしには生きることができないというもので、その証明方法として無菌動物の作出を提案した。その後50年以上が経過して1945年にアメリカの Reyniens が無菌ラットの繁殖に成功し、Pasteur の仮説は否定された。しかし、無菌動物の作出は腸内フローラが生体の生理的、解剖学的、免疫学的などの面で大きく影響を与えていることが次々と明らかになった。単に無菌動物と通常動物の比較に留まらず、特定の菌を定着させたノトバイオートによる腸内菌のもつ機能についてもデータが蓄積されてきた。ここで忘れてならないのが Trexler らにより考案されたビニールアイソレーターの普及である。これにより無菌動物が比較的容易に維持できるようになり、腸内フローラ研究を後押しした。

これとは別に、1907年に発表された Mechinikoff の「ヨーグルトの不老長寿説」が大きな研究の流れのスタートになり、現在の機能性食品、日本での特定保健用食品の開発へとつながる。さらに腸内フローラの機能研究に新たな「Tool」として遺伝子改変動物にみられる病態モデル動物の開発があげられる。通常環境でみられる病態が無菌化、SPF 化することで病変が見られなくなることが多く報告され、腸内フローラの病態への役割がクローズアップされた。

3. 新たな腸内フローラ研究

ヒトの腸内フローラ研究は現在腸内フローラそのものの研究というよりもむしろ機能性食品である Probiotics、Prebiotics、Biogenics の開発にシフトしている。これまでの整腸作用にとどまらず、医療面での予防、治療へとその範囲を広げている。大腸菌 O157:H7 を主とする腸管出血性大腸菌症は腸内フローラの不安定なグループである乳幼児と高齢者で感染率が高く(図 8)、Probiotics による腸内フローラの正常化と腸管免疫の賦活による感染防御が報告されている。ウイルス感染においても腸管感染症であるロタウイルスの感染ばかりでなくインフルエンザによる呼吸器感染においても Probiotics による感染防御が報告され、粘膜免疫の賦活化による IgA、IgG の特異抗体の増強効果と考えられる。

Bacterial translocation は腸内に生息する生きた菌が腸管以外の臓器へ移行する現象をいう。1. 腸内での特定菌種の異常増殖、2. 腸管粘膜の損傷、3. 免疫機能の低下、4. 癌、糖尿病、火傷などの全身性消耗疾患により誘導される。

胆嚢癌の外科手術後にみられる感染症や菌血症はシンバイオティクス投与

(Probiotics としてのビフィズス菌と Prebiotics としてのオリゴ糖を同時に投与すること)により発症を抑制されたとの報告があり、その時の患者の腸内フ

ローラは大腸菌群や緑膿菌数の低下とビフィズス菌、乳酸菌の増加がみられている。

大腸癌は食餌成分を腸内菌が代謝して各種発癌物質や発癌プロモーターを産生することが大きな要因であり(図9)、高脂肪、高蛋白質、低繊維食で発生率は高くなる。著者らもヒトの発癌遺伝子である *c-Ha-ras* 遺伝子を導入されたトランスジェニックマウスの *rasH2* マウスを用いてジメチルヒドラジン誘発の大腸癌にヨーグルト、アップルペクチン、ビフィズス菌培養濃縮液、大豆の乳酸菌発酵産物が抑制的に作用していることを報告している。また、2000年以降、ヒトでの疫学調査により乳酸菌飲料の膀胱癌の予防効果や大腸癌の悪性化の予防などが報告され、これまでの実験動物を用いての効果がヒトにおいてもしだいに明らかにされつつある。

最近腸内フローラとアレルギーとの関係がホットな話題となっている。そのきっかけとなった報告はアレルギーを起こす小児の腸内にはビフィズス菌や乳酸菌が少なく、これらの患者にビフィズス菌や乳酸菌を投与することによりアレルギーの症状が改善されたとの報告がある(図10)。アレルギーは免疫担当細胞のうち *Th1* と *Th2* のアンバランスにより *Th2* 優位な状態が起こり、グラム陽性菌は *Th1* を誘導することによりアレルギーを改善すると考えられる(図11)。また *Inflammatory Bowel Disease (IBD)* は腸管での免疫異常がその要因と考えられるが、各種 *Probiotics* の投与により治療効果が得られている。

生活習慣病との関係で *Probiotics* 投与により血中の中性脂肪やコレステロール、糖のレベルを低下させたり、乳酸の発酵産物で血圧の抑制効果がみられる。これらは *Probiotics* が単に整腸作用ばかりでなく腸内フローラを介することなく直接生体に作用していることが考えられ、メカニズムの解明が今後の課題である。

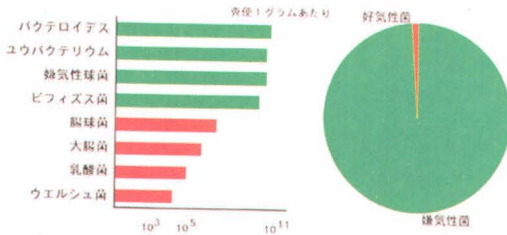
4. 腸内フローラ研究の今後の展開

腸内フローラ研究は生態学的研究から機能面へとそのスタンスが変わってきている。その中で生体と腸内細菌、腸内細菌相互の *cross-talk* の研究がますます重要となってくる。ニュートリゲノミックスのような考えを導入し、これら *cross-talk* の研究が腸内フローラのコントロール、腸内フローラと生体の関係により明らかにするものと考えられる。最終的には腸内フローラのコントロールにより疾病予防にむすびつけることが目標となる(図12)。

(図1)

正常な腸内細菌叢(腸内フローラ)

健康な成人では一定の腸内細菌構成を維持する。



(図2)



(図3)

腸内フローラのコントロール要因

腸内フローラは様々な要因で変化する。

生物学的要因

動物種
年齢
遺伝
消化管部位

フローラの外的要因

腸管生理
食餌
薬物
生活環境
外来微生物

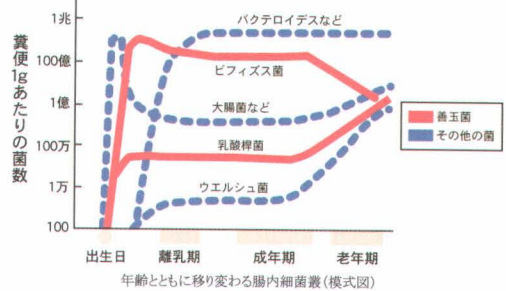
フローラの内的要因

代謝産物
栄養素の競合
場の競合

(図4)

腸内フローラの年齢による変化

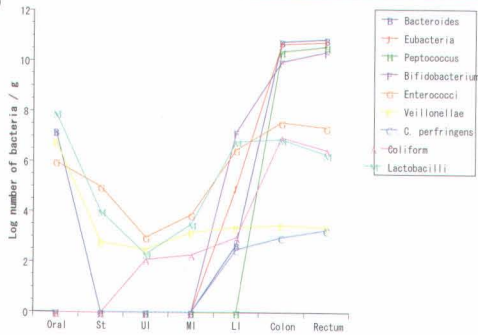
年をとると悪玉菌が増える。



年齢とともに移り変わる腸内細菌叢(模式図)

出典「腸内菌の世界」(光岡知足/冬至書房新社)より改編

(図5)



ヒト消化管各部位の細菌叢の違い(光岡原図, 1974)

(図6)

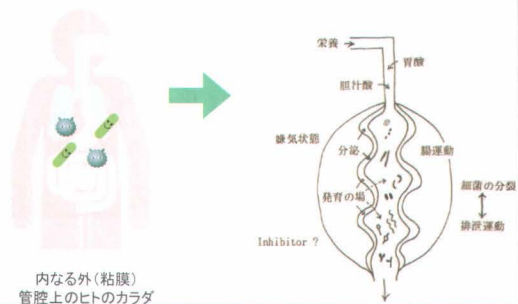
成人と乳幼児のBifidobacterium菌種の違い

菌種	成人 (N=48)	乳幼児 (N=27)
<i>B. adolescentis</i>	29 (60%)	2 (7.4%)
<i>B. angulatum</i>	2 (4.2%)	1 (3.7%)
<i>B. bifidum</i>	18 (38%)	6 (22%)
<i>B. breve</i>	6 (13%)	19 (70%)
<i>B. catenulatum</i> group	44 (92%)	5 (19%)
<i>B. longum</i>	31 (65%)	10 (37%)
<i>B. infantis</i>	0 (0%)	11 (41%)
<i>B. dentium</i>	3 (3.6%)	3 (11%)
<i>B. gallicum</i>	0 (0%)	0 (0%)

Matsuki, T. et al., 1999

(図7)

腸内でのフローラコントロールの基本メカニズム



(図8)

腸管出血性大腸菌O157大腸菌の年齢別感染者数

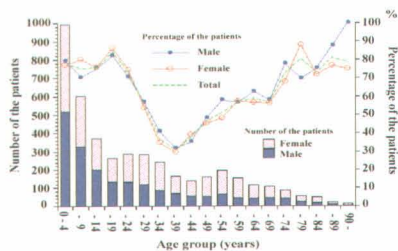
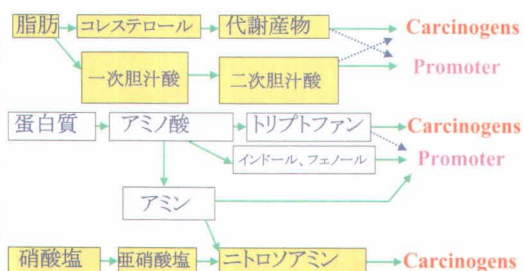


Fig. 1 Outbreaks of EHEC infection - Japan, 2001 (Apr. 2, 2002)

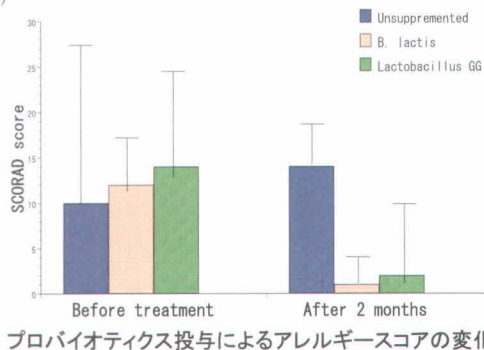
IASR
Infectious Agents Surveillance Report

(図9)

食餌と発癌

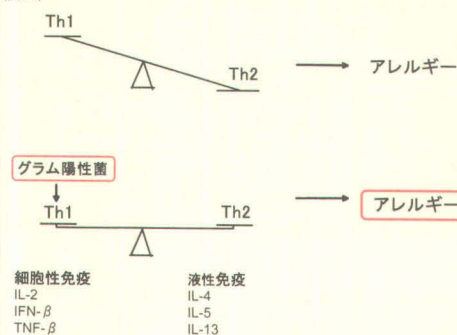


(図10)



(Isolaauri E. et al., Clin. Exp. Allergy 1999)

(図11)



(図12)

今後の展開

1. 培養法と分子生物学的解析法のすり合わせ
2. 病態、生体生理におけるKeyとなる腸内菌の解析
3. HFAマウスからHBAマウスへ、新たなキモスタートの開発
4. ノバイオームを用いたcross-talkの研究
Bacteria-bacteria, Host-bacteria
5. 腸内フローラのゲノム解析

はじめに

感染防御の中心を担う免疫系は、大きく自然免疫系と獲得免疫系の二種の免疫系に分類される。両免疫系ともに、生体内への外界異物（病原体など）の侵入を非自己として認識し、免疫応答を繰り広げるが、これまでは、獲得免疫系による外界異物を抗原として認識する機構が詳細に解析されてきた。一方、自然免疫系の外界異物の認識機構はほとんど理解されていなかった。しかし、自然免疫系は、生体に備わった極めて原始的な免疫システムであり、生体防御システムの最初の反応として異物排除をとりおこなっている。この自然免疫系による外界異物（病原体）の認識機構が、ショウジョウバエで最初に報告された Toll 分子に端を発し、近年急速に理解されてきた。そこで、Toll-like receptor の機能解析から明らかになってきた、自然免疫系による病原体の認識機構、そして TLR を介したシグナル伝達経路の解析から明らかになってきた自然免疫系の活性化機構について紹介したい。また、TLR を介した自然免疫系の活性化と慢性炎症性腸疾患との関わりについて、最近の知見を紹介したい。

自然免疫系と獲得免疫系

病原体の侵入を感知し排除する生体防御系は、一連の免疫応答により執り行われている。この免疫応答は、単純な反応系ではなく種々の細胞が複雑に絡み合い高次的な機能を持つ、自然免疫系(Innate Immunity)と獲得免疫系(Acquired Immunity) [あるいは適応免疫系(Adaptive Immunity)] から成り立つ免疫系の反応である。この2種の免疫系は、どちらも外界異物を非自己として識別するシステムである（表1）。

獲得免疫系は脊椎動物にのみに存在する高等な免疫系であるのに対し、自然免疫系は無脊椎動物から脊椎動物に至るまで、さらには植物などにも見られあらゆる多細胞生物に保存されている原始的な免疫系である。すなわち無脊椎動物では獲得免疫系が存在しなくても、十分に生体防御反応を行えるわけである。この原始的な自然免疫系を担当する細胞が、マクロファージや樹状細胞である。これに対し獲得免疫系においては、脊椎動

物にのみ存在する B 細胞や T 細胞がその中心的役割を担っている。獲得免疫系において B 細胞や T 細胞が認識する非自己は、抗原(antigen)と呼ばれ、この認識機構はこれまでに詳細に解析されてきている。これに対し、自然免疫系の細胞（マクロファージや樹状細胞）は、例えばグラム陰性菌の細胞壁の構成成分のリポポリサッカライド(LPS; lipopolysaccharide)のような病原体を構成する成分により活性化することが従来知られていたが、その分子機構はまったく不明であった。

Toll-like receptor (TLR)の同定

獲得免疫系の存在しないショウジョウバエで、Toll 受容体の変異体の解析から、Toll を介したシグナルが真菌感染に応答して、抗真菌ペプチドを産生するのに必須であることが証明された¹⁾。さらに、哺乳類の Toll ホモログが 1997 年に初めて同定され、このシグナルが種々の炎症に関与した遺伝子を誘導することが示された²⁾。その後、ファミリー分子が Toll-like receptor (TLR)として次々と発見され、現在までに 11 種 (TLR1-TLR11)が論文に報告されている。このように、哺乳類においても Toll 分子が発見され、大きなファミリーを形成していることが明らかになってきた。

TLR ファミリーは、細胞外の領域にロイシンに富んだ領域 (Leucine rich repeat: LRR) と、細胞内の領域には、Toll/IL-1 receptor (TIR)ドメインと呼ばれる IL-1 受容体ファミリーの細胞質内領域と極めて相同性の高い領域を有している。

TLR による病原体の認識

ファミリーを形成する TLR の機能、特に各 TLR が病原体の構成成分をそれぞれ特異的に認識することが、主にノックアウトマウスの解析から明らかになってきた (図 1)³⁾。

各 TLR ファミリーメンバーの機能を下記に述べる。

(1) TLR1, TLR2, TLR6

TLR2 は、グラム陽性菌の細胞壁に多く存在するペプチドグリカン(peptidoglycan: PGN)や種々の細菌の細胞膜に存在するリポペプチドの認識に必須であることが明らかになった⁴⁾。さらに、TLR2 は種々の細菌に存在するリポペプチドの病原体特異的認識を行うため、TLR1 や TLR6 などの TLR2 と構造が極めて似ている他の TLR ファミリー分子と会合していることが明らかになった。TLR2 欠損マウス由来のマクロファージはあらゆるタイプのリポペプチドに反応しない。一方、TLR6 欠損マウス由来のマクロ

ファージは、マイコプラズマ由来のリポペプチドには反応しないが、細菌由来のリポペプチドには正常に反応する⁵⁾。一方 TLR1 欠損マウス由来のマクロファージは、TLR6 欠損マウスとは逆に、マイコプラズマ由来のペプチドには正常に反応するが、マイコバクテリアや細菌由来のリポペプチドに対する反応が障害されている⁶⁾。細菌由来のリポペプチドは、その N 末端に 3 本の脂肪酸基の付加があるのに対し、マイコプラズマ由来のリポペプチドには 2 本の付加しか認めない。以上のように、構造の似た TLR2, TLR6, TLR1 は互いに協調し、リポペプチドの些細な構造の違いを識別している。

(2) TLR3

ウイルス特異的な二本鎖 RNA が、自然免疫系を活性化させることが知られている。二本鎖 RNA は、炎症性サイトカインのなかでも特に強力な抗ウイルス作用を発揮する IFN- α/β の発現を誘導するが、TLR3 が二本鎖 RNA の認識に関与していることが明らかになった⁷⁾。

(3) TLR4

哺乳類の TLR の発見と時期をほぼ同じくして、従来から LPS に対する応答性が低いマウスとして知られていた strain (C3H/HeJ) の原因遺伝子が TLR4 遺伝子の点突然変異であることが明らかになった⁸⁾。また、TLR4 遺伝子欠損マウスも作製され、このマウスが C3H/HeJ マウスと同様に LPS 低応答性であることから、TLR4 が LPS の応答性に必須の受容体であることが明らかになった⁹⁾。

(4) TLR5

病原体には、細胞壁の構成成分以外にも免疫系を活性化させる成分が存在する。例えば、鞭毛(Flagella)を持つ細菌は、鞭毛を構成するタンパク質としてフラジェリン(Flagellin)を産生する。Flagellin も細胞壁構成成分と同様に自然免疫系を活性化させるが、これは TLR5 を介したものであることが明らかにされた¹⁰⁾。

(5) TLR7, TLR8

ウイルスには DNA ウイルスや RNA ウイルスが存在する。その中で、RNA ウイルスが持つ一本鎖 RNA の認識に、TLR7 が必須であることが示された^{11,12)}。さらに TLR7 は、自然免疫系を活性化させる合成化合物をも認識する。ヒトパピローマウィルスの感染により発症する尖形コンジローマの治療薬として応用されている合成化合物 Imidazoquinoline は、IFN- α の発現を誘導することにより抗ウイルス作用を発揮する。TLR7 欠損マウスでは Imidazoquinoline による炎症性サイトカインの誘導が全く認め

られなかった¹³⁾。この結果は、TLR の活性化が種々の感染症治療の応用にもつながりうることを示している。

(6) TLR9

細菌のゲノム DNA には、“CpG 配列”と呼ばれる、強力な免疫賦活作用を有する病原体に特有の DNA 配列が存在する。特に CpG 配列を有する DNA は、細胞内寄生細菌に対して強力な生体防御反応を発揮する Th1 細胞の活性化を強く誘導する。この CpG DNA が TLR9 によって認識されることが、ノックアウトマウスの解析から明らかになった¹⁴⁾。CpG DNA は、細菌だけでなく DNA ウイルスのゲノムにも存在している。その結果、TLR9 ノックアウトマウスでは、Herpes Simplex Virus1, 2 などの DNA ウイルスに対する免疫応答が減弱している。

TLR を介した細胞内シグナル伝達

上述のように、TLR ファミリーの各メンバーが病原体の構成成分をそれぞれ特異的に認識することが明らかになった。TLR による病原体の認識は、種々の遺伝子発現を誘導する。その中には、IL-12, TNF- α , IL-6 などの炎症性サイトカイン、CD40, CD80, CD86 などの副刺激分子(co-stimulatory molecule)の遺伝子が含まれる。樹状細胞やマクロファージは従来病原体を貪食する細胞として知られていた。これら貪食細胞は抗原提示細胞として、病原体由来のペプチド抗原を MHC 分子と共に T 細胞に提示する。TLR の機能が明らかになった今、免疫系を見つめ直してみると、自然免疫系の細胞は、貪食による病原体由来のペプチド抗原の T 細胞への提示、そして TLR を介した炎症性サイトカインや副刺激分子の遺伝子発現により、抗原特異的な獲得免疫系、特に Th1 細胞分化を誘導することがわかる (図2)。このように、病原体を認識する TLR を介した自然免疫担当細胞での遺伝子発現は、獲得免疫系活性化への連携に重要な役割を担っている。

この TLR を介した遺伝子発現の誘導機構についても、シグナル伝達経路の解析からそのメカニズムが明らかになってきた。TLR ファミリーを介した細胞内シグナル伝達経路は、細胞質内に保存された TIR ドメインから開始される。そして、その下流でも、TIR ドメインを持った4種のアダプター (MyD88, TIRAP, TRIF, TRAM)が重要な役割を担っていることが明らかになってきた。特に、先に同定されていた MyD88 の解析から、TLR を介したシグナルには、MyD88 依存性のシグナルと MyD88 非依存性のシグナルがあって、異なる遺伝子発現の誘導を担っている。そして、TIR ドメインを持つアダプ

ター群がそれぞれのシグナルで特異的な働きをすることによって、自然免疫系の活性化が誘導されることが明らかになってきている。

MyD88 依存性のシグナル伝達経路

(1) MyD88

MyD88 ノックアウトマウスでは、TLR ファミリーの認識するすべての病原微生物の構成成分による炎症性サイトカインの産生が認められないことから、MyD88 が全ての TLR を介した炎症性サイトカインの誘導シグナルに必須であることが明らかになった¹⁵⁾。MyD88 は IRAK 4 (IL-1 receptor-associated kinase 4) と会合する。IRAK4 は、TLR 刺激により活性化され、同じファミリーの IRAK1 のリン酸化を誘導する。IRAK-1 欠損マウスでは、LPS に対する反応性が部分的に障害されていたが、IRAK-4 欠損マウスでは、すべての TLR リガンドに対する応答性が顕著に障害されていた¹⁶⁾。また遺伝的に細菌感染を繰り返す家系で、ヒト IRAK-4 遺伝子の変異が発見された¹⁷⁾。これらのことから、IRAK-4 が TLR を介したシグナルに重要な役割を果たしていると考えられる。IRAK の下流で作用する TRAF6 のノックアウトマウスも TLR に対する応答性が顕著に低下している¹⁸⁾。このように、MyD88 の下流では、IRAK4, 1、そして TRAF6 を介し、転写因子 NF- κ B が I κ B kinase (IKK) 複合体により活性化され、炎症反応が誘導される (図3)。

(2) TIRAP

MyD88 と同様に TIR ドメインを持つアダプターとして TIR domain-containing adaptor protein (TIRAP) のノックアウトマウスでは、TLR2 と TLR4 のリガンド刺激による炎症性サイトカインの産生に障害を認めたが、他の TLR 刺激に対する反応は正常であった^{19, 20)}。このことから、TIRAP は、TLR2 と TLR4 による MyD88 を介したシグナルに特異的に関与していることが明らかになった。

MyD88 非依存性シグナル伝達経路

MyD88 ノックアウトマウスでは TLR ファミリーによる炎症性サイトカインの産生が全く認められない。実際、TLR2, TLR7, TLR9 のリガンドで MyD88 ノックアウトマウス由来のマクロファージを刺激しても、NF- κ B の活性化は全く認められない。しかし、TLR4 リガンドで刺激した場合には、炎症性サイトカインの産生は全く認めないにもか

かわらず、NF- κ B の活性化は時間が遅れるものの正常マクロファージと同様に観察された²¹⁾。このことから、TLR4 を介したシグナルには、MyD88 依存性の炎症性サイトカインの産生に必須のシグナルと、MyD88 非依存性のシグナルが存在することが明らかになった。さらに、MyD88 非依存性のシグナルでは、TLR4 刺激により IFN- β および IP-10, GARG16 などの IFN 誘導性遺伝子が IRF3 の活性化を通して誘導されることが、明らかになった。また、TLR4 だけでなく TLR3 を介したシグナルでも、IRF3 の活性化を通じて IFN- β が誘導される。さらに、IRF3 の活性化を司るキナーゼが、IKK β と構造の似た IKK α /IKK ϵ と TBK1 であることが明らかになった²²⁾。このように MyD88 非依存性のシグナルが明らかにされてくる中で、このシグナルに必須のアダプターも明らかになった。

(1) TRIF

データベース検索により、MyD88, TIRAP に続いて発見された TIR ドメインを持つアダプター TRIF (TIR domain-containing adaptor inducing IFN- β)が発見された。TRIF ノックアウトマウスでは、TLR3 および TLR4 刺激による IRF3 の活性化、IFN- β と IFN 誘導性遺伝子の発現が著明に減弱していた²³⁾。また、TLR4 刺激に対する不応答性マウスを random mutagenesis により解析していたグループも、TRIF が TLR3 と TLR4 を介した MyD88 非依存性シグナルの活性化に必須であることを明らかにした²⁴⁾。この結果から、TRIF が TLR3, TLR4 を介した MyD88 非依存性のシグナルに必須であることが明らかになった。

(2) TRAM

さらにデータベース検索の結果、第4のアダプターとして TRAM (TRIF-related adaptor molecule)が同定された。TRAM ノックアウトマウスでは、TLR4 刺激による IRF3 活性化、IFN 誘導性遺伝子の発現に障害が認められたが、TLR3 刺激に対する応答性は正常であった²⁵⁾。このことから、TRAM は、MyD88 非依存性/TRIF 依存性のシグナルの中で TLR4 を介したシグナルに特異的に関与していることが明らかになった (図3)。

自然免疫系細胞の異常活性化と慢性大腸炎

上述のように、TLR およびそのシグナル伝達経路の解析から、自然免疫系の活性化機構の概要が明らかになってきた。この自然免疫系が、実際の免疫応答、なかでも炎症性

疾患の病態、と関わっていることも明らかになってきている。特に、自然免疫系と慢性炎症性腸疾患の関わりが、自然免疫系に属するマクロファージで IL-10 のシグナル伝達に必須の役割をはたす Stat3 の変異マウスの解析から明らかになった²⁶⁾。IL-10 は、自然免疫系細胞の活性を抑制すること、またノックアウトマウスの解析から個体レベルで慢性腸炎の発症抑制に重要な役割を担っていることが明らかになっている²⁷⁾。自然免疫系細胞特異的に Stat3 を欠損したマウスのマクロファージでは、IL-10 シグナルが消失し、TLR 刺激による TNF- α , IL-6, IL-12p40 などの炎症性サイトカインの産生が正常マクロファージに比べ顕著に増加し、CD80, CD86 などの細胞表面抗原の発現も亢進するなど、異常活性化を示した。さらに Stat3 変異マウスは、IL-10 ノックアウトマウスと同様の Th1 応答優位な慢性大腸炎を発症した。このことは、マクロファージなどの自然免疫系細胞における IL-10 による Stat3 の活性化が生体において慢性大腸炎を抑制するのに重要であり、その破綻による自然免疫系の異常活性化が慢性大腸炎の発症につながることを示している。

さらに、自然免疫系の異常活性化から慢性大腸炎に発症にいたるメカニズムが、Stat3 との二重変異マウスを数種類作製することにより、明らかにされた²⁸⁾。IFN- γ のシグナルに必須の Stat1 と Stat3 の二重変異マウス、TNF- α /Stat3 二重変異マウスでも慢性大腸炎は発症し、T ヘルパー細胞も Stat3 単独変異マウスと同様 Th1 に強くシフトしていた。一方、IL-12p40/Stat3 二重変異マウス、T 細胞のない RAG2/Stat3 二重変異マウスでは、まったく慢性大腸炎は発症しなかった。この結果から、負の活性制御機構の破綻した自然免疫系細胞から過剰に産生される IL-12p40 が Th1 細胞の分化を強く促し Th1 依存性の慢性大腸炎を引き起こすことが明らかになった。さらに、Stat3 と TLR4 の二重変異マウスでは、慢性腸炎の発症が有意に抑制され、また CD4 陽性 T 細胞からの IFN- γ 産生も減少していた。このことから、IL-10 のシグナルが消失すると、TLR がおそらく腸管の細菌叢を認識することにより自然免疫系細胞からの炎症性サイトカインの過剰産生を導き、慢性大腸炎の最初のトリガーとなることが明らかになった (図 4)。

大腸局所のマクロファージの機能

これらの結果は、大腸粘膜に局在する自然免疫系の細胞が炎症性サイトカインの産生が慢性大腸炎の発症に関与していることを示している。そこで、大腸粘膜固有層に存在する CD11b 陽性細胞 (マクロファージ系細胞) を高純度で単離し、TLR リガンド(LPS

や CpG DNA) に対する応答性を解析した²⁹⁾。脾臓の CD11b 陽性細胞は TLR 刺激により TNF- α , IL-6, IL-12p40 などの炎症性サイトカインを産生するが、大腸粘膜固有層由来の CD11b 陽性細胞はまったく産生しなかった。また、大腸粘膜固有層由来の CD11b 陽性細胞は刺激に関わらず恒常的に IL-10 の産生が見られた。次に、まだ大腸炎を発症していない若い IL-10 ノックアウトマウスあるいは Stat3 変異マウスから大腸粘膜固有層に存在する CD11b 陽性細胞を単離し、TLR リガンドに対する応答性を解析した。すると、正常マウスと違い炎症性サイトカインを有意に産生した。このように、大腸局所の自然免疫系細胞の TLR への応答性が、慢性大腸炎の発症と相関していた。そこで、正常マウスで大腸粘膜に局在する CD11b 陽性細胞が TLR に不応答になるメカニズムを、正常マウスと IL-10 ノックアウトマウスの細胞間で遺伝子発現の差を DNA microarray で比較することにより解析した。その結果、Bcl-3, IkBNS, CD163 などの遺伝子が正常マウスの大腸粘膜に局在する CD11b 陽性細胞に特異的に発現している遺伝子として同定された。Bcl-3, IkBNS 両遺伝子はアンキリンリピートをもった核に局在する IkB ファミリー分子である。これらの分子のマクロファージでの機能を解析した。Bcl-3, IkBNS 両遺伝子の mRNA が正常マウス由来の大腸粘膜 CD11b 陽性細胞には発現しているが、IL-10 ノックアウトマウス由来の細胞には発現していないことから、両遺伝子が他のマクロファージ (腹腔マクロファージやマクロファージ系細胞株 RAW264.7) での発現を解析したところ、両遺伝子ともに IL-10 により 1 時間以内に誘導された。

マクロファージにおける Bcl-3 の機能

まず、Bcl-3 をレンチウイルスシステムにより GFP とともにマクロファージ系細胞株 RAW264.7 に発現させ、LPS 刺激依存性の IL-6, TNF- α の産生を解析した。Bcl-3 を発現した細胞では、IL-6 産生に変化は認めないが、TNF- α の産生が著明に減弱していた³⁰⁾。次に、Bcl-3 ノックアウトマウス由来の腹腔マクロファージを IL-10 で前処置し、その後 LPS 刺激依存性の TNF- α , IL-6 産生を解析した。IL-6 産生は IL-10 前処置により正常マクロファージと同様に抑制された。一方、TNF- α 産生の IL-10 による抑制は、Bcl3 ノックアウトマウス由来のマクロファージでは、完全ではないものの有意に障害されていた。このことから、IL-10 で誘導される Bcl-3 は、LPS 刺激依存性の TNF- α 産生の抑制に特異的に関与していることが明らかになった。

Bcl-3 を発現したマクロファージでは、LPS 刺激による NF- κ B p50/p65 の DNA 結合能

が、IL-10 で前処置した細胞と同様に障害されていた。このように、Bcl-3 は、核内で NF- κ B の活性を制御し、TNF- α 産生を負に制御している。次に、クロマチン免疫沈降法により Bcl-3 が TNF- α のプロモーターに会合するかどうかを解析した。Bcl-3 を RAW 細胞に発現させ、その結果、Bcl-3 を発現させた細胞では、IL-6 プロモーターに Bcl-3 は会合しないが、TNF- α プロモーターには、LPS 刺激以前から会合していることが明らかになった。また、Bcl-3 は NF- κ B p50 と会合するが、Bcl-3 を発現させた細胞では、p50 が LPS 刺激前後にかかわらず TNF- α プロモーターに会合していることも明らかになった。これらの結果から、Bcl-3 が発現すると、Bcl-3 が転写活性のない p50 homodimer と会合し、TNF- α プロモーターに特異的に会合することにより、LPS 刺激依存性の転写活性の強い NF- κ B p50/p65 の DNA 結合を阻害する結果、TNF- α 産生を抑制していることが示唆された。

マクロファージにおける IkBNS の機能

次に、IkBNS をレンチウイルスシステムをもちいて GFP とともに RAW264.7 に発現させ、LPS 刺激依存性の IL-6, TNF- α の発現誘導を Northern blot 法で解析した。その結果、IkBNS を発現した細胞では、TNF- α の発現誘導に変化はないが、IL-6 の誘導が顕著に障害されていることが明らかになった。また RNAi により IkBNS の発現誘導を抑えると、TNF- α の誘導に変化はないが、IL-6 の誘導が有意に上昇した。この結果から、IkBNS は、IL-6 の発現誘導を選択的に抑制していることが明らかになった²⁹⁾。

IkBNS を発現したマクロファージでは、IkBNS が NF- κ Bp50 と選択的に会合し、また転写活性化能を持たない NF- κ B p50/p50 の IL-6 プロモーターの NF- κ B 結合領域への結合が刺激に関わらず極めて強く認められる。このように、IkBNS は、核内で NF- κ B の活性を制御していることが示唆された。

さらに、IkBNS の発現により IL-6 プロモーターの活性化は阻害されるが、TNF- α プロモーターの活性化は阻害されないことから、IkBNS は IL-6 プロモーターの活性化を選択的に阻害していることが示唆された。クロマチン免疫沈降法による解析から、IkBNS が IL-6 のプロモーターに p50 と共に選択的に TLR 刺激にかかわらず常にリクルートされていることが明らかになった。これらの結果から、IkBNS が発現すると、IkBNS が転写活性のない p50 homodimer と会合し、IL-6 プロモーターに選択的に会合することにより、TLR 刺激依存性の転写活性を有する NF- κ B p50/p65 の DNA 結合を阻害し、

IL-6 産生を抑制していることが示唆された (図 5)。

おわりに

免疫応答のトリガーとなる自然免疫系が、その以上活性化により慢性炎症性腸疾患の根本的原因となりうるということが明らかになった。そのため、大腸粘膜の局所では自然免疫担当細胞は様々なメカニズムでその活性が負に制御されている。この分子機構を明らかにすることにより、その破綻による慢性大腸炎の発症機構、さらには治療方法を確立していけることが期待される。

文献

- 1) Lemaitre B, Nicolas E, Michaut L, Reichhart J-M and Hoffmann JA: The dorsoventral regulatory gene cassette *spatzle/Toll/cactus* controls the potent antifungal response in *Drosophila* adults. *Cell* 86: 973-983, 1996
- 2) Medzhitov R, Preston-Hurlburt P and Janeway CA Jr: A human homologue of the *Drosophila* Toll protein signals activation of adaptive immunity. *Nature* 388: 394-397, 1997
- 3) Takeda K, Kaisho T, Akira S: Toll-like receptors. *Annu Rev Immunol* 21: 335-376, 2003
- 4) Takeuchi O, Hoshino K, Kawai T, Sanjo H, Takada H, Ogawa T, Takeda K and Akira S: Differential roles of TLR2 and TLR4 in recognition of Gram-negative and Gram-positive bacterial cell wall components. *Immunity* 11: 443-451, 1999
- 5) Takeuchi O, Kawai T, Muhlradt PF, Radolf JD, Zychlinsky A, Takeda K and Akira S: Discrimination of bacterial lipopeptides by Toll-like receptor 6. *Int Immunol* 13: 933-940, 2001
- 6) Takeuchi O, Sato S, Horiuchi T, Hoshino K, Takeda K, Dong Z, Modlin RL and Akira S: Role of TLR1 in mediating immune response to microbial lipoproteins. *J Immunol* 169: 10-14, 2002
- 7) Alexopoulou L, Holt AC, Medzhitov R and Flavell RA: Recognition of double-stranded RNA and activation of NF- κ B by Toll-like receptor 3. *Nature* 413: 732-738, 2001
- 8) Poltorak A, He X, Smirnova I, Liu MY, Huffel CV, Du X, Birdwell D, Alejos E, Silva M, Galanos C, Freudenberg M, Ricciardi-Castagnoli P, Layton B and Beutler B: Defective LPS signaling in C3H/HeJ and C57BL/10ScCr mice: mutation in *Tlr4* gene. *Science* 282: 2085-2088, 1998
- 9) Hoshino K, Takeuchi O, Kawai T, Sanjo H, Ogawa T, Takeda Y, Takeda K and Akira S: Cutting Edge: Toll-like receptor 4 (TLR4)-deficient mice are hyporesponsive to lipopolysaccharide: evidence for TLR4 as the *Lps* gene product. *J Immunol* 162: 3749-3752, 1999
- 10) Hayashi F, Smith KD, Ozinsky A, Hawn TR, Yi EC, Goodlett DR, Eng JK, Akira

- S, Underhill DM and Aderem A: The innate immune response to bacterial flagellin is mediated by Toll-like receptor-5. *Nature* 410: 1099-1103, 2001
- 11) Heil F, Hemmi H, Hochrein H, Ampenberger F, Kirschning C, Akira S, Lipford G, Wagner H, and Bauer S: Species-specific recognition of single-stranded RNA via Toll-like receptor 7 and 8. *Science* 303: 1526-1529, 2004
 - 12) Diebold SS, Kaisho T, Hemmi H, Akira S, and Reis E Sousa C: Innate antiviral responses by means of TLR7-mediated recognition of single-stranded RNA. *Science* 303: 1529-1531, 2004
 - 13) Hemmi H, Kaisho T, Takeuchi O, Sato S, Sanjo S, Hoshino K, Horiuchi T, Tomizawa H, Takeda K and Akira S: Antiviral low molecular weight compounds activate immune cells via TLR7 MyD88-dependent signalling pathway. *Nature Immunol* 3: 196-200, 2002
 - 14) Hemmi H, Takeuchi O, Kawai T, Kaisho T, Sato S, Sanjo H, Matsumoto M, Hoshino K, Wagner H, Takeda K and Akira S: A Toll-like receptor recognizes bacterial DNA. *Nature* 408: 740-745, 2000
 - 15) Takeda, K., and Akira, S.: Toll-like receptor signaling. *Nat. Rev. Immunol.* 4, 499-511, 2004.
 - 16) Suzuki N, Suzuki S, Duncan GS, Millar DG, Wada T, Mirtsos C, Takada H, Wakeham A, Itie A, Li S, Penninger JM, Wesche H, Ohashi PS, Mak TW and Yeh WC: Severe impairment of interleukin-1 and Toll-like receptor signalling in mice lacking IRAK-4. *Nature* 416: 750-756, 2002
 - 17) Picard C, Puel A, Bonnet M, Ku CL, Bustamante J, Yang K, Soudais C, Dupuis S, Feinberg J, Fieschi C, Elbim C, Hitchcock R, Lammas D, Davies G, Al-Ghonaium A, Al-Rayes H, Al-Jumaah S, Al-Hajjar S, Al-Mohsen IZ, Frayha HH, Rucker R, Hawn TR, Aderem A, Tufenkeji H, Haraguchi S, Day NK, Good RA, Gougerot-Pocidalo MA, Ozinsky A and Casanova JL: Pyogenic bacterial infections in humans with IRAK-4 deficiency. *Science* 299: 2076-2079, 2003
 - 18) Gohda J, Matsumura T and Inoue J: Cutting Edge: TNFR-associated factor 6 is essential for MyD88-dependent pathway but not Toll/IL-1 receptor domain-containing adaptor-inducing IFN- β -dependent pathway in TLR signaling.

- 19) Horng T, Barton GM, Flavell RA and Medzhitov R: The adaptor molecule TIRAP provides signaling specificity for Toll-like receptors. *Nature* 420: 329-333, 2002
- 20) Yamamoto M, Sato S, Hemmi H, Sanjo H, Uematsu S, Kaisho T, Hoshino K, Takeuchi O, Kobayashi M, Fujita T, Takeda K and Akira S: Essential role of TIRAP for activation of the signaling cascade shared by TLR2 and TLR4. *Nature* 420: 324-329, 2002
- 21) Kawai T, Adachi O, Ogawa T, Takeda K and Akira S: Unresponsiveness of MyD88-deficient mice to endotoxin. *Immunity* 11: 115-122, 1999
- 22) Sharma S, tenOever BR, Grandvaux N, Zhou GP, Lin R and Hiscott J: Triggering the interferon antiviral response through an IKK-related pathway. *Science* 300: 1148-1151, 2003
- 23) Yamamoto M, Sato S, Hemmi H, Hoshino K, Kaisho T, Sanjo H, Takeuchi O, Sugiyama M, Okabe M, Takeda K and Akira S: Role of adaptor TRIF in the MyD88-independent Toll-like receptor signaling pathway. *Science* 301: 640-643, 2003
- 24) Hoebe K, Du X, Georgel P, Janssen E, Tabeta K, Kim SO, Goode J, Li P, Mann N, Mudd S, Crozat K, Sovath S, Han J and Beutler B: Identification of *Lps2* as a key transducer of MyD88-independent TIR signalling. *Nature* 424: 743-748, 2003
- 25) Yamamoto M, Sato S, Hemmi H, Uematsu S, Hoshino K, Kaisho T, Takeuchi O, Takeda K and Akira S: TRAM is specifically involved in the TLR4-mediated MyD88-independent signaling pathway. *Nat Immunol* 4: 1144-1150, 2003
- 26) Takeda, K. et al.: Enhanced Th1 activity and development of chronic enterocolitis in mice devoid of Stat3 in macrophages and neutrophils. *Immunity* 10: 39-49, 1999.
- 27) Kuhn R, Lohler J, Rennick D, Rajewsky K, and Muller W.: Interleukin-10-deficient mice develop chronic enterocolitis. *Cell* 75: 263-274, 1993.
- 28) Kobayashi M, Kweon M, Kuwata H, Kiyono H, Takeda K, and Akira S.: Toll-like receptor-dependent IL-12p40 production causes chronic enterocolitis in myeloid cell-specific Stat3-deficient mice. *J. Clin. Invest.* 111: 1297-1308, 2003.

- 29) Hirotsu T, Lee PY, Kuwata H, Yamamoto M, Matsumoto M, Kawase I, Akira S, and Takeda K: The nuclear I κ B protein I κ BNS selectively inhibits LPS-induced IL-6 production in macrophages of the colonic lamina propria. *J. Immunol.* 174: 3650-3657, 2005.
- 30) Kuwata H, Watanabe Y, Miyoshi H, Yamamoto M, Kaisho T, Takeda K, and Akira S: IL-10-inducible Bcl-3 negatively regulates LPS-induced TNF- α production in macrophages. *Blood* 102: 4123-4129, 2003.

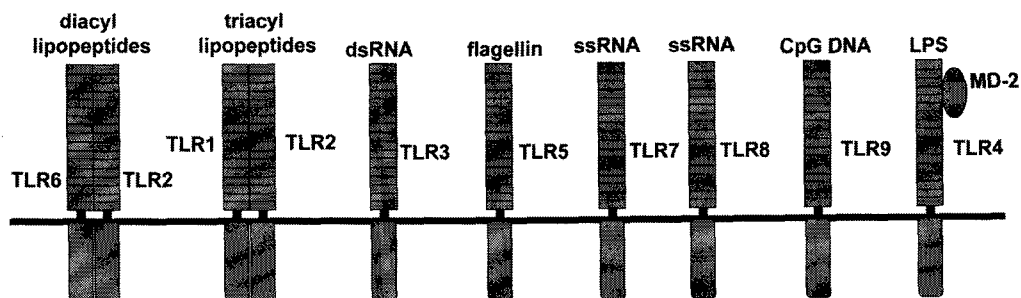


図1 TLR ファミリーとそのリガンド

TLR4 は LPS の認識に必須の受容体である。一方、TLR2 はリポペプチドの認識に必須の受容体である。TLR6 は TLR2 と会合し、マイコプラズマ由来のジアシルリポペプチドを識別する。TLR1 は TLR2 と会合し、細菌由来のトリアシルリポペプチドを識別する。TLR5 は鞭毛タンパク質（フラジェリン）を認識する。TLR9 は細菌やウイルス由来の CpG DNA の認識に必須である。そして、TLR3 はウイルス由来の二本鎖 RNA の認識に関与する。一方、TLR7 はウイルス由来の一本鎖 RNA を認識する。

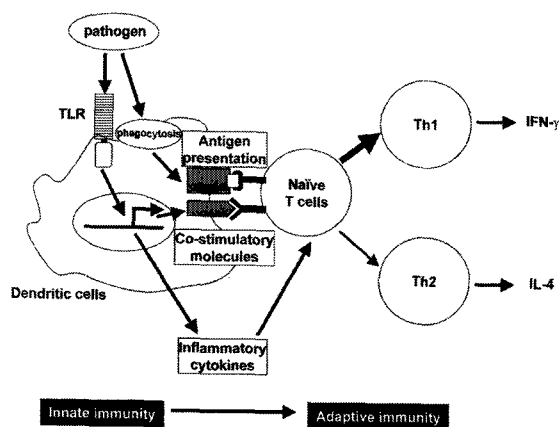


図2 自然免疫系と獲得免疫系

自然免疫系に属するマクロファージや樹状細胞は、病原体に曝されると、貪食により病原体を取り込み消化分解するとともに、病原体由来のペプチド抗原を MHC 抗原と共に T 細胞に提示する。さらに、TLR が病原体構成成分を特異的に認識し炎症性サイトカインや副刺激分子などの遺伝子発現を誘導する。貪食による抗原提示、TLR を介した炎症性サイトカイン、副刺激分子などの遺伝子発現の全てが相まって、抗原特異的な獲得免疫系を誘導する。

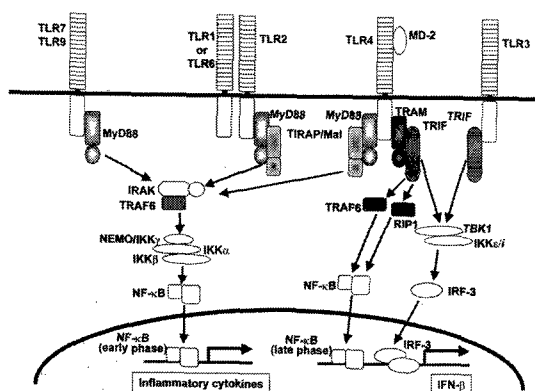


図3 TLR を介したシグナル伝達経路

TLR を介したシグナル伝達経路は、細胞質内に保存された TIR ドメインから開始される。TIR ドメインを持ったアダプター MyD88 を介し、IRAK (IRAK-4, IRAK-1) が活性化される。そして TRAF6 を介し、IKK α , IKK β , NEMO/IKK γ からなる IKK 複合体が活性化され、転写因子 NF- κ B が最終的に活性化される。このシグナルにより、TNF- α , IL-12 などの炎症性サイトカインが誘導される。TIR ドメインを持つアダプター TIRAP は、TLR2 と TLR4 を介したシグナルに特異的に関与している。TLR3, TLR4 を介したシグナルでは、MyD88 非依存性のシグナル伝達経路が存在す

る。TIR ドメインを持つアダプターTRIF がこのシグナルに必須の役割を果たしている。TRIF の下流で IKK/IKK ϵ と TBK1 により転写因子 IRF3 が活性化され、IFN- β が誘導される。TRAM は、TLR4 を介した MyD88 非依存性/TRIF 依存性のシグナルに特異的に関与している。

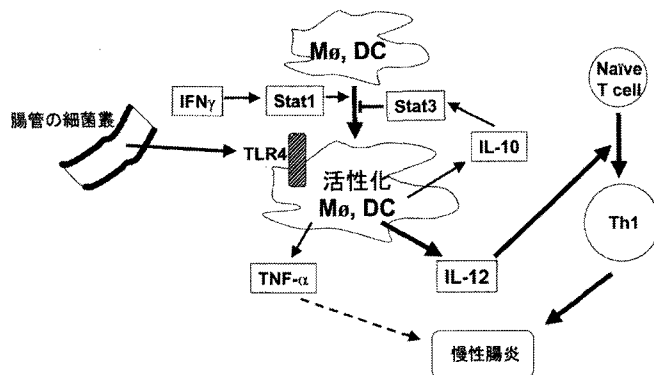


図 4 自然免疫系異常活性化と慢性大腸炎

IL-10 のシグナルに必須の Stat3 が欠失すると、マクロファージ(M ϕ)、樹状細胞(DC) が異常活性化され、TLR による腸管内細菌叢の構成成分認識により炎症性サイトカインを過剰産生する。その中で過剰産生された IL-12 が、T 細胞を Th1 型へ強く誘導することにより、Th1 細胞依存性の慢性腸炎の発症にいたる。

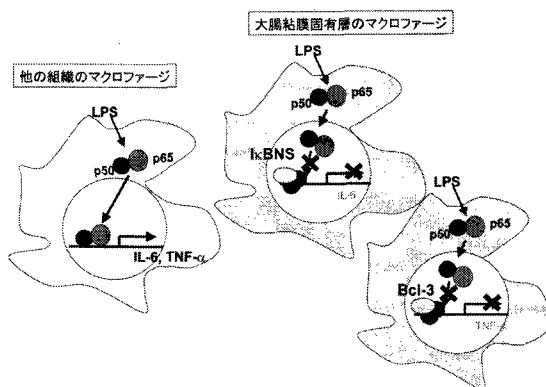


図 5 Bcl-3, I κ BNS による TNF- α , IL-6 産生の抑制機構

大腸粘膜に局在するマクロファージは、Bcl-3、I κ BNS が核内に恒常的に発現している。Bcl-3、I κ BNS は、NF- κ B p50 homodimer と会合し、それぞれ TNF- α , IL-6 プロモーターに選択的に結合することにより、LPS 刺激依存性の転写活性を持つ NF- κ B p50/p65 heterodimer の DNA 結合を阻害することにより、TNF- α , IL-6 産生を抑制する。

〈第86回研究会（平成17年6月10日）〉

テーマ：受精機構の神秘を解く

1. アンギオテンシン変換酵素(ACE)の新機能：

GPIアンカー型蛋白質遊離と受精への関与

近藤 玄（京都大学再生医科学研究所）

2. 精子が卵子と出会うまで

馬場 忠（筑波大学生命環境科学研究科）

3. 遺伝子操作動物を通して見る受精のメカニズム

岡部 勝（大阪大学微生物病研究所）

アンギオテンシン変換酵素(ACE)の新機能：
GPI アンカー型タンパク質遊離と受精への関与

京都大学再生医科学研究所
近藤 玄

はじめに

我々は、グリコシルフォスファチジルイノシトールアンカー(GPI アンカー)型タンパク質の代謝メカニズムを解明する目的で、同タンパク質遊離因子のひとつとしてマウス精巢よりアンギオテンシン変換酵素(ACE)を単離した。また、ACE の GPI アンカー型タンパク質遊離活性(以下 GPIase 活性とよぶ)が、精子の受精能に重要な役割を担っていることを見出した。本発表では、これまでの研究の経緯について以下のように発表した。

1. GPI アンカー型タンパク質とは

1) GPI アンカー型タンパク質の構造

細胞膜リン脂質のひとつでありシグナルメディエーターとしてよく知られているフォスファチジルイノシトールに3つのマンノースと1つのグルコサミンよりなる糖鎖が結合したものをグリコシルフォスファチジルイノシトール(GPI)という。この構造にエタノールアミンリン酸を介してタンパク質が結合するが、このような形で細胞膜上に繫留しているタンパク質を総称して GPI アンカー型タンパク質という。

2) GPI の機能

- i) 細胞膜の外側に GPI アンカー型タンパク質を繫留する。
- ii) 頂端側形質膜や分泌顆粒に GPI アンカー型タンパク質をソーティングする。
- iii) GPI アンカー型タンパク質を細胞膜ラフトに集積する。
などの機能が知られている。

3) 代表的な GPI アンカー型タンパク質

GPI アンカー型タンパク質は、機能的に多岐にわたる。

- i) 加水分解酵素
アルカリフォスファターゼ、カルボキシペプチダーゼ M、PH-20 (ヒアルロニダーゼ)、MT4-MMP、TESP5、アセチルコリンエステラーゼなど。
- ii) 細胞表面抗原
CEA、N-CAM、IgD、Sca-1、CD24、TCR β 、Thy-1、CD52、CD55、CD58、CD59 など。
- iii) 受容体
ウロキナーゼレセプター、葉酸レセプター、CNTF レセプター、LPS レセプターなど。

- iv) リガンド
エフリン A
- v) その他
プリオンタンパク質

2. GPI アンカー型 GFP の構築とトランスジェニックマウスの作製・解析

我々は、GPI アンカー型タンパク質の生体内での分布や代謝メカニズムの解明を行うため、まず、GPI アンカー型 GFP(EGFP-GPI)をレポーター分子として構築し、これを導入したトランスジェニックマウスを作製した。

1) GPI アンカー型 GFP の構築と培養細胞での発現

EGFP の N 末端側に精子分泌タンパク質アクロシンの膜貫通シグナル配列および N 糖鎖結合配列を、また C 末端側に Thy-1 の GPI アンカーシグナル配列を連結したキメラタンパク質を構築した。これを培養細胞に導入すると EGFP-GPI が形質膜およびゴルジ体に局在することがわかった。また、EGFP-GPI 発現細胞を細胞分画したところ、EGFP-GPI は、形質膜とミクロソーム画分にのみ存在し、さらにショ糖密度勾配により分画すると細胞膜ラフトに集積していることがわかった。

2) トランスジェニックマウスの作製と解析

EGFP-GPI コンストラクトをあらゆる組織で発現可能な CAAG プロモーターの下流に連結したのち、トランスジェニックマウスを作製した。このマウスの各臓器における EGFP-GPI の発現と局在を調べたところ、解析したすべての臓器において同分子が細胞膜表面上に発現していた。また、神経系や上皮系組織では、EGFP-GPI の頂端側局在化がみられ、さらに、唾液腺、膵臓、精囊等の外分泌腺や精巣においては分泌液中への著明な遊離・放出が観察された。

3. GPI アンカー型タンパク質遊離因子の単離とその特性

そこで、この現象を担当している分子を同定すれば、形質膜-ゴルジ体間小胞輸送による代謝経路につづく新たな GPI アンカー型タンパク質代謝メカニズムを発見できると考えた。その前に、既存の GPI アンカー型タンパク質遊離因子である GPI-PLD の発現を精巣において調べたところ、間質細胞では発現していたものの生殖細胞そのものでは発現していなかった。そこで、界面活性剤による可溶性の違いを利用したアッセイ法を考案し、これを用いてマウス精巣生殖細胞抽出液から GPI アンカー型蛋白質遊離因子を単一精製した。プロテオミクス解析の結果、この分子はアンギオテンシン変換酵素(ACE)であった。

1) アンギオテンシン変換酵素(ACE)とは

ACE は、血圧・体液ホメオスタシスの維持システムとして重要なレニン-アンギオテンシン-ブラディキニン系の中心的な役割を担う金属プロテアーゼで、酵素学的には、ジペプチジルカルボキシペプチダーゼ活性を持つ。その基質としては特にアンギオテンシン I とブラディキニンが重要であり、前者を活性化

し、また後者を不活性化することにより血管収縮をひきおこし血圧上昇をもたらす。またアンギオテンシン I は副腎皮質球状層細胞のアルドステロン合成・分泌を促進し、これは腎遠位尿細管からの水分再吸収を促すことから、体液量の調節とイオンバランスの維持にも深く寄与していることがよく知られている。また、カプトプリルをはじめとする ACE 阻害剤は、高血圧や心不全の治療薬として広く用いられている。一方、ACE ノックアウトマウスでは、低血圧に加えて、雄性不妊や腎内動脈の肥厚といった従来の活性からは説明できない表現型が見られる。また、これらの表現型は、上記基質の前駆体であるアンギオテンシノーゲンノックアウトマウスでは見られないことから、ACE には未だ知られていない機能が存在することが示唆されていた。

2) ACE の GPIase 活性の特性

次に GPIase 活性の特性を調べた。この活性は、ACE 阻害剤である Captopril に不応性であり、さらに従来の活性中心を破壊した変異体でも残存していたことから、別の領域に活性中心が存在することが示唆された。また、ACE は、細胞表面より各種 GPI アンカー型タンパク質を shedding するが、これは、同タンパク質が局在する細胞膜ラフトを、filipin 処理により破壊したとき増強された。このとき遊離されたタンパク質分子には GPI アンカーの一部が残存していたことから、ACE は GPI アンカーそのものを切断することが判明した。

3) ACE 新機能の受精への関与

雄性生殖細胞では、精巣型 ACE が特異的に発現している。この発現は、精子形成の開始と同時に上昇する。そこで、精巣の GPIase 活性を調べたところ、やはり精子形成の開始にあわせて上昇することがわかった。このことから、本活性が精子形成や受精に関与していることが示唆された。

ACE ノックアウトマウスは、精子の子宮卵管通過障害および精子-透明帯結合不全による雄性不妊を示す。そこで、特に精子-透明帯結合への関与に着目し、まず同マウスの精子における GPI アンカー型タンパク質の局在を調べたところ、TESP5 や PH-20 など受精に関与する GPI アンカー型タンパク質が遊離されていなかった。また、この精子を野生型 ACE、変異型 ACE および GPI アンカー型タンパク質を遊離することで知られている PI-PLC にて処理すると、精子-透明帯結合が回復した。これらのことから、ACE は精子表面から GPI アンカー型タンパク質を遊離し、精子-透明帯結合を促進していることが示唆された。

4. まとめ

この研究により、ACE は二つの機能を持つ酵素であることがわかった。すなわち、従来のペプチダーゼ活性により血圧調節を司り、GPIase 活性により受精に関与している。今後は、ACE の生殖細胞での新たな基質同定を含めた GPIase 活性の分子メカニズムの解明が急がれる。

精子が卵子と出会うまで

筑波大学大学院生命環境科学研究科

馬場 忠

とにかく受精というと精子と卵子が融合・合体することと思われがちですが、実際に研究してみると、とても複雑で奥が深いことに驚きます。精子が卵子に出会うまでの過程でも、精子には目が回るほど「いろいろな修飾」や「過酷な障害」が待ち構えています。膨大な数の精子が精巣で丹念に作られても、実際にその「任務」を果たせる精子が普通は1匹/回しかないということでもわかると思います。

私たち人間は、この過酷な精子のサバイバルゲームを何とかスキップしようとして、さまざまな工夫を凝らし知恵を絞ってきました。精巣上体（副精巣）精子や射出精子を用いた体外受精（IVF）と顕微授精（ICSI）などはよい例ですが、あたかも精子が卵子に出会うまでの過程に意味のないような錯覚が広がっています。しかし、さまざまな遺伝子のノックアウトマウスの解析が進んだ結果、「精子が卵子と出会うまで」の過程で明らかになっていない重要なことがわかりはじめてきました。

ADAM(A Disintegrin and Metalloprotease)は精子と卵子の細胞膜融合に関与するタンパク質 PH-30 として発見されましたが、実際には ADAM1 と ADAM2 のヘテロ複合体ファーターリンとして機能しています。また、マウスでは ADAM1 は ADAM1a と ADAM1b のサブタイプで構成され、それぞれ精巣精細胞小胞体と精子細胞膜に局在しています¹。ADAM1a の機能を明らかにするために、ノックアウトマウスを作製して調べてみました²（図1）。

ADAM1a が精巣だけに存在しているので、精巣精細胞で何らかの欠陥が出ることを期待していました。ところが、精巣にはまったく異常が認められないにもかかわらず、ADAM1a 欠損オスマウスは不妊になりました。なぜ不妊になるのかを順を追って調べてみました。まず、精巣での精子形成機能を組織学的に調べてみましたが、まったく異常は見られませんでした。また、精巣上体（副精巣）精子の数や形態、および運動性も野生型とまったく同じでした。したがって、ADAM1a 欠損オスマウスの不妊原因は、自然交尾させたあとの雌性生殖器官内の精子挙動に起因していることが推察されました。そこで、自然交尾後の精子を調べてみると、子宮内へ放出された精子数には異常がありませんでしたが、輸卵管へ上昇している精子数に大きな差異が見いだされました（図2）。マウスでは輸卵管の先端が子宮に突きさった形になっていますが、その部位を組織学的に調べてみると、ADAM1a 欠損マウス精子は子宮内腔で認められましたが、輸卵管にはまったく存在していませんでした。次に、精子と卵

子の相互作用について調べてみました。ADAM1a 欠損マウス精子の体外受精率には異常がありませんでしたが、精子の卵子透明帯結合能が著しく低下していることがわかりました(図3)。これらの結果から、ADAM1a 欠損マウス精子では、子宮から輸卵管への移動不全と透明帯結合能に異常があり、このためにそのマウスが不妊になっていることが明確になりました。

ADAM1a 欠損マウスの不妊原因はわかりましたが、なぜなのかがわかりませんでしたので、分子レベルで検討を加えてみました。ADAM1a は精巣精細胞で ADAM2 とヘテロ複合体を形成していますので、まずその有無を調べてみました。予想通り、ADAM1a 欠損マウスでは ADAM1a の欠損によって、ADAM1a/ADAM2 ヘテロ複合体ファーターリンは形成されていませんでしたが、ADAM1b/ADAM2 ファーターリンはほぼ正常に存在していました。また、精子細胞膜に存在する代表的なタンパク質を調べてみると、ADAM1a 欠損マウス精子には ADAM3 だけがほとんどないことがわかりました(図4)。ADAM1a 欠損マウス精巣では野生型と同程度の ADAM3 が生合成されていたので、ADAM3 が合成後に精子細胞膜へ運搬される過程で何らかの異常が生じていると考えました。ADAM3 を欠損するマウス精子が卵子透明帯と結合しないことはすでに明らかにされていますが³、ひょっとするとこのタンパク質が精子の子宮から輸卵管への移動でも機能している可能性が残されています。

このように、ADAM1a/ADAM2 ファーターリンは ADAM3 の精子細胞表層移行で重要な役割を果たしていて、それが精子ではなく精巣精細胞でコントロールされていることが明確になりました。最も重要なことは、精子が卵子に出会う前に雌性生殖器内ですでに制御を受けていることのように思われます。精子の子宮から輸卵管への移動制御は、カルメジンや ADAM2 の欠損マウスでも報告されていますので^{4, 5}、普遍的な機構と解釈できるような気がします。他方、子宮や輸卵管で精子の受精能が賦与されていることも推測されていますが、いまだに明確になっていません。今後とも、これらの現象が分子レベルで明らかにされていくことを期待しています。

- (1) Kim, E., Nishimura, H., and Baba, T. Differential localization of ADAM1a and ADAM1b in the endoplasmic reticulum of testicular germ cells and on the surface of epididymal sperm. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **304**: 313-319, 2003.
- (2) Nishimura, H., Kim, E., Nakanishi, T., Okabe, M., and Baba, T. Possible function of the ADAM1a/ADAM2 fertilin complex in the appearance of ADAM3 on the sperm surface. *J. Biol. Chem.*, **279**: 34957-34962, 2004.
- (3) Shamsadin, R., Adham, I. M., Nayernia, K., Heinlein, U. A. O., Oberwinkler, H. and Engel, W. Male mice deficient for germ-cell cyritestin are infertile. *Biol. Reprod.* **61**: 1445-1451, 1999.
- (4) Ikawa, M., Wada, I., Kominami, K., Watanabe, D., Toshimori, K., Nishimune, Y. and Okabe, M. The putative chaperone calmeglin is required for sperm fertility. *Nature* **387**: 607-611, 1997.

- (5) Cho, C., Bunch, D. O., Faure, J. -E., Goulding, E. H., Eddy, E. M., Primakoff, P. and Myles, D. G. Fertilization defects in sperm from mice lacking fertilin β . *Science* **281**: 1857-1859, 1998.

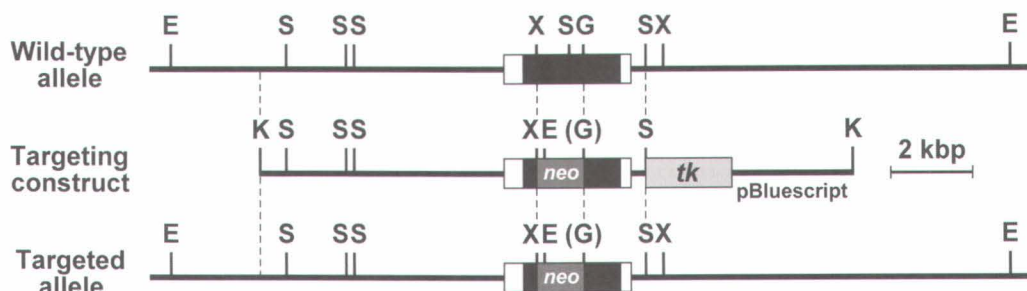


図 1 : ADAM1a 欠損マウスの作製。ナオマイシン耐性遺伝子と ADAM1a 遺伝子の置換によってノックアウトマウスが作製されたことがわかる。

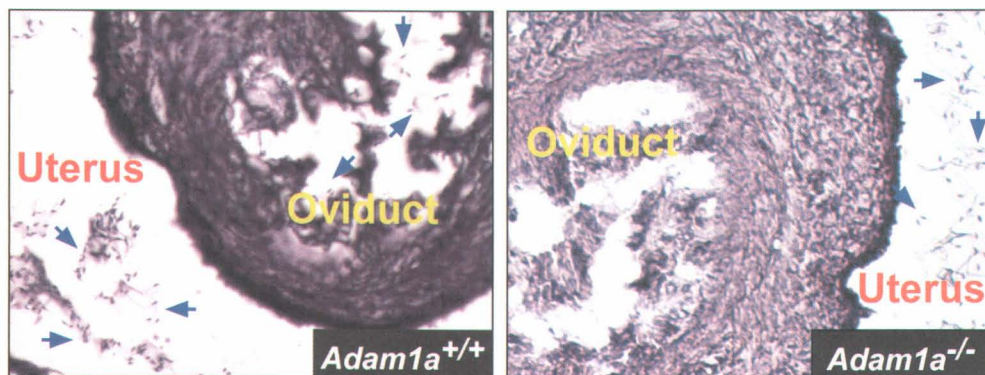


図 2 : ADAM1a 欠損マウス精子の子宮から輸卵管への移動不全。ADAM1a 欠損マウスでは、精子 (矢印) が輸卵管へ上がっていないことがわかる。

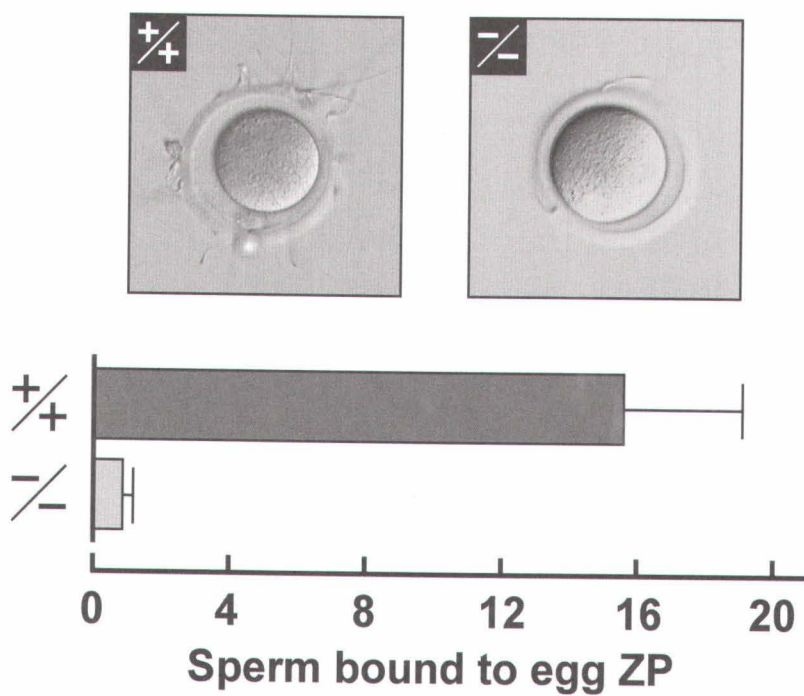


図 3 : ADAM1a 欠損マウス精子の卵子透明帯結合能不全。ADAM1a 欠損マウスでは，精子が透明帯へほとんど結合できないことがわかる。

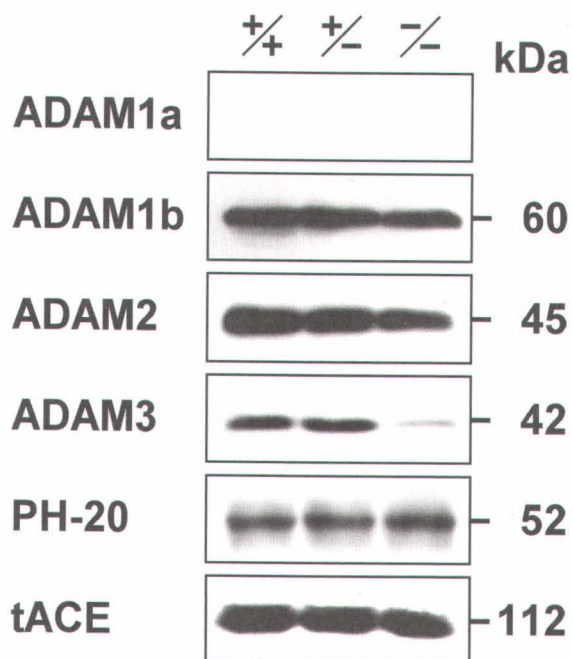


図 4 : 精子細胞膜タンパク質の存在の有無。ADAM1a 欠損マウス精子には，ADAM3 がほとんど含まれていないことがわかる。

遺伝子操作動物を通して見る受精のメカニズム

大阪大学微生物病研究所

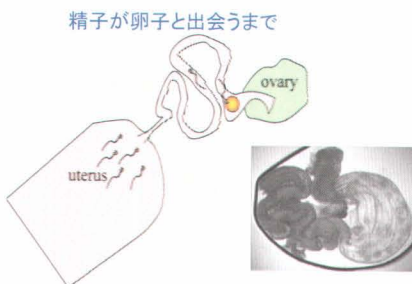
遺伝情報実験センター

岡部 勝

遺伝子改変動物を使用するとこれまでの生化学的な解析では見えなかった反応を明らかにすることができる。たとえば、われわれは全身から緑色の蛍光を発する“グリーンマウス”を作製し、その中からX染色体にトランスジーンが入ったものを利用して、これまで非常に困難であった着床前の胚の雌雄の分別を簡単に行えるような系を作製している。この系を用いて雌雄キメラを作製すると精巣内に「卵子」ができることを見出すことができた⁽¹⁾。このほか、雄性生殖細胞の研究では精子の先体内にGFPを発現するトランスジェニックマウスを作製し、これまでマウスでは観察が難しかった先体反応を可視化することに成功したので遺伝子ノックアウトマウスの生殖能力の検討に使用できるようになっている。

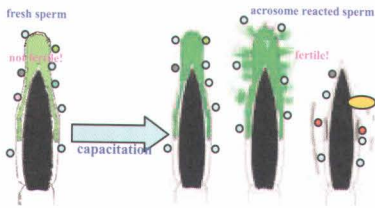
これらトランスジェニックマウス以外に遺伝子破壊動物を用いた実験が広く行われるようになり、個体レベルにおける遺伝子の機能解析がなされている。その結果、さまざまな遺伝子の役割を遺伝子欠損動物個体に現れるフェノタイプとして認識できるようになり、多くの研究成果があげられている。受精の分野においても遺伝子操作動物を用いた解析が進み、これまで受精のメカニズムに関して広く信じられてきた事柄が否定されたり、大幅な修正を加えられたりしているほか、これまでまったく知られなかった因子が新たに重要な役割を担っていることなどが明らかにされつつある。

われわれは以前、精巣特異的な分子シャペロンであるカルメジンを持たない遺伝子改変マウスを作製した。その結果、その精子は形態や運動性は正常であるが、卵子を取り囲む透明帯と結合できないことを見いだした。その後、カルメジンノックアウトマウスと同様のフェノタイプがADAM2 ノックアウトマウスにおいても報告された。われわれはカルメジン欠損マウスの精巣抽出物を用いた免疫沈降実験などから、これら2種類の遺伝子欠損マウスが非常によく似た不妊のフェノタイプを示した理由は、カルメジンがADAM2と特異的に結合し、シャペロンとしてADAM2を膜へ移行させているためであることを示した。ADAM2はもともと精子と卵子の融合に働く遺伝子であると言われてきたが、ノックアウト実験により融合には影響しないことが明らか



となった。同じくノックアウト実験で卵子ではCD9が精子との融合能に必須であることが報告されたが精子側の融合にかかわる因子については長らくの間、不明であった。精子が卵子と出会うまでには多くの難関が待ち受けているが、それらをクリアした精子は卵子と癒合して、遺伝情報を次世代へと伝えることができる。

Search for fertilization related antigen by

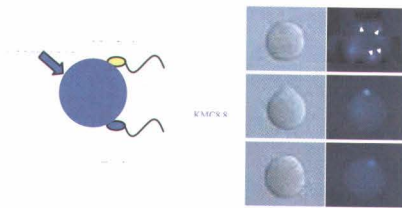


精子と卵子の融合に関与する因子はいったい何なのかは長いあいだ研究が進められてきたがよくわかっていない。われわれは精子に対するモノクローン抗体を作製して、受精能をもった精子にのみ反応して、しかも受精を阻害するものがとれれば、その抗原をあきらかにすることにより融合関連因子が明らかにできるとかんがえた。

このようにしてとられてきたモノクローン抗体の OBF13 である。この抗体は新鮮な精子とは全く反応せずに、精子をインキュベーションすると初めて反応性が現れる。とくに透明帯を通過した精子では頭部全体が反応するようになる。



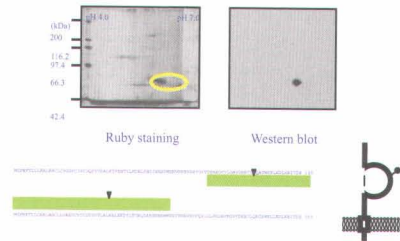
OBF13 inhibits sperm-egg fusion



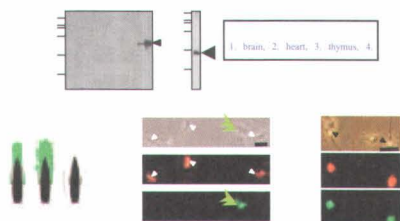
卵子に色素を入れておいてから精子をくわえると融合した精子のみが染色される。このような系を用いて、この抗体の受精に及ぼす影響を観察したところ、この抗体は精子と卵子の融合を阻害することが明らかになった。

精子を 2 次元電気泳動してウエスタンブロットによりその位置を確認すると右図の位置にスポットを同定することができた。そこでこの部分を切り取り LC/MSMS 解析を行ったところ、この遺伝子は意味のグロブリンスーパーファミリーの構造を持つことがわかった。

Izumo is a novel immunoglobulin superfamily



Expression profile and localization of



この遺伝子の発現を体の各臓器において調べたが精巣と精子以外には反応せず、精子に特異的なたんぱく質であることがわかった。

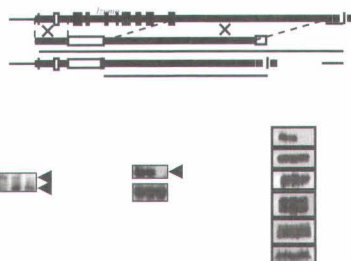
ヒトの相同遺伝子も存在したので、その配列を元に抗体を作製し、精子上の存在を確認したところ、マウスの場合と同じように新鮮な精子とは反応しない

が先体反応をおこした精子の頭部全体と反応することがわかった。

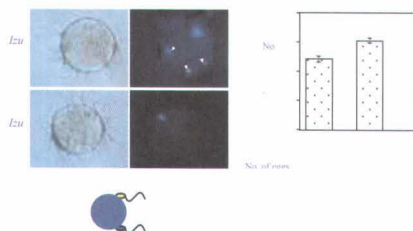
そこでこの遺伝子の機能を明らかにするために、右図のようなターゲティングベクターを作製し ES 細胞を使った相同組換えをおこない、ノックアウトマウスを作製した。

このようにして作製したマウスの精子からはこの抗原がなくなっていることが確認された。

Strategy for targeted disruption of *Izumo*



Fusion assay using *Izumo*^{-/-}

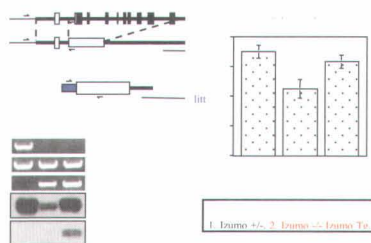


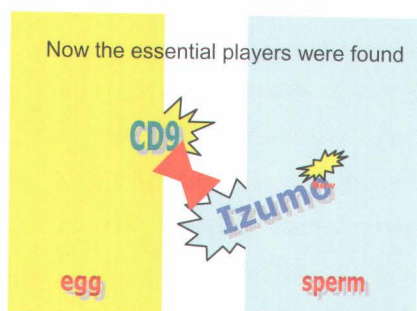
ノックアウトマウスの雄を野生型の雌と交配することにより、精子の受精能を測定したが、この遺伝子を欠損させることにより、雄は完全に不妊となった。しかもその作用点は精子と卵子の融合のステップであることが明らかになった。

このようなフェノタイプが本当にこの遺伝子の働きを失わせたことによるものであるのかどうかを明らかにするために、ノックアウトマウスにこの遺伝子の cDNA をトランスジーンとして導入して、その受精能をみたところ、見事に受精能は回復した。したがってこの遺伝子はまちがいに受精の融合のステップに働いていることが証明された。

この遺伝子はこれまで知られていなかったもので、縁結びの神様をまつた出雲大社にちなんで *Izumo* と命名した。⁽²⁾

Rescued fertility of *Izumo*^{-/-} male by transgene





今回の発見により、ようやく精子と卵子の双方で受精の融合のステップに関与するものが明らかになった。このような研究は、これまでの生化学的な手法に比べてより直接的にその因子が受精に必須なものであるのかどうかを検証することができる。遺伝子組換え動物は今後ますます盛んに利用されて受精や不妊のメカニズムの解明が進んでゆくものと思われる。

(1) Proc Natl Acad Sci U S A., 102, 4039–44 (2005)

(2) Nature, 434, 234–8 (2005)

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 25 号に掲載した第 83 回研究会以後、以下の研究会が開催された。

- 1) 第 84 回研究会（平成 16 年 12 月 10 日 於京都市勧業館「みやこめっせ」）
会員による研究発表（16 題）

＜特別講演＞

岡村 均（神戸大院・医・脳科学・分子脳科学）

身体の時間を刻む時計遺伝子

横山尚彦（京都府立医大院・医・生体機能形態科学）

遺伝的変異体の作成とその形態形成機構解明への応用

- 2) 第 85 回研究会（平成 17 年 3 月 4 日 於京大会館）

＜講演会＞ テーマ：腸内フローラについて学ぶ

1. 腸内フローラと生体反応

伊藤喜久治（東京大院・農・獣医公衆衛生学）

2. 腸内フローラと Toll-like receptor

竹田 潔（九州大学生体防御医学研究所・発生工学分野）

＜維持会員ニュース＞

（株）環境バイリス研究所：環境バイリス研究所における薬効評価試験法の紹介

－消化器系及び炎症系薬効試験モデルについて－

- 3) 第 86 回研究会（平成 17 年 6 月 10 日 於大阪大学医学部学友会館「銀杏会館」）

＜講演会＞ テーマ：受精機構の神秘を解く

1. アンギオテンシン変換酵素(ACE)の新機能：GPI アンカー型蛋白質遊離と受精への関与

近藤 玄（京都大学再生医科学研究所）

2. 精子が卵子と出会うまで

馬場 忠（筑波大・院・生命環境科学研究科）

3. 遺伝子操作動物を通して見る受精のメカニズム

岡部 勝（大阪大・微生物病研究所・遺伝情報実験センター）

＜維持会員ニュース＞

(株) 島津製作所：島津製作所の取り組み：分析機器から受託解析、試薬まで

4) 第 87 回研究会（平成 17 年 9 月 2 日 於京大会館）

＜講演会＞テーマ：個体レベルの遺伝子操作による中枢神経系の発生と機能の解析

1. 哺乳動物のneuronal identity 決定の分子機構

斎藤哲一郎（千葉大院・医・発生生物学領域）

2. 代謝型グルタミン酸受容体遺伝子操作マウスを用いた小脳の機能解析

饗場 篤（神戸大院・医・分子細胞生物学）

＜維持会員ニュース＞

1. (株) 新日本科学：SNBL China（新日本科学中国霊長類出国検疫施設）について

2. (株) ティー・ティー・エム：医療・健康産業へのポータルサイトとしての活動

～DNA 保存用カードと抗菌・消臭製品～

幹事会、評議員会、総会の議事録

1) 幹事会の概要（平成 16 年 11 月 5 日 於 京大・医・動物実験施設）

1. 出席：浅田、阿部、飯田、池田、海野、岡田、喜多、久保、庫本、黒沢、塩見、
芹川、中井、新谷、森本、山中、山本、山口（18 名）

2. 議事

- (1) 第 84 回関西実験動物研究会について
特別講演（2 題）と一般演題（16 題）のプログラムと座長が決定された。
- (2) 第 85 回及び第 86 回研究会について
第 85 回研究会（平成 17 年 3 月 4 日（金）京大会館）の担当は芹川会長、
庫本幹事に決定した。第 86 回研究会（平成 17 年 6 月）は黒澤幹事に決定した。
- (3) 第 21 回疾患モデル学会について
芹川会長より、平成 16 年 11 月 11 日と 12 日に京都大学で開催される日本疾患
モデル学会についての開催要項が説明され、要旨集が配布された。関西実験動
物研究会は後援団体として参加することとなった。
- (4) 役員改選について
芹川会長より、第 8 期役員について資料（会則と会員名簿）が配布された。
- (5) その他
芹川会長より、特許法第 30 条に基づく学術団体、博覧会に関する指定手続き等
について、関西実験動物研究会も指定団体として登録手続きを開始する旨、説
明があった。

2) 幹事会の概要（平成 17 年 2 月 24 日 於 京大・医・動物実験施設）

1. 出席：阿部、飯田、岡田、喜多、久保、庫本、黒澤、塩見、芹川、田島、新谷、
前田、森本、山中、山口（15 名）

2. 議事

- (1) 第 23 回評議員会、第 22 回総会、第 85 回研究会について話し合わせ、総会時
における司会を選出した。また、第 85 回研究会の趣旨と演者の紹介が芹川会長よ
りなされた。
- (2) 阿部幹事より平成 16 年度の事業報告がなされた。
- (3) 平成 16 年度の決算報告について話し合わせ、平成 16 年度決算報告が作成され

た。

- (4) 平成 17 年度の事業計画について話し合われ、平成 17 年度事業計画案が作成された。
- (5) 平成 17 年度の機関紙発行計画について話し合われ、関西実験動物研究会会報第 26 号の発行を決定した。
- (6) 平成 17 年度の予算について話し合われ、平成 17 年度予算案が作成された。
- (7) 第 8 期（平成 17 年度～19 年度）役員選出にあたり、第 7 期幹事の江馬眞氏より辞退の申出があり、承認された。また、新評議員候補として松田潤一郎、宮下信泉、近藤 玄氏の 3 名を評議員会に諮ることが決定された。
- (8) 芹川会長より幹事会及び研究会土日開催案があることが紹介され、評議員会での審議、並びに全会員にアンケートの実施が検討された。
- (9) 塩見幹事より、第 53 回日本実験動物学会総会（平成 18 年 5 月 11 日～13 日）におけるシンポジウム共催の申出があった。協議の結果、第 53 回日本実験動物学会を後援することとした。
- (10) 庫本幹事より、関西実験動物研究会が特許法第 30 条に基づく学術団体、博覧会に関する指定団体と認定された旨の報告があった。

3) 第 23 回評議員会の概要（平成 17 年 3 月 4 日 於 京大会館）

- 1. 出席：浅田、浅野、阿部、池田克、池田卓、稲垣、新比恵、内海、及川、岡田、岡本、喜多、庫本、久保、桑村、塩見、鈴木、芹川、高島、竹之下、千葉、坪田、中井、新谷、橋本、原田、平川、平沢、古河、前田、増岡、宮嶌、宮嶋、森島、森本、安田、山添、山中、山本好、横井、吉田、近藤、宮下（43 名）

2. 議事

- (1) 役員の改選（第 8 期 平成 17 年～19 年）

評議員 再任：旧評議員は承諾書の提出により第 8 期評議員となることが承認された。

新任：近藤 玄（京都大学）、松田潤一郎（国立感染症研究所）、宮下信泉（香川大学）以上 3 名が推薦書を提出し、承認された。

会長 芹川忠夫評議員の再任が決定された。

幹事 江馬 眞氏の辞退が承認された。

監査 清水英男、高木貞明の両氏が再任された。

- (2) 平成 16 年度事業報告：阿部幹事（集会）より平成 16 年事業報告が行われ、承認

された。

- (3) 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 号が発行されたこと報告され、承認された。
- (4) 平成 16 年度決算報告：喜多幹事（庶務）より、平成 16 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 16 年度決算報告が承認された。
- (5) 平成 17 年度事業計画案：阿部幹事（集会）より平成 17 年度事業計画案が説明され、承認された。
- (6) 平成 17 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 26 号の発行を予定している旨説明され、承認された。
- (7) 平成 17 年度予算案：喜多幹事（庶務）より平成 17 年度の予算案が説明され、承認された。
- (8) その他

芹川会長より、研究会の土日開催案があることが紹介されたが、従来どおり金曜日開催とすることになった。

塩見幹事より第 53 回日本実験動物学会総会（平成 18 年 5 月 11 日～13 日）の後援依頼があり、関西実験動物研究会は同総会を後援することとなった。

庫本幹事より関西実験動物研究会が特許法第 30 条に基づく学術団体、博覧会に関する指定団体に認定されたことが報告された。

4) 第 22 回総会の概要（平成 17 年 3 月 4 日 於 京大会館）

- (1) 岡田幹事が議長に選出された。
- (2) 阿部集会幹事より、第 23 回評議員会において第 8 期役員が改選されたことが報告された。また、第 8 期会長に芹川忠夫氏が選出されたことが報告された。
- (3) 阿部幹事より平成 16 年度事業報告が行われ、承認された。
- (4) 山本幹事より関西実験動物研究会会報第 25 号会報の発行について報告された。
- (5) 喜多幹事より平成 16 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。
- (6) 阿部幹事より平成 17 年度の事業計画(案)が説明され、承認された。
- (7) 山本幹事より関西実験動物研究会会報第 26 号の発行を予定していることが説明され、承認された。
- (8) 喜多幹事より平成 17 年度予算(案)が説明され、承認された。

- (9) 芹川会長より、第 53 回日本実験動物学会総会を後援することが報告され、承認された。
- (10) 芹川会長より、関西実験動物研究会が特許法第 30 条に基づく学術団体、博覧会に関する指定団体に認定されたことが報告された。

《会員の異動》

(平成16年11月～平成17年10月)

入会者	大田 聖	(株) ケアリー和歌山研究所
	安藤健史	(株) オリエンタルバイオサービス
	齋藤 浩充	三重大学医学部動物実験施設
	高木 弓枝	日本エス・エル・シー(株)
	宮下 信泉	香川大学総合生命科学実験センター動物実験部門
	近藤 玄	京都大学再生医科学研究所
	松田 潤一郎	国立感染症研究所
	清水 何一	清水実験材料(株)
	塩谷 恭子	国立循環器病センター研究所 動物管理室
	直井 国子	京都大学大学院医学研究科附属動物実験施設
	大地 寧	日本チャールス・リバー(株)
	桑村 有規	(株) 新日本科学
	齋藤 朋子	日本チャールス・リバー(株)
	矢野 英樹	(株) オリエンタルバイオサービス
	山田 篤	アステラス製薬(株) 安全性研究所
	井澤 武史	大阪府立大学・農・獣医病理
	大野 美千代	
	堀 孝司	(株) オリエンタルバイオサービス
	熊藤 健太	清水実験材料(株)

退会者	山下 武夫	塩野義製薬(株) 実験動物研究センター
	北山 博章	(株) オリエンタルバイオサービス
	奥本 正昭	大阪府立大学先端科学研究所
	塩田 恒三	
	柴生田 正樹	武田薬品工業(株) 医薬開発本部開発戦略部
	島 朋絵	日本チャールスリバー(株)
	谷本 純一	
	田畑 信子	武田薬品工業(株) 薬物機能第二研・光支所
	中村 公章	科研製薬(株) 中央研究所薬理研究部
	山本 利彦	沢井製薬 大阪研究所 生物研究課
	藤島 昇一	塩野義製薬(株) 摂津工場 品質評価研
	山崎 俊幸	
	渡邊 雄造	白井松器械(株)
	脇坂 江美	(株) ケアリー 和歌山研究所
	村本 泰一	
	長井 寛明	大阪府立大学・院・農学生命科学研・実験動物学
	藤平 司郎	藤沢薬品工業(株) 安全性研究所
	中川 和年	大鵬薬品(株)
	山田 秀一	京都大学ウイルス研究所

関西実験動物研究会(個人会員名簿)2005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	出雲市塩治町 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5-5-2 神戸国際ビジネスセンター	ステムセルサイエンス(株)研究開発部門
	◎◎ 浅野 裕三	419-0101	静岡県田方郡函南町桑原三本松1308-125	(株)ボゾリサーチセンター 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	619-1401	京都府相楽郡南山城村童仙房小玉181	(株)オリエンタルバイオサービス南山城研究所
	◎◎ 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	528-0052	滋賀県甲賀郡水口町大字宇川字稻場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) 医薬研究本部 研究推進部
	安藤 健史	615-0882	京都市右京区西京極葛野町 28 番	(株)オリエンタルバイオサービス
	い◎◎ 飯田 晶敏	541-0044	大阪市中央区伏見町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)筑波研究所動物研究部
	○ 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
	井澤 武史	599-8531	大阪府堺市学園町1-1	大阪府立大学・農・獣医療理
	石川 隆司	564-0053	吹田市江ノ木町 33-94	大日本住友製薬(株)研究本部 研究業務第1部
う	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	滋賀県草津市西浜川 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
	上田 正次	321-0973	栃木県宇都宮市岩曾町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	大日本除蟲菊(株)
	◎◎ 海野 隆	530-0003	大阪市北区堂島1-6-20堂島アバンザ14F	日本オルガノン(株)薬事統括部開発薬事部
	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
	大田 聖	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
	大地 寧	550-0005	大阪市西区西本町1-6-2 阿波姫ビル8F	日本チャールス・リバー(株)
か	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	名古屋市長和区鶴舞町65	名古屋大学医学部附属動物実験施設
	大野 美千代	468-0004	名古屋市長白区梅が丘2-207	
	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	大阪府立大学大学院生命環境科学研究所
	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	吹田市江ノ木町 33-94	大日本住友製薬(株)研究本部 研究業務第1部
	小木曾 敬吉	464-0044	名古屋市長千種区自由ヶ丘 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
	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
	鍵山 莊一郎	565-0871	大阪府吹田市山田丘 2-2	大阪大学医学部附属動物実験施設
	○ 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	大阪府吹田市江ノ木町 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
き	金田 平八郎	677-0032	西脇市中畑町 338	ラビオン研究所
	鍋本 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
	○ 神田 政典	561-0825	大阪府豊中市二葉町 3-1-1	塩野義製薬(株)新薬研究所
	き◎◎ 喜多 正和	602-8566	京都市上京区河原町広小路梶井町465	京都府立医科大学実験動物部門
	○ 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
	木下 邦明	224-0812	横浜市戸塚区粕尾町560	ボーラ化成工業(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	大阪市中央区道修町3-2-10	田辺製薬(株)医薬情報センター
	国友 一朗	580-0016	大阪府松原市上田8-1-20	
	◎◎ 久保 薫	634-8521	橿原市四条町 840	奈良県立医科大学 動物実験施設

関西実験動物研究会(個人会員名簿)2005年10月現在

	氏名	〒	住所	所属
	熊藤 健太	606-8304	京都市左京区吉田下阿達町37	清水実験材料(株)
〇〇	庫本 高志	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
	倉林 譲	700-0914	岡山市鹿田町 2-5-1	岡山大学医学部附属動物実験施設
〇〇	黒澤 努	565-0871	吹田市山田丘 2-2	大阪大学医学部附属動物実験施設
〇	桑村 充	599-8531	大阪府堺市学園町1-1	大阪府立大学・農・獣医療病理
	桑村 有規	591-8032	堺市百舌鳥梅町3-14-15	((株)新日本科学)
こ	小泉 清	240-0012	神奈川県横浜市保土ヶ谷区月見台 33-8-201	
	甲田 彰	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	大阪府立大学大学院農学生命科学研究科
	小林 嘉代	589-0014	大阪狭山市大野東 377-2	近畿大学ライフサイエンス研究所
	小林 忍	605-8550	京都市南区西大路八条下ル	日本新薬(株)
	小林 欣滋	532-8505	大阪市淀川区加島 3-16-89	田辺製薬(株)安全性研究所
〇	小森 彰	607-8042	京都市山科区四宮南河原町14	科研製薬(株)中央研究所薬理研究部
	近藤 玄	606-8507	京都市左京区聖護院川原町53	京都大学再生医科学研究所
	近藤 靖	532-8505	大阪市淀川区加島 3-16-89	田辺製薬(株)先端医学研究部
さ	齋藤 浩充	514-8507	三重県津市江戸橋 2-174	三重大学医学部動物実験施設
	齋藤 朋子	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)
	坂田 太二	532-8505	大阪市淀川区加島 3-16-89 田辺製薬内	田辺 R&D サービス
	坂本 雄二	651-2241	神戸市西区室谷 1-5-4	千寿製薬(株)
	佐藤 良夫	565-0871	吹田市山田丘 1-8	大阪大学歯学部中央研究室
	佐藤 雅樹	642-0017	海南市南赤坂 16-1	((株)新日本科学 薬物代謝分析センター
	鮫島 秀暢	890-0011	鹿児島市玉里団地1丁目 22-19	
	澤浦 雅人	550-0005	大阪市西区西本町 1-6-2 阿波堀ビル8F	日本チャールス・リバー(株)
し〇〇	塩見 雅志	550-0017	神戸市中央区楠町 7-5-1	神戸大学医学部附属動物実験施設
	塩谷 恭子	655-3565	大阪府吹田市藤白台5-7-1	国立循環器病センター研究所 動物管理室
	嶋川 幸三	532-8686	大阪市淀川区十三本町2-17-85	(株)武田ラビックス・系統管理第二部
	清水 何一	606-8304	京都市左京区吉田下阿達町37	清水実験材料(株)
	清水 大	769-2601	香川県大川郡大内町三本松1-1-101	(株)ケーエーシー
△	清水 英男	606-8304	京都市左京区吉田下阿達町 37	清水実験材料(株)
	清水 雅良	501-6251	羽島市福寿町間島 6-104	(株)日本バイオリサーチセンター羽島研
	白石 弘之	600-8815	京都市下京区中堂寺栗田町93	マルホ(株)京都 R&Dセンター
す	菅原 努	604-8171	京都市中京区烏丸通御池下ル虎屋町566-1	(財)慢性疾患・リハビリテーション研究振興財団
	杉井 学	576-0031	大阪府交野市森南 2-27-3	(株)ケーエーシー 営業本部
	鈴木 秀作	890-0073	鹿児島市宇宿町 1208-1	鹿児島大学医学部動物実験施設
〇	鈴木 昇	514-8507	三重県津市江戸橋 2-174	三重大学生命科学研究支援センター 機能ゲノミクス分野
	鈴木 稔	520-3423	滋賀県甲賀郡甲賀町五反田1405	塩野義製薬(株)
	角井 正義	532-8686	大阪市淀川区十三本町2-17-85	(株)武田ラビックス 技術教育担当
せ★〇	芹川 忠夫	606-8501	京都市左京区吉田近衛町	京都大学大学院医学研究科附属動物実験施設
そ	菅我 正彦	561-0825	大阪府豊中市二葉町3-1-1	塩野義製薬(株)新薬研究所
た△	高木 貞明	601-8151	京都市南区上鳥羽塔森東向町 93-8	日本エス・エル・シー(株)
	高木 弓枝	433-8114	静岡県浜松市葵 3-5-1	日本エス・エル・シー(株)
〇	高島 俊行	532-0011	大阪市淀川区西中島7-14-35-303	ハムリー(株)国際事業所 大阪出張所
	高田 達之	520-2192	大津市瀬田月輪町	滋賀医科大学・動物生命科学研究センター
	高橋 明男	187-0031	東京都小平市小川東町4-1-1	国立精神神経センター神経研究所
〇	竹之下 誠	648-0003	橋本市隅田町山内 514	
〇〇	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
	谷村 孝	590-0137	堺市城山台1-14-10	
	谷本 憲昭	532-8505	大阪市淀川区加島 3-16-89	田辺製薬(株)安全性研究所
	多根井 昌孝	604-8423	京都市中京区西の京西月光町 40	(株)ケーエーシー 営業本部
ち〇	田畑 一樹	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
つ	千葉 薫	569-1125	高槻市紫町 1-1	JT クリエイティブサービス 理化学関連事業本部
	塚原 清志	520-3423	滋賀県甲賀郡甲賀町五反田 1405	塩野義製薬(株)実験動物研究センター
	辻 嘉昭	650-0033	神戸市江戸町85-1 ハイ・ウイング神戸ビル801号	ステリスジャパン(株)
	土屋 英明	520-2192	大津市瀬田月輪町	滋賀医科大学 動物生命科学研究センター
〇	都築 政起	739-0046	東広島市鏡山1-4-4	広島大学生物生産学部家畜育種学教室
〇	蝶良 愛郎	570-0074	守口市文園町10-15	関西医大・第二病理学教室
	坪田 裕司	641-0012	和歌山市紀三井寺 811-1	和歌山県立医大第二生理学
	津村 秀樹	514-0001	三重県津市江戸橋 2-174	三重大学医学部附属動物実験施設
	鶴田 恵三	642-0017	和歌山県海南市南赤坂16-1海南インテリジェントパーク	(株)新日本科学
と	土井 清弘	604-8423	京都市中京区西の京西月光町40	(株)ケーエーシー
	堂前 嘉代子	663-8558	西宮市池開町6-46	武庫川女子大学生生活環境学部
	鳥取 潤一	895-2701	鹿児島県伊佐郡菱刈町前目字池田 3504-157	(株)ジャパンファーム クラウン研究所
〇〇	鳥居 隆三	520-2192	滋賀県大津市瀬田月輪町	滋賀医科大学動物生命科学研究センター
な	直井 国子	606-8501	京都市左京区吉田近衛町	京都大学大学院医学研究科附属動物実験施設
	中井 健史	520-3423	滋賀県甲賀郡甲賀町五反田 1405	塩野義製薬(株)実験動物研究センター
〇〇	中井 伸子	601-8550	京都市南区吉祥院西ノ庄門口町14	日本新薬(株)安全性研究部
	中井 洋一	503-0628	岐阜県海津郡海津町福江290	(株)日本生物科学センター
	中川 照文	125-0041	東京都葛飾区金町3-5-13 フォーレエレガンス301	科研製薬(株)
	長澤 久充	610-0121	京都府城陽市寺田深谷 7-76	
	中島 健博	531-0072	大阪市北区豊崎 4-12-1	(株)ケアリー
	中島 文博	564-0053	吹田市江の木町 33-94	大日本製薬(株)開発研究所安全性研究部
	中村 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)

関西実験動物研究会(個人会員名簿)2005年10月現在

	氏名	〒	住所	所属
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	052-0023	大阪府箕面市栗生間谷西 1-4-8-202	
	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)安全性研究所
	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	431-3126	浜松市有玉台4-17-15	
	西村 弘道	597-0061	貝塚市浦田 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	アステラスリサーチサービス(株)
	蓮間 忠芳	550-0005	大阪市西区西本町2-5-19	生活科学研究所
	浜田 修一	286-8511	千葉県成田市南平台1143	エスエス製薬(株)中央研究所
	早川 純一郎	920-1161	金沢市錦見台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	神戸大学大学院医学系研究科細胞分子医学
	原口 心雄	553-0002	大阪市福島区鷺洲5-12-4	塩野義製薬(株)医薬研究開発本部
	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	横浜市区西みなとみらい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
	足田 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	541-0044	大阪府中央区伏見町2-1-1三井住友銀行高麗ビル	(株)新日本科学 安全性研究所 病理センター
	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	661-0031	尼崎市武庫之荘本町2丁目21番20号	第3ハイツ武庫庄303
	廣瀬 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
	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
ふ○	福西 克弘	892-0871	鹿児島県鹿児島市吉田町宮之浦 2438	(株)新日本科学
	福田 綾子	892-0871	鹿児島県鹿児島市吉田町宮之浦 2438	(株)新日本科学
	藤井 恒雄	532-0031	大阪市淀川区加島 2-1-6	藤沢薬品工業(株)安全性研究所
	藤沢 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
	古河 恵一	589-8511	大阪府大阪狭山市大野東 377-2	近畿大学医学部共同研究実験動物室
	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 孝司	615-0882	京都市右京区西京極葛野町 28 番	(株)オリエンタルバイオサービス
	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	592-8349	堺市浜寺諏訪ノ森東1-92-4	
	前田 勝弘	564-0053	吹田市江の木町 33-94	大日本住友製薬(株)研究管理部動物室
	前田 敏宏	564-0053	吹田市江の木町 33-94	大日本住友製薬(株) 研究本部 研究業務第1部
	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・エー・シー 技術研修所
	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	静岡県浜松市美 3-5-1	日本エスエルシー(株)品質管理部
	増岡 通夫	604-8423	京都市中京区西ノ京西月光町40	(株)ケー・エー・シー
	増田 亜紀	561-0825	大阪府豊中市二葉町3-1-1	塩野義製薬(株)
	町尾 久夫	564-0043	吹田市南吹田 4-4-1	オリエンタル酵母工業(株)大阪バイオ営業所
○	松尾 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
	松田 潤一郎	567-0085	茨木市彩都あさぎ7-6-8	(独)医薬基盤研究所 生物資源研究部
	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・農学生命科学研究・実験動物学
	三原 啓子	410-0866	静岡県沼津市市道町 13-4 本山方	
○	宮下 信泉	761-6793	香川県木田郡三木町大字池戸1750-1	香川大学総合生命科学実験センター動物実験部門
	宮脇 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
	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	大日本住友製薬(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)開発研究センター
	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	高槻市大町 2-7	大阪医科大学実験動物センター

関西実験動物研究会(個人会員名簿)2005年10月現在

	氏名	〒	住所	所属
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
	矢野 英樹	619-1401	京都府相楽郡南山城村童仙房小玉181	(株)オリエンタルバイオサービス
	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 文至	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 篤	532-8514	大阪市淀川区加島2-1-6	アステラス製薬(株)安全性研究所
	山田 宣永	606-8224	京都市左京区北白川追分町	京都大学大学院農学研究科
○◎	山中 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 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 生命科学実験センター
○◎	山本 好男	520-2192	大阪市瀬田月輪町	滋賀医科大学社会医学講座法医学分野
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	神戸大学大学院医学系研究科細胞分子医学
	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)開発研究センター
○	吉田 元信	541-0045	大阪市中央区道修町 2-6-8	大日本住友製薬(株)アニマルサイエンス部
	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
わ	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
	和田 あづみ	105-8461	東京都港区西新橋 3-25-8	東京慈恵医大・総合医科学研究セ・実験動物

上記個人会員名簿に追加、訂正等があれば

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

関西実験動物研究会 維持会員名簿

(五十音順)(平成 17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	大阪市中央区道修町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	北山ラベス(株)	396-0021	長野県伊那市荒井区川北 3052
8	(株)ケアリー 和歌山研究所	648-0003	和歌山県橋本市隅田町山内514
9	(株)ケー・エー・シー	604-8423	京都市中京区西の京西月光町 40
10	(株)サンプラネット 川島事業本部	501-6024	岐阜県羽島郡川島町竹早町 2-1
11	参天製薬(株)研究開発センター	630-0101	生駒市高山町 8916-16
12	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
13	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
14	清水実験材料(株)	606-8304	京都市左京区吉田下阿達町 37
15	(株)島津製作所	305-0031	茨城県つくば市吾妻 3-17-1
16	白井松器械(株)	540-0003	大阪市中央区森ノ宮中央 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目字池田 3504-157
18	(株)新日本科学 大阪支社	541-0044	大阪市中央区伏見町2-1-1三井住友銀行高麗橋ビル
19	(株)精研	542-0066	大阪市中央区瓦屋町2丁目11-16
20	(株)ティー・ティー・エム	532-0012	大阪市淀川区木川東2-1-12 大阪府ITビジネスインキュベータ
21	大日本住友製薬(株)研究本部 研究業務第1部	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	大阪市淀川区加島 3-16-89
24	茶谷産業(株)バイオメディカル事業部	541-0052	大阪市中央区安土町1-8-15
25	(株)夏目製作所	113-0034	東京都文京区湯島 2-18-6
26	(株)日精バイリス研究所	528-0052	滋賀県甲賀郡水口町大字宇川字稲場 555
27	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
28	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
29	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
30	日本チャールスリバー(株)	550-0005	大阪市西区西本町 1-11-7
31	ハムリー(株)大阪営業所	532-0011	大阪市淀川区西中島 7-14-35-303
32	アステラスリサーチサービス(株)	532-0031	大阪市淀川区加島 2-1-6
33	丸石製薬(株)中央研究所	538-0042	大阪市鶴見区今津中 2-2-18
34	三浦工業(株)メディカル西日本営業部	533-0011	大阪市東淀川区大桐 2-7-12 三浦ビル
35	(株)三菱化学安全科学研究所大阪支店	541-0044	大阪市中央区伏見町4-1-1(明治安田生命ビル7F)
36	(株)美濃ラボ	503-0321	岐阜県海津郡平田町今尾 1195-1
37	(株)ラビトン研究所	677-0032	兵庫県西脇市中畑町 338
38	(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)島津製作所 4/14

(株)ティー・ティー・エム 6/8

社名変更

藤沢テクニス(株)→アステラスリサーチサービス(株)

大日本製薬(株)→大日本住友製薬(株)

関西実験動物研究会 評議員名簿

第8期(平成 17 年度～19年度)

氏名	所属
浅田 孝	ステムセルサイエンス(株)研究開発部門
浅野 裕三	(株)ボ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	ゲラク・スミスクライン(株)筑波研究所動物研究部
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生命環境科学研究科
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
近藤 玄	京都大学再生医科学研究所
塩見 雅志	神戸大学医学部附属動物実験施設
鈴木 昇	三重大学生命科学研究支援センター
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	
橋本 正晴	アステラスリサーチサービス(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

氏名	所属
前田 敏宏	大日本住友製薬(株)研究本部研究業務第1部
牧野 進	(株)ケーエーシー 技術研修所
増岡通夫	(株)ケーエーシー
松田 潤一郎	国立感染症研究所
宮下 信泉	香川大学総合生命科学実験センター動物実験部門
宮嶋 宏彰	(株)新日本科学
宮嶋 正康	和歌山県立医科大学実験動物施設
宮脇 茂樹	日本新薬(株)知的財産部
森岡 宏至	
森島 英喜	武田薬品工業(株)開発研究センター
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 営業本部
山本 博	富山医科薬科大学生命科学実験センター
山本 好男	滋賀医科大学社会医学講座法医学分野
横井 伯英	神戸大学医学系研究科細胞分子医学
吉田 元信	大日本住友製薬(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: kansajim@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 17年～19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	グラクソ・スミスクライン(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
	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	大日本住友製薬(株)研究本部研究業務第1部
	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	ステムセルサイエンス(株)研究開発部門
	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 聰	
	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17年12月15日 印 刷
平成17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26号
Kansai Journal of Laboratory Animals

平成17年12月

第83回研究会：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

犬伏 俊郎：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 3
古川 高子：PETを用いる分子イメージング 16

第84回研究会

岡村 均：身体の時間を刻む時計遺伝子 19
横山 尚彦：遺伝的変異体の作成とその形態形成機構解明への応用 24
＜会員の発表 16題＞ 29

第85回研究会：腸内フローラについて学ぶ

伊藤喜久治：腸内フローラと生体反応 45
竹田 潔：腸内フローラとToll-like receptor 51

第86回研究会：受精機構の神秘を解く

近藤 玄：アンギオテンシン変換酵素（ACE）の新機能：GPIアンカー型蛋白質遊離と受精への関与 67
馬場 忠：精子が卵子と出会うまで 70
岡部 勝：遺伝子操作動物を通して見る受精のメカニズム 74

＜関西実験動物研究会だより＞ 79

幹事会、評議員会、総会の議事概要 81 会員の異動 85
個人会員名簿 86 維持会員名簿 90 評議員名簿 91
会長、幹事、監事名簿 93