

関西実験動物研究会会報

Kansai Journal of Laboratory Animals

平成22年12月 32号

関西実験動物研究会

Kansai Laboratory Animal Research Association

目 次

<第103回研究会（平成21年9月4日）>

テーマ：神経・筋疾患の病態とモデル動物

1. ニワトリ筋ジストロフィー責任遺伝子の同定とモデル動物としての展開
万年 英之（神戸大学大学院農学研究科動物遺伝育種学）………… 1
2. モデル動物によって大脳基底核疾患の病態を探る
南部 篤（自然科学研究機構生理学研究所・生体システム研究部門）… 13

トピックス：実験動物施設におけるホルムアルデヒド規制とその国内外に
おける対応

池田 卓也（日本チャールズ・リバー株式会社）…………… 14

<第104回研究会（平成21年12月11日）>

<特別講演>

1. 小動物を用いた生体光イメージング
近藤 科江（京都大学大学院医学研究科）…………… 27
2. 炎症関連大腸発がんモデルの作出とその発がん・化学予防研究への活用
田中 卓二（金沢医科大学・東海細胞研究所）…………… 36

<会員の発表 14題>

<第105回研究会（平成22年3月19日）>

テーマ：器官発生・幹細胞分化の基本原理を探る

1. 器官形成研究のモデル動物としてのニワトリ胚
八杉 貞雄（京都産業大学・総合生命科学部）…………… 65
2. 哺乳動物の造血幹細胞ニッチ
長澤 丘司（京都大学・再生医科学研究所・生体システム制御分野）… 79

<第106回研究会（平成22年 6 月11日）>

テーマ：動物実験第三者認証のその後

はじめに 黒澤 努（大阪大・医・実験動物医学）	81
1. 国動協と公私動協の「動物実験に関する相互検証プログラム」	
喜多 正和（京都府立医大院・医・実験動物センター）	84
2. 日本実験動物協会第2期実験動物生産施設等福祉調査	
上田 正次（(株)フェニックスバイオ宇都宮事業所）	90
3. ヒューマンサイエンス振興財団による動物実験実施施設認証を受けて	
山田 靖子（国立感染症研究所 動物管理室）	99
4. AAALAC International国際実験動物管理公認協会認証	
須藤 有ニ（アステラスリサーチテクノロジー(株)）	109

<関西実験動物研究会だより>	121
<幹事会、評議員会、総会の議事概要>	123
<会員の異動>	127
<個人会員名簿>	128
<維持会員名簿>	132
<評議員名簿>	133
<会長、幹事、監事名簿>	135

<第103回研究会（平成21年9月4日）>

テーマ：神経・筋疾患の病態とモデル動物

1. ニワトリ筋ジストロフィー責任遺伝子の同定とモデル動物としての展開
万年 英之（神戸大学大学院農学研究科動物遺伝育種学）
2. モデル動物によって大脳基底核疾患の病態を探る
南部 篤（自然科学研究機構生理学研究所・生体システム研究部門）

トピックス：実験動物施設におけるホルムアルデヒド規制とその国内外における対応

池田 卓也（日本チャールズ・リバー株式会社）

ニワトリ筋ジストロフィー責任遺伝子の同定とモデル動物としての展開

万年 英之・笹崎晋史・松本 大和

神戸大学大学院農学研究科資源生命科学専攻動物遺伝育種学研究室

〒657-8501 神戸市灘区六甲台町 1-1

1. はじめに

筋ジストロフィーとは骨格筋の壊死・変性を主徴とする進行性の筋力低下を伴う遺伝性疾患の総称であり、今日でも有効な治療法のない難病である (Partridge, 1991)。重篤なケースでは筋力低下は助間筋などの呼吸筋にも及び、呼吸不全により死に至る。また、心臓が障害されることも多く、心不全による死亡例も多い。この病気は臨床症状、診察所見、経過、家族歴の他、血液検査、筋電図検査、筋生検などにより総合して分類される。その原因遺伝子は多岐にわたり、現在までに 30 以上の原因遺伝子が同定されている (Kanagawa と Toda, 2006)。

最も代表的な筋ジストロフィーは、dystrophin というタンパク質の欠失・異常により発症する Duchenne 型/ Becker 型筋ジストロフィー (DMD/ BMD) である。DMD/BMD は dystrophin と呼ばれるタンパク質の欠損または異常によって起こる。このタンパク質は筋鞘膜直下に存在し、N 末端は筋収縮タンパク質の一つであるアクチンと結合し、C 末端は dystrophin 糖タンパク質複合体 (dystrophin-associated glycoprotein complex; DGC) と結合していることが明らかになっている。DGC は筋細胞の外側の膜である基底膜の laminin M (merosin) と結合している(図 1)。ジストロフィンおよび DGC はアクチンと基底膜を連結し、このことにより筋肉細胞の細胞膜を激しい収縮運動から保護している。ジストロフィンや DGC、基底膜、細胞骨格が上手く機能しないと筋肉細胞は壊れやすくなる。よってこれらの構造タンパク質やそれに関連する酵素タンパク質の欠損または異常が筋ジストロフィーの発症原因となることが多い (Imamura ら 2000)。Duchenne 型筋ジストロフィーは非常に重篤な症状を呈す型の一つであり、それ故に dystrophin 及びその関連タンパク質に関しては過去精力的に研究が行われてきた。しかしそれら以外のタンパク質の異常に

よる筋ジストロフィーもいくつか報告されており、発症原因がいまだ不明である筋ジストロフィー及びその類縁疾患も数多く存在する (Terri と Kunkel, 2000)。

実験動物は原因遺伝子の同定や、病因・病態の研究、治療実験に必要不可欠であり、筋ジストロフィーに対しても様々なタイプの実験動物が確立されている。代表的な実験動物としては、*mdx* マウス (dystrophin 欠失)、*grmd* イヌ (dystrophin 欠失)、*dy* マウス (merosin 欠失)、筋ジストロフィーハムスター (δ -sarcoglycan 欠失)、筋ジストロフィーニワトリが挙げられる (Nonaka, 1987b)。ニワトリの筋ジストロフィーを除き、これらは dystrophin 及びその関連タンパク質の異常を示す型の実験動物である。これらの実験動物により、dystrophin 及びその関連タンパク質の異常による筋ジストロフィーに関する理解は近年飛躍的に深まったが、それら以外の型の筋ジストロフィーに対する研究は余り進んでいない。

ニワトリ筋ジストロフィーは半世紀以上前から研究されており (Asmundson と Julian, 1956)、いくつかのニワトリ筋ジストロフィー発症系が確立されている。その一つに New Hampshire 種の line 413 (NH-413) と呼ばれる系統が存在する。このニワトリの筋ジストロフィーは臨床症状が比較的穏やかで、交配も可能である。また、筋ジストロフィーの遺伝子を持つ受精卵が簡単に入手できることから、筋ジストロフィーの病変がいつ頃から、またどのように発現するかを経時的に観察するのに適している (Nonaka, 1987b)。この系統では、発症の遺伝様式は単一の遺伝子による不完全優性であるが、表現型は他の遺伝子による影響を受ける (Asmundson と Julian, 1956; Asmundson ら, 1966; Kikuchi ら, 1981; Wagner と Peterson, 1970)。ヒトにおける DMD/ BMD の原因タンパク質である dystrophin は正常に発現しており (Saito ら, 2005)、病因遺伝子は不明であった。

このニワトリ筋ジストロフィーの原因遺伝子を同定することにより、いまだ病因の特定されていないヒトの筋ジストロフィー、あるいは類縁疾患の解明及び筋肉メカニズムの理解に役立つと考えられる。我々はこの原因遺伝子の同定を目的とし、遺伝学的解析および生化学的解析をこれまで試みてきた。ここでは、これまでに得たニワトリ筋ジストロフィーの原因遺伝子探索についての研

究結果について概説する。

2. ニワトリ筋ジストロフィー原因遺伝子の同定

これまで本研究室では、ニワトリ筋ジストロフィー原因遺伝子解明のため、一連のポジショナルクローニングの手法を用いて研究を進めてきた。筋ジストロフィーリソースファミリーを用いた連鎖解析を行い、ニワトリ連鎖地図を構築した (Lee ら, 2002)。このニワトリ連鎖地図から、ニワトリ筋ジストロフィー原因遺伝子 (*AM*: abnormal muscle) はニワトリ第 2 染色体 q 腕に存在することが明らかとなった。この箇所はヒト第 8 染色体 q 腕とシンテニーが示されており (Schmid ら, 2000)、この領域に存在する機能遺伝子が *AM* 遺伝子である可能性が高いと考えられた。作成された連鎖地図に対し、戻し交雑個体 361 個体を用いた連鎖解析を行った結果、*AM* 遺伝子は第 2 染色体 q 腕の機能遺伝子 *IMPA1*・*CBFA2T1* 間の約 4 Mbp の領域に存在することが明らかにされ、この間に存在する 34 遺伝子が原因候補遺伝子であることが示唆された (Yoshizawa ら, 2004)。しかし、戻し交雑個体を用いた連鎖解析では、得られる情報量の限界により、これ以上の候補領域の絞込みは困難だと予想された。

そこで我々は、*AM* 遺伝子の探索を行うため、新たにニワトリ筋ジストロフィー F2 リソースファミリーを作成した。F1 世代同士を交配した F2 個体では、F1 の雄と雌両方での組換えを調べることが可能で、理論上 1 個体で戻し交雑個体 2 個体分に相当する情報を得られる。DNA マーカーとしては多型性の高いマイクロサテライトに着目した。繰り返し数の違いにより多型の生じやすい GA または CT の繰り返し配列を NCBI データベースより検索し、ニワトリ筋ジストロフィー F2 リソースファミリーの P 世代間で多型を探索した。F2 個体 487 羽及び新規開発 DNA マーカー 22 個を用いたハプロタイプ分析により、ニワトリ筋ジストロフィー遺伝子の候補領域を第 2 染色体 q 腕上の 1.2 Mbp にまで限定した (図 2)。この候補領域中には 7 つの機能遺伝子 (*ATP6V0D2*, *LOC420211*, *WWP1*, *LOC420213*, *LOC420214*, *LOC428367*, *MMP16*) が存在し、これらのいずれかがニワトリ筋ジストロフィーの原因遺伝子であることが強く示唆された (Matsumoto ら, 2007)。これらはいずれも既知の筋ジストロフィー発症機構との関連が報告されていない遺伝子だったため、ニワトリ筋ジ

ストロフィーが新規の筋ジストロフィー原因遺伝子によるものであることが示唆された。

引き続いて、各 *AM* 候補遺伝子に対して正常鶏・筋ジストロフィー発症鶏間で塩基配列と発現様式の比較を行い、*AM* 遺伝子の同定を試みた。各遺伝子の翻訳領域の塩基配列を比較した結果、筋ジストロフィー発症鶏に特異的な変異が 4 個検出された。それらの内 *LOC420214* 及び *LOC428367* で検出された 3 個の変異はアミノ酸置換を伴わない同義置換だった。アミノ酸置換を伴う非同義置換は *WWP1* においてのみ検出され、それはアルギニン（塩基性アミノ酸）からグルタミン（中性アミノ酸）へと大きくアミノ酸の性質を変える変異だった（図 3）。この変異はタンパク質の構造と機能に関わる変異である可能性が示唆された。

次いで、正常鶏 16 品種 111 個体の当該領域の塩基配列を分析した結果、この変異を持つ個体は存在しなかった。さらに筋ジストロフィー発症鶏特異的に変異の見られた部位の生物種間における保存性を調べた結果、当該部位のアミノ酸は、両生類以上の脊椎動物（ヒト・チンパンジー・サル・マウス・ラット・イヌ・ウシ・ハト・ヘビ・ワニ・トカゲ・カメ・カエル）において高度に保存されていることが示された（図 4）。

また、各 *AM* 候補遺伝子の発現解析では、*WWP1*、*LOC420213*、*LOC420214* は northern blot 法によって発現が確認可能で、*ATP6V0D2*、*LOC420211*、*MMP16* の発現解析には RT-PCR 法を用いた。*LOC428367* の発現はいずれの方法でも検出できなかった。いずれの遺伝子においても産物長の変化は検出されなかった。筋ジストロフィー発症鶏では *WWP1* の発現は減少していたが、*LOC420213*、*LOC420214*、*ATP6V0D2*、*MMP16* の発現は増加していた。しかし、正常鶏・筋ジストロフィー発症鶏間で大きく発現様式の異なる遺伝子は候補遺伝子中に存在しなかった。以上の結果は、*WWP1* 遺伝子がニワトリ筋ジストロフィーの原因遺伝子であることを強く示唆していた（Matsumoto ら、2008）。

WW domain containing E3 ubiquitin protein ligase 1 (*WWP1*) は、ユビキチン・プロテアソーム経路において重要な役割を演じるユビキチンリガーゼの一種である。本遺伝子のニワトリにおける発現パターンは報告されていないが、

発症機構の解明や本遺伝子の基礎情報を得る上で重要であると考えられた。そこで、様々な組織及び筋肉における *WWP1* 遺伝子の発現解析を正常鶏・筋ジストロフィー発症鶏間で Northern blot 法及び RT-PCR 法を用いて行った。Northern blot 法によって分析した全ての組織（胸筋・大腿筋膜張筋・大腿二頭筋・下腿三頭筋・長腓骨筋・心臓・脳・肝臓・腎臓・胚）において分子量の異なる 2 本のバンドが観察され、両者はほぼ同程度の発現量を示した（図 5）。筋ジストロフィー発症鶏では調べたほぼ全ての骨格筋で *WWP1* 遺伝子の発現が低下していることが観察されたが（図 5）、症状が認められない筋肉組織においても同様の傾向が示された（図 6）。これらの結果から、*WWP1* 発現量は本症の発症や程度に大きく影響しないことが示唆された（Matsumoto ら, 2009）。

3. ニワトリ筋ジストロフィー候補遺伝子に対する近年の知見

近年、筋ジストロフィー発症鶏において、 α -Dystroglycan の糖鎖に異常があることが報告された（Saito ら, 2005）。 α -Dystroglycan は dystrophin 糖タンパク質複合体の 1 つであり、その糖鎖異常による筋ジストロフィーがいくつか報告されている（Dalkilic ら, 2003）。また、糖鎖合成に必要な遺伝子の変異の結果によって、筋肉・眼・脳症や福山型先天性筋ジストロフィー、Walker-Warburg 症などが引き起こされる。したがって、ニワトリ筋ジストロフィーもこの糖鎖異常による筋ジストロフィーである可能性が考えられていた。しかし、連鎖解析による *AM* 候補領域内には、これまで明らかとなっている糖鎖修飾に関する遺伝子は存在せず、最終的に *AM* 遺伝子として同定した *WWP1* 遺伝子とそれらとの関連も報告されていない。糖鎖の調整を行うユビキチンリガーゼとしては Fbx2 や Fbs2 等が知られているが（Yoshida ら, 2002, 2003）、これらは F-box 型ユビキチンリガーゼであり、*WWP1* は HECT 型ユビキチンリガーゼに分類される。糖鎖の調整を行う HECT 型ユビキチンリガーゼはこれまでに報告されていない。*WWP1* が α -Dystroglycan の糖鎖修飾を行う可能性も残されているが、ニワトリ筋ジストロフィーにおける糖鎖修飾の異常は病変による二次的な現象であり、全く別の新規な機構によって発症が導かれる可能性が高い。

HECT 型ユビキチンリガーゼの基質タンパク質は、その多くが膜タンパク質である（Chen と Metasic, 2007）。したがって、*WWP1* も膜タンパク質を基質

タンパク質とする可能性が高い。事実、WWP1 が dystrophin 糖タンパク質複合体の 1 つでもある膜タンパク質 β -Dystroglycan を基質タンパク質として認識することが *in vitro* の研究により証明されている (Pirozzi ら, 1997)。ニワトリ筋ジストロフィーにおいて β -Dystroglycan の発現異常は認められず (Saito ら, 2005)、WWP1 と β -Dystroglycan との相互作用が本症発症に寄与するとは考えにくい、何らかの膜タンパク質が細胞内に蓄積することによって発症に至る可能性は高いと考えられる。

4. おわりに

これまでの研究結果から、ニワトリ筋ジストロフィー遺伝子の候補領域を第 2 染色体長腕上の 1.2 Mbp に限定した。候補領域中には 7 個の機能遺伝子が存在し、その内の一つ *WWP1* 遺伝子をニワトリ筋ジストロフィー最有力原因候補遺伝子として同定した。本遺伝子は両生類以上の脊椎動物で高度に保存されており、このことは *WWP1* がニワトリ筋ジストロフィー原因遺伝子であることを強く示唆した。また、ニワトリ筋ジストロフィー原因候補変異を持つ *WWP1* 遺伝子を C₂C₁₂ 筋芽細胞に導入すると、筋分化の異常が導かれた。筋分化の異常はニワトリ筋ジストロフィーの特徴であり、変異型 *WWP1* 遺伝子の導入によりニワトリ筋ジストロフィーの表現型が一部再現されたと考えられる。以上の結果から、*WWP1* 遺伝子をニワトリ筋ジストロフィー原因遺伝子としてほぼ同定できたが、発症を導く詳細なメカニズムはいまだ不明である。この解明は、対応するヒトの筋ジストロフィーあるいは類縁疾患の解明及び筋肉メカニズムの理解に大きく貢献すると考えられる。

今後の研究課題として、免疫沈降法や pull-down アッセイ等のタンパク質間の相互作用を検出する系を用い、筋肉における WWP1 の基質タンパク質の解明を行う必要がある。変異型 WWP1 と正常型 WWP1 で結合タンパク質に差異があった場合、細胞内における量的調節に異常があると考えられ、当該タンパク質が病変に寄与している可能性が高い。細胞内に蓄積している WWP1 の基質タンパク質を同定することにより、ニワトリ筋ジストロフィーの発症機序を明らかにできると考えている。

参考文献

- Asmundson VS, Julian LM. 1956. Inherited muscle abnormality in the domestic fowl. *Journal of Heredity*, 47: 248-252.
- Asmundson VS, Kratzer FH, Julian LM. 1966. Inherited myopathy in the chicken. *Annual Review of the New York Academic Science*, 138: 49-60.
- Chen C, Matesic LE. 2007. The Nedd4-like family of E3 ubiquitin ligases and cancer. *Cancer Metastasis Reviews*, 3-4: 587-604.
- Dalkilic I, Kunkel LM. 2003. Muscular dystrophies: genes to pathogenesis. *Current Opinion in Genetics and Development*, 13: 231-238.
- Imamura M, Araishi K, Noguchi S, Ebashi S. 2000. A sarcoglycan-dystroglycan complex anchors Dp116 and utrophin in the peripheral nervous system. *Human Molecular Genetics*, 9: 3091-3100.
- Kanagawa M, Toda T. 2006. The genetic and molecular basis of muscular dystrophy: roles of cell-matrix linkage in the pathogenesis. *Journal of Human Genetics*, 51: 915-926.
- Kikuchi T, Ishiura S, Nonaka I, Ebashi S. 1981. Genetic heterozygous carriers in hereditary muscular dystrophy of chickens. *Tohoku Journal of Agriculture Research*, 32: 14-26.
- Lee EJ, Yoshizawa K, Mannen H, Kikuchi H, Kikuchi T, Mizutani M, Tsuji, S. 2002. Localization of the muscular dystrophy AM locus using a chicken linkage map constructed with the Kobe University resource family. *Animal Genetics*, 33: 42-48.
- Matsumoto H, Maruse H, Yoshizawa K, Sasazaki S, Fujiwara A, Kikuchi T, Ichihara N, Mukai F, Mannen H. 2007. Pinpointing the candidate region for muscular dystrophy in chickens with an abnormal muscle gene. *Animal Science Journal*, 78: 476-483.
- Matsumoto H, Maruse H, Inaba Y, Yoshizawa K, Sasazaki S, Fujiwara A, Nishibori M, Nakamura A, Takeda S, Ichihara N, Kikuchi T, Mukai F, Mannen H. 2008. The ubiquitin ligase gene (*WWP1*) is responsible for the chicken muscular dystrophy. *FEBS Letters*, 582: 2212-2218.

- Matsumoto H, Maruse H, Sasazaki S, Fujiwara A, Takeda S, Ichihara N, Kikuchi T, Mukai F, Mannen H. 2009. Expression pattern of *WWP1* in muscular dystrophic and normal chickens. *The Journal of Poultry Science*, 46: 95-99.
- Nonaka I. 1987. Animal models for muscular dystrophy. In: *Muscular Dystrophy Vol. 1.* (Nonaka I ed.) 178-185. Japan Medical Journal, Tokyo.
- Partridge T. 1991. Animal models of muscular dystrophy: What can they teach us? *Neuropathology and Applied Neurobiology*, 17: 353-363.
- Pirozzi G, McConnell SJ, Uveges AJ, Carter JM, Sparks AB, Kayi BK, Fowlkes DM. 1997. Identification of Novel Human WW Domain-containing Proteins by Cloning of Ligand Targets. *The Journal of Biological Chemistry*, 272: 14611-14616.
- Saito F, Blank M, Schroder J, Many H, Shimizu T, Campbell KP, Endo T, Mizutani M, Kroger S, Matsumura K. 2005. Aberrant glycosylation of α -dystroglycan causes defective binding of laminin in the muscle of chicken muscular dystrophy. *FEBS Letters*, 579: 2359-2363.
- Schmid M, Nanda I, Guttenbach M, Steinlein C, Hoehn M, Schartl M, Haaf T, Weigend S, Fries R, Buerstedde JM, Wimmers K, Burt DW, Smith J, A'Hara S, Law A, Griffin DK, Bumstead N, Kaufman J, Thomson PA, Burke T, Groenen MA, Crooijmans RP, Vignal A, Fillon V, Morisson M, Pitel F, Tixier-Boichard M, Ladjali-Mohammedi K, Hillel J, Maki-Tanila A, Cheng HH, Delany ME, Burnside J, Mizuno S. 2000. First report on chicken genes and chromosomes. *Cytogenetics and Cell Genetics*, 90: 169-218.
- Terri GT, Kunkel LM. 2000. Advances in muscular dystrophy: Exciting new projects for millennium. *NeuroScience News*, 3: 4-12.
- Wagner WD, Peterson RA. 1970. Muscular dystrophy syndrome in the Cornish chicken. *American Journal of Veterinary Research*, 31: 331-338.
- Yoshizawa K, Inaba K, Mannen H, Kikuchi T, Mizutani M, Tsuji S. 2004. Fine mapping of the muscular dystrophy (*AM*) gene on chicken

- chromosome 2q. *Animal Genetics*, 35: 397-400.
- Yoshida Y, Chiba T, Tokunaga F, Kawasaki H, Iwai K, Suzuki T, Ito Y, Matsuoka K, Yoshida M, Tanaka K, Tai T. 2002. E3 ubiquitin ligase that recognizes sugar chains. *Nature*, 418: 438-442.
- Yoshida Y, Tokunaga F, Chiba T, Iwai K, Tanaka K, Tai T. 2003. Fbs2 is a new member of the E3 ubiquitin ligase family that recognizes sugar chains. *The Journal of Biological Chemistry*, 278: 43877-43884.

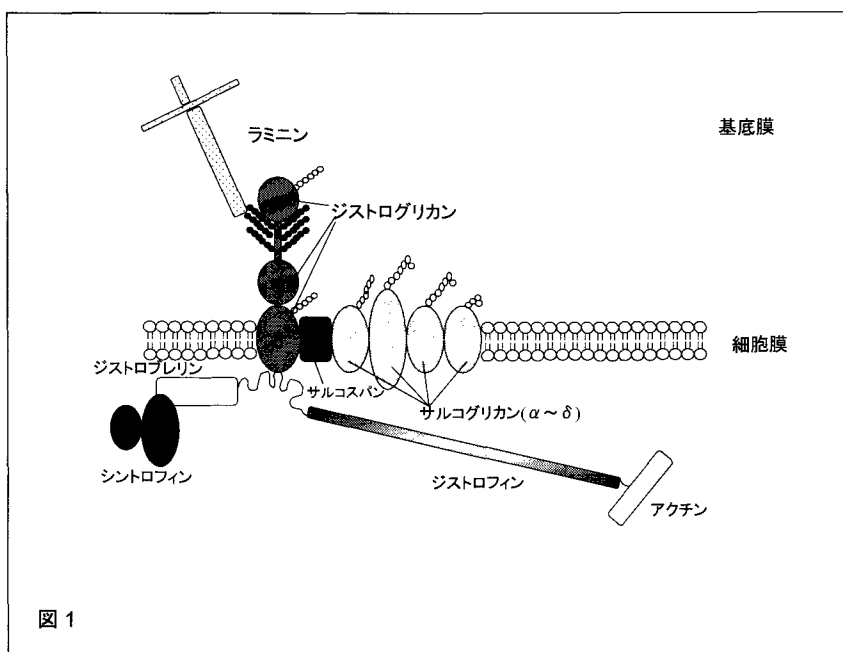


図1. 骨格筋におけるdystrophin糖タンパク質複合体 (DGC) 模式図。

骨格筋においてDGCはジストロフィン、ジストログリカン複合体、サルコグリカンとサルコスパン、シントロフィンとジストロブレリンなどから構成されている。

○：N結合型糖鎖、●：O結合型糖鎖

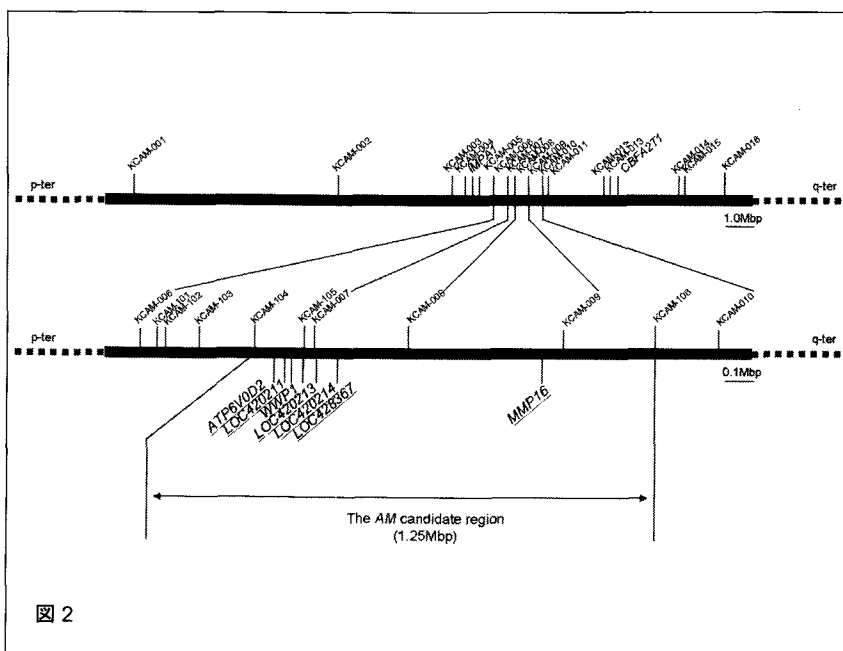


図2. ニワトリ筋ジストロフィー原因遺伝子(AM:abnormal muscle)候補領域と用いたDNAマーカー。

機能遺伝子 *IMPA1*・*CBFA2T1*間の領域が、Yoshizawaら(2004)によって絞り込まれた *AM* 候補領域である。上図に示した16個のDNAマーカー(KCAM)によって候補領域をKCAM-006・KCAM-010間に特定し、更に下図に示した11個のDNAマーカーによって候補領域をKCAM-104・KCAM-106間の約1.25Mbpにまで絞り込んだ。この領域中には7個の機能遺伝子が存在した。

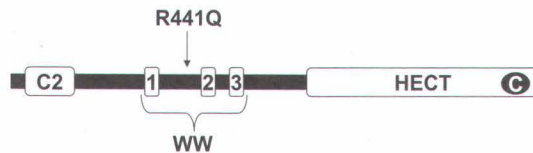


図3

図3. ニワトリWWP1のドメイン構造とニワトリ筋ジストロフィー原因変異の位置。

ニワトリWWP1は922アミノ酸残基からなり、3種の機能ドメイン(C2ドメイン、WWドメイン、HECTドメイン)を有する。HECTドメイン内のCは活性中心のシステインを示す。ニワトリ筋ジストロフィー原因変異(R441Q)は、タンパク質間結合に重要な役割を持つ2個のWWドメイン間で検出された。

	*
Chicken N ¹⁾	RNQLQGAMQGFNQRYLYSASMLSAENDPLGPLPGWERRVDSNDRVYFVNHTKTQWED
Chicken A	Q.....
Human ¹⁾	A.....Y.....K.....T.....
Chimpanzee ¹⁾	A.....Y.....K.....T.....
Monkey ¹⁾	A.....Y.....K.....T.....
Mouse ¹⁾	A.....Y.....K.....T.....
Rat ¹⁾	A.....Y.....K.....T.....
Dog ¹⁾	A.....Y.....K.....T.....
Cattle ¹⁾	AD.....A.....Y.....K.....T.....
Pigeon	
Snake	
Alligator	T.....
Lizard	T.....
Turtle	
Frog	T.....T.....

図4

図4. WWP1タンパク質の保存性。

ニワトリ筋ジストロフィー原因変異周辺のアミノ酸配列は、両生類以上の脊椎動物において高度に保存されている。Chicken N・Aは各々正常鶏・筋ジストロフィー発症鶏である。ドットはChicken Nと同じ配列であることを示す。アスタリスクは筋ジストロフィー発症鶏特異的に見られるアミノ酸置換である。1) NCBIで公開されているアミノ酸配列。



図 5

図 5. 様々な筋肉・組織におけるニワトリ *WWP1* 遺伝子の発現様式

様々な筋肉・組織のmRNA(2 μ g)を用いて、Northern blot法により *WWP1* 遺伝子の発現様式を観察した。観察対象は、胸筋(PS)・大腿筋膜張筋(TFL)・大腿二頭筋(BF)・下腿三頭筋(TS)・長腓骨筋(PL)・心臓(H)・脳(B)・肝臓(L)・腎臓(K)・胚(E)である。分析した全ての組織において分子量の異なる2本のバンドが観察され、両者はほぼ同程度の発現量を示した。N・Aは各々正常鶏・筋ジストロフィー発症鶏である。*GAPDH*は実験コントロールであり、その下の数字は *WWP1*/*GAPDH*比を示す。

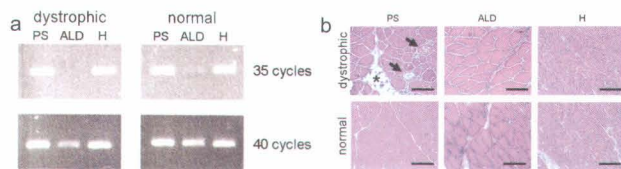


図 6

図 6. 胸筋(PS)、前広背筋(ALD)、心臓(H)におけるニワトリ *WWP1* 遺伝子の発現様式と表現型との関連

筋ジストロフィー発症鶏において、*WWP1* 遺伝子の発現は全ての筋肉で低下していたが、病理的变化が観察されたのはPSのみである。(a)RT-PCR法による *WWP1* 遺伝子の発現解析。PCRは35及び40サイクルで行った。(b)正常鶏・筋ジストロフィー発症鶏のPS、ALD、Hに対するH-E染色。発症鶏のPSでは空胞化(矢印)や脂肪滴の浸潤(アスタリスク)等の病理的变化が観察されたが、その他の筋肉ではこれらの変化は認められなかった。(スケールバー=120 μ m)

モデル動物によって大脳基底核疾患の病態を探る

南部 篤（自然科学研究機構生理学研究所・生体システム研究部門）

大脳基底核は脳の深部に存在する複数の核から成り、運動の制御や高次脳機能に関わっている。大脳基底核が機能不全に陥ると、パーキンソン病やジストニアなどの大脳基底核疾患に見られるように運動遂行に障害を来したり、あるいは強迫性障害（OCD）などのように精神症状を示したりする。さらに、これらの疾患において、脳の一部を小さく壊したり、あるいは脳内に電極を埋めて電気刺激をするという定位脳手術により、症状が軽快することがわかってきた。

このように大脳基底核疾患において、症状発現の病態生理や、定位脳手術によって症状が改善する治療メカニズムを解明するためには、（１）正常な場合において、大脳基底核を巡る信号伝達がどのように行われているのか？（２）大脳基底核疾患モデル動物において、信号伝達がどのように障害されているのか？（３）定位脳手術により、障害された信号伝達がどのように変化するのか？などを調べる必要がある。とくに神経はネットワークとして働いているので、線維連絡がつながった状態、すなわち動物個体を用いて調べること、しかも麻酔によって神経活動が大きく変化するので覚醒下無麻酔の状態で調べることが望ましい。

大脳基底核疾患のモデル動物のうち、（１）遺伝子改変技術によりヒトジストニア原因遺伝子を組み込んだモデルマウス（２）神経毒である MPTP を投与することにより作製したパーキンソン病モデルサルを取り上げ、これらの大脳基底核の神経活動が、正常と比べてどのように変化しているのかを紹介し、大脳基底核疾患の病態や定位脳手術の治療メカニズムについて考えてみたい。そして、神経疾患モデル動物から神経活動を記録・解析することの重要性を強調したい。

実験動物施設におけるホルムアルデヒド規制とその国内外における対応

池田卓也（日本チャールス・リバー株式会社）

ホルムアルデヒドは、その効果と使用の簡便さなどから実験動物用の機材や施設の殺菌消毒剤として、主たる選択肢の一つとして古くから多くの実験動物学に関連する書物に紹介されてきた^{1, 2, 3)}。そのため強い刺激臭や目・のど等の炎症を引き起こす可能性があるにもかかわらず、ホルムアルデヒドは価格が安い事もあり、多くの実験動物施設で殺菌消毒剤として常用されてきた。

このような中で、近年労働安全衛生の観点からホルムアルデヒドに対する規制が強化された。そしてこのことが契機となって、改めて実験動物施設の消毒方法が多くの場で議論され、実験動物に関連した雑誌等でも頻繁に取り上げられるようになってきた。しかしながら、規制強化の背景や本来の目的が十分に理解されていないこと等も相まって、法律の解釈や実験動物施設における実際の運用に関して一部に混乱が認められていた。そこで昨今の日本の状況と、我が国より早くから実験動物施設等でのホルムアルデヒド消毒の代替法に取り組んできた欧米の状況を含め、今後の方向性について概括する。またホルムアルデヒドに代わり過酸化水素を用いて、大規模な実験動物施設で消毒を行った事例を紹介する。

ホルムアルデヒドに対する国際的な潮流と我が国の対応

近年、化学物質に対する安全性をどのように確保するかという観点から、世界的に化学物質の管理が強化されるようになってきた。そのなかで、化学物質をその危険性と有害性ごとに分類し表示したり、安全データシートを提供したりするための万国共通ルールとして、国際連合は 2003 年に「化学物質の分類および表示に関する世界調和システム（Globally Harmonized System of Classification and Labeling of Chemicals : GHS）⁴⁾」を公布した。これを受けて、厚生労働省、経済産業省、環境省等及び関係機関は、GHS 関係省庁連絡会議を組織し、「分類マニュアル」及び「技術指針」を作成し GHS 分類作業を実施した。また厚生労働省は GHS の導入を通じて化学物質の管理を進め、化学物質等による労働災害を防止するための取り組みを開始した⁵⁾。

また 2004 年には、国際がん研究機関（International Agency for Research on Cancer）が、ホルムアルデヒドの発がん性分類を、従来のグループ 2A から「人に対して発がん

性がある」グループ1に変更し、その危険性を強く示唆した⁶⁾。このような化学物質に対する国際的な流れの中で、国内では厚生労働省が労働者の健康障害を防止するために特定化学物質障害予防規則（特化則）等の改正をおこなった。そしてその中でホルムアルデヒドを、労働安全衛生施行令上第3類物質から第2類物質（特定第2類物質）に変更し、使用に対する規制を強化した⁷⁾。これらの改正により、ホルムアルデヒドを使用するにあたっては、新たに事業者は作業環境測定、特定業務従事者検診を実施し、さらに作業環境測定の記録および結果の評価を実施し記録を保存するなどの対応が必要となった。しかし通常多くの動物実験の現場や実験動物施設では、常時ホルムアルデヒドを使って燻蒸を行うことはないため、前記の労働安全衛生施行令改正に対する解釈も含め、現場での対応に混乱がおきることとなった。

そのため、各種の研究会や雑誌等でも実験動物施設におけるホルムアルデヒドの扱いや法令解釈に関する話題が取り上げられるようになった（表1）。その中では管理濃度が0.1ppm以下と厳しく定められたことに対して、極めて現実的な希望として「実験動物施設に関しては、常時ホルムアルデヒドを使用するわけではないので規制対象外にすべきである」、「今まで長きにわたり使用して問題が無いのだから、今後も同様の使い方をしても何ら問題はない」などの、ホルムアルデヒド使用の現状を都合よく解釈して肯定する意見や、「日常よく食べる食品も含めて、自然界にはある程度の濃度で存在するホルムアルデヒドを、何故このように厳しく規制するのか」、「厳しい規制により、日本では実験動物施設の維持管理や動物を使用する研究が困難になる」などの法規制に対する反発もあった。一方、「法規制を厳密に解釈すると、ホルムアルデヒドを使用する実験動物施設の燻蒸は法令違反である」、「環境保全や実験動物施設での労働安全衛生を確保するという観点から、欧米と同様に日本でも実験動物施設のホルムアルデヒド燻蒸は全面的に禁止すべきである」というような非常に厳しい意見も一部にはあった。そして前述のような議論と並行して、ホルムアルデヒドに代わる殺菌消毒剤や消毒滅菌法についても、ようやく海外の事情も含めた情報収集や議論が真剣になされるようになってきた。また我国でも労働安全衛生の観点から、実験動物施設におけるホルムアルデヒドガス燻蒸の是非について議論が行われる事を期待したが、現実的にはほとんど議論が行なわれることはなかった。

このようななかで、ホルムアルデヒドに係る燻蒸作業における暴露防止対策の強化を目的に、特化則の改定が行われた⁸⁾。そしてその内容は現実的な日本の状況を踏ま

え、最終的に実験動物施設においては「常時ホルムアルデヒドを使用しない燻蒸作業は、燻蒸終了後にホルムアルデヒドの発生源がなくなる。そのため作業時の入室に防毒マスク使用などの対策をすることにより、また燻蒸終了後には燻蒸した飼育室のホルムアルデヒド濃度を測定し、管理濃度 0.1ppm 以下であることを確認する」という事になった。すなわち実験動物施設における飼育室などの定期あるいは不定期のホルムアルデヒドによる燻蒸消毒は、特化則改定前とほぼ同様に実施することが可能となった。特に飼育室などの燻蒸消毒を専ら外部の消毒専門業者に委託して行う場合、実験動物施設を保有する企業は燻蒸終了後にホルムアルデヒドの管理濃度を確認すること以外は、今までと何ら変わることなく燻蒸消毒を実施できることになった（表 2）。

以上のようにいくらか制限は多くなったとは言え、実験動物施設の燻蒸消毒作業にホルムアルデヒドの使用が禁止されることなく使用を継続できる事は、大方の関係者にとっては安堵できる改正内容であった。なお特化則改訂の本来の目的は、ホルムアルデヒドによる健康被害を防止することである。しかし先の特化則改正の前後に開催された研究会等では、ホルムアルデヒドを使用する作業従事者の健康と安全の確保に関して、具体的に議論されることはほとんどなかった。本来であれば、ホルムアルデヒドを実験動物施設の殺菌消毒に使い続けることが、安全衛生や環境保全の観点から良いことなのか、如何に作業従事者の安全を確保するのか、通常の動物施設においてホルムアルデヒドガス燻蒸を実施する必要性が本当にあるのか、などの議論が盛り上がるべきであったと考える。しかし議論の中心は、実験動物施設の飼育室等に対するホルムアルデヒドガス燻蒸を継続することの可否や、行政当局の判断や法令の解釈、そして現場レベルでの法規制に対する具体的な対応に終始した。このように、規制強化の背景や本来の目的を十分に理解しないことに起因すると考えられる議論や混乱があったことは残念なことである。

日本と海外

ヨーロッパの国々を中心とした欧米各国では、かなり以前から実験動物施設で働く作業従事者に対する労働安全衛生環境の確保が重要視されてきた。そしてホルムアルデヒドの人体に対する危険性について議論がなされ、必要以上のホルムアルデヒドの安易な使用を戒めてきた。一方我が国では、化学物質や実験動物アレルギーなどを含

め、実験動物に関連した労働安全衛生に関しては、欧米諸国と比較して必ずしも十分に配慮されてきたとは言えない。

筆者は 1995 年からドイツ系の外資系企業において新設の実験動物施設の運営管理を担当する事となった。実験動物施設の建設にあたり、設計時においてすでに消毒ホルムアルデヒドを使用することは、ドイツ本社の指示で禁じられていた。そのため実験動物施設は、ホルムアルデヒドに対応した施設設備とはならなかった。そのためホルムアルデヒドを使用せずに、どのように施設を消毒し維持管理するかに苦慮した。またその後に担当することになったイギリス系の外資系企業の実験動物施設においても、2003 年に施設を改修した後の再立ち上げに際して、欧米の上層部はホルムアルデヒドを動物施設の消毒に用いる事に対しては否定的であった。このようなことから個人的には、外資系製薬企業の医薬品研究開発のための実験動物施設において、新規あるいは改修後の立ち上げおよび定期的な飼育室消毒にも、ホルムアルデヒドを使うことは全く無かった。その代わり、アルコールや酸化剤等の既存の消毒薬を組み合わせた消毒(表 3)を実施することにより、約 10 年以上実験動物施設を維持管理したが、幸いにも 2 つの実験動物施設において自ら感染事故を起こすことはなかった。また外部から感染動物を持ち込まれる事はあったが、その感染を施設内で広げることは無かった。さらに感染動物が搬入され飼育室(区域)を一時的に閉鎖した時にも、ホルムアルデヒドを使うことなく前述の方法で消毒を実施したが、その後の実験動物施設の維持管理で問題が生じることはなかった。このような経験から、実験動物生産企業から SPF レベルの動物を購入し飼育する限りにおいては、ホルムアルデヒド燻蒸による消毒は実験動物飼育施設には必ずしも必要条件にはならないと考えられる。

2009 年に開催された、米国での 60th National Meeting of Association for Laboratory Animal Science や、イタリアでの 7th World Congress on Alternatives & Animal Use in the Life Sciences に出席した欧米の実験動物施設の関係者に聞く限りでは、ホルムアルデヒドを使用した実験動物飼育施設の消毒は非常に限定的であること、そしてホルムアルデヒド燻蒸に代わる消毒方法としては過酸化水素が主体であり、まれに二酸化塩素を使っている動物施設があると言うのが最近の欧米の傾向のようであった。

これらの意見を裏付けるように、カナダの実験動物施設に関するガイドラインでは、実験室や施設等の殺菌消毒には過酸化水素を第一選択として奨励している⁹⁾ また米国

の Environmental Protection Agency のガイドライン¹⁰⁾ には、ホルムアルデヒドを含めた複数の消毒方法が紹介されているが、ホルムアルデヒドに関しては発がん性等の危険性も含め指摘し、実験動物施設の消毒方法として必ずしも推奨してはいない。一方過酸化水素消毒に関しては、STERIS 社や BIOQUELL 社による過酸化水素蒸気発生用ジネレーターの開発の歴史やその有用性を紹介し推奨している。さらに米国では、Charles River Laboratories (CRL) の実験動物生産施設や Jackson Laboratory など複数の大規模な研究用実験動物施設で、過酸化水素が施設の消毒に使われその効果が実証されている^{11,12)}。一方我が国においても、先に紹介した欧米企業が開発した過酸化水素消毒用ジネレーターが輸入され、医薬品製造施設などで使われるようになってきている。また最近では医薬品製造設備で、工場建設時に過酸化水素消毒システムを建物に組み込む事がなされるようになってきている¹³⁾。また今一つのホルムアルデヒド代替物質である二酸化塩素についても、近年実験動物施設や実験室の消毒を行うための専用機器が開発され、複数の施設でその効果が実証されている^{14,15)}。

実験動物生産施設での過酸化水素による噴霧気化殺菌

実験動物生産施設では、通常定期的に飼育室内の修繕や飼育関連器材の更新を行うために、飼育室での動物生産を中止して大規模な改修作業を行う。そして改修終了後には飼育室全体をホルムアルデヒドで燻蒸殺菌を行い、飼育用器材と動物を新たに搬入して実験動物の生産活動を再開してきた。日本チャールス・リバー株式会社 (CRLJ) の親会社である CRL では、日本ではごく普通に行われているホルムアルデヒドガス燻蒸を廃し、かなり以前から生産設備には酸化剤を中心とした代替方法を導入し燻蒸殺菌消毒を実施してきた。そこで CRLJ でも、2008 年に米国西海岸カリフォルニア州にある Holister 飼育センターなど複数の施設での実績を踏まえて、改修後の過酸化水素による飼育室殺菌消毒を試みた。背景としては、まず CRL グループ内の実験動物生産施設では、日本以外ではホルムアルデヒドガス燻蒸による実験動物生産施設の殺菌消毒は行われていない。そしてまた昨今の日本の状況を鑑み、すなわち労働安全衛生関連の法規制の強化や生産施設周囲の環境保全を勘案し、ホルムアルデヒドガス燻蒸による実験動物生産施設の殺菌消毒をこれ以上継続することは適切ではないと判断したことがある。そこで CRL が用いている方法の中で、比較的多くの事例がある過酸化水素による殺菌を、日本国内においても実施することとした。しかし CRL と同様の方式

による殺菌消毒に関しては、①日本国内の実験動物生産施設では実績がない。②高額の過酸化水素噴霧器が必要となる。③CRLJの飼育室の構造上、過酸化水素噴霧器の搬出入が困難である。等の理由から採用を断念した。そのためCRLJの方法を基に、過酸化水素の噴霧気化方式による殺菌を試みた(図1)^{16,17)}。なお過酸化水素を主体とした消毒を行ったのは、実験動物生産用の飼育室A(600 m³)およびB(1080 m³)である。しかし、このような大規模なスペースに対する過酸化水素による消毒は、CRLJだけでなく共同で消毒作業にあたったメルシャンクリンテックにとっても初めての試みであった。そのため不十分な殺菌や殺菌失敗による実験動物生産への影響を勘案して、施設の部材が損傷する可能性があったにも関わらず殺菌強度を高めに設定した。またホルムアルデヒドガス燻蒸と同等の評価を行うため、バイオリジカルインジケータ(BI)を含め殺菌効果判定は、できるかぎり従来のホルムアルデヒド殺菌と同様の方法で評価(表4)し、設置場所も可能な限り同等の場所にて実施した。その結果、最初に消毒を行った飼育室Aでは、従来のホルムアルデヒド殺菌では死滅が確認されたBIの設置箇所において、過酸化水素の拡散浸透性不良により排気ダクト部分で陽性例が認められた。しかしながら飼育室AのBI以外では、飼育室Bも含め各種の微生物学的な検査結果に全く問題はなかったため、両飼育室には生産用動物を搬入し生産を再開した。両飼育室では生産再開後に生産動物に対する定期的な微生物モニタリング(表5)を実施しているが、消毒後の再稼働後2年近く経過するもまったく問題なく実験用動物を生産し出荷している。

一方、飼育室Aでは塗装表面の気泡による損傷といった問題点が確認された(図2)。そこで飼育室Bでは、薬剤の拡散性を良くするために循環ファンを設置し、施設の隅々まで蒸気が行きわたるよう殺菌を実施した。また塗装表面の損傷を減らすために単位容積あたりの過酸化水素発生量を減らすと同時に殺菌時間を26時間から4時間に短縮した。しかし上記のような改善策にもかかわらず塗装面の一部には、火膨れが散見された。この2飼育室での結果から、過酸化水素殺菌には、浸透力が弱く濃度維持が難しい等の欠点が改めて明らかになった。また金属に対する腐食性が強いことから、消毒対象施設の構造上の問題だけでなく部材等の問題も、消毒の実施に先立って検討する必要がある事が判った¹⁸⁾。一方でホルムアルデヒドは拡散性が良く、濃度を維持すれば容易に細部末端まで消毒が可能であり、使い勝手が良いと言う利点がある。

しかしホルムアルデヒドの持つ環境や安全衛生に対する問題点や、昨今の社会的な

状況、そして欧米での実績を勘案すると、過酸化水素を用いた実験動物施設の殺菌は今後増えてくると想定される。なお過酸化水素には、ホルムアルデヒドとは異なる問題点として、強い刺激性があり、失明や生命への危険性すらあるのみならず使い方を誤ると爆発の危険性もある。そのため過酸化水素の特性を充分理解し、作業者にとっても施設側にとってもより安全な殺菌方法を確立する必要がある。このような事から、過酸化水素による動物施設の消毒に関しては、未解決な課題が多く今後の検討が必要である。そのためホルムアルデヒドによる殺菌消毒のように、過酸化水素がどこの実験動物施設でも容易に使用できるまでには時間が必要と考えられる。

まとめ

昨今、さまざまな分野においてグローバリゼーションやハーモナイゼーションの掛け声のもとに、統一化や共通化が計られている。欧州の国々では、20年以上も前から労働安全衛生と環境汚染の観点から、ホルムアルデヒドやエチレンオキサイドなどは使用を控えるべきだとの議論がなされてきた。そのため多くの国々の実験動物施設では使用を控え、他の方法に転換を計ってきた。しかし残念ながら、我が国では実験動物分野における労働安全衛生に関しては、グローバリゼーションやハーモナイゼーションと言う観点でみると、諸外国と比較して必ずしも進んでいるとは言い難い。このような中で、我が国における最近のホルムアルデヒドの使用規制は、実験動物施設で働く従業員の健康被害を防ぐ立場からは、極めて喜ばしいことである。しかしながら、米国では、欧州では、と言う言葉に踊らされて、安易に諸外国の方法を盲目的に取り入れるのは性急である。実験動物施設の殺菌消毒に使う化学薬品は、微生物を死滅させ殺菌消毒を行える以上は、毒性のない物はなく程度の差こそあれ少なからず人体にも毒性がある。本稿で紹介した代表的な殺菌消毒剤も、皮膚や目の障害だけでなく、使用方法を誤ると最悪の場合は死に至るあるいは爆発の危険性を持つ化学薬品もある。たとえば過酸化水素は無味無臭であることから、飼育室などの消毒作業中に過酸化水素が存在することを知らずに立ち入ると極めて危険である。そのために消毒作業中は、過酸化水素による消毒を行っているということを明確に表示し、中に人が立ち入ることがないように対策を講じる必要がある。また既存の実験動物施設では、過酸化水素や二酸化塩素などの酸化剤はホルムアルデヒドに比較すると総じて金属などへの侵襲性が強いいため、飼育室に用いられている材質や器材に対してしばしば障害を起こす。

そのため使用に際しては注意が必要である。いずれにせよ実験動物施設の使用者は、労働安全衛生と環境保全の観点から、ホルムアルデヒドの使用を最小限にする努力が必要である。また同時に、何が自分の施設に最適な殺菌消毒方法を十分に考えて、消毒方法を選択することが肝要であるとする。

引用文献

1. 前島一淑，松本恒弥，高垣善男，加藤英一：施設の消毒と滅菌，108-125，実験動物衛生管理のための消毒と滅菌，ソフトサイエンス社，東京 1980
2. 木内吉寛：S P F 動物 264～273，実験動物技術体系，日本実験動物技術者協会編，アドスリー，東京 1996
3. 海老根猛：洗浄・消毒・滅菌装置 188-204，最新ガイドライン 実験動物施設の建築および設備 第3版，日本建築学会編，アドスリー，東京 2007
4. Globally Harmonized System of Classification and Labeling of Chemicals (GHS)，1st ed. United Nation 2005，
http://www.unece.org/trans/danger/publi/ghs/ghs_rev01/01files_e.html
5. 労働安全衛生法等の一部を改正する法律等の施行について（化学物質等に係る表示及び文書交付制度の改善関係）厚生労働省基準局 基発第 1020003 号 平成 18 年 10 月 20 日
6. IARC Classifies Formaldehyde as Carcinogenic to Humans, International Agency for Research on Cancer, World Health Organization, Press Release No. 153, 2004 June 15 <http://www.iarc.fr/en/media-centre/pr/2004/pr153.html>
7. 労働安全衛生法施行令の一部を改正する政令及び特定化学物質障害予防規則等の一部を改正する省令等の施行等について 厚生労働省基準局 基発第 02290001 号 平成 20 年 2 月 29 日
8. 労働安全衛生法施行令等の一部を改正する政令及び労働安全衛生規則等の一部を改正する省令の施行について 厚生労働省基準局基発第 1126001 号 平成 20 年 11 月 26 日
9. Guidelines on: Laboratory Animal Facilities-Characteristics, Design and Development. Canadian Council on Animal Care, Ottawa, 2003,

http://www.ccac.ca/en/CCAC_Programs/Guidelines_Policies/GDLINES/Facilities/PDFs/Facilities_Gdlines_Eng.pdf

10. “Compilation of Available Data on Building Decontamination Alternatives”
US Environmental Protection Agency, National Homeland Security Research Center, Office of Research and Development, Washington, DC 2005
<http://www.epa.gov/NHSRC/pubs/600r05036.pdf>
11. Lopez, J.A. : Commissioning to Support the Shutdown, Decontamination and Restart of an ABSL3 facility, National Conference on Building Commissioning, May 2-4 2007
12. Herd, M. Warner, A: Hydrogen Peroxide Vapor Bio-decontamination of the Jackson Laboratory’ s New Animal Facility, ALN magazine, November/December 2005
13. 馬上光夫, 市原宏信 : 過酸化水素(ガス)による消毒, アニテックス, 21(6), 25-32, 2009
14. Czarneski , M.A. : Selecting the Right Chemical Agent for Decontamination of Rooms and Chambers, Applied Biosafety, 12(2), 85-92, 2007
15. Czarneski , M.A. : Microbial Decontamination of a 65-Room New Pharmaceutical Research Facility, Applied Bio safety, 14(2), 81-89, 2009
16. 久光徹吉, 山下由貴子, 瀧脇祐樹, 高木一明, 平田守, 富田克彦, 鹵黒重樹, 伊藤雅起, 松岡 宏, 渡部嘉範, 池田卓也 : 実験動物飼育室における過酸化水素消毒の実際, 実験動物と環境, 17, 202-207, 2009
17. 瀧脇祐樹, 山下由貴子, 久光徹吉 : 実験動物飼育室に対する過酸化水素消毒の実施と工程の改善, 日本実験技術者協会九州支部会報, 33, 1-8, 2009
18. 松岡宏, 池田卓也 : 噴霧気化方式による動物飼育施設の過酸化水素蒸気殺菌, アニテックス, 21(6), 2009

表 1. 実験動物関連の研究会等でのホルムアルデヒドに関する話題

- 研究会等
 - ◆ 労働安全衛生に係るホルムアルデヒドの取り扱いについて－実験動物施設の滅菌消毒を考える：第41回日本実験動物環境研究会：シンポジウム（平成20年11月29日）
 - ◆ ホルマリン燻蒸による消毒は労働安全衛生法改正後でも可能か？－実験動物施設における消毒・滅菌方法を考える：第4回実験動物ジョイントセミナー（日本実験動物技術者協会九州支部、九州実験動物研究会、日本実験動物協同組合九州部）（平成21年4月11日）
 - ◆ 特定環境物質について考える：日本実験動物技術者協会東海支部 第35回東海支部総会（平成21年4月25日）
 - ◆ 実験動物施設における滅菌剤の使用について：日本実験動物環境研究会セミナー（平成21年6月4日）
- 雑誌
 - ◆ 特集：ホルムアルデヒドの消毒，アニテックス，2009，21(4)
 - ◆ 特集：動物実験施設の衛生・消毒，アニテックス，2009，21(6)

表 2. 実験動物施設でのホルムアルデヒドガス燻蒸に関する法解釈

特化則の要求条件	自ら自施設を実施	外部専門業者に委託
発散抑制措置	不要	不要
大量漏洩防止	不要	不要
作業主任者の選任	要	不要
作業環境測定の実施 （燻蒸後の管理濃度0.1ppm）	不要 確認作業	不要 確認作業
特定業務従事者健康診断	不要	不要
記録の保存	不要	不要

表 3. ホルムアルデヒドを使用しない飼育室の消毒事例

事例 1	事例 2
1. アルコール静拭 ● エチルアルコール 2. 予備水洗 3. 両性界面活性剤の噴霧 ● KACクリーン ● ニッサンアノン#300 4. 塩素系消毒剤の噴霧・静拭 ● ピュアラックス 5. 二酸化塩素消毒剤の噴霧・静拭 ● エクスポアー 6. 水洗	1. 消毒用アルコール静拭 ● エチルアルコール ● イソプロピルアルコール 2. 両性界面活性剤の噴霧 ● ニッサンアノン#300 3. 水洗 4. 次亜塩素酸による静拭 5. 二酸化塩素消毒剤の噴霧 ● エクスポアー 6. 水洗

表 4. 過酸化水素消毒の評価

- 過酸化水素消毒の評価
 - ◆ CI（ケミカルインジケーター）
 - ✓ ステリス社 過酸化水素用インジケーター NB305
 - ◆ BI（バイオロジカルインジケーター）
 - ✓ レーベン社 SPORE STRIPS *Geobacillus stearothermophilus* 10⁶
- 消毒法全体の評価
 - ◆ 拭き取り検査
 - ✓ 過酸化水素、Clidox®-S、Virkon®Sの各工程後に実施。
 - ✓ 対象位置の15cm四方を拭き取り。
 - ✓ 一般細菌、嫌気性細菌、真菌を検査
 - ◆ 落下細菌検査
 - ✓ 全消毒工程終了より2週間後に培地開放
 - ✓ 一般細菌、大腸菌、黄色ブドウ球菌、真菌を検査
 - ◆ 動物出荷可否判定検査
 - ✓ 動物を飼育室へ導入より4週間後に動物の微生物検査を実施

表 5. 微生物モニタリングと S P F 動物の生産

- A飼育室 2008年5月～
ヌードマウス(BALB/cヌード)
- B飼育室 2008年9月～
SDラット(CD(SD)-IGSラット)



Sendai Virus	◎	HANT	<i>Salmonella</i> spp.	◎
VPN		ECTRO	<i>S.moniliformis</i>	
MHV	◎	ECUN	<i>S.pneumoniae</i>	
MVM		CARB	<i>P.pneumotropica</i>	◎
GD-Ⅶ		MPV	β ・Hemolytic <i>Strep. spp</i>	
REO		MPUL	<i>S.aureus</i>	◎
EDIM		<i>B.bronchiseptica</i>	<i>P.aeruginosa</i>	◎
MAV		<i>C.kutscheri</i>	<i>C.piliforme</i>	◎
POLY		<i>C.rodentium</i>	Ectoparasites	
K		<i>H.hepaticus</i>	Endoparasites	
MCMV		<i>H.bilis</i>	Enteric Protozoa	
MTLV		<i>Helicobacter</i> spp.	<i>P.carinii</i>	
LCMV		<i>M.pulmonis</i>	<i>Syphacia</i> spp.	△

◎ 定期微生物モニタリング検査項目 (△ 定期微生物モニタリング検査のみ)

600ppm 次亜塩素酸ナトリウムで清拭

←空調停止、HEPAフィルター撤去、目貼り処置

←CI、BI、噴霧機器設置

35% 過酸化水素消毒

←CI、BI、機器回収、拭取り検査

←HEPAフィルター設置、空調回復

←清拭

0.12% Clidox®-S散布

←拭取り検査

←清拭

0.5% Virkon®S散布

←拭取り検査

←清拭

←落下細菌検査

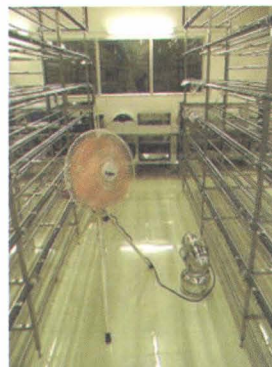


図 1. 実験動物生産施設における過酸化水素消毒

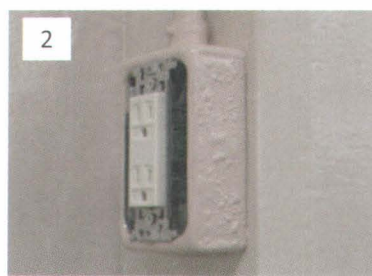
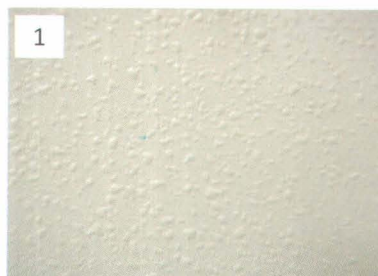


図 2. 飼育室内の壁面（1）及び電源（2）塗装表面の火膨れ

<第104回研究会（平成21年12月11日）>

<特別講演>

1. 小動物を用いた生体光イメージング

近藤 科江（京都大学大学院医学研究科）

2. 炎症関連大腸発がんモデルの作出とその発がん・化学予防研究への活用

田中 卓二（金沢医科大学・東海細胞研究所）

<会員の発表 14題>

小動物を用いた生体光イメージング

近藤科江 (Shinae Kizaka-Kondoh)

現在の所属：東京工業大学大学院生命理工学研究科、生体分子機能工学専攻、生体機能制御工学分野 (Department of Biomolecular Engineering, Tokyo Institute of Technology Graduate School of Bioscience and Biotechnology)

光イメージング技術は、日進月歩で、これまで細胞レベルで検証されてきた実験が、動物レベルにシフトしてきている。光を使った生体イメージングは、経済性に優れ、動物にも優しい手法である。また、簡便性、安全性、迅速性、多様性の面で、他のモダリティよりも優位な点も多く、単なる実験用ツールとしてではなく、次世代の臨床用画像診断への応用が期待されている。現在生体光イメージングでは、ルシフェラーゼを用いた化学発光と、蛍光タンパク質や近赤外蛍光化合物等を用いた蛍光によるイメージングが汎用されている。ともに一長一短があるものの、組み合わせることで、同時に多くの情報を生体レベルで得ることができる。ここでは、蛍光と化学発光を用いた生体イメージングについての現在の知見と、腫瘍内の低酸素誘導因子活性を光イメージングで可視化する筆者の研究を紹介したい。

はじめに

「光」の最大の問題点は透過性である。現在汎用されているイメージング機器では、透過性が最も良いとされる近赤外波長領域 (650-900nm) の光を用いても、高々 1 cm 位の組織透過性しかない (図 1)。また、自家蛍光や水の吸収が高い波長域では、光イメージングが難しいため、それらの影響をさせて「近赤外の窓」と呼ばれる波長域の利用が推奨されている (図 1)。体の内部にある光 (光源) は、拡散と散乱をしながら広がっていく。体表面に到達する光は、体表面からの深さや組織の材質 (堅さ、水分量等) に大きく左右される。当然、体表面からの距離 (深さ) が大きいほど、外部から得られる光の強さは弱くなるため、得られた画像だけでは、元の光の大きさを決定することはできない。イメージング機器の進歩も目覚ましい物があり、体内の正確な光の強さや位置の情報を得るために、3D 解析ソフトが開発されており、その精度も年々増している。

現在、小動物を用いた生体イメージングに使われている光は、化学発光と蛍光で、イメージング機械も蛍光に特化したものと、蛍光と化学発光の両方に対応したものがある。

化学発光による生体イメージング

化学発光は多くの場合、酵素を介した酸化反応によってエネルギーが与えられる。化学発光は熱をほとんど出さず、発光効率の良い。生体イメージングでは、ルシフェラーゼという酵素が汎用されており、基質であるルシフェリンとの酸化反応による化学発光を利用している。ルシフェラーゼには、汎用されているホタルルシフェラーゼ (*firefly luciferase*) の他にも、クラゲ (*Aequorea*)、ウミシイタケ (*Renilla*)、サンゴ (*Tenilla*)、コメツキムシ (*Pyrophorus plagiophthalmus*)、バクテリア (*Vibrio fischeri*, *V. harveyi*) から単離されたシフェラーゼが、研究用に開発されている。

ルシフェラーゼのレポーターとしての有用性は、培養細胞を用いた発現誘導実験によって示されており、転写因子研究においては必須であるといっても過言ではない。小動物のイメージング機器が開発されて、ルシフェラーゼ活性を光のイメージとして個体レベルで測定することが可能になった。化学発光は、1) 励起光照射を必要としない、2) 自家発光の影響が少ない、3) 化学反応による発光であるため、基質を調整することで反応時間 (発光時間) を調整することが可能、という蛍光にはない利点を有している。一方で、4) 基質がルシフェラーゼ酵素のあるところに到達する効率や時間が発光量に影響するため、条件設定が定量性に信頼を与える上で重要になる。

ルシフェラーゼは、タンパク質であるため、目的の組織でルシフェラーゼ遺伝子を発現させる、またはルシフェラーゼたんぱくを局在させる必要がある。たとえば、ルシフェラーゼ・レポーター遺伝子を安定に保持する細胞を移植する。観察時には、麻醉器と超高感度冷却 CCD カメラを備えたイメージング装置内で静止している動物の体表面で、基質との反応時に細胞から放出される微弱な化学発光を数分かけて捉え、ソフトウェアによりデジタル処理して画像化する。

化学発光を用いた生体イメージングの特徴は、移植直後から非侵襲的に腫瘍の状態を可視化できるのみでなく、条件を設定することにより「定量性」を担保することができるという点である。現在は 3 次元で解析する事により、発光している場所の特定や大きさをより正確に把握することができるようになっている (図 2)。

蛍光による生体イメージング

生体イメージングに汎用されている蛍光材料としては、蛍光タンパク質、近赤外の蛍光化合物および無機の蛍光物質カンタムドットがある。蛍光タンパク質を用いたイメージングでは、蛍光タンパク質（緑色蛍光タンパク質 GFP や赤色蛍光タンパク質 RFP）をコードするレポーター遺伝子を組み込んだ細胞や、遺伝子改変マウス（トランスジェニックマウス等）が用いられているが、いずれも波長域が自家蛍光と同じ領域にあり、自家蛍光よりもかなり強い蛍光が出ていないと観察ができないという欠点がある。近赤外の蛍光化合物は、自家蛍光の少ない領域に蛍光領域をもち、透過性に優れているため、標識色素としてプローブ開発に用いられている。カンタムドット（Qdot）は、退色が少なく、安定であることと、多様性、修飾による応用性があり、プローブ開発に用いられている。

蛍光物質を用いたイメージングでは、蛍光物質の退色や励起光の（立体的な対象物に対する）照射効率といった不確定な要素が大きく、蛍光測定に定量性を持たせることは困難である。その一方で、ルシフェラーゼのように基質を必要とせず、測定時間も短く（数秒以内）、いつでも可視化できるという利点がある。現在、蛍光の退色時間を自動的に算出することにより、ほぼ正確に蛍光を発している細胞の位置や大きさを3次元で画像化するソフトを搭載しているイメージング機器や、自家発光を波長の違いで画像処理し、バックグラウンドをほぼ完全に除いてイメージングする装置が開発されている。

腫瘍内の低酸素誘導因子活性を可視化するためのプローブ開発

生体光イメージング研究の一例として、筆者らが開発している「腫瘍内の低酸素誘導因子活性を可視化するプローブ開発研究」を紹介する。腫瘍内には生理的酸素濃度よりかなり低い酸素濃度を有し、低酸素誘導因子 HIF-1 が活性化されている領域が存在する(図3)。その領域は、放射線治療や抗がん剤に抵抗性を有し、転写因子である HIF-1 によって誘導される様々な遺伝子の機能により、血管新生の更新、アポトーシス回避、転移・浸潤能の更新といった腫瘍全体の悪性化に関与している。従って、HIF-1 活性を有する腫瘍内低酸素領域は、腫瘍の悪性化の指標となりえ、それを可視化することができれば、治療方針を立てる場合に有用な情報を提供することができる。

HIF-1 活性がある低酸素領域に特異的なプローブを構築するために、我々は、PTD-ODD という融合タンパク質を用いている。低酸素細胞特異性をもたせるために、HIF-1 の α 因子 (HIF1- α) がもつ酸素依存的分解 (ODD: oxygen-dependent degradation) ドメインの一部を用いている。このドメインを融合タンパク質に融合させると融合タンパク質が HIF-1 α を同様の酸素依存性を持つようになる。即ち、有酸素状態の細胞では速やかに分解し、低酸素状態の細胞では安定化する。PTD (タンパク質膜透過ドメイン: protein transduction domain) は約 20 アミノ酸からなるポリペプチドで、任意のたんぱく質を細胞内に輸送することができる。PTD の機能により、融合タンパク質は細胞膜を自由に通過し、細胞内で酸素依存的分解制御を受けることになる。

この PTD-ODD 融合タンパク質に近赤外蛍光標識(NIR)をつけたプローブを構築し(図 4)、担癌マウスにこのプローブを尾静脈から投与して、高感度 CCD カメラを搭載した光イメージング装置 IVIS-SPECTRUM を用いて、プローブの体内動態を経時的に観察した。マウス 1 匹 (約 20g) あたり 0.1~0.5 nmol のプローブを投与することで、プローブが全身に分布し、有酸素細胞からは速やかにクリアランスされ、癌の低酸素領域に特異的に残留し、癌の低酸素誘導因子が活性化している領域を可視化することができる(図 5)。低酸素誘導転写因子 HIF-1 依存性のプロモーターの下流にルシフェラーゼ遺伝子をつないだプラスミドを構築し、細胞に導入後、これらのレポーター遺伝子を安定に保持するがん細胞株を樹立した。この癌細胞株をヌードマウスに移植して腫瘍をつくり、ルシフェリン基質を投与すると、HIF-1 依存的ルシフェラーゼが発現する腫瘍細胞は、化学発光の生体イメージングで非侵襲的に可視化することができる(図 5 最右パネル)。つまりがんの低酸素領域を可視化し、プローブが特異的に集まるか否かを評価する上で有用である。ルシフェラーゼが化学発光をしている状態で解剖すると、*ex vivo* での解析が可能である。したがって、プローブが確かに標的となる腫瘍部分に局在しているかを、最終的に解剖して確認する際も、化学発光と蛍光を組み合わせることで、*ex vivo* で容易に、確実にリアルタイムで確認することができる(図 6)。

我々は、上記プローブを用いて、直径数mm程度の微小な癌でも可視化することに成功している。また、放射性同位元素をつけた PTD-ODD 融合タンパク質の生体内動態を観察した場合でも、同様に腫瘍特異的イメージを得ることができている。今後、

動物用の低酸素イメージングプローブ試薬として、また、PET や MRI 用の標識を付加することで、臨床応用ができるプローブとして開発していく予定である（図 4）。

おわりに

小動物を用いた生体光イメージングは、外部から観察する事ができない同所移植モデルでの観察に有用である（図 6）。薬剤の治療効果を観察する上でも、同所移植は信頼性が高く、評価が容易になれば同所移植を用いる評価の方が望ましい。何より光イメージングを用いることで、同一マウスを経時的に観察する事が可能になり、また手技的なミスによる誤差を減らす事ができるため、作業効率の改善、動物費用の削減につながる。なにより動物愛護の観点からも望ましく、国内外のメガファーマではすでに複数の光イメージング機器を設置している。今後光イメージング機器や技術の進歩に伴い、生体光イメージングは、動物実験にはなくてはならない技術となることは必至である。

謝辞

本研究は、独立行政法人科学技術振興機構から指定を受けた京都市地域結集型共同研究事業「ナノテク材料による医療用イメージングとターゲティング技術の開発」研究の一環として実施された研究の成果を含んでいる。

参考文献

1. 近藤科江 生体光イメージングを用いた動物実験 LABIO 21 37:14-18 (2009)
2. 近藤科江 インビボ光イメージング法 細胞 The Cell 41(9):377-380 (2009)
3. 近藤科江、平岡眞寛 イメージングによるがんの悪性度診断 Cancer Frontier 11: 43-51 (2009)
4. 永澤秀子、近藤科江。低酸素誘導因子(HIF-1)と低酸素標的創薬 ファルマシア 45(4):321-36(2009)
5. 近藤科江、平岡眞寛 小動物をも用いた光イメージング研究の現状、ナノメディシン -ナノテクノ医療応用- 宇理須恒雄 編集、オーム社、平成 20 年 2 月 18 日発行
6. 近藤科江 概論 日進月歩のイメージング技術のがん診断への応用。実験医学、10 月増刊号 Vol.25(No.17),2770-2777 (2007).

7. 近藤科江、田中正太郎、平岡眞寛 癌微小環境イメージングによる悪性腫瘍診断法開発 実験医学、10 月増刊号 Vol.25(No.17), 2805-2812 (2007).
8. 近藤科江 環境標的としての低酸素細胞の光イメージング 実験医学 9 月号。Vol.25(No.14),2144-2150 (2007)。
9. Kizaka-Kondoh S, Konse-Nagasawa H. Significance of nitroimidazole compounds and HIF-1 for imaging tumor hypoxia. Cancer Sci, 100(8):1366-1373 (2009).
10. Kizaka-Kondoh S, Tanaka S, Harada H, Hiraoka M. The HIF-1 active microenvironment: an environmental target for cancer therapy. Advanced Drug Delivery Reviews, 61(7-8):623-632 (2009)

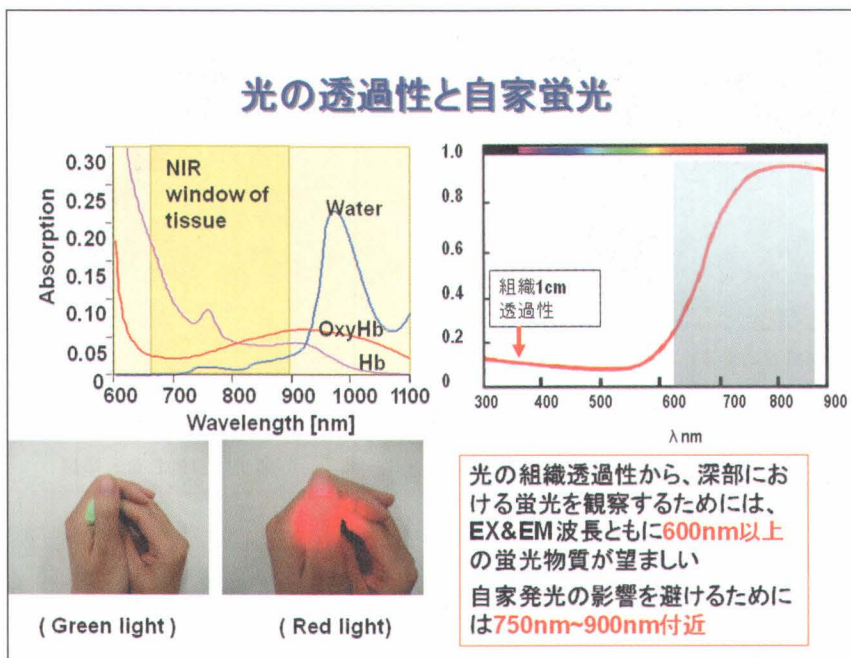


図1 光の透過性

右上：各波長における1cmの組織を通る透過率(%)を赤い線で示している。
 左上：ヘモグロビン(Hb、ピンク)、オキシヘモグロビン(OxyHb、赤)、水(青)の吸収領域を示している。「近赤外の窓」と呼ばれる波長域が濃い黄色で示してある。
 下図：緑よりも波長の長い赤の光の方が透過性が良い事をしめている。

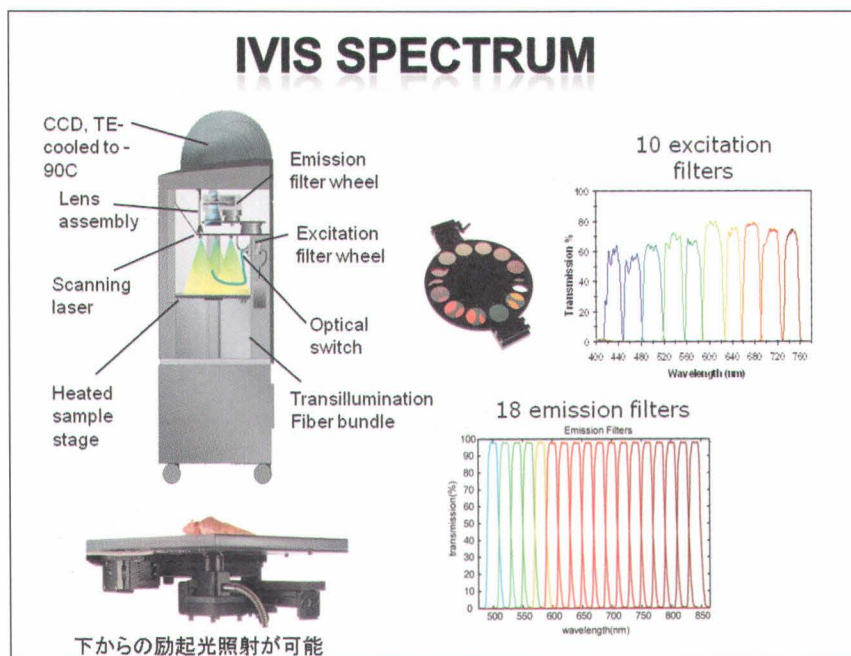


図2 光イメージング機器

光イメージングは、麻酔で静止しているマウスを暗室で高感度CCDカメラにより撮像する。多様な蛍光波長に対応できるように、また、3D解析用に、狭い波長域をもった多くのフィルターを搭載している。

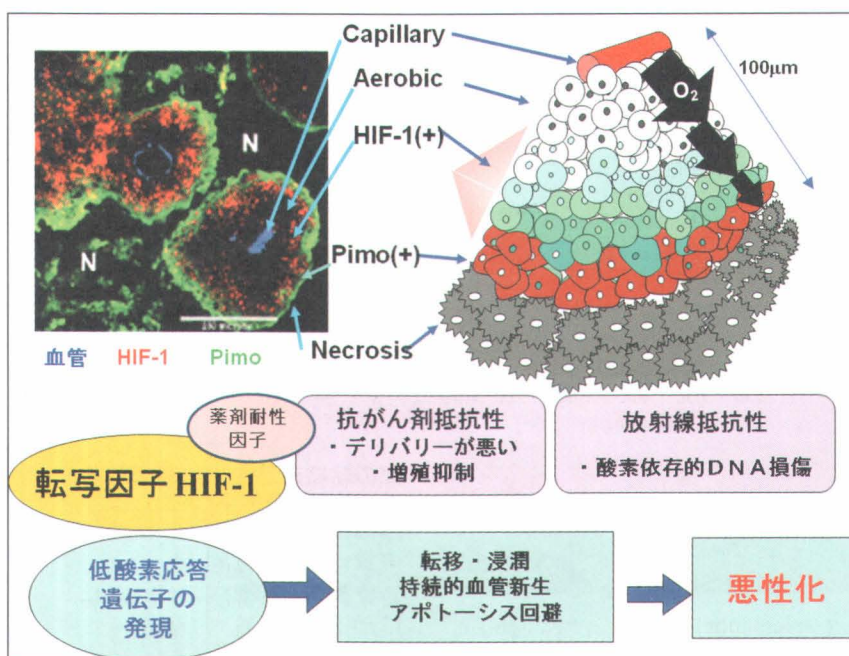


図3 腫瘍内の微小環境と低酸素誘導因子

左上図：腫瘍切片の蛍光染色。青：腫瘍血管、赤：HIF-1 活性がある領域、緑：極めて低酸素の領域

右上図：腫瘍内の模式図。左の免疫染色図に対応させている。

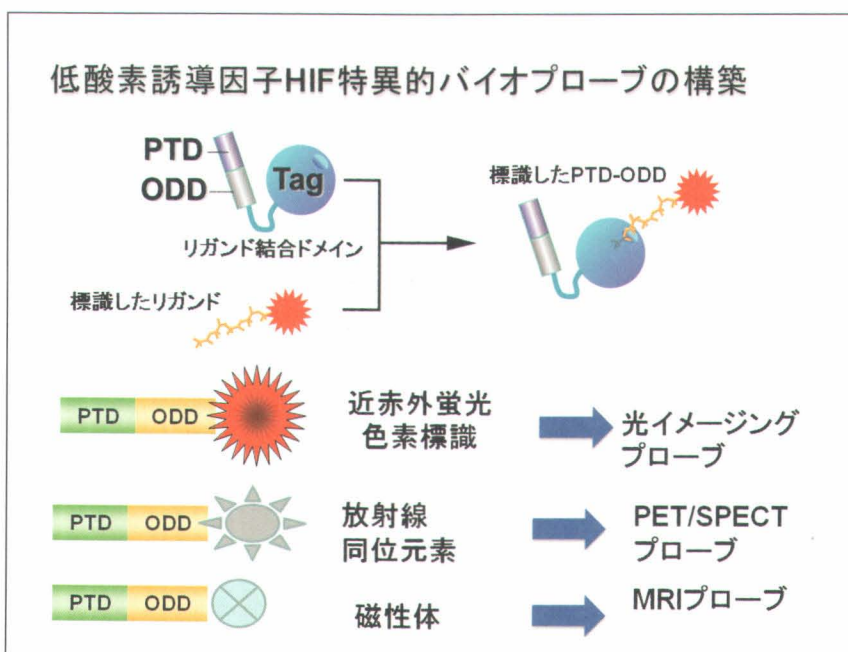


図4 低酸素誘導因子HIFを可視化するバイオプローブ

融合タンパク質で構築したプローブPOHは、低酸素誘導因子HIF-1の α サブユニットと同じドメインを持っていて、酸素濃度依存的に安定化する。そのPOHに近赤外蛍光色素をつけることで、光イメージングプローブを構築した。同様に放射性同位元素化合物、MRI磁気材料をつけることで、それぞれPET/SPECT、MRIイメージングプローブとして構築できると考えられる。

近赤外蛍光色素標識プローブ(POH-N)

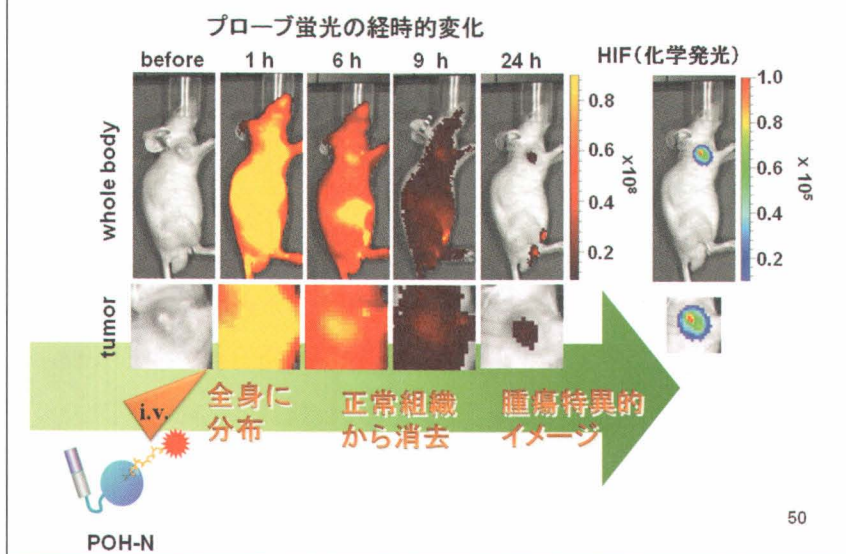


図5 低酸素誘導因子HIFを可視化するバイオプローブPOH-Nによる光イメージング
 右図：化学発光による前足に皮下移植した腫瘍内の低酸素誘導因子活性の可視化
 左図：上記マウスにPOH-N投与後経時的に蛍光イメージングした。6時間までにはプローブは腫瘍に集まり、24時間までには、腫瘍特異的イメージングが得られた。

すい臓がん同所移植の可視化

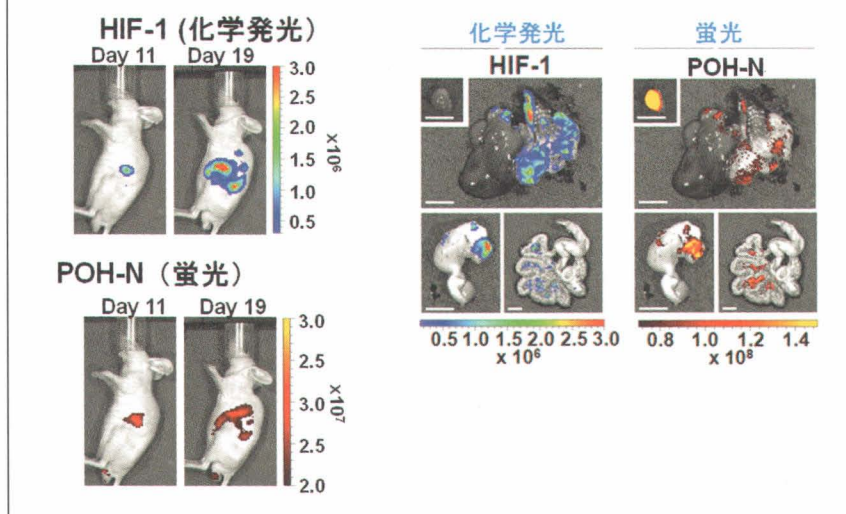


図6 HIF-1活性を有する腫瘍内低酸素領域の可視化
 左上図：ヒトすい臓がん細胞をヌードマウスの膵臓に同所移植し、移植後11日目と19日目に化学発光で腫瘍の低酸素誘導因子活性を可視化した。
 左下図：低酸素誘導因子HIFを可視化するバイオプローブPOH-Nを上記マウスに投与して24時間後に撮像した。
 右図：19日目のマウスを解剖して低酸素誘導因子が活性化したがん細胞の分布をex vivoイメージングで確認した。腫瘍の位置(化学発光)とPOH-Nプローブが観察される位置(蛍光)がほぼ一致しているのがわかる。

炎症関連大腸発がんモデルの作出とその発がん・化学予防研究への活用

田中卓二

金沢医科大学(KMU)腫瘍病理学講座・東海細胞研究所 (TCI-CaRP)

はじめに

炎症とがんの関連は旧くから指摘されてきた[1]が、胃がん発症と密接に係わるピロリ菌 (*Helicobacter pylori*) 感染に関する報告とピロリ菌発見者の Marshall と Warren [2]が 2005 年ノーベル生理学・医学賞を受賞したことから、諸臓器での炎症とがん発症の関連 (図 1) に関する多数の報告が PubMed 上を賑わし、主要なジャーナルで特集が組まれることとなった。

大腸においても潰瘍性大腸炎やクローン病などの炎症性腸疾患、なかでも潰瘍性大腸炎は罹患期間 (罹患期間 10 年で 1.6%のリスクが、20 年で 8.3%、30 年で 18.4%に増加) や炎症の程度に比例して大腸がん発症のリスクが高くなる (図 2) [3]ことが解っており、私どもは以前よりこの炎症に係わった大腸発がんに興味を持っていた[4]。我国を含めたアジア諸国では欧米諸国と同様に大腸がん患者とともに潰瘍性大腸炎患者の増加が指摘されており (図 3)、炎症を背景とする大腸がんの発症機構の解明が化学予防などその阻止に関する戦略の構築に必要と考えられる。そのためには新規動物モデルの作出が必須だが、有用な動物モデルは乏しかった。本稿では私どもが作出したヒト潰瘍性大腸炎を模倣する大腸炎を背景とした大腸発がんの短期マウス・ラットモデルの詳細とモデルを利用した化学予防物質の探索について紹介したい。

(1) ヒト大腸がんの発生過程

ヒト大腸がんの発生過程には少なくとも 4 つのタイプ (adenoma-carcinoma sequence type, HNPCC type, de novo type, colitic cancer type) がある (図 4) [5]。このうち大腸炎を背景とするものは colitic (colitis) cancer type で、炎症を繰り返す大腸粘膜に iNOS 系などのフリーラジカル産生により DNA 損傷が惹起され、次いで *p53* の変異が生じ、前がん性病変の dysplasia が生じる。さらに、炎症病巣で産生された COX-2、iNOS、サイトカイン等により異形成 dysplasia の発育が促進され、*DCC* 遺伝子の欠失などの遺伝子異常が蓄積して浸潤性大腸がんに至るというものである。通常の大腸がん (adenoma-carcinoma

sequence type) と異なり、*APC*, *K-ras* 遺伝子やマイクロサテライト不安定性 (MSI) の関与は少ないと考えられているが、検討の余地があるとされている。

(2) 炎症関連大腸発がんモデルの作出

大腸発がんの動物モデルは主にラットを用いて研究され、azoxymethane (AOM)、methylnitrosomethanol (MAM) acetate、1,2-dimethylhydrazine (DMH)などが大腸発がん物質として広く用いられている(図5) [6]。約半数のラットの大腸がん発症には30週程必要である。一方、マウスを用いた実験・研究では、同様の大腸発がん物質を投与するが複数回投与が必要で、大腸がん発症には40週以上の長期間を要する。そこで、マウスを用いて炎症を背景とし、短期間で大腸がんを誘発する新規のモデル作出を試みた[7]。1998年以降 *Nat Med* 紙上を賑わしていた PPAR agonists の大腸発がんへの影響に決着をつけようと、aberrant crypt foci (ACF)を指標としたラットの実験[8]で使用した大腸起炎物質 dextran sodium sulfate (DSS) (図6) に ACF の発生を促進するプロモーター作用があることを確認していたため、DSS と AOM を組合せば、マウスでも短期間に大腸がんを誘発できると予想した。DSS は non-genotoxic carcinogen であるため、雄性 ICR マウスに DSS→AOM、DSS 投与期間中に AOM 投与、AOM→DSS と 3 つの組合せで群を構成した(図7)。DSS→AOM 群、AOM→DSS 群では、処置の間に1週間の休薬期間を設けた[7]。DSS は2%の用量で1週間の飲水投与し、AOMは低用量の10 mg/kg 体重を単回、腹腔内投与した。その結果、AOM→DSS 群で大腸腫瘍が大腸肛側 1/2~1/3 に高頻度かつ多発し、DSS の強力なプロモーション作用を確認した(図8)。この時、発がんにおける炎症の重要性を改めて認識した[7]。また、発生した大腸がん細胞の核に β -カテニンの集積をみた。

次いで、AOM (10 mg/kg 体重)単回、腹腔内投与後の DSS プロモーション作用の有無を5用量 (0.1%、0.25%、0.5%、1%、2%) で検討した(図9) [9]。その結果、0.25%以下ではプロモーション作用は見られず、0.5% DSS で僅かに腺腫 (5匹中1匹に1個) が発生した。1% DSS、2% DSS 投与では全例に大腸腫瘍が発生し、大腸腺がんは2% DSS 群に多かった(図10)。同時に炎症スコア、免疫染色による炎症性細胞の nitrotyrosine 陽性スコアは DSS の用量に比例して高く、DSS プロモーション作用には炎症と nitrosation が係わることが判明した(図11)。

次に、AOM (10 mg/kg 体重、単回、腹腔内投与)/2% DSS (1週間) 投与雄性 ICR マウス大腸の経時的变化を観察した[10]。その結果、大腸腺腫、腺がんはそれぞれ AOM 投与後

3 週、4 週で発生し、14 週までの観察期間中、経時的にその個数が増加した (図 12)。興味深いことに、炎症スコアや nitrotyrosine 陽性スコアの高値は DSS 投与終了後の 5-6 週まで持続していた (図 13)。この時点では、DSS 投与による粘膜潰瘍は顕微鏡的に修復されているため、この炎症、特に nitrotyrosine 陽性スコアの持続は、AOM 投与後 5 週、10 週時での大腸粘膜 iNOS 高発現、PPAR γ 低発現 (図 14) とともに、興味深い。

AOM に変えて DMH [11]あるいはヘテロサイクリックアミンの 1 つ PhIP [12]をイニシエーターとしても同様の結果を得ている (図 15)。病理組織学的には DMH / DSS 投与により発生した腺がんは AOM / DSS 投与によるそれに比較して、異型度が高く、より aggressive な印象を受けた。尚、誘発された腺癌細胞は、COX-2、iNOS、 β -カテニン陽性であった (図 16)。 β -カテニン遺伝子の変異は AOM / DSS (コドン 32-34、37、41)、DMH / DSS (コドン 32、34、37、41)、PhIP / DSS 処置 (コドン 32、34) により誘発された腺がんでは若干異なっていた (図 17)。しかし、これらの変異はいずれも β -カテニン蛋白 degradation に重要な役割をするとされるコドン域 (32-34、37、41、45) に集中していた。

マウスの系統による DSS 誘発大腸炎の感受性の差が報告されており [13]、その感受性の差が大腸発がんに影響するか否かを知るために、AOM / DSS 誘発大腸発がんの感受性を 4 系統 (Balb/c、C57BL/6N、C3H/HeN、DBA/2N) のマウスで検討した結果、Balb/c > C57BL/6N >> C3H/HeN = DBA/2N の順に感受性が高く (図 18)、これは DSS 処置による nitrotyrosine 陽性スコアに比例しており、AOM / DSS 誘発大腸発がんにおける nitrotyrosine の重要性が示唆された [14]。

家族性大腸腺腫症 (FAP) のモデル動物として知られる *Apc*^{Min/+}マウスは、ヒト FAP と異なり大腸ではなく小腸に腫瘍 (腺腫) が多発するが大腸腫瘍の発生は極めて少ない。しかし、大腸粘膜には dysplastic crypts が観察される (図 19) [15]。そこで DSS 投与による大腸粘膜の炎症がこの dysplastic crypts の発育を促進するか否かを検証するために、イニシエーション処置を行わず 2% DSS を *Apc*^{Min/+}マウスに 1 週間飲水投与した [16]。驚いたことに、DSS 投与終了後 4 週時には多数の大腸腫瘍が発生した (図 20)。発生した大腸腺がんは免疫染色にて β -カテニン、COX-2、iNOS、p53 陽性を示しており (図 21)、酸化ストレス・ニトロソ化ストレスに加えてこれらも DSS による *Apc*^{Min/+}マウス大腸発がんに関与することが示唆された。DSS 投与により誘発された *Apc*^{Min/+}マウス大腸における炎症が強力なプロモーション作用を発揮したと考えられ、興味深い。

以上、マウスを用いた炎症関連大腸発がんモデルを紹介したが、ラットでも同様の処置

(AOM / DSS、DMH / DSS など) により短期間に大腸腫瘍を誘発することが可能である [17]。これらの系を用い、炎症が保わる大腸発がん機構の解明とその抑制、DSS のプロモーション作用の機構解明に向けた研究の発展に期待したい。特に、京都大学庫本らによる Kyoto *Apc* Delta (KAD) ラットを用いたチャレンジングな研究 [18] の進展に期待している。

(3) 炎症関連大腸発がんモデルを利用した化学予防物質の探索と機構解析

AOM / DSS 誘発マウス・ラット大腸発がんモデルを用いて、いくつかの天然性あるいは合成性化合物についてその発がん抑制効果を指摘してきた。いずれも有望な化合物であり、ヒトへの応用が望まれる。代表的なものとして、柑橘由来の auraptene や nobiletin [19]、collinin [19]、 β -cyclodextrin 包接 auraptene と GOFA [20]、tricin [21]、melatonin [17]、ウルソデオキシコール酸 [22]、COX-2 選択的阻害剤 (nimesulide) [23]、iNOS 選択的阻害剤 [24]、PPAR リガンド (troglitazone、bezafibrate) [23]、スタチン製剤 (pitavastatin) [25] などである。いずれの化合物にも抗炎症作用があり、大腸局所や大腸がんにおける COX-2、iNOS、炎症性サイトカインなどの発現を抑制することが判っている。詳細については、個々の報告を参照されたい。

おわりに

以上、私どもが作出したヒト潰瘍性大腸炎を模倣する大腸炎を背景とした大腸発がんの動物モデルについて紹介し、そのモデル動物を利用した化学予防物質の探索について述べた。別に、AOM / DSS 処置マウスの大腸粘膜における網羅的遺伝子発現解析により、Wif1、Plat、Myc、Plscr2 の発現増加、Pparbp、Tgfb3、Ppargamma の発現低下をみており [26]、さらに プロテオミクス解析では非腫瘍部に比べ大腸がん組織で beta-tropomyosin、tropomyosin 1 alpha isoform b、S100 calcium binding protein A9 が発現上昇し、Car1、selenium-binding protein 1、HMG-CoA synthase、thioredoxin 1、1 Cys peroxiredoxin protein 2、Fcgbp protein、Cytochrome c oxidase subunit Va、ETHE1 protein が発現低下していた [27]。炎症が保わる大腸発がんにおけるこれらの遺伝子や蛋白発現の意義については不明な点が多く、詳細な解析が望まれる。発がん抑制では、最近の研究で炎症性細胞だけでなく、がん細胞での NF- κ B や Nrf2 の発現を確認している [20] ことから、これらも化学予防の標的分子となり得ると考えている。また、プロトコールの改変により大腸発がん物質 [28] やプロモーターの検出にも役立つ [29]。今回紹介した動物モデルは、幸なこと

に世界各国の大腸発がん、炎症性腸疾患、炎症とがんをテーマとしている若手研究者に興味を持って頂いている。このモデルを用いて炎症が係わる大腸発がん機構（methylation、microRNA など）の解明とその抑制と抑制機構の解明、DSS のプロモーション作用機構の解明がさらに進むことを期待したい。

文献

- [1] Balkwill, F.; Mantovani, A. Inflammation and cancer: back to Virchow? *Lancet*, 2001, 357, 539-545.
- [2] Marshall, B.J.; Warren, J.R. Unidentified curved bacilli in the stomach of patients with gastritis and peptic ulceration. *Lancet*, 1984, 1, 1311-1315.
- [3] Eaden, J.A.; Abrams, K.R.; Mayberry, J.F. The risk of colorectal cancer in ulcerative colitis: a meta-analysis. *Gut*, 2001, 48, 526-535.
- [4] Tanaka, T.; Kohno, H.; Murakami, M.; Shimada, R.; Kagami, S. Colitis-related rat colon carcinogenesis induced by 1-hydroxy-anthraquinone and methylazoxymethanol acetate (Review). *Oncol Rep*, 2000, 7, 501-508.
- [5] Tanaka, T. Colorectal carcinogenesis: Review of human and experimental animal studies. *J Carcinog*, 2009, 8, 5.
- [6] Rosenberg, D.W.; Giardina, C.; Tanaka, T. Mouse models for the study of colon carcinogenesis. *Carcinogenesis*, 2009, 30, 183-196.
- [7] Tanaka, T.; Kohno, H.; Suzuki, R.; Yamada, Y.; Sugie, S.; Mori, H. A novel inflammation-related mouse colon carcinogenesis model induced by azoxymethane and dextran sodium sulfate. *Cancer Sci*, 2003, 94, 965-973.
- [8] Tanaka, T.; Kohno, H.; Yoshitani, S.; Takashima, S.; Okumura, A.; Murakami, A.; Hosokawa, M. Ligands for peroxisome proliferator-activated receptors alpha and gamma inhibit chemically induced colitis and formation of aberrant crypt foci in rats. *Cancer Res*, 2001, 61, 2424-2428.
- [9] Suzuki, R.; Kohno, H.; Sugie, S.; Tanaka, T. Dose-dependent promoting effect of dextran sodium sulfate on mouse colon carcinogenesis initiated with azoxymethane. *Histol Histopathol*, 2005, 20, 483-492.

- [10] Suzuki, R.; Kohno, H.; Sugie, S.; Tanaka, T. Sequential observations on the occurrence of preneoplastic and neoplastic lesions in mouse colon treated with azoxymethane and dextran sodium sulfate. *Cancer Sci*, 2004, 95, 721-727.
- [11] Kohno, H.; Suzuki, R.; Sugie, S.; Tanaka, T. Beta-Catenin mutations in a mouse model of inflammation-related colon carcinogenesis induced by 1,2-dimethylhydrazine and dextran sodium sulfate. *Cancer Sci*, 2005, 96, 69-76.
- [12] Tanaka, T.; Suzuki, R.; Kohno, H.; Sugie, S.; Takahashi, M.; Wakabayashi, K. Colonic adenocarcinomas rapidly induced by the combined treatment with 2-amino-1-methyl-6-phenylimidazo[4,5-b]pyridine and dextran sodium sulfate in male ICR mice possess beta-catenin gene mutations and increases immunoreactivity for beta-catenin, cyclooxygenase-2 and inducible nitric oxide synthase. *Carcinogenesis*, 2005, 26, 229-238.
- [13] Mahler, M.; Bristol, I.J.; Leiter, E.H.; Workman, A.E.; Birkenmeier, E.H.; Elson, C.O.; Sundberg, J.P. Differential susceptibility of inbred mouse strains to dextran sulfate sodium-induced colitis. *Am J Physiol*, 1998, 274, G544-551.
- [14] Suzuki, R.; Kohno, H.; Sugie, S.; Nakagama, H.; Tanaka, T. Strain differences in the susceptibility to azoxymethane and dextran sodium sulfate-induced colon carcinogenesis in mice. *Carcinogenesis*, 2006, 27, 162-169.
- [15] Hata, K.; Tanaka, T.; Kohno, H.; Suzuki, R.; Qiang, S.H.; Yamada, Y.; Oyama, T.; Kuno, T.; Hirose, Y.; Hara, A.; Mori, H. beta-Catenin-accumulated crypts in the colonic mucosa of juvenile ApcMin/+ mice. *Cancer Lett*, 2006, 239, 123-128.
- [16] Tanaka, T.; Kohno, H.; Suzuki, R.; Hata, K.; Sugie, S.; Niho, N.; Sakano, K.; Takahashi, M.; Wakabayashi, K. Dextran sodium sulfate strongly promotes colorectal carcinogenesis in Apc(Min/+) mice: inflammatory stimuli by dextran sodium sulfate results in development of multiple colonic neoplasms. *Int J Cancer*, 2006, 118, 25-34.
- [17] Tanaka, T.; Yasui, Y.; Tanaka, M.; Oyama, T.; Rahman, K.M. Melatonin suppresses AOM/DSS-induced large bowel oncogenesis in rats. *Chem Biol Interact*, 2009, 177, 128-136.
- [18] Yoshimi, K.; Tanaka, T.; Takizawa, A.; Kato, M.; Hirabayashi, M.; Mashimo, T.;

- Serikawa, T.; Kuramoto, T. Enhanced colitis-associated colon carcinogenesis in a novel Apc mutant rat. *Cancer Sci*, 2009, 100, 2022-2027.
- [19] Kohno, H.; Suzuki, R.; Curini, M.; Epifano, F.; Maltese, F.; Gonzales, S.P.; Tanaka, T. Dietary administration with prenyloxycoumarins, auraptene and collinin, inhibits colitis-related colon carcinogenesis in mice. *Int J Cancer*, 2006, 118, 2936-2942.
- [20] Tanaka, T.; de Azevedo, M.B.; Duran, N.; Alderete, J.B.; Epifano, F.; Genovese, S.; Tanaka, M.; Curini, M. Colorectal cancer chemoprevention by 2 beta-cyclodextrin inclusion compounds of auraptene and 4'-geranyloxyferulic acid. *Int J Cancer*, 2010, 126, 830-840.
- [21] Oyama, T.; Yasui, Y.; Sugie, S.; Koketsu, M.; Watanabe, K.; Tanaka, T. Dietary tricin suppresses inflammation-related colon carcinogenesis in male Crj: CD-1 mice. *Cancer Prev Res (Phila)*, 2009, 2, 1031-1038.
- [22] Kohno, H.; Suzuki, R.; Yasui, Y.; Miyamoto, S.; Wakabayashi, K.; Tanaka, T. Ursodeoxycholic acid versus sulfasalazine in colitis-related colon carcinogenesis in mice. *Clin Cancer Res*, 2007, 13, 2519-2525.
- [23] Kohno, H.; Suzuki, R.; Sugie, S.; Tanaka, T. Suppression of colitis-related mouse colon carcinogenesis by a COX-2 inhibitor and PPAR ligands. *BMC Cancer*, 2005, 5, 46.
- [24] Kohno, H.; Takahashi, M.; Yasui, Y.; Suzuki, R.; Miyamoto, S.; Kamanaka, Y.; Naka, M.; Maruyama, T.; Wakabayashi, K.; Tanaka, T. A specific inducible nitric oxide synthase inhibitor, ONO-1714 attenuates inflammation-related large bowel carcinogenesis in male Apc(Min/+) mice. *Int J Cancer*, 2007, 121, 506-513.
- [25] Yasui, Y.; Suzuki, R.; Miyamoto, S.; Tsukamoto, T.; Sugie, S.; Kohno, H.; Tanaka, T. A lipophilic statin, pitavastatin, suppresses inflammation-associated mouse colon carcinogenesis. *Int J Cancer*, 2007, 121, 2331-2339.
- [26] Suzuki, R.; Miyamoto, S.; Yasui, Y.; Sugie, S.; Tanaka, T. Global gene expression analysis of the mouse colonic mucosa treated with azoxymethane and dextran sodium sulfate. *BMC Cancer*, 2007, 7, 84.
- [27] Yasui, Y.; Tanaka, T. Protein expression analysis of inflammation-related colon carcinogenesis. *J Carcinog*, 2009, 8, 10.

- [28] Kohno, H.; Totsuka, Y.; Yasui, Y.; Suzuki, R.; Sugie, S.; Wakabayashi, K.; Tanaka, T. Tumor-initiating potency of a novel heterocyclic amine, aminophenylnorharman in mouse colonic carcinogenesis model. *Int J Cancer*, 2007, 121, 1659-1664.
- [29] Hata, K.; Tanaka, T.; Kohno, H.; Suzuki, R.; Qiang, S.H.; Kuno, T.; Hirose, Y.; Hara, A.; Mori, H. Lack of enhancing effects of degraded lambda-carrageenan on the development of beta-catenin-accumulated crypts in male DBA/2J mice initiated with azoxymethane. *Cancer Lett*, 2006, 238, 69-75.

図1

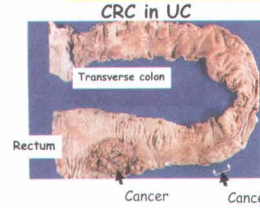
炎症と癌

Inflammation and associated cancer

Chronic inflammation	Site and associated cancer
Chewing tobacco/Oral irritation	Oral cancer
Smoking/Chronic bronchitis/Chronic obstructive pulmonary disease	Lung cancer
Asbestos	Mesothelioma
Reflux esophagitis/Barrett's esophagus	Esophageal adenocarcinoma
<i>H. pylori</i> -induced gastritis	Gastric adenocarcinoma and MALT lymphoma
Chronic pancreatitis	Pancreatic adenocarcinoma
Viral (Hepatitis B and C virus hepatitis)	Hepatocellular carcinoma
Opisthorchis sinensis infection (liver fluke)	Cholangiocarcinoma
Inflammatory bowel disease (IBD)	Colorectal adenocarcinoma
Pelvic inflammatory disease	Ovarian cancer
Human papilloma virus (HPV) infection	Anogenital carcinoma
Schistosomiasis	Bladder cancer
Chronic scar tissue	NSCarc cancer arising in the lung, skin, and other areas of scarring
Human herpes simplex virus type 8	Kaposi's sarcoma
Chronic osteomyelitis	Osteosarcoma
MALT, mucosa-associated lymphoid tissue.	

図2

UC patients are high risk groups of colorectal cancer (CRC) development



Rate of CRC development in UC patients:

Dis. Period (year)	Rate (%)
10	1.6
20	8.3
30	18.4

Dysplasia in UC

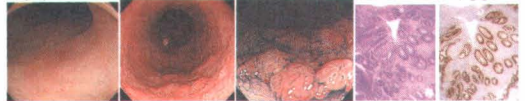


図3

Risk of Colorectal Cancer

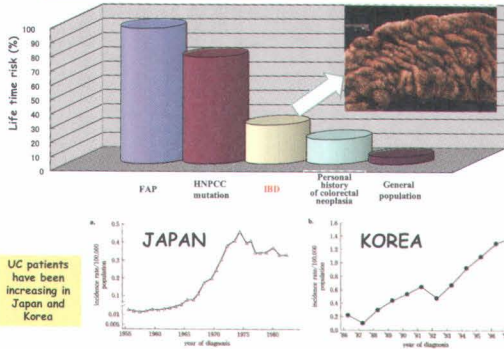


図4

Carcinogenesis Step of CRC

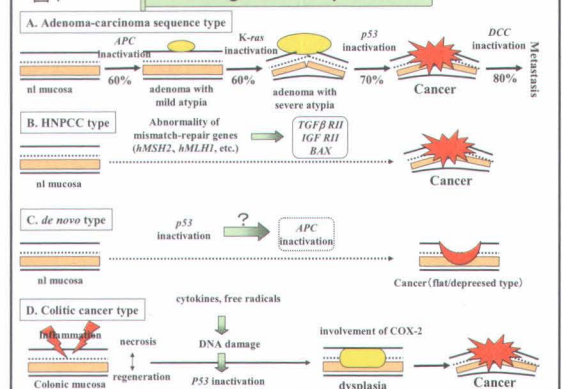


図5

Models of Colon Carcinogenesis

- Carcinogen-induced Animal Models

- Azoxymethane (AOM)
- 1,2-Dimethyl-hydrazine (DMH)
- HCA: 2-Amino-1-methyl-6-phenylimidazo[4,5-b]pyridine (PhIP)
- 2-Amino-3,8-dimethylimidazo[4,5-f]quinoxaline (MeIQx)

- Mutant, Transgenic, knockout Animal Models

- Min mouse and APC^{Δ474} knockout mouse

Animal Models of Inflammatory Bowel Disease

- Chemically- and polymer- induced Models

- Trinitrobenzene sulfonic acid (TNBS): rat, mouse, rabbit
- Dextran sulfate sodium (DSS): rat, mouse, hamster
- Carrageenan: mouse, guinea pig, rabbit

- Microbial-induced Models

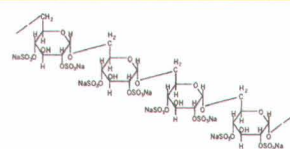
- Cotton-top tamarins (*Saguinus oedipus*)

- Mutant Mice

- IL-2^{-/-}, IL-10^{-/-}, TCR-α^{-/-}, TCR-β^{-/-}

Dextran sulfate sodium (DSS) - A sulfated polysaccharide

図6



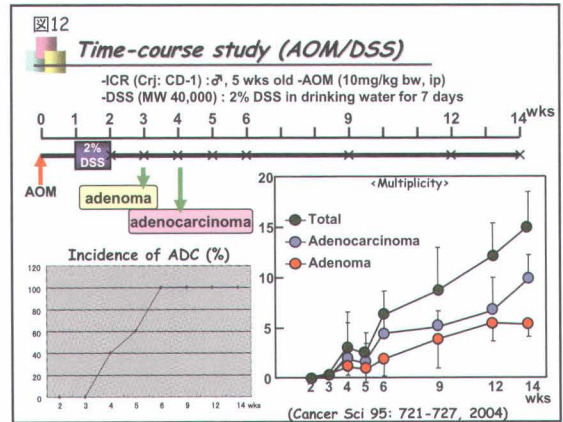
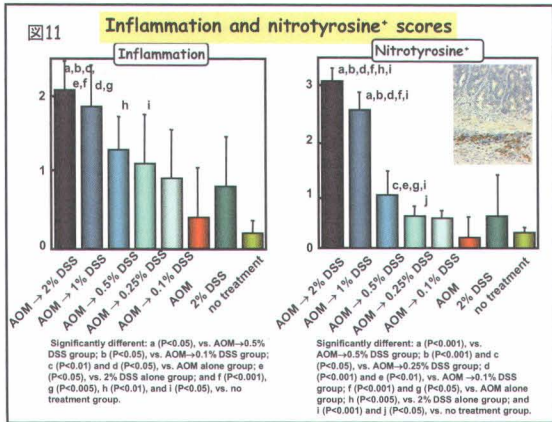
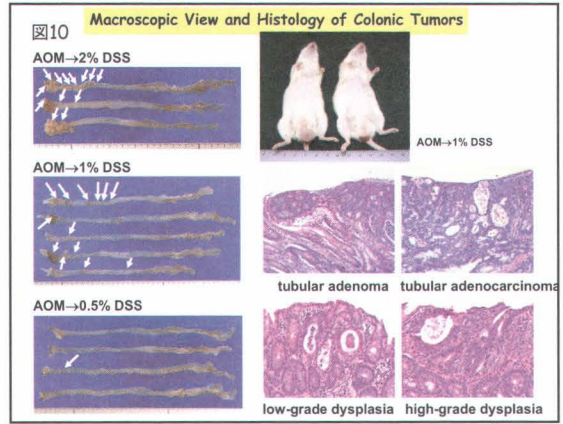
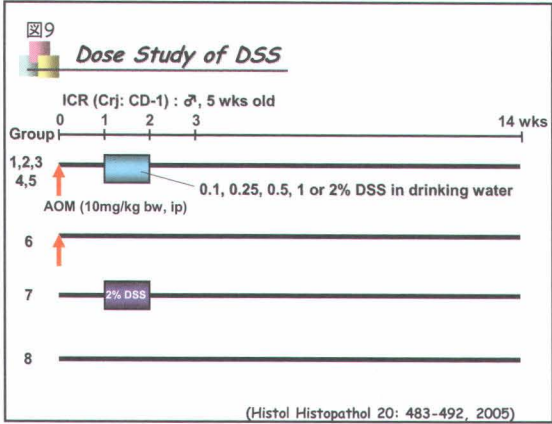
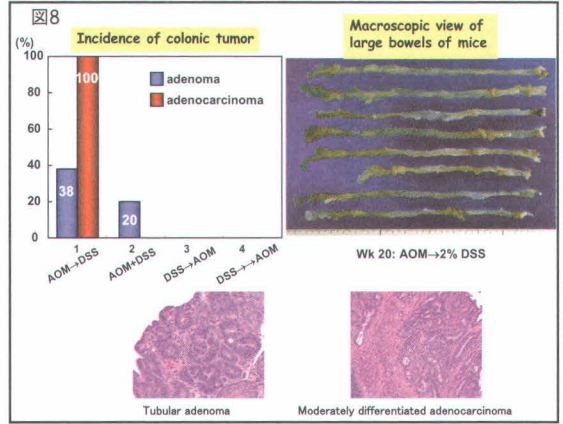
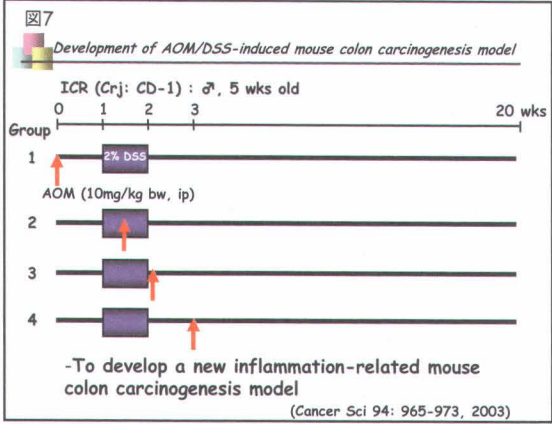
-DSS (1-5% in drinking water or diet) induces colitis in rodents

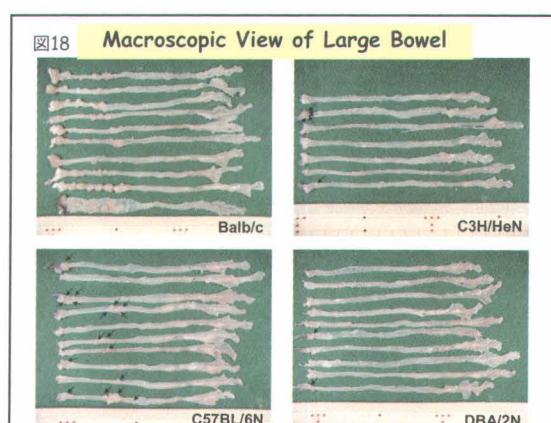
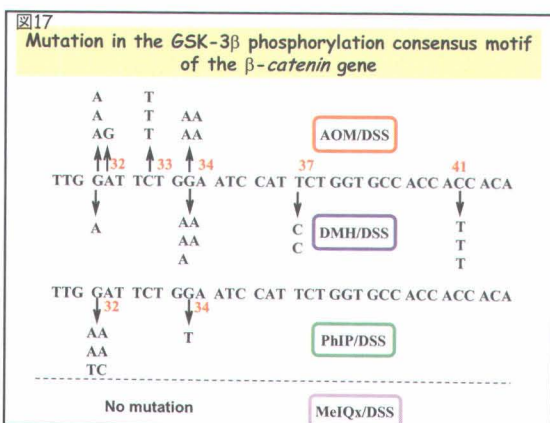
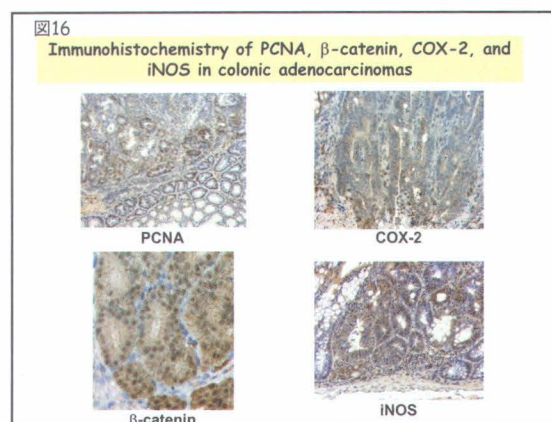
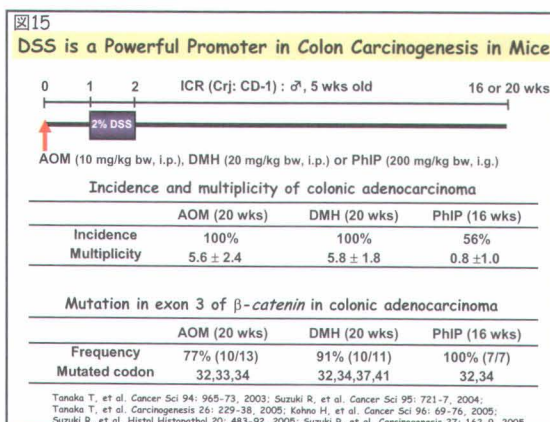
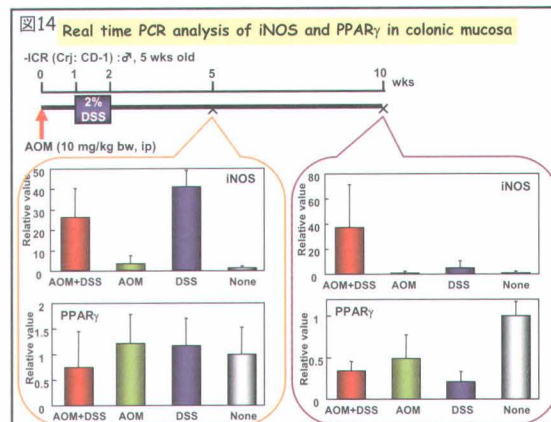
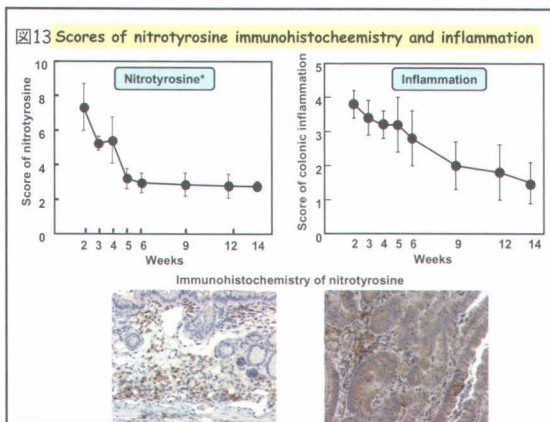
-Treatment with DSS (1% in diet) after DMH exposure produces colonic adenocarcinoma (Hirono I, et al. Gann 74: 493, 1983)

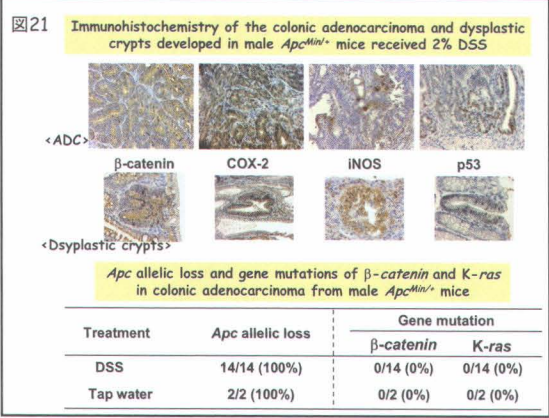
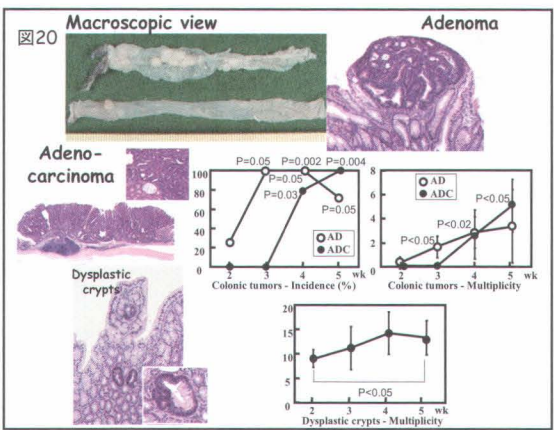
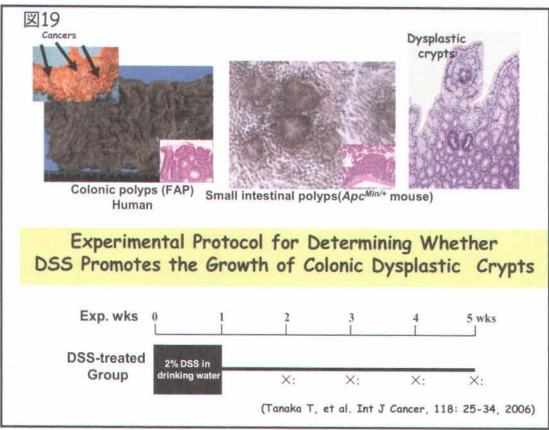
-The tumorigenicity of DSS is non-genotoxic effects (Mori H, et al. Nutr Cancer 6: 92, 1984)

-Cycle treatment with 3% DSS (MW 54,000, 7 days) and distilled water (14 days) produces colonic tumors (Okayasu I, et al. J Gastroenterol Hepatol 17: 1078, 2002)

-DSS increases the number of ACF induced by AOM (Tanaka T, et al. Cancer Res 61: 2424, 2001)







<第104回関西実験動物研究会>

日時 平成21年12月11日（金）10：00～16：50

場所 京都市勧業館「みやこめっせ」

< 会 員 の 発 表 >

1. てんかん発症過程に関わる成長ホルモンの役割

○加藤啓子（大阪府立大学・生命環境科学研究科）

2. 欠神発作脳波pre-clinical波の発作リズムに見られたバラツキ

○坪田裕司¹、斉藤千明²、飯島一憲³、大和田恭子²

（¹大阪河崎リハ大・リハビリテーション・生理、²群馬高専・物質工学科、
³東京大・工・電子工学科）

3. 実験動物のEntamoeba muris検査法の検討

○小谷祐子¹、田島 優¹、愛原勝巳¹、河崎愛子¹、藪内かおり¹、河合澄子²、
高木康博²、橋場良治²、塩谷恭子³、金子司郎¹、岡本 明¹、鍵山壮一郎¹、
黒澤 努^{1,2}

（¹大阪大学医学部附属動物実験施設、²大阪大学大学院医学系研究科実験動物
医学、³国立循環器病センター動物実験室）

4. マウスの消化管原虫、Spiroplasma murisの検査について

○池 郁生（（独）理化学研究所バイオリソースセンター）

5. クローズドコロニーddYの中から発見された疾走を伴うてんかん様の症状を呈するマウスについて

○小浦美奈子、野口洋子、鈴木 治、中村和臣、松田潤一郎

（医薬基盤研究所・生物資源研究部・実験動物開発研究室）

6. Phenotype-driven mutagenesisによる新規てんかんモデルラットの開発

○石田紗恵子¹、真下知士¹、田上 史¹、西尾健資²、芹川忠夫¹

（¹京大院・医・動物実験施設、²京大院・医・認知行動脳科学）

7. 日本産野生由来近交系ラットDOB/Odaの特性解析

○井上聡子¹、庫本高志¹、根小田祐基¹、山崎賢一¹、岡島涼子¹、真下知士¹、
城ヶ原貴通^{2,3}、織田銃一²、芹川忠夫¹

（¹京大院・医・附属動物実験施設、²名大院・生命農、³岡山理大・理）

8. Phodopus campbelliに発見された黒眼黄色被毛色突然変異ハムスターのtyrosinase-related protein1遺伝子cDNA塩基配列には欠損領域が存在した

○和田あづみ¹、大川 清¹、都築政起²

（¹東京慈恵会医科大学・実験動物研究施設、²広島大学・大学院生物圏科学）

9. 水頭症ミュータントhhyマウスの病態解析

○平野隆爾¹、森 展子²、森田健治³、山手丈至¹、桑村 充¹

(¹大阪府大院・獣医病理、²大阪府大院・理、³大阪府大理学部)

10. 高齢ニホンザルのtau蛋白蓄積

○中村紳一郎¹、李 相来^{1,2}、鈴木樹理³、中道正之⁴、鳥居隆三¹

(¹滋賀医科大学動物生命科学研究センター、²韓国生命工学院国家霊長類研究所、³京都大学霊長類研究所、⁴大阪大学人間科学部)

11. マウス根尖病巣におけるIL-17の役割

○喜多正和^{1,2}、大迫文重³、山本俊郎³、金村成智³、今西二郎²

(¹京府医大院・実験動物センター、²免疫・微生物、³歯科)

12. 炎症性腸疾患モデルとしてのKyoto Apc Deltaラット

○吉見一人¹、田中卓二²、芹川忠夫¹、庫本高志¹

(¹京大院・医・動物実験施設、²金沢医科大学腫瘍病理学)

13. SDTラットにおける主要組織適合遺伝子複合体のゲノムプロファイリング

○横井伯英、大矢美紀、清野 進

(神戸大学大学院医学研究科細胞分子医学)

14. 遺伝子改変技術を用いて作成した新たな癌悪液質モデルマウスの解析

○齋藤浩充¹、吉田利通²、加藤琢磨³、鈴木 昇¹

(¹三重大・生命科学研究支援センター・動物機能ゲノミクス、²三重大院・医・修復再生病理学、³三重大院・医・生体防御医学)

てんかん発症過程に関わる成長ホルモンの役割

○ 加藤啓子（大阪府立大学・生命環境科学研究科）

要旨：

てんかんは、ヒト・ネコで1%、イヌで平均2-3%に発症する頻度の高い慢性神経疾患である。その原因は遺伝的素因に起因した突発性の場合と、ガン化・虚血・水頭症等も含めた二次的な素因に起因した症候性の場合によるものが知られているが、根本的な障害は、神経回路網の異常な同期性放電による。てんかんの約2-3割の患者(患者)は、てんかん薬に対する抵抗性を獲得する難治てんかんへと進行するが、薬剤耐性の獲得を予防するには、難治てんかんの発症メカニズムに関わる分子基盤を知る必要がある。そこで演者らは、このヒト難治てんかんの5割を占める側頭葉てんかんのモデルマウスを用いて、てんかん発作誘導に関わる分子基盤の解明を目指してきた。側頭葉てんかんのモデルマウスとは、情動学習の中枢である扁桃体に刺激電極を挿入し、1日1回約2週間軽微な刺激(480 μ A, 200 μ sec duration, 60 Hz, 2 sec)を導入することで、てんかん発作を誘導する、扁桃体キンドリングマウスである。スクリーニングをおこなった結果、成長ホルモンと α 2,3-シアル酸転移酵素がてんかん発症に連動した発現上昇を示すことを見出した。本研究会では、このうち成長ホルモンの作用について解説する。てんかん発作誘導に連動した発現上昇を示す成長ホルモンが、受容体を介してStat5のリン酸化を亢進し、神経活動(Egr1, Arc)、糖代謝(Nr4a1)及び、神経保護作用(Npas4)に関わる遺伝子の発現を上昇させ、てんかん発作誘導を促進することがわかった。この一連の成長ホルモンシグナル系は、新規のシグナル系であると同時に、てんかん発作に加え、不安症やうつ病の発症にも関与することがわかった。

うつ病を含む気分障害、不安症、てんかん等の神経精神疾患の50%が初発年齢が14歳以前であることと、成長ホルモンが子供の成長に強く関わることは、本演題で示した成長ホルモンシグナル系が脳機能調節に非常に重要であることを支持し、更なる解明が、これら神経精神疾患の治療薬の開発につながるかもしれない。

欠神発作脳波 pre-clinical 波の発作リズムに見られたバラツキ

○坪田裕司¹、斉藤千明²、飯島一憲³、大和田恭子²

(¹大阪河崎リハ大・リハビリテーション・生理、²群馬高専・物質工学科、
³東京大・工・電子工学科)

我々はてんかん発作の解析を効率良く進めるために、脳波を入力信号として、Wavelet 変換による発作時脳波の特徴抽出と、3層構造で中間層24個の人工ニューラルネットによる欠神発作自動判定システムを構築した。発作判定の精度は、熟練者の判定データとの一致率で93%である。我々は、このシステムを用いて、てんかんモデル動物であるWakayama Epileptic Rat (WER) ラットの慢性脳波データを解析し、発作のリズムを検討し、これまでに発作発症頻度について、暗期に高く、明期には低い発作率で推移し、ラットの活動期に欠神発作も高くなることを報告してきた(第100 回関西実験動物研究会 他)。今回、臨床で pre-clinical 波と呼ばれる、単発の棘徐波について解析したところ、これらと異なるリズムを示す例を多数発見したので報告する。

材料には、欠神発作と強直発作を1 個体が同時に示すてんかんモデル動物であるWER ラットの脳波記録を用いた。慢性脳波記録は、自由行動下でテレメトリ法(500scan/s)により採取されたもので、上記ニューラルネットにより、1 秒間脳波における欠神発作あり、なしを判定した。各個体データにおいて3 日間の各発作の持続時間を分析し、連続する通常の発作波と、前後に発作がなく1 秒だけ出現する棘徐波をpre-clinical波として、各出現頻度を解析した。

その結果、発作発症頻度について、連続波は、暗期に高く明期には低い発作率で推移するが、pre-clinical波の時間推移において、8個体は両者が同じリズムで推移するが、5個体では異なる位相を示すことを発見した。両発作波の位相のずれには、数時間から12時間の有意なバラツキがあった。

pre-clinical 波は、これまで臨床概念では、発作に至らずに終わる病態の背景を示す程度の波と考えられている。しかし、今回複数個体で異なるリズムを示す例を認めたことから、両者には違う臨床的意味があり、別の発症機序が存在することが示唆された。また、発作波の自動解析システムは長期に渡る解析に有効であることも確認された。

実験動物の *Entamoeba muris* 検査法の検討

○小谷祐子¹、田島 優¹、愛原勝巳¹、河崎愛子¹、藪内かおり¹、
河合澄子²、高木康博²、橋場良治²、塩谷恭子³、金子司郎¹、岡本 明¹、
鍵山壮一朗¹、黒澤 努^{1,2}

(¹大阪大学医学部附属動物実験施設、²大阪大学大学院医学系研究科実験動物医学、³国立循環器病センター実験動物管理室)

【背景・目的】*Entamoeba muris* (*E. muris*) はマウス、ラットおよび他の齧歯動物に強い感染力を持つ消化管内原虫である。*E. muris* は、主としてマウスの盲腸内で増殖し、環境が変化した場合は速やかにシストを形成する。近年、種の識別にPCRによる検査方法が用いられ、系統樹解析結果が報告されている。また、糞便よりDNAを容易に抽出する方法や、分離培養された*E. muris*の塩基配列の報告もされている。

現在、大阪大学医学部附属動物実験施設では、消化管内原虫の検査を鏡検にて行っている。消化管内原虫陽性と判定されたマウスとラットの検体を用い、PCR法においても同等な結果が得られるか比較した。また、塩基配列の解読および系統樹解析を行い、種の同定も試みた。

【方法】マウスおよびラットの盲腸内容物と糞便を検査材料とした。これらの材料からのDNA抽出には、QIAGEN社のQIAamp DNA stool Mini Kitを用いた。*E. muris*のSSU-rRNA遺伝子を標的とした特異プライマーを設計し、PCRを行った。得られたPCR産物はダイレクトシーケンス法を用いて塩基配列を解読し、系統樹解析は遺伝子解析ソフトCLUSTALWを用い、系統樹作成はTree Viewを使用した。

【結果・考察】盲腸内容物と糞便からのDNAを用いたPCR法による*E. muris*検出結果は、直接塗抹法と同等な結果が得られた。また系統樹解析の結果、施設内で採取した検体は動物種に関わらず全て*E. muris*と同一クラスターに属した。

糞便での検体から良好な検出結果が得られたことから、検査時において供試動物に淘汰可能な動物がいない場合、PCR法は有効であると思われる

マウスの消化管原虫、*Spironucleus muris*の検査について

○池 郁生、梶田亜矢子、小澤雅司、岡本裕行、吉木 淳

(独立行政法人理化学研究所バイオリソースセンター実験動物開発室)

理化学研究所バイオリソースセンター(BRC)は、ナショナルバイオリソースプロジェクトのもとでマウスの収集・保存・提供事業を行って、既に3,000系統を超えるマウス系統を収集し、約2,000系統以上をウェブ等で公開し研究者に提供している。BRCに寄託されたマウスはすべて体外受精あるいは帝王切開等によって清浄化しているが、その作業時に寄生虫検査を行ったところ、2008年度の8ヶ月に生体で寄託されたマウス系統の3割が原虫ないし蟯虫に汚染されていた。その中で、最近汚染報告が稀れになってきた*Spironucleus muris*を検出したので動画を交えながら報告する。

*S.muris*は鞭毛虫のディプロモナスに属し、マウスの小腸上部等に寄生する。感染すると、ホストのマクロファージ機能に影響し、非感染動物と比べ広範囲の抗原に対する免疫応答が悪くなる。また感染ヌードマウスでは寿命が短くなるとされる。

*S.muris*はウェット塗抹標本で特徴的な速い動きを示す。我々は盲腸内容物のウェット塗抹標本の顕微鏡検査中、40倍対物レンズの視野を直線的に動くモノを複数見つけ、動画撮影を行った。その一つの動きが遅くなり、ついには停止したのであるが、動き方ならびに本体および鞭毛の形態から*S.muris*と判定した。

本盲腸内容物からDNAを抽出し、*S.muris*特異的プライマ(*S.muris*で唯一報告のあるSSU rRNA領域およびElongation factor 1 α)でPCRを行ったところ、標的遺伝子が検出され、DNA配列は各々既報の配列と100%一致した。これは、例数や感度の点で検討事項が残っているものの、本PCRが*S.muris*検査に有効であることを示唆する。

マウス寄生虫に関する遺伝子情報は未報告のことが多い。*S.muris*を含め、実験用マウスの寄生虫汚染を減らすためには、マウス寄生虫の情報整備を進め、PCR等による迅速・客観的な検査方法を拡充する基礎、また病原因子特定も視野にいれ、本感染系を感染モデル、治療モデルにする基礎にしていく必要がある。

クローズドコロニーddYの中から発見された疾走を伴うてんかん様の 症状を呈するマウスについて

○ 小浦美奈子、野口洋子、鈴木 治、中村和臣、松田潤一郎
(医薬基盤研究所・生物資源研究部・実験動物開発研究室)

現在ヒトてんかんのモデルとしては、ELマウスが広く使われているところであるが、発症日令が70日と比較的早く、雄の突然死があるなど継代維持には困難が伴う。今回、当研究室のddYのコロニー(クローズドコロニーであるが、集団が小さいため近交係数が高いと考えられる)から、てんかん様の発作をおこすマウスが見つかった。尾を持ちマウスを吊り上げて廻す、背中をこするなどの刺激を与えると、早いものでは直後、遅い場合は2-3分後に、頭部皮膚および耳介のの痙攣が始まり、四肢を硬直させ、のけぞるような姿勢(後弓反張)を示し、全身の痙攣に移行する。外見的な症状はELマウスのてんかん発作(強直間代発作)とほぼ同じである。しかし、大変特徴的なことは、最初の激烈な発作がおさまり少し間をおいた後に、激しくケージ内を走り回り、跳び上がり、ケージ外に飛び出してしまうほどの疾走発作を起こすことである。この発作の出現は、生後5ヶ月から8ヶ月であり、継代維持に関しては、繁殖も比較的容易であり、充分数の子孫を確保できるため、実験動物研究資源バンクとして、ユニークなてんかんモデル系統としての樹立を開始している。現在、これらの症状を確実に示すラインの選抜を行うと共に、同じddYコロニーに認められる斜頸、多動、旋回、過肥などの症状と分離できるかを試みている。

Phenotype-driven mutagenesisによる新規てんかんモデルラットの開発

○石田紗恵子¹、真下知士¹、田上史¹、西尾健資²、芹川忠夫¹

(¹京大院・医・動物実験施設、²京大院・医・認知行動脳科学)

てんかんの我が国における罹患率は約1%と推定され、その発作症状は多様である。遺伝素因と環境素因を制御することができるモデル動物は、てんかん発症機構の解析研究や新規抗てんかん薬の開発研究において有用である。この度、ゲノム上にランダムに点突然変異を誘発する化学変異原、エチルニトロソウレア (ENU)を投与したF344/NSlc雄ラットと同系統の雌ラットを交配して得たG1ラットの行動スクリーニングから、筋の不随意運動及びてんかん様発作を自発的に発症するラットを発見し、系統化することに成功した (Kyoto epileptic rat (KER)と命名)。本研究の目的は、KERの特性解析と責任遺伝子の同定により、本ラットにおける行動異常の発症メカニズムを解明することである。

KERの筋不随意運動とてんかん様発作は、10週齢から18週齢にかけて進行性に症状が悪化する。16週齢における筋電図測定の結果、筋線維束が次々と収縮・弛緩するミオキミアと不随意に骨格筋が収縮するミオクローヌスに認められる異常波形がそれぞれ確認された。また、10週齢以降に認められる強直間代発作時には、spike and wave型の発作波が大脑皮質と海馬に群発することが明らかになった。これらの行動異常は常染色体優性遺伝形式を示した。97頭の戻し交雑子と115個のsimple sequence length polymorphic (SSLP)マーカーを用いた連鎖解析の結果、第4染色体上の10Mbの範囲に原因遺伝子座をマッピングした。この領域に位置する電位依存性カリウムチャネル遺伝子Kcna1の塩基配列を解析したところ、KERに特異的なミスセンス変異T925A (S309T)が発見された。

ヒトKCNA1は、小脳性の運動失調症状とミオキミアが特徴的に認められるEpisodic ataxia type1 (EA1)の原因遺伝子である。また、EA1患者ではてんかん発症率が高いことが報告されている。KERは、全ての個体がてんかん発作を発症するので、てんかん発症機序を解明するための有用なモデルになると期待される。

日本産野生由来近交系ラットDOB/Odaの特性解析

○井上聡子¹、庫本高志¹、根小田祐基¹、山崎賢一¹、岡島涼子¹、真下知士¹、

城ヶ原貴通^{2,3}、織田銑一²、芹川忠夫¹

(¹京大院・医・附属動物実験施設、²名大院・生命農、³岡山理大・理)

DOB/Odaラットは、2000年に名古屋大学大学院生命農学研究科附属山地畜産実験実習施設(愛知県東部山間部の北設楽郡設楽町)のヤギ小屋にて捕獲されたドブネズミに由来する野生由来系統である。兄妹交配14世代の時点で、ナショナルバイオリソースプロジェクト「ラット」(NBRP-Rat)に寄託され、2009年に、20世代に達した。

F15世代のゲノムDNAを用いた357個のSSLPマーカーによるジェノタイピングにより、DOB/Odaラットと既存の実験用ラットとの多型率は88～95%であることが明らかとなり、DOB/Odaラットは、既存の実験用ラットにはないゲノム特性を持っていることが示された。

今回は、(1) F20世代を対象にした109項目からなるNBRP-Ratの特性解析の結果と、(2) F14～20世代における繁殖成績を報告する。

(1) DOB/Odaラットは、雌雄とも、血圧・心拍数、尿量・尿中電解質、血液生化学検査、血液学的検査、器官重量などにおいて、際立った特徴は見出されなかった。しかし、他のラット系統に比べ、オープンフィールドでの運動量が多く、低体重であった。

(2) 妊娠期間は19～24日で、出産率は92%、離乳率は86%であった。平均産子数は 6.1 ± 4.5 匹、平均離乳数は 5.7 ± 5.3 匹であった。

DOB/Odaラットは低体重、多運動量、低産子数といった表現形質を示すものの、生理学的に際立った外れ値がなく、ラットの標準系統として利用できることが示唆された。

Phodopus campbelliに発見された黒眼黄色被毛色突然変異ハムスターの tyrosinase-related protein 1遺伝子 cDNA塩基配列には欠損領域が存在した

○和田あづみ¹、大川 清¹、都築政起²

(¹東京慈恵会医科大学・実験動物研究施設、²広島大学・大学院生物圏科学)

Phodopus属ハムスターとはユーラシア大陸北東部周辺に原産する掌・蹠が毛で覆われた小型齧歯目である。1990年代に愛玩動物として流行したPhodopus属ハムスターは、さらなる疾患モデル候補となりうる新規突然変異体の発見も期待できる優れた育種素材であると考えられ、我々はこの愛玩用Phodopus属ハムスターに対し「狭義の実験動物」としての基盤を整備している。

我々は2007年1月に、未導入であった被毛色変異体を入手した。この変異体は、黒色眼球をもつものの、被毛の黒色部分が淡色化し、全体として黄色味が強い色彩を呈した。この変異形質は、常染色体性の単純な劣性遺伝をし、マウス等で報告されているtyrosinase-related protein 1 (tyrp1)座位の劣性突然変異型遺伝子による表現型と類似していた。そこで、野生型被毛をもつP. campbelli、P. sungorus、およびこの被毛色突然変異ハムスターについて、tyrp1遺伝子のcDNA塩基配列を決定した。その結果、被毛色突然変異ハムスターのtyrp1遺伝子cDNA塩基配列に528bpの欠失領域を確認した。マウスなど他種動物のtyrp1遺伝子cDNA塩基配列からexon領域を推定したところ、この被毛色突然変異ハムスターtyrp1遺伝子cDNA塩基配列の欠損領域は、exon3およびexon4部分に相当していた。また、その配列から予想されるtyrosinase-related protein 1は、176アミノ酸が欠失していた。

水頭症ミュータントhhyマウスの病態解析

○平野隆爾¹、森展子²、森田健治³、山手丈至¹、桑村 充¹

(¹大阪府大院・獣医病理、²大阪府大院・理、³大阪府大理学部)

水頭症は脳脊髄液が何らかの要因により頭蓋腔内に貯留し、脳機能の低下を来す病態の総称である。水頭症は難治性疾患であり、水頭症ミュータントマウスは水頭症の病理発現解明のためのモデル動物として有用である。本研究で用いる遺伝性出血性水頭症(hemorrhagic hydrocephalus, hhy)マウスは自然発生水頭症ミュータントであり、生後2週間程で脳脊髄液貯留のため頭部が膨隆、剖検で側脳室の拡張が認められる。また、大脳皮質に異所性灰白質があり、多くの例で脳内出血がある。hhyの原因遺伝子は12番染色体上にあり、森によって最近同定された(投稿準備中)。本研究は、hhy原因遺伝子のcDNAをプローブとし、大脳皮質におけるhhy遺伝子の発現を調べ、作製されたhhyたんぱく特異抗体を用いてhhyたんぱくの組織局在を調べることにより、hhyマウスの病理発生を明らかにすることを目的とした。

使用したマウスは、hhy野生型およびhhyホモマウスの1)胎齢15日および18日、2)生後0日と5日である。大脳の凍結切片を作製し、遺伝子発現とたんぱくの組織・細胞内局在をin situ hybridization、免疫組織化学および免疫電顕で調べた。

In situ hybridizationの結果、胎仔期においては、hhy原因遺伝子の発現は脳室壁に局限されており、免疫組織化学でも、hhyたんぱくは脳室周辺域に局在していた。またhhyたんぱく存在部位に、密着結合の足場たんぱくであり神経上皮細胞の頂端部マーカーであるZO-1が共在していた。免疫電顕では、hhy陽性シグナルが脳室面の細胞の頂端部密着結合部位に認められた。生後0日、5日においてhhyたんぱくの脳室面局在が認められたが、シグナルは胎仔期に比べ減弱しており、生後5日ではほとんど検出されなかった。本研究の結果、hhyたんぱくのシグナルは、胎仔期の上衣/神経上皮細胞頂端部密着結合部位に強く現れ、生後、上衣細胞の分化とともに減弱した。これまでのhhyマウス脳の病理解析では、胎仔期から上衣/神経上皮細胞の扁平化や消失が認められている。今回の結果と合わせ考えると、hhyたんぱくは、上衣/神経上皮細胞層の維持に何らかの役割を果たしていると考えられる。

高齢ニホンザルのtau蛋白蓄積

○中村紳一郎¹、李相来^{1,2}、鈴木樹理³、中道正之⁴、鳥居隆三¹

¹滋賀医科大学動物生命科学研究センター、²韓国生命工学院国家霊長類研究所、³京都大学霊長類研究所、⁴大阪大学人間科学部

アルツハイマー病(AD)で観察される老人斑(SP)ならびに神経原線維変化(NFT)ではリン酸化タウ(tau)が見られる。一方、高齢動物ではもっぱら神経細胞と軸索にtauが見られるが、SPと関連したtau蓄積、tau蓄積と嗜銀性、加齢性病変との関連については不明な点が多い。

15歳、推定26歳、推定29歳(♂)と34歳6ヶ月(♀)、計4例のニホンザル大脳ホルマリン固定材料で、抗tau抗体のAT-8、抗アミロイドβ蛋白(Aβ;SPの構成成分)抗体のBA27に対する免疫染色、NFTを見いだす鍍銀染色のガリアス染色を行った。

26歳の動物には被殻の変性神経細胞の細胞体に釣り針状、神経網に微細顆粒状、白質のグリア細胞にtau陽性像を認めた。一部の微細顆粒状構造はガリアス染色に陽性だった。Aβ陽性SPと一致するtau蓄積は見られなかった。

29歳の動物には、コロナ状の核を中心に周囲神経網に微細顆粒状を示すtau陽性像、Aβ陽性SPに巻き込まれた腫大突起のtau陽性像を認めた。34歳の動物にはSPに巻き込まれた腫大突起のtau陽性像を認め、この陽性構造は29歳の動物のそれよりも大型だった。tau陽性突起を持つSPは主に前頭前野、同部Aβ陽性SPの約1/4に確認された。15歳の動物はいずれの病変も陰性、29歳、34歳の動物はガリアス染色陰性だった。

高齢ニホンザルに、動物ではほとんど観察されない、Aβ沈着に関連したSPに巻き込まれた突起のtau蓄積を確認した。嗜銀性の変化は非常に少量で、ニホンザルで示された像は、tauのリン酸化からはじまり嗜銀性を得るまでの、非常に初期的な段階の変化と考えられた。

マウス根尖病巣におけるIL-17の役割

○喜多正和^{1,2}、大迫文重³、山本俊郎³、金村成智³、今西二郎²

(¹京府医大院・実験動物センター、²免疫・微生物、³歯科)

根尖病巣は、ウ蝕が進行して歯牙内部の歯髄組織への細菌感染により生じた壊死歯髄組織や、根尖歯周組織への細菌感染に対する根尖歯周組織における免疫応答により、根尖部分に骨の吸収が生じる病態である。しかしながら、根尖病巣の病態形成におけるサイトカインの役割については不明な点が多い。本研究では、根尖病巣形成におけるIFN- γ 、TNF- α 、IL-17Aの役割について遺伝子欠損マウスを用いて検討した。

Prevotella intermedia (ATCC25611) および *Prophyromonas gingivalis* (ATCC33277) の菌液をマウス下顎第1臼歯の歯髄腔内に感染させることにより、マウス根尖病巣モデルを作成した。感染21日後に μ CTおよび病理組織学的解析により根尖病巣の形成を確認した結果、正常マウスと同様、IFN- γ 遺伝子欠損マウスおよびTNF- α 遺伝子欠損マウスにおいても根尖病巣の形成が認められた。しかしながら、IL-17A遺伝子欠損マウスにおいては根尖病巣の形成が認められなかった。また、根尖病巣局所におけるIL-17の産生をRT-PCR法およびreal time RT-PCR法で検討した結果、非感染マウスに比べ、感染マウスの根尖病巣において有意にIL-17A mRNAの発現が増強していることが明らかとなった。

以上の結果より、IFN- γ とTNF- α は根尖病巣の形成においてほとんど関与していないが、IL-17Aは根尖病巣の形成において重要な役割を果たしていることが証明された。

炎症性腸疾患モデルとしてのKyoto Apc Deltaラット

○吉見 一人¹、田中 卓二²、芹川 忠夫¹、庫本 高志¹

(¹京大院・医・動物実験施設、²金沢医科大学腫瘍病理学)

Kyoto Apc Deltaラット (KAD、F344-Apcm1Kyo) は、家族性大腸腺腫症の原因遺伝子であるApc遺伝子にナンセンス変異 (S2523X) を持つ。

KADにアゾキシメタン (AOM) とデキストラン硫酸 (DSS) を投与すると、対照系統のF344/NSlcに比べ、大腸腫瘍を高率に誘発できる。この試験において、KADはDSS投与中とその後の数週間、F344よりも激しい下痢症状を示した。

そこで、KADのDSS誘発大腸炎に対する高感受性を確かめるため、KADとF344にDSSのみを投与することにより大腸炎を誘発し、臨床症状、病理組織学的解析、炎症性サイトカインの発現解析を行った。

【材料と方法】

5週齢の雄KAD (n=30) とF344/NSlc (n=30) に、2% DSSを1週間飲水投与した。投与終了時と投与終了後1週目、および3週目に各10頭ずつ病理学的検査を行った。大腸については、剖検1時間前にBrdUを腹腔内投与した後、免疫染色を行って分裂細胞数を数えた。また、大腸粘膜組織からRNAを調製して、炎症性サイトカインの発現量を調べた。

【結果と考察】

KADでは、DSS投与期間中、下痢と血便が高頻度に観察され、投与終了後3週目においても、大腸粘膜下に多数の炎症細胞が残存していた。一方、F344では、下痢は見られたが血便は低頻度で、投与終了後3週目では、大腸の炎症細胞はほぼ消失していた。粘膜上皮細胞の分裂細胞数は、投与終了後3週目において、KADの方が有意に多かった。また、炎症性サイトカインの発現量は、投与終了後3週目において、KADの方が有意に高かった。

以上の結果、KADにおいて、DSS誘発大腸炎からの回復が、F344に比べて遅延することが明らかとなり、炎症性腸疾患のモデル動物として有用であることが示唆された。

SDTラットにおける主要組織適合遺伝子複合体のゲノムプロファイリング

○横井伯英、大矢美紀、清野 進

(神戸大学大学院医学研究科細胞分子医学)

【目的】 Spontaneously diabetic Torii (SDT) ラットは新たに確立された自然発症糖尿病モデルである。2型糖尿病のモデルとして使用されているが、インスリンを分泌する膵臓のベータ細胞の破壊が認められるなど、その病態には1型糖尿病とも類似する部分がある。1型糖尿病においては主要組織適合遺伝子複合体 (RT1) の特定のタイプが強く関与するが、SDTラットのRT1のタイプはこれまで報告されていない。今回、SDTラットにおけるRT1のゲノムプロファイリングを行い、1型糖尿病との関連を検討した。

【方法】 初めに、代表的な6系統 (BN, DA, F344, GK, KDP, LEW) とSDTラットについて、RT1領域に存在する10個の多型マーカーのプロファイリングを行った。次に、SDTラットのRT1プロファイルに類似すると考えられた数系統のゲノムDNAをNBRP-Ratから入手し、さらに詳細な解析を行った。

【結果】 6系統との比較解析の結果、SDTラットのRT1プロファイルはこれらの系統とは異なることがわかった。さらに文献データとの比較から、SDTラットに類似する特定の数系統を推測することができた。

現在、類似する数系統との比較解析から、SDTラットのRT1プロファイルの詳細を決定している。

【考察】 SDTラットのRT1は1型糖尿病モデルであるKDPラットと異なることから、典型的な1型糖尿病ではないこと、病態や発症メカニズムが1型糖尿病とは異なることが示唆された。

遺伝子改変技術を用いて作成した新たな癌悪液質モデルマウスの解析

○齋藤 浩充¹、吉田 利通²、加藤 琢磨³、鈴木 昇¹

(¹三重大・生命科学研究支援センター・動物機能ゲノミクス、²三重大院・医・修復再生病理学、³三重大院・医・生体防御医学)

背景:悪疫質(cachexia、カヘキシー)は、癌や慢性疾患の経過中に起こる主として栄養失調に基づく病的な全身の衰弱状態である。カヘキシーの改善は、患者のQOL向上に重要であり、そのためには、原因因子の解明と、治療薬開発につながるよい動物モデルが必要不可欠である。これまで報告されているカヘキシーモデルマウスは、ヒトおよびマウスから得た自然発症または化学発癌腫瘍の移植モデルであり、腫瘍の原因遺伝子が不明である。本研究では、遺伝子改変により得られたp53遺伝子欠失、癌型K-ras遺伝子発現を原因とする横紋筋肉腫瘍による新たなカヘキシーモデルを作成し、その病態を解析した。

方法と結果:Cre/LoxPシステムを応用して、任意の時期と臓器に癌型K-Ras遺伝子を強制発現できるマウスを作製し、大腿骨格筋に癌型K-ras遺伝子発現を誘導すると、p53^{+/+}とp53^{-/-}の遺伝背景においてのみ、遺伝子型が癌型K-ras遺伝子発現・p53^{-/-}の多形型横紋筋肉腫(RMS)が発生する。RMSに罹患した動物は、約2週間で全例死亡し、体重減少をとまなう悪疫質が主たる原因であると推察された。

そこで、摘出した活性型K-ras遺伝子発現・p53^{-/-}-RMS腫瘍塊を材料として、造腫瘍能(+)カヘキシー発症能(+)腫瘍株、造腫瘍能(+)カヘキシー発症能(-)腫瘍株を樹立し、2つの株を正常動物に皮下移植し腫瘍を造らせ、より詳細な病態解析を行った。経時的な、体重、摂食量、飲水量測定、X線CTによる体脂肪率測定、血清中サイトカイン濃度の測定の結果、カヘキシー発症能(+)腫瘍株移植マウスでは摂食量の低下にともなう体重および体脂肪の減少が生じることが明らかとなり食欲不振症(Anorexia)が主要な病態であることが示された。また、カヘキシー誘導因子として報告されている炎症性サイトカイン濃度は、カヘキシー発症能(+), (-)腫瘍株を移植したマウスの血清中で有意な差が認められず、新たなカヘキシー誘導因子の関与が示唆された。

カヘキシー誘導因子同定のため、移植後2wにおけるカヘキシー発症能(+), (-)の腫瘍塊、および、正常骨格筋のRNAを精製しマイクロアレイによる遺伝子発現プロファイルを行った。カヘキシー発症能(+)の腫瘍において有意に高い発現を示し、かつ発現量が相対的に高く分泌性タンパク質をコードする4遺伝子をカヘキシー誘導因子の候補とした。この、4遺伝子の発現ベクターを、造腫瘍能(+)カヘキシー発症能(-)腫瘍株に導入し、各因子を恒常的に発現する細胞株を新たに樹立した。現在、この細胞株をマウスに移植し、カヘキシー誘導能の検討を行っており、その結果も合わせて報告する。

<第105回研究会（平成22年3月19日）>

テーマ：器官発生・幹細胞分化の基本原理を探る

1. 器官形成研究のモデル動物としてのニワトリ胚

八杉 貞雄（京都産業大学・総合生命科学部）

2. 哺乳動物の造血幹細胞ニッチ

長澤 丘司（京都大学・再生医科学研究所・生体システム制御分野）

器官形成研究のモデル動物としてのニワトリ胚

八杉 貞雄

(京都産業大学総合生命科学部生命システム学科)

はじめに

ニワトリ胚は古くから発生学の材料として多くの観察実験に用いられてきた。アリストテレスはその「動物誌」や「動物発生論」において卵の中におけるニワトリ胚の発生を記述している。中世に入っても、ファブリキウスなどの著名な解剖学者が発生の詳細な記載を行っている。生物学史上有名な、前成説と後成説の論争に決着をつけたのはパンダーらによるニワトリ胚の発生に基づく「胚葉」説であった。このように、身近な発生の観察材料としてニワトリ胚は、多くの研究者の注目を集めたのである。

20世紀になって、ルーやシュペーマンによる実験発生学が興隆すると、両生類を用いた発生学が有力になったが、まもなく実験発生学におけるニワトリ胚の有用性が認識され、以後、神経、神経冠、四肢、皮膚、眼、腎臓など多くの器官形成研究がニワトリ胚を用いて行われている。それらについては成書¹を参照されたい。

ニワトリが発生学の好個の材料として用いられている理由としては、初期発生の段階ですでに微細手術が可能な大きさであること、飼育施設を要しないこと、入手が簡単であること、哺乳類と遺伝的に近縁で、ゲノムも類似していることなどが上げられるであろう。勿論鳥類と哺乳類は体制も異なり、発生の様式も完全に同じではないが、多くの点で、鳥類胚について得られた知見・知識は相当程度まで哺乳類にも適用できることはまちがいない。

本稿では、ニワトリ胚の消化器官形成について筆者の研究室で行われた研究をまとめて報告し、ニワトリ胚を用いることの意味と問題点について述べてみたい。実験動物の研究者からご意見をいただければと思う。

1 ニワトリ胚における前胃と砂嚢の形成

消化器官は、いうまでもなく、動物が生存するのに必須の器官系であり、脊椎動物では大まかに、食道、胃、小腸、大腸からなる。肝臓や脾臓といった重

要な器官も消化管から分岐するので、消化器官系の一部であるし、成体では呼吸器官として働く肺も、喉頭部で消化管から分岐して生じる。消化器官は「内胚葉性器官」とよばれるが、実はすべての消化器官は終生内胚葉由来の上皮と中胚葉由来の間充織（間葉、後に結合組織と平滑筋）から構成されるので、内中胚葉性器官というのが正しい。また、上皮と間充織の相互作用が本稿の中心課題の一つである。

ニワトリの消化器官も基本的に食道、胃、小腸、大腸からなるが、哺乳類と異なるのは、胃が前胃（腺胃）と砂嚢（筋胃）の2つに分かれていることである（図1）。これは硬い穀粒などを消化するために強力な筋肉を備えた砂嚢が発達したためである。鳥類に歯がないこととも関係している。前胃は胃腺をもち、消化酵素ペプシン（正確には前駆体のペプシノゲン）を分泌する。ただ、鳥類の胃腺は脊椎動物で唯一複合腺である。その形成過程の概略を述べると、孵卵5日までは上皮は単層柱状であって腺はない。5.5日から6日になると一部の上皮細胞が立方状になり、その部分から上皮が間充織中に陥入して腺が形成される。腺は前胃全体の成長と共にその数を増していき、同時に枝分かれして複合腺を形成する（図2）。陥入しない上皮は内腔上皮とよばれ、主として粘液の産生に関係する。ペプシノゲン（胚期ニワトリペプシノゲン、ECPg）遺伝子は9日頃から転写され、15日頃転写量が最大になって、孵化直前にはほとんど停止する。孵化直後から成体型のペプシノゲンが転写される。ECPgの発現は完全に前胃腺上皮細胞に特異的で、他の臓器では決して発現しないし、前胃でも内腔上皮には発現が見られない。

砂嚢は、前胃のすぐ後方に形成されるが、若い胚ではその境界は曖昧である。孵卵4日頃からは外見的にも区別がつくようになる。胚期の砂嚢上皮が腺を形成することはない、勿論ECPgも発現しない。砂嚢では間充織中に強大な平滑筋層が形成され、それが食物の破碎に重要な役割を果たすことは前述の通りである。

2 上皮の分化に対する間充織の役割

筆者が関心を抱いたのは、初期発生ではほとんどその境界も明らかでない前胃と砂嚢が、どのようにして独自の形態形成と細胞分化を起こすのか、ということである。すでに多くの器官形成において、上皮—間充織相互作用が重要で

あることが示されていたので、筆者も上皮分化に対する間充織の影響を調べることにした。

まだ前胃腺が形成されない 5.5.ないし 6 日胚から前胃と砂嚢を摘出し、コラゲナーゼ処理によって上皮と間充織を分離し、それらを再結合して 6 日間器官培養を行った。そして、上皮が腺を形成するか、ECPg 遺伝子を発現するかを検討した。結果はきわめて明瞭で、間充織が前胃由来であれば上皮は腺を形成し、一方砂嚢間充織と結合された前胃上皮は決して腺を形成せず、ECPg も発現しない。すなわち、少なくとも前胃と砂嚢に関しては、上皮の発生運命を決定するのは間充織であることが示された（図 3）。筆者らはさらに実験を拡大して、食道、小腸、そして肺の上皮と間充織の組合せについても同様の実験を行い、ECPg の発現を観察した（図 4）²。このデータは我々にいろいろなことを教えてくれる。箇条書きにしてみると、以下の通りである

（1）前胃間充織は食道と砂嚢の上皮に対して ECPg 発現を「誘導」する。

（2）しかし、小腸上皮は決して ECPg を発現しない。

（3）砂嚢間充織は、ECPg 発現を阻害する。

（4）驚くべきことに、肺間充織は、食道、前胃、砂嚢上皮に対して、ECPg 発現を誘導する。ただし、肺上皮は前胃や肺の間充織存在下でも決して ECPg を発現しない。

これらの結果から筆者が考えたモデルは図 5 に示す通りである。食道、前胃、砂嚢の上皮は ECPg 発現のポテンシャルをもっていて、前胃間充織はそれを支持ないし促進する。一方砂嚢間充織（と多分食道間充織）はそれに対して抑制的に働く。肺間充織には前胃間充織と同様の作用をもつ因子が存在するが、肺上皮にはポテンシャルがないので、正常発生でも実験条件下でも決して ECPg を発現しない。小腸上皮も同様に、発生の早い段階からこのポテンシャルを失っている。このモデルと矛盾する実験結果はこれまで得られていないので、作業仮説として有効である。それでは、ここで問題となる「間充織因子」とはどのようなものであろうか。

3 前胃の間充織因子

組織間相互作用には多くの成長因子が関わることが知られている。そこで、消化器官間充織と肺間充織について、いくつかの成長因子遺伝子の発現パター

ンを比較した。その結果、BMP2 と FGF10 が、ともに前胃間充織と肺間充織で発現していることが分かった。とくに BMP2 は、6 日胚前胃間充織では発現が見られるのに対し、同じ時期の食道や砂嚢の間充織では発現しないこと、腺形成が進行した 7 日胚以後では前胃間充織でも発現が低下することが見出され、BMP2 が腺形成の初期に作用するのではないかと考えられた。

その可能性を検証するためには、BMP2 遺伝子の過剰発現と機能抑制の実験が必須である。ニワトリではいまだに実用的なトランスジェニック動物が作成されていないので、組織レベルでの実験が必要となる。現在では、ニワトリ細胞への遺伝子導入には、ウイルスを用いるかエレクトロポレーションを用いるのが主要な手技である。われわれは、BMP2 遺伝子を組み込んだ replication competent avian sarcoma (RCAS)ウイルスを、前胃間充織に感染させ、その上で砂嚢上皮を培養した。すると上皮には対照よりはるかに多数の腺が形成され、腺上皮細胞は ECPg を発現した。一方、BMP に対する抑制作用が知られている Noggin 遺伝子を組み込んだ RCAS ウイルスを感染させると、上皮の腺形成は完全に抑制される（図 6）³。このことは、腺形成には BMP2 がきわめて重要な作用をもっていることを示唆する。ただし、BMP2 を砂嚢間充織に発現させても、それと共に培養された前胃上皮には腺が形成されないので、BMP2 が発現すればそれで腺形成を誘導できる、というものではない。当然他にも多くの因子が関与している。

FGF10 は、四肢や肺の形成に基本的に重要で、FGF10 ノックアウトマウスではこれらの器官がまったく形成されない。同時に消化器官の形成不全も報告されている。そこでニワトリ胚の胃形成領域に FGF10 遺伝子を組み込んだ RCAS ウイルスを感染させて、その影響を調べた。FGF10 は成長因子であるから、当然上皮の細胞分裂は増加するが、それは腺上皮細胞の過形成をもたらし、同時に分化の方向にも変化を生じさせた。正常の腺上皮細胞は、cSP (chicken spasmodic polypeptide)という遺伝子を発現しない（この遺伝子は内腔上皮で特異的に発現する）のだが、FGF10 過剰発現胚では肥厚した腺上皮細胞がこの遺伝子を発現するようになる。FGF の作用を拮抗的に阻害する、可溶性受容体の遺伝子を過剰発現させると、前胃の分化は抑えられ、ECPg は勿論、それに先駆けて発現するいくつかの遺伝子の発現も見られなくなる。このように FGF10 も前胃腺形成には必須の因子であり、さらに過剰な FGF10 は、おそらくは上皮細胞の分裂を促進することによって、その分化にも影響を与える。⁴

間充織因子としてはそのほかにも多くの因子が存在するであろうし、それぞれの因子は間充織内でも複雑なシグナル伝達を行って、最終的に上皮細胞の形態形成や分化に影響を与えるにちがいない。前胃間充織で比較的特異的に発現する因子として **Wnt5** や **DAN** などがあり、その解析も行ったが、ここでは省略させていただく。いずれにしても、上皮の発生運命がこれほどはっきりと間充織によって決定されること、そしてそこに関わる因子を分子レベルで示した例は、世界でも少ないであろう。

4 腺上皮と内腔上皮の分化に関わる因子

間充織からの影響で前胃腺が形成されることが分かったが、上皮すべてが腺になるわけではない。腺は最終的にはかなり等間隔に形成される。腺上皮と内腔上皮の分化を司る因子にはどのようなものがあるだろうか。

上述の間充織因子の発現パターンを見ると、およそ間充織に一様に分布するので、間充織因子が直接上皮の分化を決定するとは考えにくい。おそらくは上皮細胞で発現する遺伝子にあるパターンが生じて、いわば腺上皮細胞になるポテンシャルをもつ細胞群が生じ、その運命の実現に間充織因子が必要なのであろう。それでは、上皮細胞ではどのような遺伝子が発現しているであろうか。

われわれはこれまでに、20種類を越える遺伝子群の発現を調べた。主要なものは **GATA**, **Sox**, **Fox**, **Fra** などの転写因子、**EGFR**, **FGFR** などの成長因子の受容体、**Smad** などのシグナル伝達因子、**Notch-Delta** システム、**Sonic hedgehog(Shh)** のような形態形成因子、などである。それらの遺伝子は当然固有の発現パターンを示し、あるものは腺形成以前からずっと全上皮細胞で発現し、あるものは腺形成以後は腺上皮細胞での発現が低下あるいは消失する。逆に腺上皮細胞でのみ発現が維持される遺伝子もある。

このような遺伝子群の中で、腺上皮細胞で発現が低下あるいは消失するものに注目し、その機能解析を行った。もっとも明確な結果をもたらしたのは、**Shh** で、その過剰発現は腺形成を完全に抑制し（図7）、一方 **Hedgehog** の阻害剤である **cyclopamine** で前胃を処理すると、腺形成が促進された⁵。**Shh** は、いうまでもなく発生のあらゆる局面で活躍するといっても過言ではないスーパースターであるが、胃の形成でも重要な役割を担っている。

同様の働きをもつのが、**Peroxisome proliferator activated receptor (PPAR)**

γである。この遺伝子は、生体内では種々のリガンドと結合し、またいくつかのコファクターと一緒に転写因子として作用する。PPARγを単独で強制過剰発現させても影響が見られないが、リガンド存在下でPPARγを過剰発現すると、腺形成が抑制される。

もっとも興味ある知見は、Notch-Delta システムに関する研究から得られた。一様に見える前胃上皮が、腺上皮と内腔上皮に分化するというような局面では、Notch-Delta による側方抑制のような仕組みがあるのではないかと考えるのはごく、自然なことであろう。なんらかの側方抑制的システムで、上皮内にほぼ等間隔に特別な性質を持った細胞集団が生じ、その集団が腺上皮に分化する（あるいは内腔上皮に分化する）ことは十分予想されるからである。実際、リガンドである Delta1 の発現は、腺形成に先立って上皮内に点在して観察される。一方 Notch1 の発現は、内腔上皮には見られるが、成立した腺上皮には観察されない。我々は、Notch シグナルが活性化された細胞を検出するコンストラクトを用いて、Notch の機能解析を行った。その結果をまとめると、

(1) Notch1 が活性化された細胞は、数時間後に腺細胞に分化する。腺細胞では Notch 遺伝子は発現しない。

(2) Delta1 を強制発現すると、隣接した細胞で Notch1 が活性化される。

(3) Notch1 の過剰発現は、上皮細胞を未分化な状態に維持する。

以上の結果から我々は、未分化で一様に見える前胃上皮中に、Delta1 が点在して発現し、周囲の細胞の Notch1 を活性化して、その集団が腺を構築する、という予想を確認することができた(図8)。現在では、このシステムが働くことが、腺領域を決定するプロセスの中で、もっとも初期の現象であると考えている⁶。ただし、Delta1 の点在した発現のメカニズムは今後の課題である。

5 ペプシノゲン遺伝子の発現に関わる因子

前胃に腺が生じ、2, 3 日経つと腺上皮細胞では ECPg 遺伝子が発現する。前述のようにこの遺伝子は前胃腺上皮細胞以外では決して発現せず、かつ胚期のみに発現する。この特異的発現を調節する因子も我々の研究対象となってきた。

まず、胚期のみに発現する機構としては DNA のメチル化が考えられた。実際、ECPg 遺伝子のメチル化の度を調べると、成鳥では著しく高いのである。これ

により、胚期のみに ECPg が発現する仕組みは説明できるが、それでは腺上皮細胞で特異的に発現することはどのように考えればいだろうか。われわれは、前胃腺上皮細胞における遺伝子発現を調べる過程で、重要な転写因子である Sox2 の発現が低下し、一方 Gata5 の発現が上昇することを見出した。そこで、ECPg 遺伝子上流配列からこれらの転写因子の結合サイトを検索し、そこに突然変異を導入する方法で Sox2 や Gata5 の役割を調べた。その結果、ECPg 遺伝子上流に存在する 5 つの Gata 結合サイトのうち、少なくとも 3 つが協同的に働いて ECPg 遺伝子の発現を促進すること、Sox2 は強力にその発現を抑制することを明らかにした (図 9) ⁷。これにより、腺上皮細胞で ECPg 遺伝子が特異的に発現する機構の一端が示された。

6 上皮による間充織分化の制御

われわれはよく、上皮間充織の「相互作用」という言い方をする。これまで述べてきたことはほとんど、上皮分化に対する間充織の作用についてであった。それでは、上皮は間充織の分化になにも影響しないのだろうか。図を見ていただくと分かるように、間充織の外周部には孵卵 5, 6 日頃から筋肉 (平滑筋) が分化する。また、平滑筋の収縮を制御する神経叢も分化する。われわれは、なぜ平滑筋や神経叢が、外周部に分化するのかに関心をもった。これまで、横紋筋の分化に関する因子 (MyoD や Myf5 など) はよく知られていたが、平滑筋の分化を制御する因子は未知であった。われわれは、繊維芽細胞などを平滑筋に分化させる作用をもつ因子を発見して **smooth muscle-activating protein (SMAP)** と命名し、その発現をてがかりに、平滑筋が発達する砂嚢を用いてこの問題に取り組んだ。

6 日胚の砂嚢を摘出し、上皮と間充織を分離し、上皮を間充織の表 (本来上皮があった側) や裏に貼り付けるという組合せを作り、器官培養した。その結果、平滑筋は常に上皮から一定の距離をおいたところに形成されることが分かった。つまり、上皮はその近くでは平滑筋の分化を抑制するのである (図 10)。次に問題になるのは、上皮の作用を担う因子である。われわれは、消化管上皮で発現する Shh をその候補の 1 つと考え、Shh を常に発現する細胞を間充織の裏側に移植するという手法で、その効果を見た。すると、やはり細胞塊に接した間充織細胞は平滑筋に分化しなかった。この効果は、培地に **cyclopamine** を

添加すると抑制されるので、確かに Shh が平滑筋分化の領域を決定していることが明らかになったのである⁸。

7 終わりに

ニワトリ胚では、消化器官の分化に上皮間充織相互作用が関わることが明らかになり、そこに作用するいくつかの因子も同定することができた。それには、上皮と間充織を分離、再結合するなどの実験的手技と遺伝子導入が比較的容易であるという、ニワトリ胚の特性が有用であった。最初にも述べたように、ニワトリと哺乳類は、動物学的にはきわめて近縁であり、ニワトリについて得られた知見は多くの場合哺乳類にも適用可能である。実際、BMP、Shh、FGF、Notch などの因子は、哺乳類の消化管発生にも関わっていることが次々と示されている。

また、ニワトリ初期胚は、New の培養方法というテクニックで、内胚葉側を上にして培養することが可能で、これによって、内胚葉の発生運命を詳細に調べ⁹、また、消化管が形成される以前の内胚葉に種々の遺伝子を導入してその効果をみる事が可能である。これもニワトリ胚の特性として現在の発生生物学では大いに注目されている。

一方で、マウスなどを用いたいいわゆる遺伝子導入動物の作製が困難であることは、ニワトリ胚のもつ不利な点である。ただ、これについても、上述のようにきわめて効率のよい遺伝子導入法¹⁰が開発されているので、今後はその方法を用いて、さらに研究が進展することが期待される。なお、本稿に述べた筆者らの研究については、綜説を参照されたい¹¹。

文献

- 1 東中川徹・八杉貞雄・西駕秀俊編 (2008) ベーシックマスター 発生生物学。オーム社。
- 2 Urase, K., Fukuda, K., Ishii, Y., Sakamoto, N. and Yasugi, S. (1996). Analysis of mesenchymal influence on the pepsinogen gene expression in the epithelium of chicken embryonic digestive tract. Roux's Arch. Dev. Biol. 205: 382-390.
- 3 Narita, T., Saitoh, K., Kameda, T., Kuroiwa, A., Mizutani, M., Koike, C., Iba, H. and Yasugi, S. (2000). BMPs are necessary for stomach gland formation in the chicken embryo: A study using virally induced BMP-2 and Noggin expression. Development

127: 981-988.

- 4 Shin, M., Noji, S., Neubüser, A. and Yasugi, S. (2006) FGF10 is required for cell proliferation and gland formation in the stomach epithelium of the chicken embryo. *Dev. Biol.* 294, 11-23.
- 5 Fukuda, K., Kameda, T., Saitoh, K., Iba, H. and Yasugi, S. (2003) Down-regulation of endodermal Shh is required for gland formation in chicken stomach. *Mech. Dev.* 120, 801-809.
- 6 Matsuda, Y., Wakamatsu, Y., Kohyama, J., Okano, H., Fukuda K. and Yasugi, S. (2005) Notch signaling functions as a binary switch for the determination of glandular and luminal fates of endodermal epithelium during chicken stomach development. *Development* 132, 2783-2793.
- 7 Watanuki, K. and Yasugi, S. (2003) Analysis of transcription regulatory regions of embryonic chicken pepsinogen (ECPg) gene. *Dev. Dyn.* 228: 51-58.
- 8 Sukegawa, A., Narita, T., Kameda, T., Saitoh, K., Nohno, T., Iba, H., Yasugi, S. and Fukuda, K. (2000). The concentric structure of the developing gut is regulated by Sonic hedgehog derived from endodermal epithelium. *Development* 127: 1971-1980.
- 9 Kimura, W., Yasugi, S., Stern, C. and Fukuda, K. (2006) Fate and plasticity of the endoderm in the early chick embryo. *Dev. Biol.* 289, 283-295.
- 10 Fukuda, K. Sakamoto, N., Narita, T., Saitoh, K., Kameda, T., Iba, H. and Yasugi, S. (2000). Application of efficient and specific gene transfer systems and organ culture techniques for the elucidation of mechanisms of epithelial-mesenchymal interaction in the developing gut. *Dev. Growth & Differ.* 42: 207-211.
- 11 Yasugi, S. and Mizuno, T. (2008) Molecular analysis of endoderm regionalization. *Dev. Growth & Differ.* 50: S79-S96.

ニワトリ胚消化管の分化

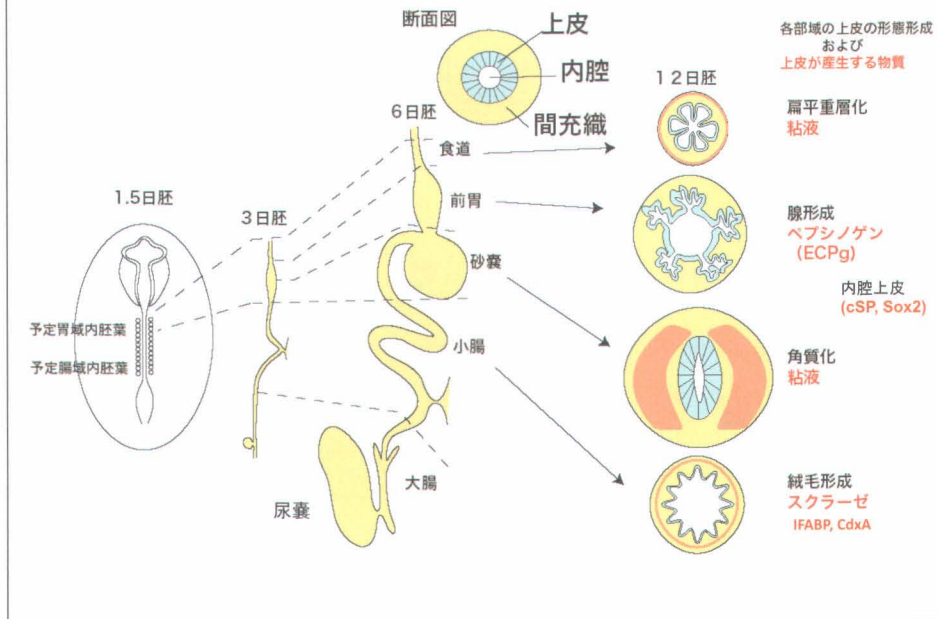


図 1

ニワトリ胚前胃の発生過程

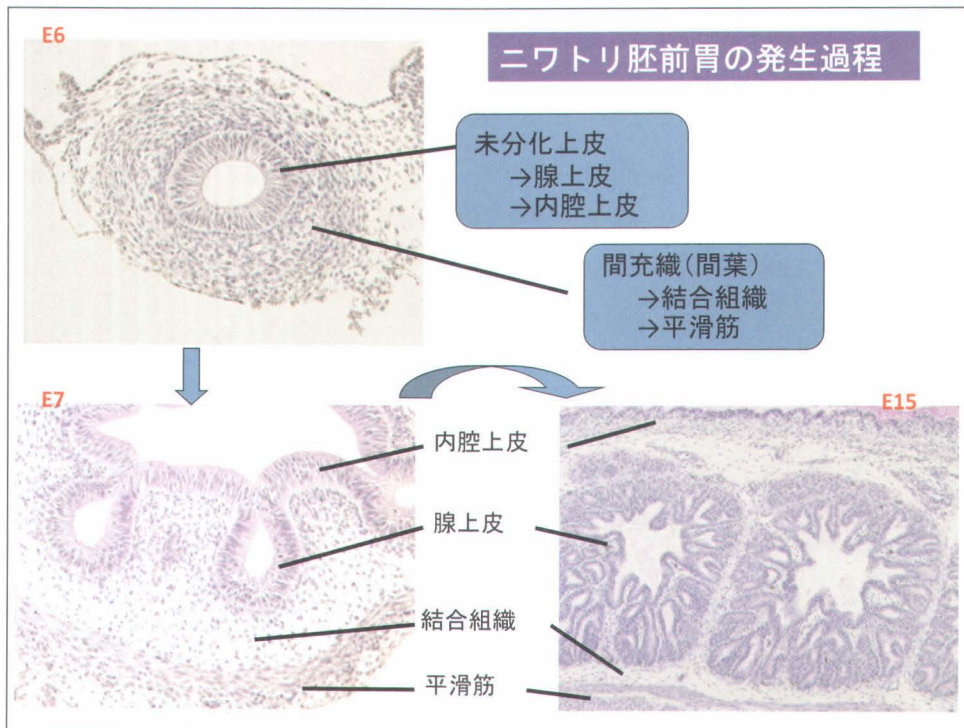


図 2

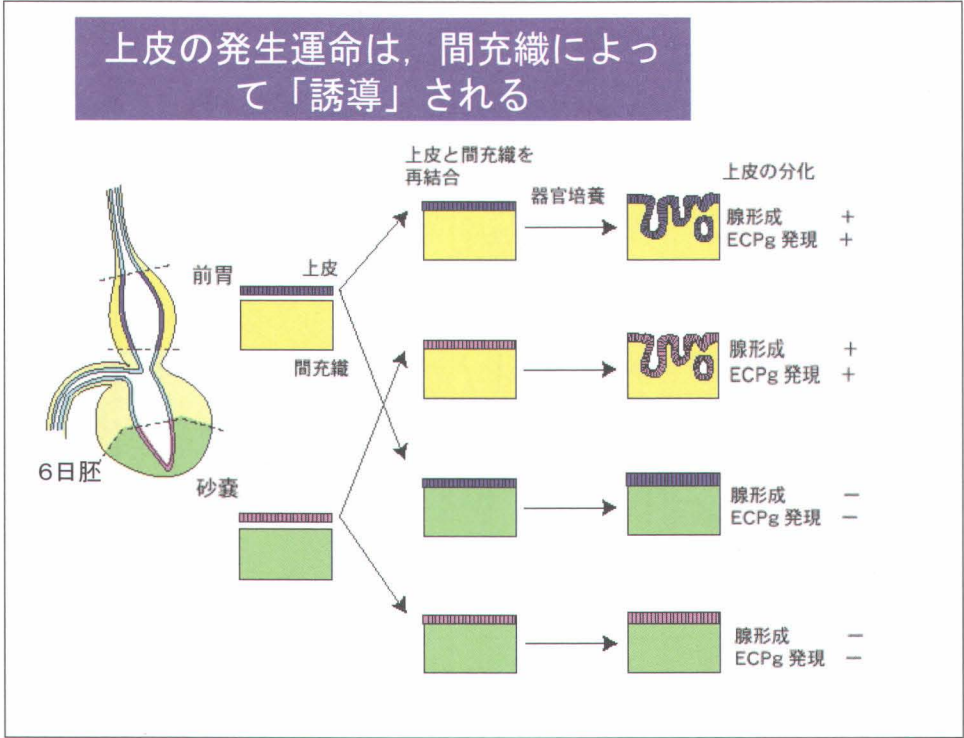


図 3

上皮－間充織再結合培養片におけるECPgの発現 (ECPg発現培養片/総培養片)

		上 皮						
		肺	食道	前胃	砂囊	小腸	大腸	尿囊
間 充 織	肺	0/6	13/13	13/13	37/39	0/8	0/2	
	食道	0/5	1/8	4/6	1/10	0/8	0/6	0/12
	前胃	0/13	11/11	9/9	26/29	0/7	0/7	0/20
	砂囊	0/6	0/3	0/7	0/9	0/3	0/9	0/7
	小腸	0/4	1/6	5/6	10/14	0/3	0/3	0/7
	大腸	0/2	0/6	2/5	1/10	0/2	0/3	

多くの上皮細胞がECPgを産生

少数の上皮細胞がECPgを産生

図 4

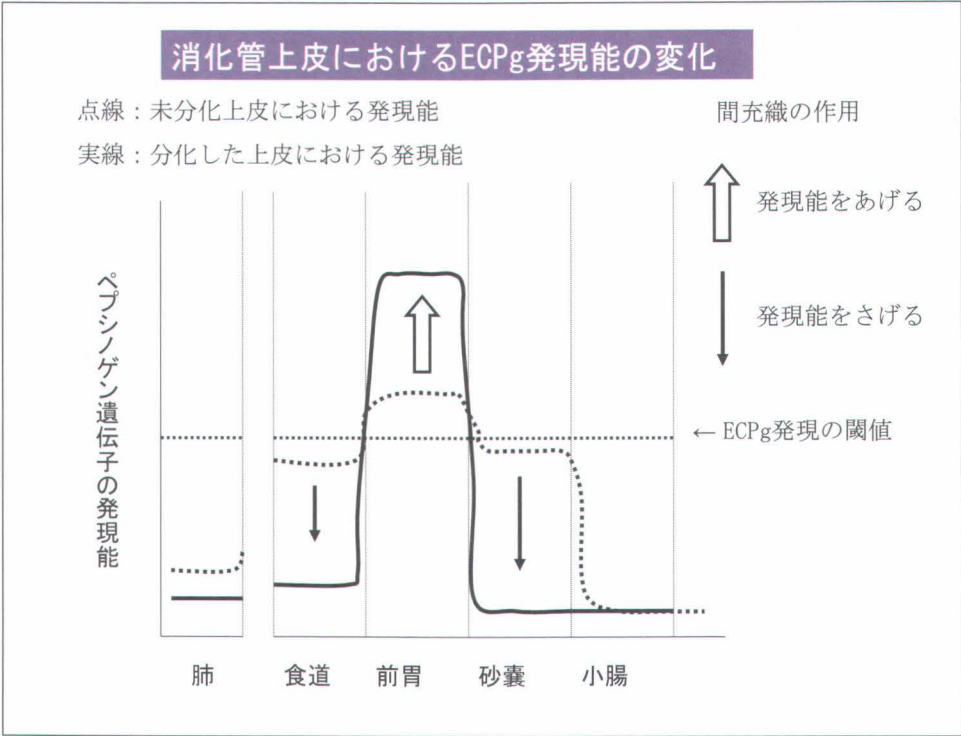


図 5

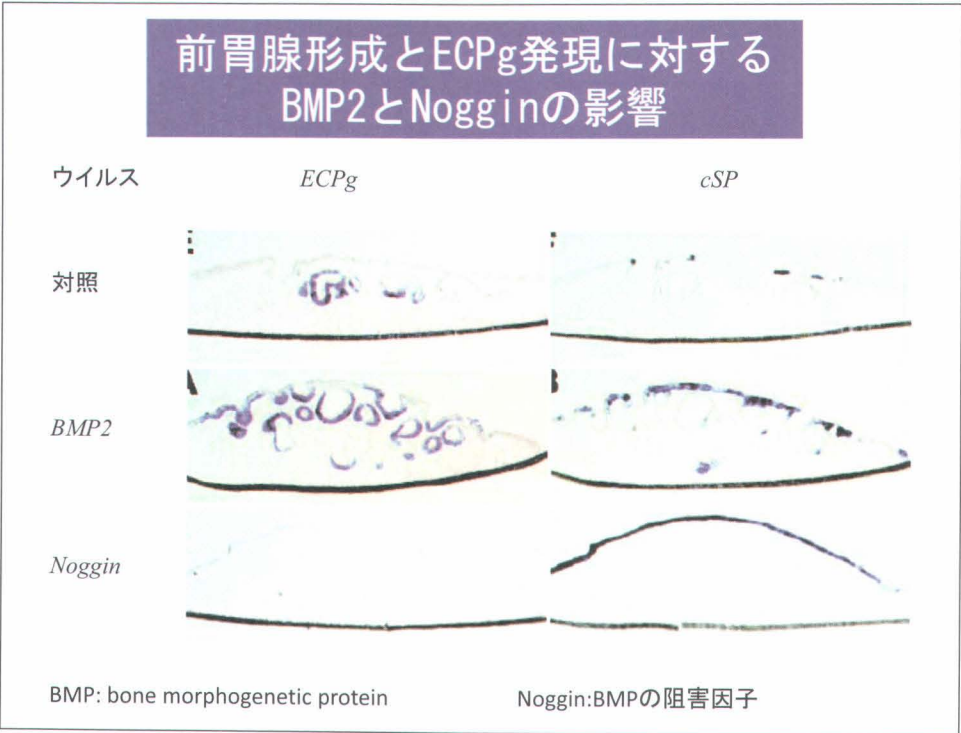


図 6

Shh の過剰発現は腺形成やECPg発現を抑制する

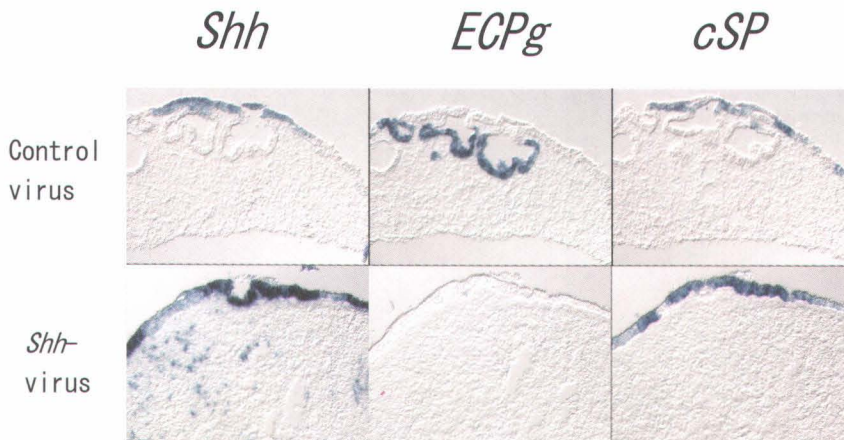
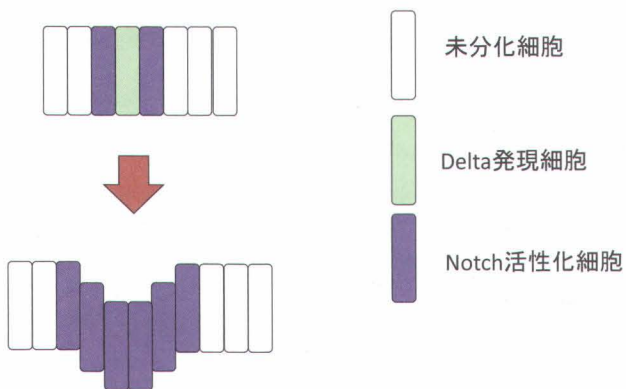


図 7

Delta-Notch による腺の形成制御の模式図



Delta発現細胞は周囲の細胞のNotchシグナルを活性化し、Notch活性化細胞群は腺を形成する。

図 8

前胃腺上皮細胞におけるECPg遺伝子の発現制御

- ECPg遺伝子の発現には、上流にあるGATA転写因子結合配列 (GA) が重要である。
- Sox2転写因子はECPg発現を抑制する。
- 腺上皮細胞ではcGATA5遺伝子の発現が増加し、cSox2発現が低下する
→ ECPg発現の誘導

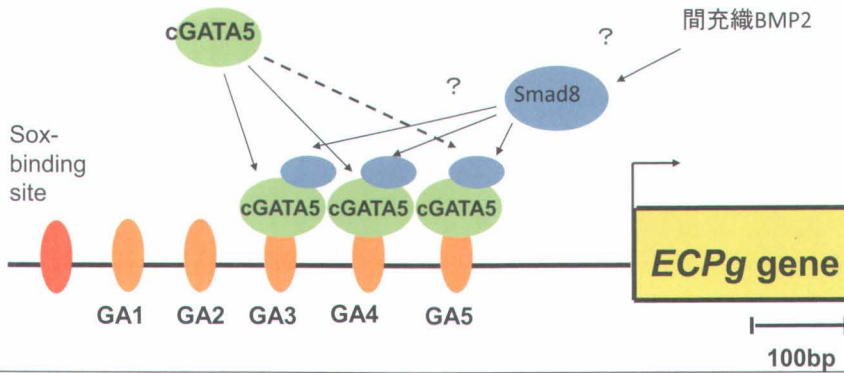


図 9

間充織の分化に上皮が関わることを示す実験

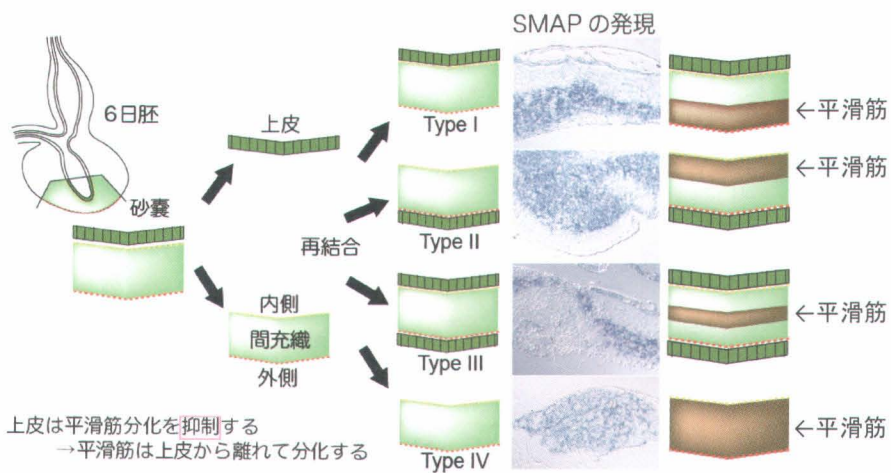


図10

器官発生・幹細胞分化の基本原理を探る

長澤 丘司

(京都大学・再生医科学研究所・生体システム制御分野)

哺乳動物の造血幹細胞は、十種類以上の血液細胞を生涯にわたり産生し続けている代表的な組織幹細胞で、骨の中心部の骨皮質に囲まれた空間である骨髓にごく少数維持されているが、骨髓内のどこに局在するのかについては議論となっている。造血幹細胞の維持や分化制御は、その局在場所であるニッチ（ニッチェ；niche）と呼ばれる特別な微小環境によって制御されていると推定されているがニッチの実態は不明である。成体骨髓の造血幹細胞ニッチを構成する細胞について、近年、米国の研究グループより骨辺縁に局在する骨芽細胞の一種で N-カドヘリンを高発現する SNO 細胞であるという報告と骨辺縁から離れた洞様毛細血管の内皮細胞であるという報告が出されているがいずれも証明されるには至っていない。一方、私たちは、ケモカインという細胞運動の制御で知られるサイトカインファミリーに属する CXCL12 の受容体 CXCR4 が、造血幹細胞の維持と B リンパ球の産生に必須であることを遺伝子欠損マウスを用いた研究で明らかにし、骨髓腔内に一様に分布し CXCL12 を高発現する細胞である CAR 細胞が造血幹細胞や B リンパ球のニッチを構成するのではないかと考えている。CAR 細胞は造血幹細胞と接着する長い突起を持ち、細胞突起による幹細胞へのサイトカインの供給という新しい細胞間相互作用を担っている可能性がある。本講演では、これらの知見をもとに、哺乳動物の造血幹細胞ニッチの実体や幹細胞の維持におけるニッチの役割について考察したい。

参考文献

Nagasawa, T.

Nat. Immunol. 9:345-346, 2008

Sugiyama, T., Kohara, H., Noda, M., and Nagasawa, T.

Immunity 25:977-988. 2006

Nagasawa, T.

Nat. Rev. Immunol. 6:107-116, 2006

<第106回研究会（平成22年6月11日）>

テーマ：動物実験第三者認証のその後

はじめに 黒澤 努（大阪大・医・実験動物医学）

1. 国動協と公私動協の「動物実験に関する相互検証プログラム」
喜多 正和（京都府立医大院・医・実験動物センター）
2. 日本実験動物協会第2期実験動物生産施設等福祉調査
上田 正次（(株)フェニックスバイオ宇都宮事業所）
3. ヒューマンサイエンス振興財団による動物実験実施施設認証を受けて
山田 靖子（国立感染症研究所 動物管理室）
4. AAALAC International国際実験動物管理公認協会認証
須藤 有ニ（アステラスリサーチテクノロジー(株)）

動物実験第三者認証のその後

大阪大学医学部実験動物医学教室

黒澤 努

はじめに

我が国の動物実験施行の法的根拠は動物の愛護及び管理に関する法律（動物愛護法）の第 41 条の規定“動物を科学上の利用に供する場合の方法、事後措置等”である。この動物愛護法が 2005 年に改正されたが、動物実験の施行が厳しく法律で規制されると科学の進展の妨げになるとの考えから、改訂論議の行われていた 2004 年に日本学術会議は“動物実験に対する社会的理解を促進するために”を提言した。提言の“現状と課題”では、“各研究機関が法規に準拠して動物実験指針を制定し、動物実験委員会を設けて、動物実験を自主的に管理している。この自主管理体制は定着してよく機能しており、わが国の動物実験は科学的にも倫理的にも適正に運営されて、国際的にも高い水準にある。”とした。しかし、問題点として“わが国には米国のような全国統一の動物実験ガイドライン（指針）がなく、指針はそれぞれの研究機関が個別に定めているため、規制の具体的基準が外から見えにくい。また、各研究機関が実施している自主管理の内容を客観的に評価検証する仕組みがないため、動物実験が適正に管理されていることを社会に対して説明する仕組みがないため、動物実験が適正に管理されていることを社会に対して説明する説得力に問題が残る。”とした。この提言の中では大きく 2 つの項目が述べられた。そのひとつが米国の ILAR の基準のような全国的に共通な動物実験の指針が我が国にはないことから、我が国は共通の指針が必要であるとした。これはその後、厚労省及び文科省から依頼を受けたという形を整えて日本学術会議から公表された。残念ながら農水省からも依頼を受けたということにはならず、全国的に共通な指針ということでは若干の影をのこした。もう一つの項目が第 3 者評価システムの構築である。

欧米の動物実験規制の実態

米国の動物実験施行に関する規制の在り方は、わが国でもよく知られていて、法律としては動物福祉法があり、その遵守は農務省が行う査察により担保されている。しかし、この法律には動物実験が最も多く行われる対象である、マウス、ラットは含まれていないことから米国内でも議論が続いている。ただし、一般的な説明としては米国政府は米国公衆衛生局が動物実験の在り方に関しての政策を示しており、その政策に沿っていなければ公的な研究資金は提供しないとする政策で担保されているとされている。また政府はこのための査察は行わないが、民間の非営利組織である、AAALAC International の施設訪問とそれによる研究機関の認証をもって、適切性担保が補完されているとかがえられている。

すなわち、米国では公的な研究資金の提供は AAALAC International に認証された研究機関にしか行わないという政策で動物実験の適切性を担保しているのである。一方、欧州の多くの国々では動物実験は法的に規制されていて、この規制のため動物実験には極めて厳格な手続きが必要となっていて、研究を行う側からは不満の声がよく聞かれる。日本学術会議には動物実験反対運動団体も過激な動物実験愛護団体も所属しておらず、研究者が参加している団体であるから、欧州の研究仲間のこうした不満を良く聞かされていたと思われる。このため我が国には欧州型の法的規制を避けたいとする科学者の声が多数をしめ、自ずと米国型の方式を導入したいとすることはよく理解できる。

わが国の新しい認証検証システム

米国では農務省の査察の仕組みが整っていることをよく理解していなかったことはないと思われるが、日本学術会議の提言は AAALAC International のような非営利の独立した団体を意識したものと思われる。いずれにせよ、2つの大きな提言項目の一つが実現できないこととなると、動物実験の法的規制強化につながりかねないことから、関係者はこぞってその設立に努力した。私は科学の国際性を考えると、こうした指針、第3者認証などは国際的に同歩調をとるべきと考え、これまで AAALAC International の活動を支援してきた。しかし、現実の問題として日本学術会議が提言したことが実現できなければ、明日からの動物実験に支障をきたすことも避けなければならない。

こうした背景から新たに設立された3つの我が国の第3検証システムについて良く検討することも重要であると考え今回の企画を行った。各地ですでに同様な検討は始まっているが、今回は実際に検証ないし認証をうけた研究機関の実務者の側からの意見を集約してみようとした。そこで検証ないし認証を受けたことを公言している研究機関の実務者からお話を伺うこととして、以下の10項目（表1）についてあらかじめ述べていただきたい事を各演者に依頼した。これは長らく AAALAC International の活動にかかわってきた者として、自分自身が新しい我が国の制度に関して、ぜひ聞いてみたい点を列挙したものである。さらに、すでに国際的によく認知されている認証団体である AAALAC International の認証とわが国の制度の比較を行えるように、AAALAC International の完全認証を得ている機関からのご発表を依頼した。

表 1

講演者へのお願い

(自分としてぜひ聞いてみたい点)

1. 制度の概要
2. 事前提出した資料等の内容（申請書以外）
3. 事前提出資料の作成に要した時間、日数等

4. 査察、検証、訪問等来られた方の人数
5. 来られた方の滞在時間
6. 来られた方の時間の使い方（書類の点検、施設の見学、会議等）
7. 来られた方の指摘事項
8. 来られた方々の専門性等
9. 査察、検証、訪問等後の連絡、情報交換、認証等
10. 受けた制度の長所、短所、改善点

今回の企画には、個人的な考えとして動物実験を行う研究機関は国際的な認証機関である **AAALAC International** の認証を受けることが最適であろうが、現実に設立された国内機関があるのであれば、この国内制度と国際制度との関係をどのようにすべきかの問題解決の糸口としたいという意図が含まれていた。各演者は企画者の期待に応じて自身の体験に基づき極めて貴重な情報提供を行った。とくに質問項目の 10 番目に関しては今後の国内第 3 者検証制度に関する建設的な意見が多く述べられた。

結論

各演者からの情報とこれまでの国際認証制度にかかわってきた経験から以下のような意見を持つにいたった。すなわち、わが国に作られた 3 つの新しい制度はいずれもが **AAALAC International** の国際的な認証システムに類似した検討項目に基づき設計されていて、重大な欠陥と呼べるものは存在しない。当然長い歴史を持つ **AAALAC International** のような専門的かつ網羅的な制度ではないものの、これまで我が国には十分根付いていない、動物実験への第 3 者の関わりが普及する糸口になるものと期待できる。3 つの別々の制度が共存することの是非と実際に検証を行う体制の専門性と公開性については相当に改善の余地を残しているとはいえ、これらの制度の健全な発展は、適切な動物実験を行う上での極めて重要な要素の一つなることの確信を得た。今後は動物実験の施行に関して第 3 者の目が入ることが我が国の多くの研究機関に受け入れられ、その検証ないし認証を受けたうえで、国際認証に進むことが我が国の健全な動物実験の在り方として適当ではないかと考えるにいたった。ただ我が国の制度ではいずれも業界内部での検討が行われているが、実施団体はいずれも動物実験推進団体である。**AAALAC International** のように実験動物福祉を追求する団体が認証するような制度は国民にとって極めてわかりやすい制度である。我が国の制度も実施団体が真に実験動物福祉を求める団体と国民が認識すれば、これらの制度は多くの国民にも受け入れられるものと考ええる。

国動協と公私動協の「動物実験に関する相互検証プログラム」

京都府立医科大学大学院医学研究科

実験動物センター 喜多正和

平成 18 年、動物実験が適正に実施されるため、文部科学省、厚生労働省および農林水産省からそれぞれ基本指針が告示され、その基本指針には、動物実験の実施体制が基本指針に適合していることを自己点検・評価し、外部の者による検証に努めることが規定されている。そこで、外部検証として現在、文部科学省管轄の大学および研究所に対しては、国立大学動物実験施設協議会（国動協）及び公私立大学実験動物施設協議会（公私動協）が相互検証委員会を立ち上げ「動物実験に関する相互検証プログラム」を実施しており、厚生労働省管轄の製薬企業および研究所に対しては、ヒューマンサイエンス財団が動物実験施設の認証を、農林水産省管轄の企業に対しては、（社）日本実験動物協会が実験動物生産施設の動物福祉調査を実施している。

本講演では、国立大学動物実験施設協議会（国動協）及び公私立大学実験動物施設協議会（公私動協）が実施している「動物実験に関する相互検証プログラム」の概略、ならびに相互検証を受けた経緯や結果などについて概説する。

1、動物実験に関する相互検証プログラム

動物実験は、「動物の愛護及び管理に関する法律（法律第 105 号 最終改正、平成 17 年 6 月 22 日）」、「実験動物の飼養及び保管並びに苦痛の軽減に関する基準（環境省告示第 88 号 平成 18 年 4 月 28 日）」等の関係法令を遵守すると共に、文部科学省の所管する大学、研究機関等においては、「研究機関等における動物実験等の実施に関する基本指針（以下、基本指針という）（文部科学省告示第 71 号 平成 18 年 6 月 1 日）」に基づき、機関の長の責任において適正に実施されなければならない。

また、基本指針には、動物実験の実施体制が基本指針に適合していることを自己点検・評価し、外部の者による検証に努めることが規定されている。検証は各大学等の長の責任において実施するものであり、個別に外部委員を委嘱して検証を受ける方法、外部団体に依頼して専門家による検証を受ける方法、近隣の大学等が相互に検証を行う方法等、いろいろな方法が考えられる。

国立大学動物実験施設協議会(国動協)及び公私立大学実験動物施設協議会(公私動協)は、各機関が行う自己点検・評価、外部検証の円滑な実施を支援するとともに、検証プロセスの透明性と公正性を確保し、社会的な理解の下での動物実験の適正な実施とそれによる学術研究の発展に資するため、大学等における動物実験に関する相互検証プログラムを公表している(http://www.kokudoukyou.org/kensyou/iken_bosyu.html)。相互検証実施体制をスライドに示したが、基本的に2～3名の専門委員からなる調査チームによる書面調査と訪問調査が実施される。

大学等における動物実験に関する相互検証プログラムの基本方針は以下の通りであり、その実施要領の詳細については上記 URL を参照して頂きたい。

1) 文科省基本指針を受け、各機関が行う自己点検・評価の結果を検証する。

各大学等の自己点検・評価を踏まえ、実験動物あるいは動物実験に関する経験と見識を持つ専門家によるピアレビューとして検証を行う。個別調査を行う専門委員は、大学等の規模や研究分野に見合った組織や体制とその実効性を、自己点検・評価報告書等の資料や関係者のヒアリング等をもとに検証し、段階的な向上をめざす助言を行う。

2) 検証プロセスの透明性と公正性を確保する。

各機関において行う自己点検・評価および本プログラムで行う検証は、各機関における動物実験の実施体制の適正性を社会的に担保するため、透明性と公正性が求められる。個別の調査を担当する専門委員に対しては、共通理解の下で評価が行えるよう、評価の目的や内容について十分な研修を行うことにより、公正性を確保する。また、透明性の確保のため、自己点検・評価および検証のプロセスや評価基準等について公表し、さらに、検証結果を確定する前に、当該機関から意見の申立てを受ける機会を設ける。

3) 制度自体の点検と評価により、第三者評価制度の構築を目指す。

本制度自体の点検・評価を行うとともに、他団体が行う同様の制度との連携を図り、わが国における動物実験の第三者評価制度の構築に貢献することを目指す。

2、動物実験に関する相互検証を受けて

平成18年の文部科学省基本指針の告示を受け、本学では平成18年12月に「京都府立医科大学動物実験規程」を作成、平成19年2月に教授会で承認され、平成

19年4月に施行した。平成19年度は新しく施行した「京都府立医科大学動物実験規程」の周知期間として、学内説明会を7回開催し、「動物の愛護及び管理に関する法律の一部を改正する法律」、「実験動物の飼養及び保管並びに苦痛の軽減に関する基準」、「研究機関等における動物実験等の実施に関する基本指針」、「日本学術会議が作成した動物実験の適正な実施に向けたガイドライン」及び動物実験にかかわるその他の法規を動物実験実施者ならびに動物実験責任者等に周知徹底させた。

平成21年度から、国立大学動物実験施設協議会（国動協）及び公私立大学実験動物施設協議会（公私動協）は、文部科学省告示「研究機関等における動物実験等の実施に関する基本指針（基本指針）」の規定に基づき、各機関が行う自己点検・評価、外部検証の円滑な実施を支援するとともに、検証プロセスの透明性と公正性を確保し、社会的な理解の下での動物実験の適正な実施とそれによる学術研究の発展に資するため、「動物実験に関する相互検証プログラム」を実施した。そこで、本学においては平成21年5月に「京都府立医科大学動物実験規程」に則して平成20年度の「動物実験に関する自己点検・評価」を実施し、「動物実験に関する相互検証プログラム」による検証申請を行い、平成21年9月に訪問調査を受けた。訪問調査は2名の調査員により実施され、本学においては動物実験委員会委員長、実験動物センター部門長ならびに事務職員3名が対応にあたった。訪問調査の所用時間は施設の視察を含め合計4時間であったが、ほとんど休憩もなく内容的には非常に密度の高いものであった。本学の訪問調査スケジュール（表1）ならびに本学が準備した訪問調査資料リスト（表2）を掲載しておくので、参考になれば幸いである。

また、平成22年2月にすでに検証申請に対する検証結果を受領している（スライド）。検証委員会から通知された「動物実験に関する検証結果報告書」の中で、本学に対する検証の総評はスライドに示す通りであった。

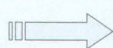
今回、公立大学動物実験施設としては初めて相互検証を受けてみて、事務的な準備の煩雑さはあったものの、それ以上に得るものの方が大きかったように思う。特に、これまで実施したことがなかった自己点検により、学内で不足している書類などの存在が明らかとなり、改善することができた点がもっとも良かったことだと感じている。今後、各大学においては速やかに「動物実験に関する自己点検・評価」を実施し、「動物実験に関する相互検証プログラム」による検証を受けてもらいたい。

2004年 日本学術会議第7部会提言 「動物実験に対する社会的理解を促進するために」

- ・ 学術研究、試験研究の不可欠な手段である動物実験を、法律で規制するのではなく、自主管理体制により適正化する。
- ・ 1980年：動物実験ガイドラインの策定について（勧告）
- ・ 1997年：教育・研究における動物の取り扱い—倫理的及び実務的問題点と提言—（特別委員会報告）

問題点

諸外国のような統一ガイドラインがないため、規制の具体性が分かりにくい。
各機関における自主管理体制を客観的に評価・検証する仕組みがない。



統一ガイドラインの策定
第3者評価システムの構築

研究機関等における動物実験等の実施に関する 基本指針（文部科学省告示71号）

第6 その他

2 基本指針への適合性に関する自己点検・評価及び検証

「研究機関等の長は、動物実験等の実施に関する透明性を確保するため、定期的に、研究機関等における動物実験等の基本指針への適合性に関し、自ら点検及び評価を実施するとともに、当該点検及び評価の結果について、当該研究機関以外のものによる検証を実施することに努めること。」

自己点検・評価の実施 → その結果を外部検証

3 情報公開

「研究機関等の長は、研究機関等における動物実験等に関する情報（例：機関内規程、動物実験等に関する点検及び評価、当該研究機関以外の者による検証の結果、実験動物の飼養及び保管の状況等）を、毎年1回程度、インターネットの利用、年報の配布その他の適切な方法により公表すること。」

規程、自己点検・評価結果、検証結果、動物飼養保管状況

→ 適切な方法で公表

国立大学法人動物実験施設協議会（国動協）と 公私立大学実験動物施設協議会（公私動協）による

相互検証プログラム

規則関係

検証委員会規程（案）

自己点検・評価関係

現況調査票（案）

自己点検・評価報告書イメージ（案）

自己点検・評価事項（案）

相互検証

相互検証実施要領（案）

訪問調査について（対象機関用ガイド）

検証結果報告書（案）

国動協・公私動協 相互検証委員会

国立大学法人動物実験施設協議会（国動協）

有川二郎（北海道大学）

浦野 徹（熊本大学）

笠井憲重（東北大学）

◎八神健一（筑波大学）

公私立大学実験動物施設協議会（公私動協）

佐加良英治（兵庫医大）

片平清昭（福島県立医大）

喜多正和（京都府立医大）

○下田耕治（慶応大学）

◎委員長 ○副委員長

相互検証プログラム（最終案）

- 検証は各機関の長の責任において実施
- いろいろな方法があり得る
 - 個別に外部委員を委嘱して検証を受ける
 - 外部団体に依頼して専門家による検証を受ける
 - 近隣の大学等が相互に検証を行う

各団体による動物実験に関する第三者の評価の取り組み

団 体	対 象	評価基準の根拠	
（社）日本実験動物協会	実験動物生産施設の動物福祉調査	実験動物基準	施設単位
国立大学法人動物実験施設協議会・公私立大学実験動物施設協議会	大学等における動物実験実施体制（自己点検・評価結果）の検証	文科省の基本指針	機関単位
ヒューマンサイエンス（HS）財団	製薬企業、厚生省所管研究機関等における動物実験施設の認証	厚生労働省の基本指針	施設単位の認証評価
AAALAC International（国際実験動物愛護評価認証協会）	研究機関の実験動物愛護管理体制の認証	日本の法令・指針等（ILAR guide も）	機関単位の認証評価

プログラムの基本方針

1) 文科省基本指針に基づき、各機関が行う自己点検・評価の結果を検証する。

- ◆ 実験動物や動物実験に関する経験や見識を有する専門家によるピアレビュー
- ◆ 大学の規模や研究分野に見合った組織や体制とその実効性を、自己点検・評価報告書等の資料の確認、関係者のヒアリング等により実施
- ◆ 段階的改善を促す助言

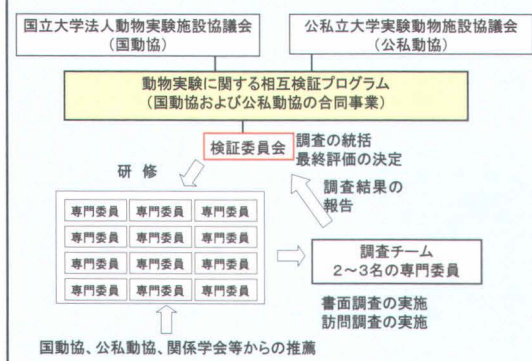
2) 検証プロセスの透明性と公正性を確保する。

- ◆ 検証の目的、内容、手順等について研修を受けた調査員が実施
- ◆ 自己点検・評価、検証のプロセス、評価基準等の公表
- ◆ 検証結果の確定の前に、当該機関の意見を受ける

3) 制度自体の点検・評価と第3者評価制度の構築を目指す。

- ◆ 試行的な実施の後、制度自体を点検・評価
- ◆ わが国の動物実験に関する第3者評価制度の構築につなげる。

相互検証の実施体制



相互検証のタイムスケジュール

2007年 5月	準備委員会の設置(国動協・公私動協)
2008年 3月	実施要領、マニュアル、評価項目など、規則や様式の作成
2008年 7～8月	相互検証プログラム(案)の公表・意見収集・決定
2008年 9～10月	相互検証プログラムの説明会
2008年 10月～	各機関における自己点検・評価
2009年 4～6月	相互検証の申請受付(初年度目標:10機関程度) 専門委員の選考、研修
2009年 7月	担当調査員(調査チーム)の決定、書面審査
2009年 8～11月	訪問調査
2009年 12月	検証委員会による検証結果の決定
2010年 1月	検証結果報告書の通知
2010年 4～6月	相互検証の申請受付(次年度目標:20機関程度)

「動物実験に関する相互検証プログラム」訪問調査

次 第

日 時 : 平成21年9月18日(金) 13時～17時(予定)
場 所 : 京都府立医科大学 基礎医学学舎5階 第9会議室
調査員 : 八神 健一 教授(筑波大学大学院人間総合科学研究科):主査
片平 清昭 准教授(福島県立医科大学医学部附属実験動物研究施設)
本学の対応者 : 木村 寛 動物実験委員会委員長(研究部長)
喜多 正和 動物実験委員会委員(実験動物センター部門長)
見学予定施設 : 中央研究室実験動物室

日 程
13:00～13:30 現況調査票および自己点検・評価報告書による概要説明
13:30～14:30 資料の説明・ヒアリング
14:30～15:00 資料の内容確認(調査員のみで実施)
15:00～15:30 ヒアリング
15:30～16:30 施設の視察
16:30～17:00 質疑、総評

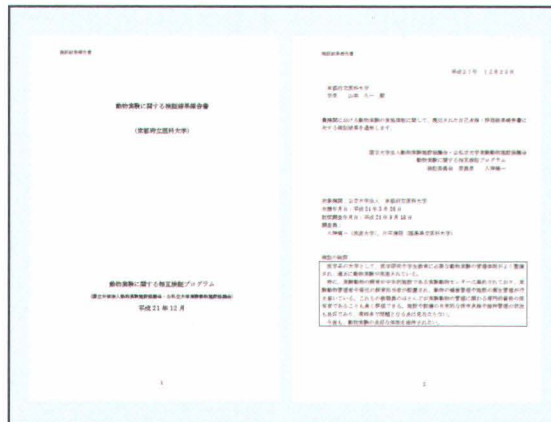
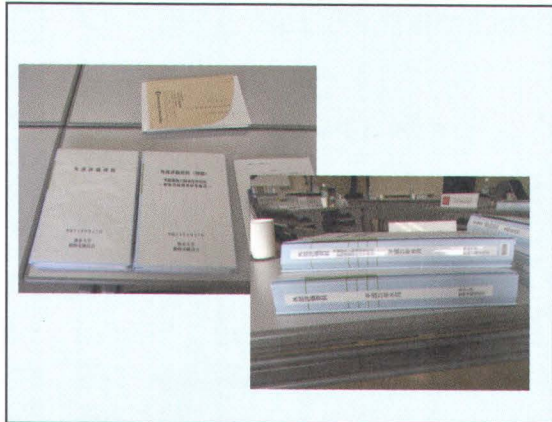
「動物実験に関する相互検証プログラム」訪問調査における資料リスト(1)

番号	自己点検の対象とした資料	備 考
1	京都府立医科大学実験規程	
2	京都府立医科大学動物実験委員会規程	
3	計画書などの様式(①動物実験計画書(別記第1号様式)、②動物実験結果報告書(別記第2号様式))	
4	動物実験計画書の審査要領(1年度を超えて継続する動物実験計画の審査について、②動物実験計画書作成上の注意事項)	
5	京都府立医科大学遺伝子組換え実験安全管理規程	
6	京都府立医科大学感染性病原体管理規程	
7	京都府立医科大学バイオセーフティ委員会規程	
8	国立感染症研究所病原体等安全管理規程	別冊
9	感染性動物実験における安全対策	別冊
10	動物実験施設等で使用する有害化学物質の取り扱いについて	「22」の中に添付
11	動物実験施設等における負傷、疾病への対応について	「22」の中に添付
12	動物実験施設における災害対策マニュアル	「22」の中に添付
13	飼養管理施設設置承認申請書一覧表	
14	飼養管理施設設置承認申請書	別冊「平成19年度動物実験等審査」
15	視察報告書(平成18年度第12回動物実験委員会・会議報告書)	別冊「平成18年度動物実験委員会」

「動物実験に関する相互検証プログラム」訪問調査における資料リスト(2)

番号	自己点検の対象とした資料	備 考
16	動物実験委員会委員名簿	「動物実験に関する現況調査票」2頁
17	委員会等様式(会議報告書)	別冊「平成19年度・平成20年度動物実験委員会」
18	平成20年度動物実験計画一覧(①小動物、②中・大動物)	
19	動物実験結果報告書及び経過報告書の集計結果	別冊「平成20年度動物実験等審査」
20	平成19年度業績集特報	別冊
21	平成20年度安全管理を要する動物実験(遺伝子組換え実験、病原微生物使用実験、毒物・感染症物質等実験、H使用実験)にこの動物実験計画一覧	
22	実験動物の飼養管理マニュアル	「10」「11」「12」を含む。
23	実験動物飼養管理週報日誌	別冊
24	中央研究室実験動物センター利用講習会資料	別冊
25	実験動物講習会スライド	
26	大学院医学研究科講義概要(①博士課程、②修士課程)	
27	講習会実施記録(講習会出席者名簿)	
28	京都府立医科大学ホームページ	
29	その他	別冊





【検証の総評】

医学系の大学として、医学研究や学生教育に必要な動物実験の管理体制がよく整備され、適正に動物実験が実施されている。

特に、実験動物の飼育が中央的施設である実験動物センターに集約されており、実験動物管理者や専任の飼育担当者が配置され、動物の健康管理や施設の衛生管理が行き届いている。これらの教職員のほとんどが実験動物の管理に関わる専門的資格の保有者であることも高く評価できる。施設や設備の日常的な保守点検や維持管理の状況も良好であり、現時点で問題となる点は見当たらない。今後も、動物実験の良好な体制を維持されたい。

検証結果（１）

検証結果報告書

検証結果

1. 規程及び体制等の整備状況

1) 機関内規程

1) 機関による自己点検・評価結果

- 基本指針に適合する機関内規程が定められている。
- 機関内規程は定められているが、一部に改善すべき点がある。
- 機関内規程が定められていない。

2) 自己点検・評価の妥当性

「京都府立医科大学動物実験規程」が定められ、その内容は基本指針の趣旨に合ったものである。よって、動物実験に関する機関内規程の整備状況について、自己点検・評価は妥当な内容と判断する。

3) 改善に向けた意見

特になし。

検証結果（２）

2. 動物実験の実施状況

1) 機関による自己点検・評価結果

- 基本指針に適合し、適正に動物実験が実施されている。
- 概ね良好であるが、一部に改善すべき点がある。
- 多くの改善すべき問題がある。

2) 自己点検・評価の妥当性

1 年間に 272 件の動物実験計画が承認され、医学分野における動物実験が適正に実施されている。しかしながら、動物実験の実施結果の報告について、提出率は約 8 割で動物実験責任者の転出等の理由により未提出の例が見られる。実施結果の把握方法に工夫の余地がある。よって、動物実験の実施状況について、「概ね良好であるが、一部に改善すべき点がある」とした自己点検・評価の内容は妥当と判断する。

3) 改善に向けた意見

動物実験計画を年度毎に承認しているのに対して、実施結果の報告は完了時としているため、同様な内容の実験計画を次年度に継続する場合は報告がなされていない。年度毎の報告あるいは継続の上限を定める等の方法により、実験計画に対応した結果の把握を検討するとともに、転出者についても可能な限り提出させる工夫を重ねられたい。

動物実験と動物福祉

真理の追究のため何をしても正義というわけではない。
そこに科学者の良心、責任がある。

動物の命、科学と医学、社会、
動物資源保護に対する責任

説明責任



日本実験動物協会第2期実験動物生産施設等福祉調査

上田正次（株式会社フェニックスバイオ宇都宮事業所）

1. はじめに

社団法人日本実験動物協会（以下、「日動協」と略す。）が実施する「第2期動物生産施設等福祉調査」は、国内で3つの機関が実施する動物実験第三者認証の一つに位置付けられる。現在のところ、日動協の会員もしくは日本実験動物協同組合（以下、「実動協」と略す。）の組合員の実験動物生産施設（飼養保管を伴う関連業種および受託業務を含む）を対象に、動物福祉の向上と業務の改善及び実験動物生産業界に対する社会的理解の促進を図ることを目的として実施するもので、平成21年2月20日に受けた本調査について報告する。

2. 制度の概要

「第2期動物生産施設等福祉調査」は、「動物の愛護及び管理に関する法律」（平成17年6月12日改正、平成18年6月1日施行）第7条の「動物の所有者又は占有者の義務等」、第40条の「動物を殺す場合の方法」、および第41条の「動物を科学上の利用に供する場合の方法、事後措置等」に規定される実験動物の取り扱いにもっとも重要と思われる3つの条文に焦点を絞り、平成16年度から20年度の5年間に日動協が実施した「実験動物生産施設模擬調査」の結果を踏まえて、新たに実施する本格的な調査で、日本学術会議第7部報告（2004年7月15日）「動物実験に対する社会的理解を促進するために（提言）」にある「研究機関の自主管理を第三者的立場から評価する機構の設置」、いわゆる「動物実験第三者認証」に相当するもので、平成21年度から平成25年度の5ヵ年間で行うことが計画されている。

ここで行われる調査項目は、主に「実験動物の飼養及び保管並びに苦痛の軽減に関する基準」（平成18年4月28日環境省告示）に拠り定められたものである。

本調査を次の手順で受けた。まず、調査申請書を日動協会長に提出して訪問調査の日程を調整して訪問調査の期日が決定した。調査日が決まった後に、調査申請機関及び調査対象施設の概要、12項目62設問からなる調査票および機関内規定としての「実験動物福祉規程」等の事業所で適用している規程類を事前に提出した。訪問調査は、3名の調査委員から

なる調査チームの訪問を受けて、面談、文書・記録類・写真等の閲覧及び目視により、「調査票」に記載された内容を概ね 5 時間をかけてひとつひとつ具体的に確認することで行われた。

調査委員が調査結果を持ち帰り、日動協で開催される評価委員会で報告し、調査・評価委員会による評価を経て、実験動物福祉調査・評価委員会の委員長名でなされた「指導・助言」を文書で受けた。これに対し、指摘を受けた各内容について改善とその実施時期を明記した回答書を速やかに作成して答えた。

この回答書をもとにして評価委員会が「調査基準」により評価判定した「第 2 期実験動物生産施設等福祉調査結果報告書」の通知を日動協会長名で受けた。

以下に、本調査を受けるにあたり準備した事項や訪問調査において行われた事象の内容並びに準備に要した時間等を具体的に説明する。

3. 事前提出資料および準備資料の作成について

本調査を受けるにあたって、12 項目（組織・体制、飼育管理、動物の健康管理、施設・設備、生活環境の保全、危害防止、記録管理、教育訓練、輸送・保管・販売、その他、生産施設、受託試験等を行う施設）に分類された 62 の設問からなる調査票に対し、根拠資料を記入して YES・NO で回答した。日動協のホームページに個々の設問内容が掲載されているのでご覧いただきたい。また、調査を受ける施設で運用する動物福祉に関する規程類をつけて事前資料として提出した。

YES・NO の記入と根拠資料の準備にあたっては、事前に点検すべき評価項目や準備すべき資料等を解説した「調査ガイドライン」が示されており非常に役立った。これは、調査を受ける施設に対して作成されたもので、設問の意味や事例が詳細かつ具体的に示され、事前点検すべき評価項目も非常に解りやすく解説してあった。このため、YES・NO の回答を根拠資料を確認して容易に行うことができた。また、訪問調査日に用意しなければならない資料等の準備も非常に円滑に進めることができた。

事前に準備した資料類を具体的にあげると、規程類、標準操作手順書、組織図等の基本事項に関するもの、微生物モニタリングや飼育施設運営に関する日報類等の日常管理に関わるものに加え、廃棄物処理業者の資格証明書のコピーや契約関係の書類、また、動物輸送記録や教育研修記録など、調査当日の説明や質疑に欠かせない様々な資料であった。尚、調査票に「根拠資料など」として揚げた資料の一覧を「調査票根拠リスト」として作成し

た。更に、視察が難しい場所は、説明を助ける写真集を作成し、施設の運営方法を解りやすくビジュアル化したDVDを準備した。

「調査ガイドライン」が事前に示されていたことで、事前提出資料の作成も思いのほかスムーズに行うことができた。事前提出資料の準備に要した時間は、動物福祉に関する規程類のプリントアウトに 10 分間程度、調査票の記入に 30 分間程度、また、根拠資料を確認することも約 30 時間で済ませることができた。一方、準備資料の作成に要した時間は、必要な根拠資料のコピー類の作成に 3 時間、54 枚からなる写真集の作成に 4 時間、調査員 3 名分の標準手順書 (SOP) を増刷するに 3 時間を要した。このように多くの準備すべきものがあったが、事前準備は 2 週間で延べ 40 時間という比較的短い時間で行えた。

4. 訪問調査について

訪問調査の当日は、1 チーム 3 名からなる調査員（主査、委員、事務局）を迎え、調査を受ける側として責任者 3 名（所長、動物実験委員会委員長、実験動物管理者）が出席した。最初に調査員（事務局）から今回の調査に関する制度や秘密保持の説明を受けた。

次に、DVD を使って調査を受ける動物施設の概要を説明した。その後に、いよいよ調査票にある項目をひとつひとつ説明し、関係資料の確認と質疑を行って記載内容を相互に確認した。これらの作業は約 3 時間をかけて行われた。

このような書面等による会議室での確認作業の後、施設見学ツアーで実際の現場を視察して書面では確認が難しい事項等を確認した。施設内の視察に加え、周囲の環境や臭気・騒音の状況、廃棄物の保管状況等を両者で確認した。また、本ツアーで視察が難しい場所については、予め用意した写真集を使って設備状況等を説明することで確認を受けた。これらには約 45 分間を費やした。

施設見学ツアーが終了した後、調査員だけで 30 分間程度の協議がなされた。その後に、約 30 分間をかけて調査結果の報告を受け、内容を相互に確認した。最後に、主査調査員から 15 分程度をかけて口頭による暫定的な指導・助言を受けた。

このように訪問調査は昼食を挟んで 6 時間、実務で 5 時間を越える時間をかけて丁寧に行われた。

本調査では、調査票の回答にしたがって動物実験が適切に実施されていることを確認することを基本に、記録内容の確認に重点がおかれていた。特に、適切に実施していることの確認では、「押印」という動作による管理体制が求められた。また、日常管理の状況が動

物実験実施の最終責任者である機関の長に速やかに伝達されることを担保する体制が求められた。これらのことは、通常管理体制の下で、標準操作手順書(SOP)を遵守して適切に運営している事項を押印により確認するという作業の大切さや機関の長への伝達体制が重要であることを再確認することになり、大いに参考になった。

特に、弊社では、受託機関として依頼を受けて遺伝子組換え動物を作製し、飼育して届けるということを行っているため、日常管理・観察の中で動物に異常を認めた場合には、些細なことでも速やかに依頼者に伝達することを重視する体制が徹底されていた。しかし、本調査で指摘を受けた異常の内容は、遺伝子改変に関する事柄ではなく、通常の健常動物等を飼育している中で起こりうる異常を意味するものであり、また、報告する相手も依頼者ではなく施設を管理運営する最終責任者である機関の長であった。動物福祉の観点からは当然のことであったが、つい忘れがちな事項であった。

5. 調査の実施結果に基づく指導・助言等について

訪問調査を受けてから2週間後に、調査の実施結果に基づく指導・助言等を文書で受けた。指摘された事項の改善内容等を事項ごとに具体的な取組み方と達成期日を明記した回答書を速やかに作成して提出した。

一連の調査・指導・助言・改善策の回答を送付してから1ヵ月半後に、「第2期実験動物生産施設等福祉調査結果報告書」を受け取った。

本調査は指導的な立場を重視するという観点から、この「調査結果報告書」に記載される評価は、施設の単なるランク付けの評点や評語を与えた場合に生じる誤解を避けるため、例えば、A、B、C、Dというような評語を用いるのではなく、以下に示したような内容で4つに区分した評価で指導が行われた。

- 実験動物の飼養保管施設として、調査項目のすべてが良好であり、実験動物福祉の観点から適切な管理・運営がなされている。
- 実験動物の飼養保管施設として、調査事項が概ね良好であり、実験動物福祉の観点から適切な管理・運営がなされている。
- 実験動物の飼養保管施設として基本的な要件を満たしているが、調査項目の一部に不備が認められる。実験動物福祉の観点から改善が望ましい。
- 動物実験の飼養保管施設として基本的な要件に欠陥があり、調査事項に重大な不備が認められる。実験動物福祉の観点から早急な改善が必要である。

はじめて受けた訪問調査であったが、今回の「調査結果報告」で「実験動物の飼養保管施設として、調査事項のすべてが良好であり、実験動物福祉の観点から適切な管理・運営がなされている。」との評価を受けることができた。

6. おわりに

本調査では、大学等の公的機関で動物実験施設の運営・管理にあたっている経験豊富な現役の専門化から具体的に指摘・指導を得ることができ、自己点検では気づくことが難しい様々な事項について部外者の目による点検を受けることができた。また、専門的な視点から指摘・指導を受けることで、課題の掘り起しと対処法を具体的に知ることができた。更に、訪問調査を受けたことが動物福祉に対する従業員の意識の向上にもつながり、非常に有意義な調査であった。

しかし、1日という限られた時間の訪問調査であったため、時間的な制約の中で豊富なメニューをこなさなければならないため、スケジュール的には非常にタイトであった。また、内容が調査票の項目に限定された面も否めなかった。

現在のところ、本調査の対象が日動協の会員と実動協の組合員に限定されており、他の2つの機関が運用する制度を含めて現行制度の中でカバーされない動物実験施設もある。第三者認証を定着した制度とするには、全ての希望者が受けることのできるシステムを整備することが必要かつ重要であり、今後の課題と考えられた。

最後に、最も気になる費用は、日動協会員の施設が10万円、非会員の施設が13万円という実費に近い費用でコストパフォーマンスの点でもリーズナブルな費用であった。

図1. 調査手順

「調査申請書」を提出 ←

2008.12.16

機関名・代表者名、施設面積、担当者名(窓口)、
実験動物管理者名、日動協資格者数、事業内
容、調査対象施設の従業員数、取扱い動物

訪問調査の日程調整 ←

調査員の選任

事前資料を提出 ←

2009.1.30

・調査申請機関及び調査対象施設の概要
・調査票
・動物福祉に関する規定

訪問調査(書類確認、ヒアリング、施設の視察)

2009.2.20

指導・助言(文書)

2009.3.6

調査チームの派遣

調査員3名(委員長・委員・事務局)

調査時間:5時間

回答(文書)

2009.3.11

「調査票」の記載内容の確認

⇒ 面談、文書・記録類・写真等
の閲覧及び目視

「調査結果報告書」の通知

2009.4.24

1

図2. 事前提出した資料等の内容(申請書以外)

①動物福祉に関する規程類

フェニックスバイオ宇都宮事業所 実験規程集

☆動物実験関連規程

☆遺伝子組換え実験関連規程

・動物実験規程

・組換え実験実施規則

・動物実験委員会規程

・動物実験承認規程

②調査票(12項目、62設問)

YES/NO、根拠資料(文書・記録類)の記載

組織・体制(6)、飼育管理(5)、動物の健康管理(7)、
施設・設備(8)、生活環境の保全(4)、危害防止(8)、
記録管理(2)、教育訓練(5)、輸送・保管・販売(7)、
その他(2)、生産施設(5)、受託試験等を行う施設(3)

2

図3. 準備した根拠資料(その1)

実験規程集 ・実験動物規程 ・動物実験委員会規程
(事前提出) ・動物実験承認規程 ・組換え実験実施規則

標準管理マニュアル (SOP)

日報 (飼育室・洗浄室・実験室・空調施設等)

日本実験動物協同組合員名簿 (組合員証)

実験動物委員会議事録
(組換えDNA実験安全委員会 & 動物実験委員会の合同委員会)
⇒ 委員会活動、実験動物管理者任命、自己点検評価

飼育環境検査成績書 (環境検査結果報告書)

組織図 (動物実験福祉体制づくり、
日常の実験・飼育管理の指示・報告体制)

微生物モニタリング結果 (実中研ICLASモニタリング)

3

図4. 準備した根拠資料(その2)

廃棄処理委託契約書コピー

廃棄業者の自治体認可票コピー
(産業・特別廃棄物収集・運搬業許可書・一般廃棄物処理業許可書)

処分動物の記録

建物管理業務報告書 (施設管理記録)

入所記録簿 (訪問者・入室エリア・訪問者の動物接触状況・対応者等)

株式会社フェニックスバイオ宇都宮事業所緊急連絡網

教育研修記録 (社内研修記録、各種研修会修了書等)

動物輸送記録

配送基準 (委託輸送会社)

向精神薬試験研究施設設置者登録証コピー

4

図5. 準備した根拠資料(その3)

施設概要紹介DVD

写真集 (54枚)

- 飼育室関係 … 飼育室全景、ケージ、ラック、壁、床 等
- 衛生設備 … 洗浄滅菌室全景、オートクレーブ、ケージワッシャー、
流し台、アルコール噴霧器 等
- 逃亡防止設備 … ネズミ返し、網設置排水溝
- 表示 … 組換え動物飼育室、RI実験室、汚染検査室
- 出入口施錠状況… 玄関、カードキー、飼育室、テンキー、逆行防止ドア
- 環境保全 … 廃棄物置場、医療廃棄物(可燃物・危険物)、
動物死体保存冷凍庫、ボイラ設備、吸排気ダクト
- 危害防止 … 防塵マスク、有機溶剤用毒ガスマスク、クリーン室内着衣
- 輸送車 … 空調設備、監視CCDカメラ&モニター、消毒剤噴霧器
荷台(ネズミ返し・固定・滑り止め床)

5

図6. 事前提出資料の作成に要した時間、日数等

- ①動物福祉に関する規程類
 - ・(A4版47頁)をプリントアウト ⇒ 10分間
- ②調査票(12項目、62設問)
 - ・YES/NOの記入 ⇒ 30分間
 - ・根拠資料の確認 ⇒ 30時間(10日間)

約30時間

☆準備資料の作成に要した時間

- ①根拠資料に関するコピー類作成 ⇒ 3時間
- ②写真集作成 ⇒ 4時間
- ③標準手順書(SOP)の増刷(3部) ⇒ 3時間

約10時間



合計:40時間(2週間)

6

図7. 査察・検証・訪問等来られた方と対応者の人数

訪問調査チーム:3名

- ・評価委員会 委員長
- ・評価委員会 委員
- ・評価委員会 事務局

対応者:3名

- ・施設責任者(所長)
- ・動物実験委員会 委員長
- ・実験動物管理者

7

図8. 受けた制度の長所、短所、改善点

- 長所
- ・専門家から具体的に指摘・指導を得ることができた。
 - ・部外者の目による課題の掘り起しができた。
 - ・従業員意識の向上につながった。

- 短所
- ・調査票の項目に内容が限定された。
 - ・バリア区域の入室制限で調査が限定された。
 - ・調査時間が限られ、スケジュール的にタイトであった。

改善点

調査対象が日動協会員と実動協組合員に限定されており、第三者認証を制度として定着させるには、農林水産省が所管する機関で、日動協会員・実動協組合員以外の希望者でも受けることができる体制を作る必要がある。

8

—動物実験第三者認証のその後— ヒューマンサイエンス振興財団による 動物実験実施施設認証を受けて

山田 靖子

国立感染症研究所 動物管理室 室長

3つの「動物実験等の実施に関する基本指針」

「動物の愛護及び管理に関する法律」（動愛法）は平成17年に改正され、平成18年に施行された。施行に向けて、環境省は「実験動物の飼養及び保管並びに苦痛の軽減に関する基準」（平成18年4月28日）、文部科学省、厚生労働省、農林水産省はそれぞれ個別の「動物実験等の実施に関する基本指針」を制定した（平成18年6月1日）。また、同日、日本学術会議が省庁共通の「動物実験の適正な実施に向けたガイドライン」を策定した。

文部科学省、厚生労働省、農林水産省の3つの基本指針は概ね同じ内容であるが、自己点検及び評価、情報公開の部分で若干の相違がある。3つの基本指針の比較を図1に示す。外部評価については動愛法には記載されなかったものの、2つの基本指針で触れられている。文科省と農水省が「当該研究機関等以外の者による検証に努めること」と、ほぼ同じ文面で外部評価について記載しているのに対して、厚労省ではこの文言がないこと、また情報公開の具体的な内容と方法が明記されていない。

4つの外部評価機構

現在、国内で実施されている外部評価機構は4つ存在する（図2）。日本実験動物協会（日動協）の動物福祉調査は、農水省基本指針に基づいて、日動協に所属する実験動物のブリーダーや受託機関を対象とする。ブリーダーは販売のための繁殖が主体であり、研究機関の動物実験とはかなり異なった視点での外部評価が要求される。国立大学法人動物実験施設協議会・公私立大学実験動物施設協議会（国動協・公私動協）の相互検証は、文科省基本指針に基づいて、国動協・公私動協に所属する大学が対象となる。大学には動物センターのような大規模な共同利用施設と、学内に散在する小規模な動物実験施設があり、その双方を含めて評価する難しさがある。厚労省基本指針には外部検証の記述がないが、ヒュ

一マンサイエンス振興財団動物実験実施施設認証センター（HS 財団認証センター）が厚労省基本指針に基づいて、主に製薬業、受託試験機関などを対象としている。企業では部外秘の情報部分が含まれ、また定型的試験の繰り返しが多いこと、などが挙げられるとともに、対象機関の多くが経験している薬事法の GLP との相違を明確にすることが必要である。AAALAC International は国際的な動物実験の認証機構である。英語での対応、通訳の手配などが必要となることと、国際的な基準が要求される。

HS 財団認証センターによる認定までの流れ

ヒューマンサイエンス振興財団は、厚労省の基本指針に基づいて外部評価を行う動物実験実施施設認証センターを組織し、平成20年度より認証制度をスタートした。センターの組織は、事務局、申請施設の実地調査に向く認証評価員、認証評価員のコメントを検討し評価結果を決定する評価委員会、運営に関する事項を検討するとともに評価結果の報告を受ける運営委員会である。認証制度スタート時に認証評価員のレベルを合わせる目的で、2つの国立研究機関動物実験施設の実地調査を参加可能な認証評価員全員の出席で行なった。国立感染症研究所（感染研）戸山庁舎はその2番目の施設であった。感染研には3つの庁舎があるが、HS財団認証センターの認定は施設ごとであるので戸山庁舎のみを対象とした。通常の実地調査は2名の認証評価員が出向き2日間の日程で行われるが、感染研の実地調査は認証評価員全員の出席を目的としたため、1日の日程で行った。

1. 実地調査まで（図3）

調査に先立って、提出した事前提出書類を図4に示す。

- 申請書（施設名、所在、面積、動物種 機関の長が申請）
- 平面図
- 事前提出資料
 - 機関内規程等 関係文書名一覧
 - 動物実験実施規程及び計画書、終了報告書、通知書様式
 - 動物実験委員会規程及び動物実験委員会名簿
 - 実験動物管理運営規程
 - 動物実験施設承認関係書類（チェックリストを含む）
 - SOP目次

- ・ 動物実験の管理体制及び動物実験計画書承認までのフロー

HS財団認証センターは書面調査を行い、事前に確認すべき事項がある場合はその部分の確認を取るが、感染研の書面調査では特に確認すべき事項がなかったので、実地調査の日程調整に進んだ。実地調査には機関の長、動物実験委員会委員長の出席が求められるため、その日程調整が必要であった。事前提出資料及び実地調査時の資料は実際に稼動しているものであり、資料準備のために特段の時間は要さなかった。

2. 実地調査

実地調査当日は会議室に、事前に文書名や目次、様式のみを提出した資料の本文、動物実験計画書本文、施設管理関係書類（温湿度記録、施設日報、異常報告書など）を準備した。実地調査に出席したのは、認証センター側は認証評価員2名（感染研の調査は研修を兼ねたので、ほかに9名）、事務局1名（感染研の調査は研修を兼ねたので、他に1名）、感染研側は機関の長（所長）、動物実験委員会委員長、動物実験施設管理者（動物管理室長）、実験動物管理者（戸山庁舎勤務の動物管理室職員）、飼育担当主任（業務委託）、動物管理区受付（業務委託）、動物実験委員会受付（臨時職員）であった（図5）。

午前中は会議室においてヒアリングを行なった（図6）。感染研動物実験施設管理者がパワーポイントを用いて、施設、機関内規程、動物実験委員会、などについて説明し、認証評価員との質疑応答を行った。次いで、動物実験委員会委員長、機関の長のヒアリングをそれぞれ行なった。機関の長へのヒアリングは動物実験のバックアップ体制の確認であった。次いで、その場で任意に選択された動物実験計画2つについて経過の確認を行なった。感染研では動物実験委員会の書類は電子ファイルで保存しているので、計画書、審査通知、コメントに対するレスポンスなどをスクリーンに映し出して説明を行なった。承認後の動物導入、実験結果の報告の確認を行なった。また、今までに実験終了後の改善指導があったかを確認した。

午後約2時間で施設内実地調査を行った（図7）。認証評価員が実際に動物実験施設に入り、出入り管理、実験動物の飼養状況、動物実験の現場の視察、衛生管理、遺伝子組み換えや病原体の安全管理などを確認した。感染研では感染実験区域へは特に立ち入りを制限しているので、この区域の実地調査は行なわなかった。

その後、出席した認証評価員全員でコメント案を作成する時間が取られた（図8）。コメント案はその場で施設側に伝えられるが、後日、評価委員会で内容が精査される。

3. 認定までの流れ（図9）

実地調査を行った認証評価員と事務局が、評価結果報告書（案）を作成する。評価委員会では事務局と認証評価員から、実地調査で確認した事項の講評と評価結果報告書（案）の説明を受ける。評価委員会ではコメントを2つのカテゴリーに分類する。動物実験計画書の審査や承認といった動物実験の根幹に関わるコメントは、評価結果を出す前に「確認事項」として施設側に示し、説明あるいは対応を求める。「確認事項」の十分な説明あるいは改善策が確認された場合に「適合」の評価とされる。一方、根幹には関わらないコメントは「検討事項」として今後の検討を促す形となる。

感染研は確認事項なしであったので、「適合」の評価を受け、「認定証」を交付された（図10）。認定証の有効期限は3年である。「検討事項」は複数指摘があったので、内容を精査し、ひとつずつ改善しているところである。

今後の課題

認定を受けた施設のうち、公表を承諾した施設名（平成21年度末までに9施設）がHS認証センターのホームページに掲載されている。施設名を見てもわかるように、今後このセンターの評価対象はGLPにも対応している企業が多いと予想される。数は少ないながら、我々のような厚労省管轄の医学系研究機関は、企業とは動物実験の性質が異なることから、今後どのような形の外部評価を受けるべきか、まだ先行きが見えない。

動物実験の基本的な倫理は同一であるのに、国内に学術会議のガイドラインを含めれば4つの基本指針があり、国内の外部評価機構がそれと呼応するように3つ存在する。また、国内3つの外部評価機構はそれぞれ対象とする機関に制限があり、対象とならない動物実験施設は国内に多数存在する（図11）。筆者は、現存の3つの国内外部評価機構のそれぞれが培った経験を相互に持ち寄り、国内のすべての動物実験施設が同じ基準で外部評価を受けられるよう、国内で統一した外部評価機構が築かれることを望む。非常に難しい課題と想像されるが、実験動物関係者の総力を挙げて構築してもらいたい、と希望する。

動愛法は改正された平成17年から5年後に見直すことになっており、今年（平成22年）からその見直し作業が始まった。「実験動物の福祉」では届出制の検討（届出制又は登録制等の規制導入の検討）が課題として挙げられている。まだ方向性が見えていない外部評価と、検討が始まった届出制について、今後の動きに注目したい。

図1

3つの基本指針の比較

文科省	農水省	厚労省
第6 その他-2 基本指針への適合性に関する自己点検・評価及び検証	第2 実験機関の長の責務-6 点検及び評価並びに検証	第2 実験機関の長の責務-7 自己点検及び評価
動物実験等の実施に関する透明性を確保するため	←同様の記載なし	←同様の記載なし
当該研究機関等以外の者による検証を実施することに努める	当該研究機関等以外の者による検証を実施することに努める	←同様の記載なし
第6 その他-3 情報公開	第2 実験機関の長の責務-7 情報公開	第2 実験機関の長の責務-8 動物実験等に関する情報公開
動物実験等に関する情報 (例：機関内規程、動物実験等に関する点検及び評価、当該研究機関等以外の者による検証の結果、実験動物の飼養及び保管の状況等)を、毎年1回程度、インターネットの利用、年報の配付その他の適切な方法により公表	動物実験等に関する情報（例えば：機関内規程、動物実験等に関する点検及び評価、当該研究機関等以外の者による検証の結果、実験動物の飼養及び保管の状況等）について、毎年度、インターネットの利用、年報の配付その他の適切な方法により公表	機関内規程及び7の規定に基づく点検及び評価の結果等について、適切な方法により公開

図2

4つの外部評価機構

外部評価機構名	評価の基準	評価の名称
日本実験動物協会 (実験動物生産施設等福祉調査)	農水省基本指針	4段階評価
国立大学法人動物実験施設協議会 公私立大学実験動物施設協議会	文科省基本指針	相互検証
ヒューマンサイエンス振興財団 動物実験実施施設認証センター	厚労省基本指針	認定
AAALAC International	Guide for the Care and Use of Laboratory Animals	認証

図3

ヒューマンサイエンス振興財団 動物実験実施施設認証センター 実施調査までの流れ

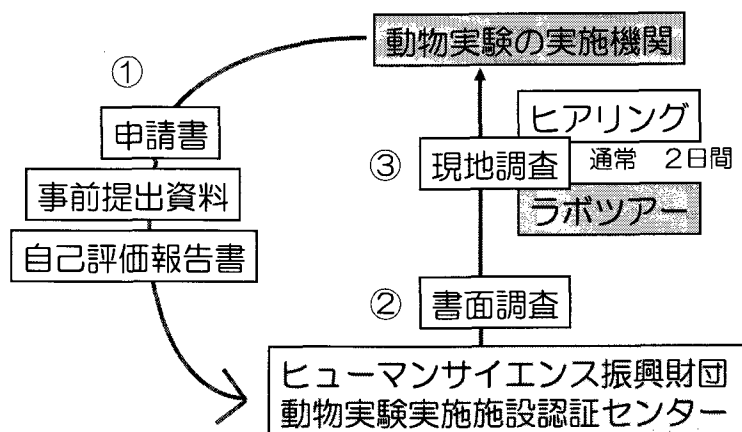


図4

事前提出資料

- ・ 申請書（施設名、所在、面積、動物種 機関の長が申請）
- ・ 平面図
- ・ 自己評価報告書
- ・ 事前提出資料
 - ・ 機関内規程等 関係文書名一覧
 - ・ 動物実験実施規程及び計画書、終了報告書、通知書様式
 - ・ 動物実験委員会規程及び動物実験委員会名簿
 - ・ 実験動物管理運営規程
 - ・ 動物実験施設承認関係書類（チェックリストを含む）
 - ・ SOP目次
 - ・ 動物実験の管理体制及び

動物実験計画書承認までのフロー

図5

ヒアリング

認証センター側

- 認証評価員 2名
(感染研の調査は研修を兼ねたので、他に9名)
- 事務局 1名
(感染研の調査は研修を兼ねたので、他に1名)

感染研側

- 機関の長(所長)
- 動物実験委員会 委員長
- 動物実験施設管理者(動物管理室長)
- 実験動物管理者(戸山庁舎勤務の動物管理室職員)
- 飼育担当主任、動物管理区受付、動物実験委員会受付
(業務委託及び臨時職員)

図6

ヒアリング内容

- 施設側から概要説明
- 動物実験委員長、機関の長のヒアリング
- 計画書を2つ選んで
 - ・ 計画書の内容
 - ・ 委員会コメント、審査通知、コメントに対するリ
スpons
 - ・ 動物導入
 - ・ 実験結果の報告
- 実験終了後の改善指導の有無

通常は半日～1日(感染研は午前中半日)

図7

ラボツアー

- 出入り管理
- 実験動物の飼養状況
- 動物実験の現場の視察
- 衛生管理
- 安全管理 遺伝子組み換え動物、病原体

通常は半日～1日（感染研は午後2時間）

図8

調査日当日のまとめ

- 認証センター側でコメントをまとめる。
最低限のポイント：
 - 動物実験委員会の審査のシステムが矛盾なくできていること
 - 機関の長が明確で、責任者としての自覚があること
 - 3Rsの実践を確認できる計画書であること
- 施設側へコメントを伝える。

ディスカッションの時間：1時間～2時間

図9

認定までの流れ

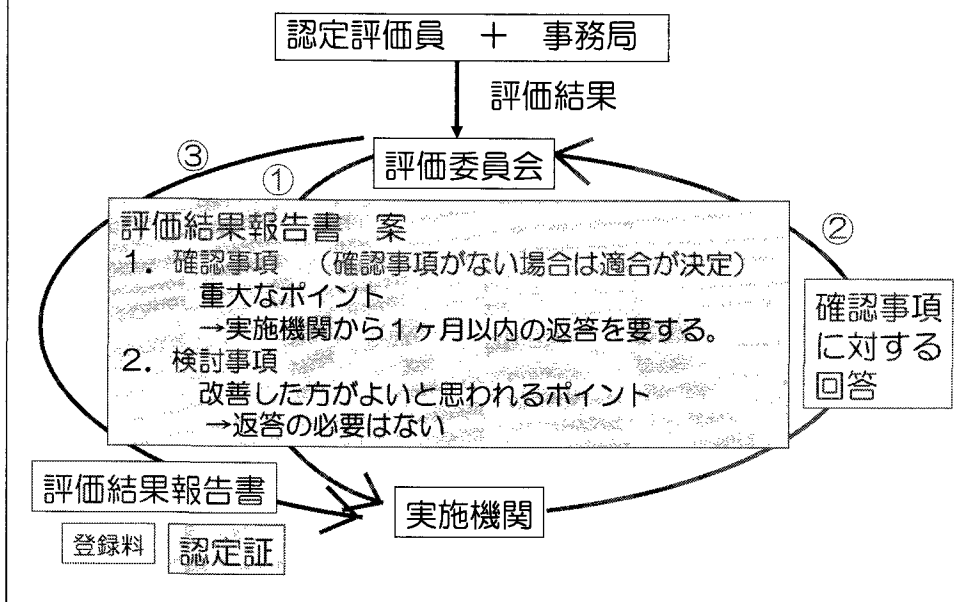


図10

認定証

国立感染症研究所 戸山庁舎 殿

貴研究機関の動物実験実施施設は厚生労働省が通知した「厚生労働省の所管する実施機関における動物実験等の実施に関する基本指針」に基づき当財団動物実験実施施設認証センターが評価した結果、適合していると認められますのでここに認定します。

認定番号 08-002
認定日 平成21年3月25日
有効期間 平成24年3月24日

(財)ヒューマンサイエンス振興財団
理事長 下田 智久

認定は施設ごと
・感染研には
3庁舎あるが、
認定は戸山庁舎
のみ

認定の有効期間は
3年

認定証の利用：

- ・見学者
- ・地域住民
- ・自治体

などへの
施設説明

図11 厚労省関係

ヒューマンサイエンス振興財団

動物実験実施施設認証センター



製薬、化粧品、受託研究などの企業が主な対象

厚労省管轄であっても研究機関は動物実験の性質が異なる

HS認証センター
国動協・公私動協
日動協



3つの外部評価機構は対象が制限
されている
対象とならない施設は国内に多数
存在



外部評価をどう進めるか？

「動物実験第三者認証のその後」

第106回 関西実験動物研究会
2010年6月11日(金)

AAALAC International
国際実験動物管理公認協会認証
- アステラス製薬での取り組み -



アステラスリサーチテクノロジー株式会社
須藤有二

1

AAALACによる認証について(1)

- ◆ Association for Assessment and Accreditation of Laboratory Animal Careの略(1996年改称)。
- ◆ 1965年に現米国実験動物学会から独立した機関で、動物管理及び使用プログラムに対する国際的認証を交付する唯一の非政府組織である。
- ◆ 動物実験が合法的、科学的且つ動物福祉に基づいて実施されているかを、ILAR(Institute for Laboratory Animal Research)が発行する「実験動物の管理と使用に関する指針(Guide for the Care and Use of Laboratory Animals)」の基準に照らして検証し認証を与える。
- ◆ 米国ではFDAの査察においても一部調査を減免される等、その認証を得るメリットが大きく、法規制当局、公的研究機関、企業、動物愛護団体までも含めて信頼性が高く、米国の動物実験施設では認証取得が基本になっている。

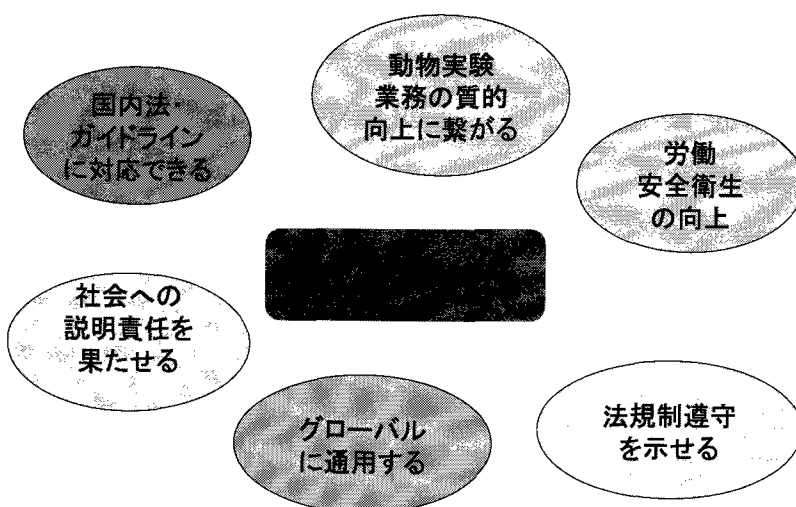
2

AAALACによる認証について(2)

- ◆当初、米国内の実験動物施設の認定を行ってきたが、その役割が世界的に求められるようになり、欧州やアジアの大学や企業の研究所(29ヶ国、740施設以上)で認証を受ける施設が急増し、グローバルスタンダードになっている。
- ◆調査官による“**Site visit (施設訪問)**”は、動物実験プログラムの内容について実地調査し、訪問先の専門家との見解の相違をなくすという方針で進められる。調査官は現行の研究機関の実務者が務め、極めて現実的な指示・提案がなされる。裁定が厳しい一方、時間をかけて改善を促すことも特徴とされる。
- ◆現在(10年6月)、国内では6機関が認証を取得している(CRO 3施設、製薬2施設、大学1施設)。

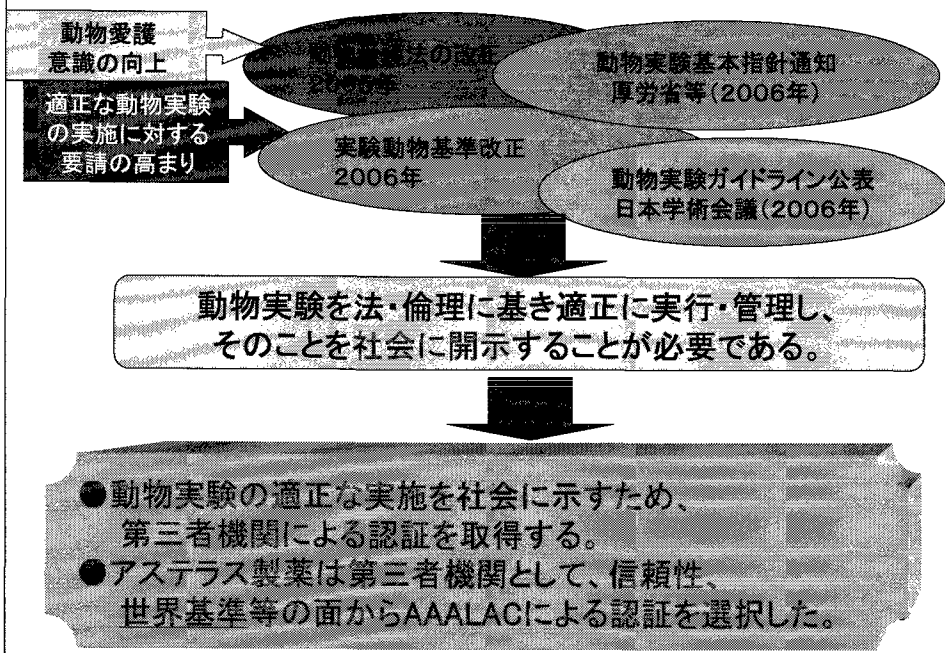
3

AAALACによる認証に期待するもの



4

AAALAC認証取得を促した社会的背景



AAALAC申請への必須確認項目(1)

AAALACの認証を得るためには

◆動物実験の実施体制が整備されている

ILAR基準

- 動物実験委員会の設置
- 動物実験委員会が機能
- 動物実験の審査実施
- 動物実験指針が制定
- 職員教育
- 記録の作成・保存
- 自己点検・調査・公表

AAALAC申請への必須確認項目(2)

AAALACの認証を得るためには

◆動物が適正な環境で飼育、実験されている

ILAR基準

- 堅固で逃亡しない
- 清浄に維持・管理
- ケージは適正な広さ・高さ
- 環境が適正に維持
- 手術室の清浄性
- BS、RI等が確実に管理
- 動物の特性に配慮

7

AAALAC申請への必須確認項目(3)

AAALACの認証を得るためには

◆3R*に基づき動物が適正に取り扱われている

3R* = Replacement, Reduction, Refinement

ILAR基準

- 苦痛・恐怖の低減
- 代替法の導入・動物数の削減
- 適正な獣医学的管理の提供
- エンリッチメントに配慮
- 適正な安楽死法の採択
- 外科手術等の適正実施
- 適正な飼育管理(清掃、給餌、ケア、観察)
- 実験手技の選択・洗練

8

AAALAC申請への必須確認項目(4)

AAALACの認証を得るためには

◆労働安全衛生に配慮されている

ILAR基準

- 化学物質からの防御
- 感染症の予防
- RIによる障害
- 針刺、機器による事故防止
- 健康管理
- 健康管理組織の設置・機能
- 教育体制
- 防護具の設置・着用
- 非常事態への対処

9

AAALAC申請への必須確認項目(まとめ)

AAALACの認証を得るためには

- ◆動物実験の実施体制が整備されている
- ◆動物が適正な環境で飼育、実験されている
- ◆3R*に基づき動物が適正に取り扱われている
- ◆労働安全衛生に配慮されている

ILAR基準との適合を施設調査・評価

認証



(毎年の年次報告と)
3年毎に調査・評価

10

AAALAC認証取得までの工程の実際(1)

◆機関内での認証取得の承認(2年前)

◆“The guide”に照らして社内programの適合性を確認(2年間)

◆Program Description*の作成(英文)(6ヶ月)

『PD*: 指定された書式で作成する申請書』



◆識者によるProgram Descriptionの確認・修正(3ヶ月)

◆Application formに必要事項を記載の上、Program descriptionとともにAAALAC事務局にe-mailで送信(調査3ヶ月前)



AAALAC内部でのProgramの検討

11

AAALAC認証取得までの工程の実際(2)

◆AAALACから正式受領の連絡(約2週間後)

◆AAALACへの調査費用の支払い(施設面積により異なる)

◆調査官の選定通知、Site visitの日程、準備等の調整

◆受入準備(通訳依頼、ホテル手配、交通連絡、スケジュール調整等)

◆Program descriptionの修正版、直近の動物実験委員会(IACUC)議録英訳等の送信

◆Site visit (2008年4月2~4日、3日間)

12

AAALAC認証調査の実際 (加島事業場:08年4月)

調査対象: 薬理研・安研・創推研・代謝研

	初日(4/2)	2日目(4/3)	3日目(4/4)
AM	AAALAC説明 プログラムの確認 質疑応答	ラボツアー	Documentの確認
PM	ラボツアー 動物実験委員との Lunch meeting	ラボツアー	調査官内部MT 講評
	ラボツアー		

- ◆ AAALACからの理念等の説明
- ◆ 機関の長の挨拶、当方から当社のProgramに関する概要説明、スケジュールの提案
- ◆ Program description (実験、飼育・施設管理、安全衛生プログラム)について質疑応答
- ◆ 動物実験委員会メンバーとのLunch meeting
- ◆ 全ての実験室、飼育室、関連施設をツアー
- ◆ “Documentの確認” ⇒ 過去2年間のIACUC-PC、獣医学的管理記録等についての記録の確認
- ◆ 調査官の内部MT
- ◆ 講評 ⇒ 指摘事項提示

13

AAALACの調査時の風景



↑
講評にて



アステラス製薬
加島事業場:08年4月

← 最前列右から4名が調査官

14

AAALAC認証取得までの工程の実際(3)

◆指摘事項への回答 (Post Site Visit Response : 2週間以内)

- ✓ **Mandatory**: 必須対応項目
- ✓ **Suggestion**: 自主検討項目(改善提案)

◆再指摘・質問事項への回答(随時)

◆最終回答、改訂Program descriptionの送信

◆ Council meeting (年3回)で審議

◆結果(Status)の連絡

- ✓ **Award full accreditation** : 完全認証
- ✓ **Award accreditation with condition** : 条件付認証(年次報告で指摘対応)
- ✓ **Provisional status**: 暫定資格(最長24ヶ月の猶予後再審査へ)
- ✓ **Withhold accreditation** : 保留

15

AAALAC認証の楯



16

AAALAC認証取得のための具体的ポイント (1/5)

◆動物実験をする仕組みが整っているか

- ✓ IACUC *が機能しているか(議事録、IACUC-PCの審議・承認)
- ✓ IACUCの中に外部委員がいるか
- ✓ Program review(自己点検)の質、方式、頻度(2回/年)
- ✓ 獣医学的管理責任者の動物実験継続、安楽死の権限が規定されているか

* IACUC: 機関内動物実験委員会

Institutional Animal Care and Use Council

17

AAALAC認証取得のための具体的ポイント (2/5)

◆獣医学的管理体制が整っているか

- ✓ 獣医師の数は足りているか
- ✓ 365日動物を観察し、異常発生時の対応が明確になっているか
- ✓ 獣医学的管理記録が残され、機能しているか
- ✓ 獣医学的管理者が適正な頻度で動物をチェックできているか
- ✓ 麻酔、鎮痛、鎮静剤が適正に使用されているか
- ✓ 安楽死は適正な方法で行われているか
- ✓ 定期的にサルTBテストがなされているか

18

AAALAC認証取得のための具体的ポイント (3/5)

◆動物飼育が適正に行われているか

- ✓ SOPが制定され、機能しているか
- ✓ 飼育管理者の教育、訓練が行われているか
- ✓ 動物の馴化(期間等)に配慮されているか
- ✓ 臭気、汚れなく清潔に保たれているか
- ✓ 動物にストレスがかからないような管理(洗浄時の放水等)ができているか
- ✓ エンリッチメントに配慮されているか(プログラムはあるか)
- ✓ げっ歯類の金網ケージ等の使用ルールがあるか
- ✓ 滅菌を行わないケージ、床等の清浄性確認はなされているか
- ✓ ケージカード情報はILARの基準に準拠しているか(IACUC承認番号、期限)

19

AAALAC認証取得のための具体的ポイント (4/5)

◆動物の飼育環境は適正か

- ✓ 大動物のケージサイズはILARのガイドに適合しているか(体重、体長)
- ✓ 施設内の器材等にサビ、粘着物が残っていないか
- ✓ 温度、湿度、照明、換気、風向等は適正に管理されているか
- ✓ 給気の質は適正か(エアフィルターの質、All freshが基本)
- ✓ 機器(モニター等)の点検は行われているか、表示されているか
- ✓ 手術室の構造、運用は適正か

20

AAALAC認証取得のための具体的ポイント (5/5)

◆労働安全衛生に配慮されているか

- ✓ 蛍光灯は防水、飛散防止措置がとられているか
- ✓ ヒトがアレルギーに暴露されていないか
- ✓ サルからの感染症対策はとられているか(特にBウイルス対策)
- ✓ ホルマリン等のガスは局所排気下で使用されているか
- ✓ 機器(オートクレーブ、遠心器等)の点検整備は行われているか
- ✓ 特殊業務(感染、RI等)における安全衛生対策がとられているか
- ✓ 健康管理等の体制は整っているか
- ✓ エーテル麻酔は原則禁止
- ✓ 注射針のリキャップは禁止

21

AAALAC認証取得で最も苦労した点

- ◆ 社内各部署で第三者認証のメリットを理解してもらえるまでに時間と労力を要した。
- ◆ 所謂コンサルタントをお願いしなかったもので、どのように準備し、何が指摘され、どの程度対応すればよいか、暗中模索の試みであった。
- ◆ 準備の過程で改善を行うため機関内調整(各署の理解・合意、予算等)、実行が難しかった。
- ◆ 施設調査の受入準備(スケジュール調整、通訳手配、担当員配置、指摘まとめ、研究者待機、)。
- ◆ 指摘事項への回答案の決定、回答書作成等の対応(2週間以内厳守)。
- ◆ 申請資料、メールのやりとり、調査時の対応が全て英語になるので、苦労した。

22

AAALAC認証取得で得られた効果

- ◆ 調査を受けるまでの過程で、飼育管理者・実験者ともに成長した(調査官への対応準備、実験部門との調整、施設整備、動物管理体制の整備等)。
- ◆ 施設利用者の動物愛護への意識、ルール遵守意識が向上した。
- ◆ IACUC-PCの重要性の認識が徹底され、使用動物数削減、手技、方法等が精査されるようになった。
- ◆ 実験部門と飼育管理部門で共通の目的をもてたことにより、相互のコミュニケーションがよくなった。
- ◆ 動物飼育管理者のモチベーションが向上した。
- ◆ 施設の整理整頓が進み、安全で快適な実験環境になった。
- ◆ 様々なリスクへの気付きを与えられた(化合物管理、労働安全、動物愛護、実験ミス、人獣共通感染症等)。



動物利用の種々の側面で質的向上がもたらされた。

23

まとめ

- ◆ アステラスでは、06年前後の実験動物に関わる国内規制の厳格化や動物福祉への社会的要請の変遷を受けて、AAALACによる第三者認証取得を目指し、08年に加島事業場でこれを取得するに至った。
- ◆ この認証取得のプロセスに得た経験こそが最も価値在る成果として、動物利用の種々の側面での質的向上をもたらした。

24

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31号に掲載した第103回研究会以後、以下の研究会が開催された。

- 1) 第104回研究会(平成21年12月11日 於 京都市勧業館「みやこめっせ」)
会員による研究発表(14題)

＜特別講演＞

1. 小動物を用いた生体光イメージング
近藤科江(京都大学大学院医学研究科)
2. 炎症関連大腸発がんモデルの作出とその発がん・化学予防研究への活用
田中卓二(金沢医科大学・東海細胞研究所)

- 2) 第105回研究会(平成21年3月6日 於 京大会館)

＜講演＞ テーマ：器官発生・幹細胞分化の基本原理を探る

1. 器官形成のモデル動物としてのニワトリ胚
八杉貞雄(京都産業大学・工学部生物工学科)
2. 哺乳動物の造血幹細胞ニッチ
長澤丘司(京都大学・再生医科学研究所・生体システム制御学分野)

＜維持会員ニュース＞

1. オリエンタル技研工業(株)：最新の室内除染技術：過酸化水素除染装置
2. 白井松器械(株)：「作業環境改善のご提案」

- 3) 第106回研究会(平成22年6月11日 於 大阪大学コンベンションセンター)

＜講演会＞ テーマ：動物実験第三者認証のその後

「はじめに」 黒澤 努(大阪大院・医・実験動物医学)

1. 国動協と公私動協の「動物実験に関する相互検証プログラム」
喜多正和(京都府立医大院・医・実験動物センター)
2. 日本実験動物協会第2期実験動物生産施設等福祉調査
上田正次((株)フェニックスバイオ宇都宮事業所)
3. ヒューマンサイエンス振興財団による動物実験実施施設認証を受けて
山田靖子(国立感染症研究所 動物管理室)
4. AAALAC International 国際実験動物管理公認協会認証
須藤有二(アステラスリサーチテクノロジー(株))

<維持会員ニュース>

エルエスジー(株)：疾患モデルにおけるオープンソースダイエット(R)の利用と
その応用

4) 第107回研究会(平成22年9月10日 於 滋賀医科大学・臨床講義室)

<講演会>テーマ:難病克服への実験動物を用いたアプローチ

1. 家族性アミロイドポリニューロパチー、老人性全身性アミロイドーシスと疾患モデル動物

植田光晴(熊本大学大学院生命科学研究部病態情報解析学分野)

2. 筋萎縮性側索硬化症研究におけるモデル動物のインパクト

漆谷 真(滋賀医科大学分子神経科学研究センター神経難病治療学)

3. 霊長類の循環器疾患とモデル動物開発

揚山直英(医薬基盤研究所霊長類医科学研究センター)

<維持会員ニュース>

(株)イブバイオサイエンス：イブバイオサイエンスのカニクイザル安定供給への
取り組み

幹事会、評議員会、総会の議事録

1. 幹事会の概要(平成 21 年 10 月 30 日 於 京大・医・動物実験施設)

1) 出席

阿部、飯田、喜多、久保、庫本、桑村、近藤、芹川、田島、坪田、中井、中村、松田、森本、山添、山本、横井(17 名)

2) 議事

(1) 第 104 回研究会について

- ・ 一般講演は 14 題、特別講演は 2 題。
- ・ プログラムの順序と座長が決められた。
- ・ 一般講演の演題時間は質疑応答を含め 12 分とした。

(2) 今後の研究会について

- ・ 芹川会長より、第 28 回評議員会、第 27 回総会、第 105 回研究会について説明があった。
- ・ 芹川会長より、第 106 回、第 107 回、第 108 回、第 109 回研究会について説明があった。
- ・ 芹川会長より、第 108 回研究会の担当幹事として、松田幹事と山添幹事の推薦があった。
- ・ 松田、山添幹事が了承した。108 回研究会は例年通り、京都にて会員の研究発表を予定。特別講演もしくはシンポジウムを企画する。
- ・ 田島幹事より、第 106 回研究会について説明があった。評議員の研究発表を予定している旨、説明があった。
- ・ 喜多幹事より、新たに関西に異動されてきた先生方を紹介するような企画が提案された。
- ・ 阿部幹事より、第 105 回研究会以降の維持会員ニュースについて説明があった。

(3) 名誉会員について

- ・ 芹川会長から、名誉会員の規程(案)について説明があり、次回幹事会において審議することとなった。

(4) その他

山本幹事より、会報の発行のための原稿を依頼中との報告があった。

2. 幹事会の概要(平成 22 年 2 月 26 日 於 京大・医・動物実験施設)

1) 出席

阿部、池田、喜多、久保、庫本、黒澤、近藤、芹川、田島、坪田、中井、中村、森本、山添、横井(15 名)

2) 議事

(1) 平成 21 年度の事業報告について

- ・ 阿部幹事より、平成 21 年度の事業報告があった。

(2) 平成 21 年度の決算報告について

- ・ 庫本幹事より平成 21 年度決算報告があった。
- ・ 庫本幹事より平成 21 年度繰越金決算書の監査結果について報告があった。
- ・ 懇親会費の取扱いについては、演者招待分の領収書を決算書に添付することとした。
- ・ 各会員の懇親会費については、その都度精算し、残金については芹川会長が管理することとした。

(3) 平成 22 年度の事業計画について

- ・ 阿部幹事より平成 22 年度事業計画(案)について説明があった。
- ・ 第 106 回研究会(平成 22 年 6 月 11 日)の開催概要について黒澤幹事より追加説明があった。
- ・ 第 107 回研究会(平成 22 年 9 月 10 日)の開催概要について中村幹事より追加説明があった。
- ・ 第 108 回研究会の懇親会は聖護院御殿荘で開催することとした。

(4) 平成 22 年度の予算案について

- ・ 庫本幹事より平成 22 年度予算案について説明があった。
- ・ 第 106 回研究会(平成 22 年 6 月)より、当日参加費を 2,000 円とすることにした。

(5) 名誉会員について

- ・ 芹川会長より、名誉会員に関する細則(案)について説明があった。
- ・ 審議の結果、名誉会員に関する細則は定めず、議事資料として幹事会に留め置くこととした。

(6) 平成 23 年度以降の研究会について

- ・ 第 109 回研究会の担当幹事である芹川会長より、企画についての提案が求められた。

(7) その他

- ・ 芹川会長より、平成 21 年度研究会参加者及び会員数の推移について報告があった。
- ・ 黒澤幹事より、第 22 回代替法学会の開催報告があった。
- ・ 芹川会長より、関西実験動物研究会が後援する第 57 回日本実験動物学会の内容説明があった。
- ・ 芹川会長より、第 18 回国際ラット遺伝システムワークショップの後援依頼があり、了承された。
- ・ 第 27 回総会の司会に森本幹事が推薦された。

3. 第 28 回評議員会の概要(平成 22 年 3 月 19 日 於 京大会館)

1) 出席

浅野、阿部、池田卓、稲垣、上田、海野、大野、沖本、喜多、久保、倉林、庫本、黒澤、近藤、塩見、塩谷、鈴木、芹川、高木、高島、田島、千葉、坪田、中井、中村、橋本、平川、平沢、星、前田、牧野、真下、松田、宮下、宮脇、森本、山添、山本好、横井(39 名)

2) 議事

(1) 平成 21 年度事業報告及び決算報告

- ・ 阿部集会幹事と山本編集幹事より、平成 21 年度の事業報告があった。
- ・ 喜多庶務・会計幹事より、平成 21 年度収支決算報告書について報告があった。
- ・ 海野評議員より編集費について質問があり、喜多庶務・会計幹事が説明した。
- ・ 芹川会長より、繰越金決算書について報告があった。
- ・ 平成 21 年度収支決算報告が、全会一致で承認された。

(2) 平成 22 年度事業計画及び予算案

- ・ 阿部集会幹事と山本編集幹事より、平成 22 年度の事業計画(案)が説明された。
- ・ 喜多庶務・会計幹事より、平成 22 年度予算案について説明があった。
- ・ 平成 22 年度事業計画(案)および予算案が、全会一致で承認された。

(3) その他

- ・ 芹川会長より、第 57 回日本実験動物学会総会についての開催概要が紹介された。
- ・ 芹川会長より、第 18 回国際ラット遺伝システムワークショップの開催概要が紹介され、関西実験動物研究会の後援依頼があった。
- ・ 第 18 回国際ラット遺伝システムワークショップを後援することが、全会一致で承認された。

- ・ 喜多幹事より、平成 22 年 4 月より公立私立大学動物実験施設協議会の会長を務めるとの情報提供があった。

4. 第 27 回総会の概要(平成 22 年 3 月 19 日 於 京大会館)

司会の森本幹事より、総会の開催にあたり、議長の推薦が求められた。

中村幹事が議長に選出された。

1) 議事

(1) 平成 21 年度事業報告及び収支決算報告

- ・ 阿部集会幹事と山本編集幹事より、平成 21 年度の事業報告がされた。
- ・ 喜多庶務・会計幹事より、平成 21 年度決算報告がされた。
- ・ 山崎監事より、監査を行った繰越金決算書について報告があった。
- ・ 平成 21 年度事業報告ならびに決算報告が全会一致で承認された。

(2) 平成 22 年度の事業計画及び予算案

- ・ 阿部集会幹事と山本編集幹事より、平成 22 年度の事業計画(案)が説明された。
- ・ 喜多庶務・会計幹事より、平成 22 年度予算案について説明があった。
- ・ 平成 22 年度事業計画ならびに予算案が、全会一致で承認された。

(3) その他

- ・ 芹川会長より、第 57 回日本実験動物学会総会の開催概要が紹介された。
- ・ 芹川会長より、第 18 回国際ラット遺伝システムワークショップの開催概要が紹介され、関西実験動物研究会による後援依頼があった。
- ・ 第 18 回国際ラット遺伝システムワークショップを後援することが、全会一致で承認された。

《 会員の異動 》

(平成21年11月～平成22年10月)

入会者	安倍 宏明	マーシャル・バイオリソーシス・ジャパン(株)
	田中 卓二	(株)東海細胞研究所
	棚橋 友子	(株)オリエンタルバイオサービス 営業部
	高木 康博	大阪大学大学院医学系研究科実験動物医学教室
	坂田 進	畿央大学
	野々口 和幸	(株)ケーエーシー
	日柳 章彦	滋賀医科大学動物生命科学研究センター
	熊本 香名子	滋賀医科大学動物生命科学研究センター
	今野 兼次郎	京都産業大学
退会者	清水 雅良	(株)日本バイオリサーチセンター羽島研
	足立 民子	田辺三菱製薬(株)安全研
	佐藤 良夫	
	菅原 努	(財)慢性疾患・リハビリティション研究振興財団
	三原 径子	
	安井 菜穂美	武庫川女子大学 健康未来学講座
	高谷 尋美	田辺三菱製薬(株)安全性研究所
	高田 達之	滋賀医科大学・動物生命科学研究センター
	滝澤 明子	京都大学大学院医学研究科附属動物実験施設
	吉岡 勝	武田薬品工業(株)開発研究センター
	西森 司雄	
	藤井 恒雄	藤沢薬品工業(株)安全性研究所
	安藤 健史	(株)オリエンタルバイオサービス
	中島 健博	(株)ケアリー
	神子田 武	(株)武田ラビックス
	小森 彰	科研製薬(株)中央研究所薬理研究部
	横山 政幸	ポーラ化成工業(株) 中央研究所 実験動物管理室

関西実験動物研究会(個人会員名簿)2010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
○	浅田 孝	650-0047	神戸市中央区港島南町2-2 先端医療センター内	(財)先端医療振興財団
	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
	阿部 敏男	743-8502	山口県光市大字三井宇武田4720	(株)武田ラビックス 光事業所
	安倍 宏明	305-0047	つくば市千現 2-1-6 つくば創業プラザ210	マーシャル・バイオリソーシス・ジャパン(株)
い	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)
	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	520-3001	滋賀県栗東市東坂 531-1	(株)ケーエーシー バイオサイエンス事業部
	李 成一	570-8506	守口市文園町10-15	関西医科大学附属生命医学研究所モデル動物部門
	飯田 晶敏	562-0024	大阪府箕面市栗生新家五丁目14-8	(岐阜大学 応用生物科学部獣医学課程)
○◎	池 郁生	305-0074	つくば市高野台 3-1-1	(独)理化学研究所バイオリソースセンター
	池田 卓也	222-0033	横浜市港北区新横浜3-17-6 イノテックビル11F	日本チャールス・リバー(株)
	池田 克己	663-8137	西宮市池開町 6-46	武庫川女子大学 薬学部
	池淵 一也	771-0194	徳島市川内町平石夷野 224-2	大鵬薬品工業(株)
	井澤 武史	599-8531	大阪府堺市学園町1-1	大阪府立大学・農・獣医病理
○◎	石井 高夫	564-0051	吹田市豊津町15-11 江坂石周ビル	(株)エム技研
	石坂和彦	106-0046	東京都港区元麻布3-1-36 つなかわビル3F	テクニプラスト・ジャパン(株)
	巖原 美穂	650-0047	神戸市中央区港島南町6丁目7-4 HI-DEC	(株)ビオスタ
	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
	稲垣 晴久	444-8585	岡崎市明大寺町字西郷中38	自然科学研究機構生理学研究所 NBR事業推進室
○	乾 俊秀	335-8505	埼玉県戸田市川岸2丁目2-50	田辺三菱製薬(株)研究推進部
	乾 公正	525-0025	滋賀県草津市西渋川 2-3-1	石原産業(株)中央研究所
	乾 雅臣	574-0043	大阪府大東市灰塚 5-10-3	日本医科学動物資材研究所
	井上 勉	578-0901	東大阪市加納7丁目 23-3-112	
	今林 潤一	631-0806	奈良市朱雀 6-17-3-4B	
○	新比恵 啓志	541-0046	大阪市中央区平野町 2-6-6	田辺三菱製薬(株)信頼性保証本部 くすり相談センター
	岩谷 千鶴	520-2192	大津市瀬田月輪町	滋賀医科大学動物生命科学研究所
	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)創薬第一研究所
	上田 正次	321-0973	栃木県宇都宮市岩管町1198-4	(株)フェニックスバイオ宇都宮事業所
	上野 涉	263-8555	千葉市稲毛区穴川 4-9-1	(独)放射線医学総合研究所 実験動物開発・管理課
う○	内尾 こずえ	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実験動物開発室
	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	579-8046	東大阪市昭和町7丁目22	
	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	105-0004	東京都港区新橋5-23-7 三栄ビル9F	シンバイオ製薬(株)開発戦略本部前臨床開発部
お○	及川 弘	525-0028	滋賀県草津市上笠 2-1-8-1	
	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513	(株)イブバイオサイエンス
	大竹 聰	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
	大坪 義和	532-0003	大阪市淀川区宮原 5-2-30	沢井製薬(株)
○	大野 民生	466-8550	名古屋市長和区鶴舞町65	名古屋大学大学院医学系研究科附属医学教育支援センター
	大和田 恭子	371-8530	前橋市鳥羽町 580	群馬工業高等専門学校 物質工学科
	岡崎 彰亮	107-0052	東京都港区赤坂1丁目11-28 森ビル5F	エドストロムジャパン(株)
	岡島 涼子	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
	岡田 利也	598-8531	泉佐野市りんくう往来北 1-58	大阪府立大学大学院生命環境科学研究科獣医学専攻
○◎	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寄生虫病学
	沖本 一夫	564-0053	吹田市江の木町 33-94	大日本住友製薬(株)研究管理部管理第1G 動物管理チーム
	荻野 信二	567-0878	大阪府茨木市蔵垣内 1-3-45	大日本住友製薬(株)茨木工場
	尾崎潤一郎	591-8004	堺市北区蔵前町1414-19	
か	鍵山 荘一郎	565-0871	大阪府吹田市山田丘 2-2	大阪大学大学院医学系研究科実験動物医学教室
	勝亦 芳裕	412-0039	静岡県御殿場市かまど1284	(株)ボゾリサーチセンター 御殿場研究所
	加藤 鋭二	562-0015	大阪府箕面市稲 2-7-3	
	加藤 啓子	603-8555	京都市北区上賀茂本山	京都産業大学
	鍋木 力	606-8304	京都市左京区吉田下阿達町	清水実験材料(株)
き○◎	川合 是彰	573-1134	枚方市養父丘 1-12-17	
	河合 澄子	565-0871	吹田市山田丘2-2	大阪大学大学院医学系研究科実験動物医学教室
	河田 昭彦	433-8114	浜松市葵東 3-5-1	日本エスエルシー(株)受託研究部
	川中 栄奈	606-8202	京都市左京区田中大堰町45 デトムワン京大前206号	
	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
○	喜多 正和	602-8566	京都市上京区河原町広小路梶井町465	京都府立医科大学大学院医学研究科実験動物センター
	北田 一博	060-0810	札幌市北区北10条西8丁目	北海道大学先端科学技術共同研究センター
	北野 光昭	676-8688	高砂市高砂町宮前町 1-8	(株)カネカ フロンティアバイオ・メディカル研究所
	木下 邦明	399-4501	長野県伊那市西箕輪2148-188	(株)イナリサーチ
	木村 国雄	520-2324	滋賀県野洲市近江富士 4-5-16	
く	日下部 健	599-8531	大阪府堺市中区学園町1-1	大阪府立大学大学院獣医学専攻動物構造機能学
	日柳 章彦	520-2192	大津市瀬田月輪町	滋賀医科大学動物生命科学研究所
	久世 博	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
	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 先端医学研究機構 施設部 動物実験施設
○◎	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)
	熊本 香名子	520-2192	大津市瀬田月輪町	滋賀医科大学動物生命科学研究所
	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

	氏名	〒	住所	所属
○	倉林 讓	559-0034	大阪市住之江区南港北1-26-16	森ノ宮医療大学保健医療学部鍼灸学科
	黒木 宏二	554-0022	大阪市此花区春日出中 3-1-98	大日本住友製薬(株)
○◎	黒澤 努	565-0871	吹田市山田丘 2-2	大阪大学大学院医学系研究科実験動物医学教室
	黒松 久	160-0022	東京都新宿区新宿区 2-19-1 ビッグス新宿ビル10F	(株)IHシバウラ
○◎	桑村 充	598-8531	泉佐野市りんくう往来北 1-58	大阪府立大学大学院生命環境科学研究科獣医病理学教室
	桑村 有規	591-8032	堺市百舌鳥梅町3-14-15	((株)新日本科学)
リ	小泉 清	248-0007	神奈川県鎌倉市大町2-3-3キャトルセゾン鎌倉A21	((株)DIMS医学研究所)
	甲田 彰	665-0817	兵庫県宝塚市平井山荘5-24-303	
	小浦 美奈子	567-0085	茨木市彩都あさぎ 7-6-8	(独)医薬基盤研究所
	小谷 祐子	565-0871	吹田市山田丘2-2	大阪大学医学部附属動物実験施設
	小林 欣滋	532-8505	大阪市淀川区加島3-16-89	田辺三菱製薬(株)安全性研究所
	小山 公成	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)
○◎	近藤 玄	606-8507	京都市左京区聖護院川原町53	京都大学再生医学研究所
	近藤 靖	532-8505	大阪市淀川区加島 3-16-89	田辺三菱製薬(株)先端医学研究部
	今野 兼次郎	603-8555	京都市北区上賀茂本山	京都産業大学
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
	三枝 順三	600-8813	京都市下京区中堂寺南町134 京都リサーチパーク2号館	JST 山中ips 細胞特別プロジェクト
	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
	坂田 進	635-0832	奈良県北葛城郡広陵町馬見中 4-2-2	畿央大学
	坂本 雄二	651-2241	神戸市西区室谷 1-5-4	千寿製薬(株)
○	佐加良 英治	663-8501	西宮市武庫川町1-1	兵庫医科大学動物実験施設
	佐々木昌志	554-0022	大阪市此花区春日出中 3-1-98	大日本住友製薬(株)研究管理部
	佐藤 秀蔵	532-8686	大阪市淀川区十三本町 2-17-85	(株)武田ラビックス 実験支援部
	佐藤 順子	419-0123	静岡県田方郡函南町間宮59-1-102	(株)三菱化学安全科学研究所
	佐藤 浩	444-8585	岡崎市明大寺町西郷中 38	自然科学研究機構 生理学研究所
	鮫島 秀暢	890-0011	鹿児島市玉里団地1丁目 22-19	
LO◎	澤浦 雅人	567-0865	茨木市横江 2-9-2	日本チャールス・リバー(株)カスタマーサポートセンター
○	塩見 雅志	650-0017	神戸市中央区楠町 7-5-1	神戸大学大学院医学研究科附属動物実験施設
○	塩谷 恭子	565-3565	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
△	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 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 大	603-8214	京都市北区紫雲林院町83パークシティ北大路308	
す	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センター医薬開発研究所
	杉井 学	576-0031	大阪府交野市森南 2-27-3	
	杉本 潤一郎	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
○	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)
	須藤 有二	532-8514	大阪市淀川区加島 2-1-6	アステラスリサーチテクノロジー(株)
せ★○◎	芹川 忠夫	606-8501	京都市左京区吉田近衛町	京都大学大学院医学研究科附属動物実験施設
そ	曾我 正彦	561-0825	大阪府豊中市二葉町3-1-1	塩野義製薬(株)新薬研究所
た○	高木 貞明	601-8151	京都市南区上鳥羽塔森東向町 93-8	日本エス・エル・シー(株)
	高木 弓枝	433-8114	静岡県浜松市葵 3-5-1	日本エス・エル・シー(株)
	高木 康博	565-0871	吹田市山田丘 2-2	大阪大学大学院医学系研究科実験動物医学教室
○	高島 俊行	532-0011	大阪市淀川区西中島7-14-35-303	ハムリー(株)国際事業部 大阪出張所
	高橋 明男	187-0031	東京都小平市小川東町4-1-1	国立精神神経センター神経研究所
	高橋 尚士	650-0047	神戸市中央区港島南町6丁目7-4 HI-DEC	(株)ビオスタ
○	竹之下 誠	648-0003	橋本市隅田町山内 513	(株)イフバイオサイエンス
○◎	田島 優	565-0871	吹田市山田丘 2-2	大阪大学大学院医学系研究科実験動物医学教室
	田島 朋子	598-8531	泉佐野市りんくう往来北 1-58	大阪府立大学大学院生命環境科学研究科
	田中 卓二	500-8285	岐阜市南郷 5丁目1-2	(株)東海細胞研究所
	棚橋 友子	615-0882	京都市右京区西京極葛野町28	(株)オリエンタルバイオサービス 営業部
	谷村 孝	590-0137	堺市南区城山台1-14-10	
	谷本 憲昭	532-8505	大阪市淀川区加島 3-16-89	田辺三菱製薬(株)安全性研究所
ち○	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
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 R&Dサポートグループ
	塚原 清志	520-3423	滋賀県甲賀郡甲賀町五反田 1405	塩野義製薬(株)実験動物研究センター
	辻 嘉昭	650-0033	神戸市江戸町85-1 ベイ・ウイング神戸ビル801号	サンタサーロ&ステリプロソリューション株式会社
	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
	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
○◎	坪田 裕司	597-0104	大阪府貝塚市水間158	大阪河崎リハビリテーション大学・理学療法専攻生理学
	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
て	鶴見 東志子	570-8506	大阪府守口市文園町10-15	関西医科大学 動物センター
と	出口 央士	606-8507	京都市左京区聖護院川原町53	京都大学再生医学研究所 附属再生実験動物施設
	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
	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
○	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	349-0221	埼玉県南埼玉郡白岡町上野田 737-102	
	中井 健史	520-3423	滋賀県甲賀郡甲賀町五反田 1405	塩野義製薬(株)実験動物研究センター
○◎	中井 伸子	601-8550	京都市南区吉祥院西ノ庄門口町14	日本新薬(株)研企画統括部研開発管理課
	中島 文博	520-3001	滋賀県栗東市東坂 91	(株)ケーエーシー
	中西 聡	606-8501	京都市左京区吉田近衛町	京都大学大学院医学研究科附属動物実験施設
○◎	中村 紳一郎	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
	中村 正典	650-0047	神戸市中央区港島南町 1-5-5 BMA3F	カルナバイオサイエンス(株)研究開発部
	中山 亮	666-0112	川西市大和西 3-28-10	

	氏名	〒	住所	所属
	那須 礼史	586-0006	大阪府河内長野市松ヶ丘中町 1330-1	堺化学工業(株)医薬事業部
	夏目 克彦	113-8551	東京都文京区湯島 2-18-6	夏目製作所(株)
	並河 知子	532-0003	大阪市淀川区宮原5丁目2-30	沢井製薬(株)生物研究部
	南地 勇	520-3423	滋賀県甲賀郡甲賀町五反田1405	塩野義製薬(株)
	西 泰明	514-0063	三重県津市洪見町763-35 洪見宿舎2号	(三重大学生命科学研究支援センター)
	西井 康恵	635-0832	奈良県北葛城郡広陵町馬見中4-2-2	畿央大学 健康科学部
	西川 哲	263-8555	千葉市稲毛区穴川 4-9-1	放射線医学総合研究所
	西原 義人	412-0039	静岡県御殿場市かまど1284	(株)ポリリサーチセンター
	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
	西山 秀志	532-8686	淀川区十三本町 2-17-85	(株)武田ラビックス
ね	根本 良夫	561-0825	豊中市二葉町3-1-1	塩野義製薬(株)新薬研究所
	野々口 和幸	604-8423	京都市中京区西ノ京西月光町 40	(株)ケーエーシー
は○	橋本 正晴	604-8423	京都市中京区西ノ京西月光町 40	(株)ケーエーシー アニマルケア事業本部
	浜田 修一	314-0255	茨城県神栖市砂山14番地	三菱化学安全科学研究所鹿島研究所毒性第2グループ
	原口 心雄	561-0825	豊中市二葉町 3-1-1	塩野義製薬(株)新薬研究所
○	原田 正史	545-0051	大阪市阿倍野区旭町	大阪市立大学医学研究科動物実験施設
ひ	飛田 康孝	520-3001	滋賀県栗東市東坂 91	(株)ケーエーシー
○	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	561-0825	大阪府豊中市二葉町3-1-1	塩野義製薬(株)創薬・開発研究所
	平山 信恵	650-0017	神戸市中央区楠町 7-5-1	神戸大学医学部附属動物実験施設
	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
ふ	福岡 俊文	554-0022	大阪市此花区春日出中3-1-98	大日本住友製薬(株)安全性研究所
	藤沢 公忠	567-0865	茨城県横江 2-9-2	日本チャールス・リバー(株)カスタマーサポートセンター
○	古河 恵一	589-8511	大阪府大阪狭山市大野東 377-2	近畿大学医学部共同研究実験動物室
ほ○	星 信彦	657-8501	神戸市灘区六甲台町1-1	神戸大学大学院農学研究科応用動物学科
	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
	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 信一	592-8349	堺市西区浜寺諏訪ノ森東1-92-4	
ま○	前田 敏宏	520-3001	滋賀県栗東市東坂 91	(株)ケーエーシー バイオサイエンス事業部 生物科学センター
○	牧野 進	528-0005	滋賀県甲賀市水口町水口1639-28松尾団地	
○	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	433-8114	静岡県浜松市葵 3-5-1	日本エスエルシー(株)品質管理部
○	増岡通夫	604-8423	京都市中京区西ノ京西月光町 40	(株)ケー・エー・シー
	町尾 久夫	564-0043	吹田市南吹田 4-4-1	オリエンタル酵母工業(株)大阪バイオ営業所
	松尾 公平	554-0022	大阪市此花区春日出中3-1-98	大日本住友製薬(株)研究業務動物管理グループ
○◎	松田 潤一郎	567-0085	茨城県戸田市中川岸2-2-50	(独)医薬基盤研究所 生物資源研究部 実験動物開発研究室
	松本 耕三	603-8555	京都市北区上賀茂本山	京都産業大学工学部生物工学科
み	三上 崇徳	701-0192	岡山県倉敷市松島 577	川崎医科大学中央研究部医学生物センター
	水内 博	335-8505	埼玉県戸田市川岸2-2-50	田辺三菱製薬(株)創薬研究所
	水野 信哉	565-0081	吹田市山田丘 2-2-B7	大阪大学大学院医学系研究科分子再生医学教室
	水野 洋子	565-0871	吹田市山田丘3-2	大阪大学 蛋白質研究所 8 F動物室
	御田村 亜紀	561-0825	大阪府豊中市二葉町3-1-1	塩野義製薬(株)
○	宮下 信泉	761-6793	香川県木田郡三木町大字池戸1750-1	香川大学研究推進機構総合生命科学研究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	(株)新日本科学 大阪支社
○	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
	宮地 均	606-8507	京都市左京区聖護院川原町53	京都大学ウイルス研究所附属感染症モデルセンター
	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
む	武藤 通彦	520-3423	滋賀県甲賀郡甲賀町五反田1405	塩野義製薬(株)実験動物研究センター
も	森 幹雄	564-0053	吹田市江の木町 33-94	大日本住友製薬(株)研究管理部 管理第2グループ
	森岡 宏至	591-8022	堺市北区金岡町 1200-6	
	森岡 一輝	544-8666	大阪市生野区巽西 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
○◎	森本 純司	569-8686	高槻市大学町 2-7	大阪医科大学研究機構実験動物センター
や○	安田 正秀	569-1094	高槻市奈佐原 4-20-1	大阪薬科大学動物関連研究施設
	安原 吉高	532-8686	大阪市淀川区十三本町 2-17-85	武田薬品工業(株)創薬第一研究所 病態モデルG
	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
	数内 かおり	665-0033	宝塚市伊子志2-4-29-708	((株)新日本科学 CR事業カンパニー前臨床事業部 安全研)
△	山崎 章弘	222-0033	横浜市港北区新横浜 3-17-6 イノテックビル11F	日本チャールス・リバー(株)
	山崎 樹里	520-2192	大津市瀬田月輪町	滋賀医科大学・動物生命科学研究所
○◎	山添 裕之	554-0022	大阪市此花区春日出中3-1-98	住友化学(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・獣医療
	山田 篤	532-8514	大阪市淀川区加島2-1-6	アステラスリサーチテクノロジー(株)安全性研究部
○	山田 宣永	950-2181	新潟県西区五十嵐二の町 8050	新潟大学農学部資源動物遺伝学分野
	山田 泰久	502-0081	岐阜市長良4丁目3番地	
○	山中 久	399-4501	長野県伊那市西箕輪2148-188	(株)イナリサーチ
	山本 大	314-0255	茨城県神栖市砂山14	(株)三菱化学安全科学研究所安全性第2部
○	山本 博	930-0194	富山市杉谷 2630	富山大学生命科学先端研究センター 動物資源開発分野
○◎	山本 好男	518-0131	三重県伊賀市ゆめが丘1-3-3「ゆめテクノ伊賀」内	三重大学社会連携研究センター 伊賀研究拠点
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研究科細胞分子医学
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
	渡邊仁美	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附属再生実験動物施設

関西実験動物研究会(個人会員名簿)2010年10月現在

氏名	〒	住所	所属
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
和田 聡	314-0255	茨城県神栖市砂山14	(株)三菱化学安全科学研究所安全性第2部

上記個人会員名簿に追加、訂正等があれば

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

関西実験動物研究会 維持会員名簿

(五十音順)(平成22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	アステラスリサーチテクノロジー(株)動物管理部	532-0031	大阪市淀川区加島 2-1-6
3	(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
4	(株)イプバイオサイエンス	648-0003	和歌山県橋本市隅田町 513
5	(株)エーテック	662-0854	兵庫県西宮市榎塚町2-15サンコーポユウⅢ201号室
6	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
7	(株)大塚製薬工場 研究開発センター	772-8601	徳島県鳴門市撫養町立岩字芥原 115
8	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
9	オリエンタル技研工業(株)	532-0011	大阪市淀川区西中島 3-23-15 セントアーバンビル
10	(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
11	北山ラベス(株)	396-0021	長野県伊那市荒井区川北 3052
12	(株)ケー・エー・シー	604-8423	京都市中京区西の京西月光町 40
13	三協ラボサービス(株)	132-0023	東京都江戸川区西一之江 2-13-16
14	参天製薬(株)研究開発センター	630-0101	生駒市高山町 8916-16
15	三和プラントエンジニアリング(株)	771-0202	徳島県板野郡北島町太郎八須字新開1-10
16	塩野義製薬(株)医薬研究本部	561-0825	大阪府豊中市二葉町 3-1-1
17	(株)島津製作所・分析計測事業部・マーケティング部	101-8448	東京都千代田区神田錦町 1-3
18	清水実験材料(株)	606-8304	京都市左京区吉田下阿達町 37
19	(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
20	白井松器械(株)	540-0003	大阪市中央区森ノ宮中央 1-19-16
21	(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
22	(株)精研	542-0066	大阪市中央区瓦屋町2丁目11-16
23	大日本住友製薬(株)研究本部 研究管理部 管理第1G、動物管理チーム	564-0053	吹田市江の木町 33-94
24	高塚ライフサイエンス(株)	700-8577	岡山市今1丁目 3-9
25	(株)ティー・ティー・エム	532-0011	大阪市淀川区西中島 6-3-25 北白石ビル東館
26	財団法人動物繁殖研究所	300-0134	茨城県かすみがうら市深谷1103
27	(株)夏目製作所	113-0034	東京都文京区湯島 2-18-6
28	日精バイリス(株)	528-0052	滋賀県甲賀市水口町宇川555
29	(株)日本医科学動物資材研究所	179-0074	東京都練馬区春日町 6丁目 10-40
30	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
31	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
32	日本照射サービス(株)	105-8716	東京都港区新橋5丁目11-3
33	日本新薬(株)創薬研究所・安全性研究部	601-8550	京都市南区吉祥院西ノ庄門口町 14
34	日本チャールス・リバー(株)カスタマーサポートセンター	567-0865	茨城県横江2-9-2
35	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
36	(株)ビオスタ	650-0047	神戸市中央区港島南町6丁目7番4号 HI-DEC 404
37	(株)フェニックスバイオ	321-0973	栃木県宇都宮市岩曽町1198-4
38	丸石製薬(株)中央研究所	538-0042	大阪府鶴見区今津中 2-2-18
39	三浦工業(株)メディカル西日本営業部	579-8502	東大阪市西石切町 7-5-1 三浦大阪ビル3F
40	(株)美濃ラボ	503-0321	岐阜県海津郡平田町今尾 1195-1
41	(有)メディア	606-8106	京都市左京区高野東開町 1-23-28-506
42	(株)メディエート	611-0041	宇治市槇島町目川 117-5
入会 H21/12/15(株)イプバイオサイエンス		退会 H21/12/31(株)サンブラネット BMR部 H21/12/31(株)H4シバウラ H22/2/2 新光電子(株)	

上記維持会員名簿に追加、訂正等があれば下記までご連絡下さい
事務局(TEL:075-753-4489, FAX:075-753-4409, e-mail:kansaijim@anim.med.kyoto-u.ac.jp)

関西実験動物研究会 評議員名簿

第9期(平成20年度～22年度)

氏名	所属
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 光事業所
飯田 晶敏	岐阜大学 応用生物科学部獣医学課程
池田 卓也	日本チャールス・リバー(株)
池田 克己	武庫川女子大学 薬学部
稲垣 晴久	自然科学研究機構生理学研究所
新比恵 啓志	田辺三菱製薬(株)信頼性保証本部 くすり相談センター
上田 正次	(株)フェニックスバイオ宇都宮事業所
内海 健二郎	
海野 隆	シンバイオ製薬(株)開発戦略本部前臨床開発部
大野 民生	名古屋大学大学院医学系研究科附属医学教育支援センター
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
沖本 一夫	大日本住友製薬 研究業務第1部 動物管理チーム
喜多 正和	京都府立医科大学大学院医学研究科実験動物センター
北田 一博	北海道大学先端科学技術共同研究センター
久保 薫	奈良県立医科大学先端医学研究機構動物実験施設
倉林 譲	森ノ宮医療大学保健医療学部鍼灸学科
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	大阪大学大学院医学系研究科実験動物医学
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
佐加良 英治	兵庫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
塩谷 恭子	国立循環器病センター研究所 動物管理室
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
高木 貞明	日本エス・エル・シー(株)
高島 俊行	ハムリー(株)国際事業所 大阪出張所
竹之下 誠	(株)イブバイオサイエンス
田島 優	大阪大学大学院医学系研究科実験動物医学
千葉 薫	JT クリエイティブサービス R&Dサポートグループ
坪田 裕司	大阪河崎リハビリテーション大学リハビリテーション学部生理学教室
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)研究企画統括部研究管理課
中村 紳一朗	滋賀医科大学動物生命科学研究センター
橋本 正晴	(株)ケーエーシー アニマルケア事業本部
原田 正史	大阪市立大学大学院医学研究科動物実験施設

氏名	所属
平川 公昭	(株)新日本科学 大阪病理センター
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
星 信彦	神戸大学大学院農学研究科応用動物学講座
前田 敏宏	(株)ケーエーシー生物科学センター
牧野 進	
真下知士	京都大学大学院医学研究科附属動物実験施設
増岡 通夫	(株)ケーエーシー 生物科学センター
松田 潤一郎	(独)医薬基盤研究所 生物資源研究部
宮下 信泉	香川大学研究推進機構総合生命科学研究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
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(株)生物環境科学研究所
山田 宜永	京都大学大学院農学研究科
山中 久	(株)イナリサーチ営業本部
山本 博	富山大学生命科学先端研究センター動物資源開発分野
山本 好男	三重大学社会連携研究センター・伊賀研究拠点
横井 伯英	神戸大学大学院医学研究科細胞分子医学

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: kansajjim@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20年～22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	京都府立医科大学大学院医学研究科実験動物センター
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 光事業所
	池田 卓也	日本チャールス・リバー(株)
	岡田 利也	大阪府立大学大学院生命環境科学研究科獣医学専攻
	黒澤 努	大阪大学大学院医学系研究科実験動物医学
	久保 薫	奈良県立医科大学先端医学研究機構動物実験施設
	桑村 充	大阪府立大学大学院生命環境科学研究科獣医病理学
	近藤 玄	京都大学再生医科学研究所
	塩見 雅志	神戸大学大学院医学研究科附属動物実験施設
	田島 優	大阪大学大学院医学系研究科実験動物医学
	坪田 裕司	大阪河崎リハビリテーション大学リハビリテーション学部
	松田潤一郎	(独)医薬基盤研究所 生物資源研究部 実験動物開発研究室
	森本 純司	大阪医科大学研究機構実験動物センター
	山添 裕之	住友化学(株)生物環境科学研究所
	横井 伯英	神戸大学大学院医学研究科細胞分子医学
編集:	山本 好男	三重大学社会連携研究センター・伊賀研究拠点
	飯田 晶敏	岐阜大学 応用生物科学部獣医学課程
	中村紳一郎	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)研開企画統括部研開管理課
監事:	清水 英男	清水実験材料(株)
	山崎 章弘	日本チャールス・リバー(株)

平成22年12月15日 印 刷
平成22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32号
Kansai Journal of Laboratory Animals
平成22年12月

第103回研究会：神経・筋疾患の病態とモデル動物

- 万年 英之：ニワトリ筋ジストロフィー責任遺伝子の同定とモデル動物としての展開 1
南部 篤：モデル動物によって大脳基底核疾患の病態を探索 13
池田 卓也：実験動物施設におけるホルムアルデヒド規制とその国内外における対応 14

第104回研究会

＜特別講演＞

- 近藤 科江：小動物を用いた生体光イメージング 27
田中 卓二：炎症関連大腸発がんモデルの作出とその発がん・化学予防研究への活用 36
＜会員の発表 14題＞ 49

第105回研究会：器官発生・幹細胞分化の基本原理を探索

- 八杉 貞雄：器官形成研究のモデル動物としてのニワトリ胚 65
長澤 丘司：哺乳動物の造血幹細胞ニッチ 79

第106回研究会：動物実験第三者認証のその後

- 黒澤 努：はじめに 81
喜多 正和：国動協と公私動協の「動物実験に関する相互検証プログラム」 84
上田 正次：日本実験動物協会第2期実験動物生産施設等福祉調査 90
山田 靖子：ヒューマンサイエンス振興財団による動物実験実施施設認証を受けて 99
須藤 有二：AAALAC International国際実験動物管理公認協会認証 109

＜関西実験動物研究会だより＞ 121

- 幹事会、評議員会、総会の議事概要 123 会員の異動 127
個人会員名簿 128 維持会員名簿 132 評議員名簿 133
会長、幹事、監事名簿 135