

関西実験動物研究会会報

Kansai Journal of Laboratory Animals

平成25年12月 35号

関西実験動物研究会

Kansai Laboratory Animal Research Association

目 次

<第115回研究会（平成24年 9 月 7 日）>

テーマ：動物実験実施体制の課題

1. わが国の動物実験実施体制の課題と将来：動物愛護法改正問題への製薬協の取り組み
中村 和市（日本製薬工業協会医薬品評価委員会）…………… 1
2. 動物実験の自主管理の推進に向けて－HS財団の動物実験外部評価・検証制度－
佐々木 弥生（公益財団法人 ヒューマンサイエンス振興財団）……… 2
3. Laboratory animal welfare might be resolutely by education and laws
Jae-Hak Park（Seoul National University）…………… 8

<第116回研究会（平成24年12月14日）>

<特別講演 1 >

獣医外科学、実験動物学、実験動物医学、動物実験代替法学

- 黒澤 努（大阪大学医学部 実験動物医学教室）…………… 9

<特別講演 2 >

実験動物の領域に潜り込んで得たもの

- 芹川 忠夫（京都大学大学院医学研究科 附属動物実験施設）…………… 12

<トピックス>

Introduction of the Education Program for Animal Experiment in Seoul National University

Jung Sun MIN¹, Seung Hyeok SEOK², Su-Cheong YEOM², Jeong-Hwan CHE¹, Chung-Gyu PARK^{1,2}, Hak CHANG^{1,2}, Kook Hyun LEE^{1,2}, Kang, Byeong-Cheol^{1,2}

（¹Department of Experimental Animal Research, Biomedical Research Institute, Seoul National University Hospital, ² College of Medicine, Seoul National University）…………… 28

- <会員の発表 14題> …………… 29

<第117回研究会（平成25年3月1日）>

テーマ：アカハライモリとゼブラフィッシュを用いて生命原理を解き明かす

1. アカハライモリのモデル動物化に向けた資源・技術・情報基盤の研究
：外傷性疾患の治療と再生研究への適用を視野に

千葉 親文（筑波大学生命環境系

脳神経情報学分野・再生生理学研究室）…………… 43

2. ゼブラフィッシュの色素細胞間相互作用とパターン形成

渡邊 正勝（大阪大学生命機能研究科 パターン形成研究室）…………… 52

<トピックス>

実験用シロネズミの起源

庫本 高志（京都大学大学院医学研究科附属動物実験施設・

ナショナルバイオリソースプロジェクト「ラット」）…………… 60

<第118回研究会（平成25年6月14日）>

テーマ：遺伝子改変技術を用いた糖尿病および動脈硬化研究

1. 脂質代謝・動脈硬化研究におけるウサギの有用性—ヒトapoA-II トランスジェニックウサギの開発と応用—

小池 智也¹、北嶋 修司²、西島 和俊²、渡辺 照男²、塩見 雅志¹、範江林³（¹神戸大学大学院医学研究科附属動物実験施設、²佐賀大学総合分析実験センター生物資源開発部門、³山梨大学大学院医学工学総合研究部分子病理学講座）…………… 67

2. 新たなインスリン分泌メカニズムと糖尿病治療薬開発における意義

清野 進（神戸大学大学院医学研究科分子代謝医学）…………… 74

<トピックス>

高活性型TALENの開発と様々な動物におけるゲノム編集

山本 卓（広島大学大学院理学研究科数理分子生命理学専攻）…………… 75

<関西実験動物研究会だより>…………… 79

<幹事会、評議員会、総会の議事概要>…………… 81

<会員の異動>…………… 85

<個人会員名簿>…………… 86

<維持会員名簿>…………… 92

<評議員名簿>…………… 93

<会長、幹事、監事名簿>…………… 95

<収支・予算>…………… 96

<会則>…………… 99

わが国の動物実験実施体制の課題と将来 - 動物愛護法改正問題への製薬協の取り組み -

日本製薬工業協会 医薬品評価委員会
基礎研究部会
中村和市

平成 17 年 6 月に「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」（平成 17 年法律第 68 号）が公布され、3R のうち、Refinement に関する規定に加え、Replacement 及び Reduction が盛り込まれた。平成 18 年 6 月には、本法律の施行にあわせて「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」（厚生労働省大臣官房厚生科学課長通知 科発第 0601005 号）が通知された。これを受け、製薬協では平成 18 年 7 月に動物実験に関する自主ガイダンスを策定している。また、製薬協加盟企業の要望を把握したうえで、ヒューマンサイエンス振興財団による国内第三者認証事業の立ち上げを支援し、同事業は平成 20 年 4 月に開始されるに至った。製薬協では、その後も「動物実験に関する社内規則作成手引書」の作成や厚労省や大学の専門家を招いてのセミナー開催などの啓発活動を行う一方、日本動物実験代替法評価センター（JaCVAM）にも委員を送り新規動物実験代替法の公定化に協力してきた。さらに ICH ガイドラインにおける 3R 理念の盛り込み、iPS 細胞応用への産官学協力などにも取り組んできた。平成 23 年 11 月に日本国内に動物実験施設を有する製薬協加盟企業に対して行った調査では、残念ながら「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」にある自己点検及び情報公開、また第三者認証への対応に関しては、他社の様子眺めが原因と考えられる対応の遅れが見られた。しかし、平成 25 年 3 月までには対象企業のほぼ全社がこれらの対応を済ませる予定となっている。

近年、製薬業界はグローバル化の時代を迎え、国内創薬基盤弱体化の懸念もある。適正な動物実験が制限されることになれば、各種疾病の患者を第一とした社会的要請に応えられず、製薬に関わる基礎研究及び応用研究の遅れも想定される。平成 22 年から現行の「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」の見直し、環境省中央環境審議会動物愛護部会で議論されてきた。そのような中であって、製薬協は専門家による自主管理体制の存続を主張してきた。そのことが動物福祉のために最善と考えるからである。平成 24 年 6 月に医療イノベーション会議（内閣官房）によってまとめられた「医療イノベーション 5 か年戦略」にも「革新的医薬品・医療機器の開発等において動物を用いた試験実施は、極めて重要であり、医療イノベーション推進のためには、研究内容を熟知する研究開発機関の自主的管理の下、これを動物愛護の観点と科学技術の進歩の観点の調和を図りながら、引き続き、適切に実施することが必要である。」と述べられている。今後とも、社会の理解を得ながら、動物実験のさらなる適正化に努める考えである。

動物実験の自主管理の推進に向けて
—HS 財団の動物実験外部評価・検証制度—

公益財団法人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
佐々木弥生

はじめに

平成 18 年の厚労省指針の策定後、指針を発出した 3 省庁の中で、動物実験実施施設の外部評価体制が整備されていなかった厚労省所管業種の外部評価機関の必要性が関係者から要望され、弊財団は関係業界の状況等を踏まえ約 1 年間の準備期間を経て、平成 20 年に外部評価事業を創設した。

平成 24 年に動物の愛護及び管理に関する法律（以下、「動愛法」という。）の一部改正があり、自主管理の検証として、外部評価を活用することについて理解が深まったと考えられる。動愛法の改正の経緯とともに事業開始 5 年目を迎えた事業について、ご紹介することとしたい。

1. 平成 24 年動物愛護管理法改正と施行内容

1) 改正法案の審議経過

平成 17 年の動愛法の一部改正時の規定により、施行後 5 年後を目途に見直しを行うこととされたことに伴い、平成 22 年 8 月中央環境審議会動物愛護部会に設置された小委員会で検討が開始された。同審議会では 25 回にわたる議論がなされ、平成 23 年 12 月のパブリックコメントを経て、実験動物に関する議論は、登録制の導入の可否は両論併記の形で報告書がとりまとめられた。

法律改正にむけて、平成 24 年 8 月に衆議院調査局環境調査室が「動物の愛護及び管理をめぐる現状と課題」¹⁾として、現状等の詳細を取りまとめている。

その後は議員立法として一部改正が検討され、平成 24 年 8 月 28 日に衆議院環境委員会において法律案の起草・審議²⁾、同日の参議院の環境委員会の審議を経て翌 29 日に参議院で可決成立し、9 月 5 日に公布された。今回の改正では、実験動物に関する法律の改正事項はないが、衆議院環境委員会決議及び参議院環境委員会附帯決議³⁾として

「政府は動物の愛護及び管理の逸走の推進が人と動物の共生する社会の実現に不可欠であることに鑑み、本法を施行するに当たっては、次の事項に留意し、その運用について万全をきすべきである。(一部略)七、実験動物の取扱いに係る法制度の検討に関しては、関係者による自主管理の取組及び関係府省による実態把握の取組を踏まえつつ、国際的な規制の動向や科学的知見に関する情報の収集に努めること。また、関係府省との連携をはかりつつ、3R（代替法の選択、使用数の削減、苦痛の軽減）の実効性の強化等により、実験動物の福祉の実現に努めること。」とされ、動物実験の実施にあたり3Rに配慮した実施の強化が求められることになった。

国会での審議では、実験動物について、平成24年8月28日に開催された衆議院環境委員会にて提案者の田島委員は、兵庫県の条例並に届け出制の実施、3Rの義務化を検討したが、施設情報の開示による損害や生命科学研究発展の障害から見送りとなったこと、自主的な努力を図る一方で不断の検討を行うべきと発言している。参議院環境委員会においても同様の説明がなされた。また、衆参両院とも改正案の可決とともに、同文の委員会決議及び附帯決議について全会一致で決議された。

2) 改正法案の施行

改正動愛法は平成25年9月1日に施行され、動物の愛護及び管理に関する施策を総合的に推進するための基本的な指針の改正、実験動物関係では、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が改正された。動物の愛護及び管理に関する施策を総合的に推進するための基本的な指針⁴⁾では、実験動物については法改正の衆参両院の審議の際の付帯決議の内容が盛り込まれている。

また、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においては、一般原則に定期的に当該基準等の遵守状況について点検を行い、適切な方法により公表すること、当該点検結果については可能な限り、外部の機関等による検証を行うよう努めることが規定されるとともに、飼養保管の方法の項に必要な健康の管理並びにその動物の種類、修正等を考慮した飼養保管のための環境確保が追加されている。

2. 認証事業の概況

1) 事業開始の経緯と認定実績

前回平成17年の動愛法の改正に基づき、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（以下、「基本指針」という。）が策定され、平成18年

6月1日に施行された。また、日本学術会議のガイドラインも示された。これらを受け、財団では、平成19年11月から準備委員会を発足させ、その検討結果をふまえ、平成20年7月末に認証事業を開始した。しかしながら、学術会議のガイドラインでは「当該機関等以外の者による検証を行うことを考慮する」とされているが、基本指針において外部検証については触れられていないことから、初年度は4件(4機関)、21年度においても5件(4機関)にとどまった。22年度において、財団の主要な事業である政策創薬総合研究事業等に関して厚生労働省の省内仕分けが実施され、財団の動向が不明確な状況となったこともあり、4件(2機関)と認証数は低迷した。

平成23年9月の学術会議分科会において、日本製薬工業会より外部評価の実施による自主管理の充実などの取組みの報告がなされたことなどを受け、23年度から申請が増加し、当該年度の新規認定機関は7件(2回目の認定機関を合わせ11件)となった。24年度は新規認定機関は38件(2回目の認定機関を合わせ43件)と大幅な増となっている。25年度については10月末現在で新規認証機関は17件であり、24年度より少ないものの、23年度を超える新規認定数となる。25年10月末現在の認定機関数は75機関である。

なお、22年度において、関係団体より財団の外部評価に関して、評価に向けての準備段階で相談を受けてほしいとの要望があり、相談制度を導入した。具体的には、認証評価員との面談、書面又は実地調査により基本指針への適合性に関する相談が可能となり、23年度になり、1件の利用があった。

2) 調査の流れと調査方法

事前に提出いただいた書面をもとに、実地調査では、施設の規模(飼養保管施設及び動物実験室等の面積)に合わせて、1日～2日間をかけ、施設の概要説明、機関内規程・手順書等、動物実験委員会の審査等に関する資料、飼育・施設の管理に関する資料、教育訓練、自己点検、情報公開に関する資料の確認、ラボツアー、機関の長及び動物実験委員会委員長との面談を行っている。また、ラボツアーについては、認証を受ける施設の各動物種ごとに飼養保管状況が把握できることを目標として実施しており、可能な限り実施中の試験・実験の状況、飼育作業が把握できるよう協力をお願いしている。

実地調査の最後に、認証評価員による暫定的な評価を口頭で伝達しているが、正式な評価結果については、評価委員会における評価後、事務局より文書(評価結果報告書)により伝達している。

3) 評価の視点

認定における評価基準は基本指針への適合性として実施しており、基本指針において引用されている動愛法、飼養保管基準、カルタヘナ法等動物実験に関連する諸法令も考慮して実施している。

評価のポイントとして次の4点をあげておきたい。

- ①実施機関において自主管理体制が整備されていること
- ②動物実験委員会がその機能を発揮していること
- ③自己点検が実施され、実施結果のフォローアップがなされていること
- ④教育訓練が継続的に実施されていること

特に動物実験委員会が機能を発揮するためには、審査資料において代替法の検討、動物数の根拠、苦痛の軽減に関して評価可能な内容が網羅されていること、かつ、その内容に対して、科学的観点、動物福祉に関する国際的な状況も踏まえた観点から審査が実施されていることを、透明性・説明責任についても配慮して提示できることが求められる。調査時には、可能な限り動物実験委員会における審査状況及び実験の実施状況等を提示された資料に従って把握し、3Rの原則に従った動物実験実施の取り組みの向上に資するよう動物福祉の観点からコメントしている。

また、自己点検についても、基本指針に定められた範囲について実施し、必要な改善がなされていること、教育訓練については動物倫理面の教育に合わせて麻酔法、安楽死法等の実験手技も含めて行われることが望ましいと考えている。

申請機関からの実地調査時の反応としては、自主管理に関する実地調査は初めてであり対応方法がわからないとのコメントが多くみられたものの、認証評価員からのコメントについて、外部からの視点についての気づきとしてとらえてもらえたと考えている。

また、各申請者とも基本指針に従って、自主管理体制は運用されているものの、指針制定前の規定や運用を基盤としていと思われ、機関内規程の用語や記載ぶりについて、理解しやすさの点からより充実を求める場合もある。

4) 2回目の認定における調査について

平成23年度下半期において、制度開始1年目（平成20年度）に認証した施設について、継続認証のための第二回の調査が実施されることとなり、2回目の実地調査の方法、評価の視点について、評価委員会及び運営委員会において検討を実施した。

例えば、初回の評価時に評価結果報告書として伝えている自主管理の向上にむけての

対応状況の確認は必須であるが、前回評価対象とした事実関係を再度確認すべきか否かについて検討を行った。施設の運用の変更や社内体制の変更等の可能性があることから、初回の調査と同じように機関内規程の確認、動物実験委員会の活動状況、自己点検、教育訓練、情報公開、ラボツアーによる飼養保管状況の確認等を行うこととした。

実際に2回目の実地調査では、前回調査時の自主管理の向上に向けてのコメントに対して、各機関では真摯に対応いただき、自主管理の向上につながる結果となっていた。また、機関内規程の変更、委員会の審査運用の変更、認証の範囲の変更（動物飼育施設の閉鎖、施設の運用の変更（バリアからコンベンショナルへ）に伴うもの等）などがあり、2回目の実地調査においても初回と同様に調査を行うことは意義ある状況と認識された。

特に、安楽死法、麻酔法の変更、飼育環境の改善など動物福祉に関する国際動向への対応は各施設において十分認識され、対応が進んでいたことを強調したい。

おわりに

海外の規制をみても米国、欧州で異なり、地域に即した管理方法が選択され、実施されているが、動物実験を巡る環境の変化は年をおって大きくなっているように感じられる。我が国の動物実験に関する規制の枠組みの議論は、次回の動物愛護法の改正時期に向けて既に始まっているといえよう。次回改正の4年後にむけて、動物実験の自主管理状況について関係者間での十分な情報共有と議論の深まりが必要と考える。

財団としても、動物実験実施施設外部評価事業を通じて、適正な動物実験の実施に関する関係者の理解が深まるよう努力していく所存である。

参考資料

1. 動物の愛護及び管理をめぐる現状と課題（平成24年8月 衆議院調査局環境調査室）

[http://www.shugiin.go.jp/itdb_rchome.nsf/html/rchome/Shiryo/kankyoku_201208_dobutsuaigo.pdf/\\$File/kankyoku_201208_dobutsuaigo.pdf](http://www.shugiin.go.jp/itdb_rchome.nsf/html/rchome/Shiryo/kankyoku_201208_dobutsuaigo.pdf/$File/kankyoku_201208_dobutsuaigo.pdf)

2. 衆議院環境委員会決議（議事録）

http://www.shugiin.go.jp/itdb_kaigiroku.nsf/html/kaigiroku/001718020120828012.htm

http://www.shugiin.go.jp/index.nsf/html/index_rchome.htm

3. 参議院附帯決議

http://www.sangiin.go.jp/japanese/gianjoho/ketsugi/180/f073_082801.pdf

4. 動物の愛護及び管理に関する施策を総合的に推進するための基本的な指針（抄）

平成 18 年環境省告示第 140 号（最終改正：平成 25 年環境省告示第 80 号）

第 2 今後の施策展開の方向

2 施策別の取組み

（6）実験動物の適正な取扱いの推進

①現状と課題

実験動物の飼養等については、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 月環境省告示第 88 号、以下「実験動物の飼養保管等基準」という。）に基づき、自主管理を基本としてその適正化を図る仕組みとなっているが、本基準の遵守し同等を円滑に行うための体制整備が十分にされていない施設が一部にある。動物を科学上の利用に供することは、生命科学の進展、医療技術等の開発等のために必要不可欠なものであるが、その飼養及び科学上の利用に当たっては、動物が命あるものであることに鑑み、科学上の利用の目的を達することができる範囲において、国先的にも普及し、定着している実験動物の取扱いの基本的考え方である「3R の原則」（代替法の活用：Replacement、使用数の削減：Reduction、苦痛の軽減：Refinement）を踏まえた適切な措置を講じること等が必要とされている。

②講ずべき施策

ア関係省庁、団体等と連携しつつ、「3R の原則」や実験動物の飼養保管等基準の周知が、当該基準の解説書の作成等を通して効果的かつ効率的に行われるようにするとともに、実験動物に関する国際的な規制の動向や科学的知見に関する情報を収集すること。イ国は、実験動物の飼養保管等基準の遵守状況について、緊急時に対応するための計画作成状況も含め、定期的な実態把握を行うこと。

Laboratory animal welfare might be resolved by education and laws.

Prof. Jae-Hak Park

Laboratory Animal Medicine College of Veterinary Medicine Seoul National University <http://eanimal.snu.ac.kr/> Tel +82-2-880-1256 Fax +82-2-887-1257

Animal protection law of Korea has been amended. In addition, a new law about laboratory animals started to act. These laws need the understanding of animal welfare by the companion animal owners, animal researchers and farm animal owners. We can find that animal welfare is one of main jobs in many formal or national institutions such as OIE. Veterinarians may be in the middle of a net of duties: to their patients, client, other vets, and animals. Veterinarians are often faced with ethical problems in their jobs including as an obligated members of IACUC. Ethical educations may be the tools to make these decisions good. If veterinarians are uneducated about ethics, they may decide routine affair by inadequate ethical principles without ever asking questions about them. A good and continuous ethical education will give also immediate practical help in appropriately resolving situations in which interest conflict between clients, general citizen, researchers and animals. As members of IACUC, Korean animal welfare laws require at least one veterinarian educated with laboratory animal medicine and one member from NGO related with animal welfare. I will describe the animal welfare laws related with laboratory animals in Korea.

獣医外科学、実験動物学、実験動物医学、動物実験代替法学

大阪大学医学部 実験動物医学教室

黒澤 努

関西実験動物研究会にて私の研究教育活動の総括をお話したい。

私は北海道大学獣医学部を卒業し、当時は臨床の獣医外科医となるべく研修をかさねていた。さらに英語がまったく使えないのにもかかわらずニュージーランドのマッセイ大学獣医学部の大学院に留学した。ここでは我が国では経験することのできなかった獣医外科学、麻酔学を学んだだけでなく、実際の修練もさせていただいた。

留学を終え腕の良い獣医外科医として活躍すべく母校の獣医外科学教室に戻ったが、まもなく教授から勘当されてしまった。ほかに行くところもなかったので、とりあえず自分が学生時代に獣医学を教わった教授にごあいさつに伺ったところ、基礎系の梁川良教授から獣医臨床のトレーニングを外国で受けた経験は貴重なので、なんとか獣医学の分野に残るよう説得された。そこであたらしく注目された実験動物学の分野での研鑽をすすめられ、慶応大学の前島先生のご指導を仰ぐこととなった。そのとき予研の中川先生の教室に研究生として所属し、実験動物学の勉強を始めた。しかし、マッセイ大学では実験外科学の勉強をしていたことから、本当の意味での実験動物学事始めはマッセイ大学で勉強をはじめた、1974 年までさかのぼることとなる。前島先生のご紹介で四方淳一先生の帝京大学医学部外科学教室の助手に採用され、もっぱら動物実験を行う研究助手を 8 年間務めることとなった。その間前島先生の師である田嶋嘉雄先生のご指導を受けることとなった。とくに田嶋先生からは獣医外科学の経験をいかしてその知識経験を麻酔を必要とする動物福祉の分野の研究を進展するよう指示された。それ以来田嶋先生の指示を堅持し麻酔学（安楽死を含む）の研究活動を行うこととなった。また帝京大学医学部では臨床医学とりわけ消化器外科学を勉強することとなり、貴重な医療の現場の経験を積ませていただいた。

結婚し子どももできてやがて臨床獣医外科医にも戻ろうかと思っていた矢先、大阪大学医学部へ行く話が出た。新しく動物実験施設を作るのでその責任者として転任することとなった。大阪大学に行くまでの間、実中研の野村達治先生、鍵山直子先生のご指導をうけることとなり、自分が全く経験したことのない微生物モニタリングや生殖工学などをにわかに勉強したことをなつかしく思い出す。伊藤登志雄先生にはお酒の飲み方をたっぷり伝授してもらった。また実中研の仲間と麻雀、テニスに興じた。研究生活の束の間のくつろぎであった。大阪大学赴任後は動物実験施設建設のためほぼ土方の親方と同じような生活となり、建築設計、設備設計などを一から覚えながら、概念設計を行った。このとき大阪大学は米国型の実験動物管理を行うこととし、私は米国ミシガン大学の **Ben Cohen** 先生に師事することとなった。そこで実験動物医学の存在を知り、若手の実験動物医学専門医多数の知己を得ることとなった。我が国にも適切な実験動物福祉の枠組みが必要であると考え米国の仕組みに習おうとしたが我が国にはこの専門医制度がないことがネックのように思われ、日本実験動物医学会の設立に笠井憲雪先生と奔走した。現在この専門医制度は順調に発展し、**96** 名の専門医を認定しただけでなく国際組織である **IACLAM** のメンバーとなることができた。

新鋭の施設も出来上がり、運営のソフトも固まったころ寄生虫学者である岡本宗裕助手が赴任した。動物実験施設の運営もさることながら、共通の研究テーマを探すこととなり、腎臓病をテーマとすることとした。予研から中川雅郎先生らが開発した **ICGN** マウスをいただいて、研究を開始した。現在この慢性腎不全発症モデルマウスは **F63** になっている。途中水野信哉君およびやがて彼と結婚する堀川洋子君、中国からきた岳秉飞君も研究室に加わり、一時期はその研究に没頭した。研究室員の努力でそれなりの研究成果もあげることができた。

しかし、その間にも動物福祉の研究は進めていて、前島先生の先導で **Koken Rat** の開発に携わり、その普及に努力した。これをきっかけに日本動物実験代替法学会に入会し、やがて種々の役員を仰せつかることとなった。この動物実験代替法学に携わる前哨戦として **ISO/TC194 WG3**

Animal Protection Aspect の日本代表となり ISO 文書 Animal Welfare Requirement を作ったことが刺激となっていた。動物実験代替法学は 3 Rs にかかわる研究と実践であるが、学会はもっぱら Replacement の研究をおこなっていて、Refinement の研究は主流ではなかった。2007 年に WC6 世界動物実験代替法会議を大野泰雄会長のもと東京で開催することとなり、科学委員長を拝命し、世界の動物実験代替法を目の当たりにみることで、Refinement が我が国のウイークポイントであることを思い知らされた。Refinement の充実が獣医学的ケアが中心となっていることから、動物実験代替法学と実験動物医学が密接に結びついていることが理解できた。したがって当初から行っていた実験動物麻酔学の研究もその両者にまたがっていることに気付いた。また Refinement の実践としては AAALAC International の存在があり、実験動物の利用と福祉の評価認定を行うことを通じて実験動物福祉の充実と研究の推進が国際的に行われていることも理解するようになった。

こうして、獣医外科医が実験動物学に入り込み実験動物医学専門医会の設立に奔走し、さらには動物実験代替法学にまでその研究領域を広めていったのである。またこれらの活動は我が国だけにとどまらず、やがて AFLAS および IACLAM の設立へとつながっていったのである。

定年を迎えてすべての Duties から逃れられることを夢見ていたが、これらの活動の中にはいまだ未完成のものがあるように感ぜられ、もうちょっとだけはお付き合いしようという気持ちになっている。

実験動物の領域に潜り込んで得たもの

芹川忠夫（京都大学医学研究科附属動物実験施設）

はじめに

大阪府立大学農学部獣医学科に入学して以来、獣医師としての進路をあれこれ考えた。当時、獣医学科には実験動物学教室はなく、実験動物学という授業もなかった。しかし、卒後の選択肢をいろいろ検討しているうちに、猪 貴義先生や山内忠平先生らが「畜産の研究」（26 巻第 1 号、昭和 47 年 1 月発行、養賢堂）に執筆されていた実験動物学に関する総説に出会った。発展途上の分野であることを知り、私にも何かできそうな魅力を抱かされた。そして、実験動物の領域に身を置くことを決めて、地元の京都に本社のある北山ラベス株式会社に就職した。赴任先は岐阜県にあった羽島研究所で SPF ラットの生産とラットを用いた安全性試験の見習いからスタートした。半年後、国立予防衛生研究所（予研）の獣疫部実験動物室において実験動物の感染症についての研修をその年度末までさせて頂いた。中野健司先生、武藤 健先生、中川雅朗先生らの指導を受けた。当時、予研獣疫部の実験動物室には多くの実験動物関連業者の特に若手が研修に出入りしており、メッカのような存在であった。関西実験動物研究会の現会員である星野雅行さんや木下邦明さんも、その中におられた。私はマウス、ラット、モルモット、ウサギ、ネコの病理解剖検査や寄生虫検査に加えて、ウサギの肝臓型コクシジウムの感染実験を経験させて頂いた。羽島研究所に戻り業務に携わっていく中で、ラットの腸トリコモナスや当時国内で発表報告のなかった、所謂ラットのおたふく風邪（唾液腺涙腺炎ウイルス感染症）を見つけてしまい、SPF コロニーの維持の難しさ対策の難しさを痛切に感じた。面白さもあり、何かさらに大きく展開したいという身勝手な想いがどんどん膨らんでも行ったが、現実とのギャップを克服することができずに、当てもなく遂に会社を去ってしまった。しかし、京都の自宅での 2 か月間の失業生活の後に、予研の先生に紹介されて京都大学医学部附属動物実験施設の助手に応募したところ、思いがけなく採用された。‘実験動物の領域に潜り込んで...’というタイトルは、このような経緯があったことに因る。

1. 京都大学における動物実験の管理業務

附属動物実験施設の助手として昭和 48 年 10 月に赴任、昭和 63 年 1 月に助教授、平成 5 年 9 月に教授、そして平成 6 年 4 月以降、平成 25 年 3 月に定年退職するまで動物実験施設長を併任した。また、京都大学の動物実験委員会の委員長、副委員長、医学研究科の動物実験委員会の委員長も長く担った。約 40 年間も広義の公職を務めたのであるから、記録を残しておく義務があると思い、詳細に綴らせて頂く。

1) 動物実験施設の設立、建設、手直し工事、そして再稼働

昭和 47 年 5 月 1 日に附属動物実験施設が設置され、衛生学の藤原元典教授が施設長に就

任、総工費約 7 億円、延床面積 6,490 平方メートルの本棟の建設が認可された。旧 7 帝大の医学部に動物実験施設が誕生し始める初期の頃である。早速に、設立委員会が設置され、医学研究科の基礎と臨床に属する教員や技官が委員に選ばれ、動物実験施設棟が設計された。翌年の昭和 48 年 2 月に、山田淳三先生が放射線医学総合研究所から専任の助教授として赴任され、同月に動物実験施設棟が着工された。私は同年 10 月採用であった。ゆえに、私達専任教員 2 名は設計に係わらなかった。求められたのは、建築途上における調整と完成後の動物実験施設棟と純系動物飼育室の運営が主なものであった。純系動物飼育室では、昭和 32 年以来、近交系と非近交系のマウスおよび京都ウイスターラットの維持、繁殖、提供事業が行われていた。東北大学、大阪大学、九州大学など、他大学の医学部においても、実験用マウスおよびラットの学内供給事業が同様に行われていた。昭和 38 年頃までには、病理学教室において京都ウイスターラットから選抜育種法により高血圧自然発症ラット SHR が開発されていた。昭和 48 年 3 月に、実行小委員会と称して、(1) マウス、ラット、ハムスター委員会、(2) ウサギ、モルモット委員会、(3) イヌ、ネコ、サル委員会、(4) 無菌、系統、繁殖委員会、(5) 規程作成委員会、(6) 整備計画委員会、(7) 運営委員会、が発足した。昭和 49 年 8 月 31 日に動物実験施設棟の竣工、引き渡しがなされ、同年の 10 月 1 日に空調等機械保守管理運転の業務委託が開始され、11 月 11 日に催された記念式典、見学会、祝賀会には、田嶋嘉雄日本実験動物学会理事長らが招かれ、岡本道夫京大総長、医学部基礎臨床教授を始め多くの関係者が開所を祝った。最新の大規模な動物実験施設への医学部関係者の期待は極めて高かった。翌年の昭和 50 年 2 月 1 日に、実験動物の搬入が始まり、動物実験施設の利用が開始された。昭和 50 年 4 月に動物実験施設棟の正面で撮影されたスタッフの記念写真は、皆の明るい笑顔が印象的であった。ところが、その 3 カ月後の 5 月 27 日に、会計検査官の指摘による手直し工事を行うことが決定され、7 月 16 日には、収容中であった全ての動物を動物実験施設棟から一旦搬出するという大変悲しい事態に直面することになった。工事終了後、同年 11 月 1 日に動物の再搬入が開始された。工事期間中は、本棟の南側駐車場にプレハブ舎を建て、スタッフの居室と一部の動物の収容室に充てた。この期間を利用して、私は東京大学医科学研究所の獣医学研究部にマウス・ラットの微生物モニタリング法の研修に派遣され、さらに、イヌブルセラ病の検査法についても学ぶ機会を得た。附属動物実験施設の検疫・検査システムを構築することが、獣医師としての私の最初の任務であったので、上記の研修機会が与えられたことは不幸中の幸いではあった。しかし、医学研究科の先生方の期待に応えて開設した途端の大規模な手直し工事は、皆の意気を消沈させるものであった。このような出来事の結果、附属動物実験施設の運営が本格的に開始されたのは、昭和 51 年度からと言って良いであろう。動物実験施設の最初のスタッフは、助教授、助手に加えて、前述の純系動物飼育室からの技官と非常勤職員、外科系教室の動物担当の技官、新規採用された動物の飼育や洗浄担当の非常勤職員、および業務委託した空調設備管理員、藤原財団からの支援で雇用された受付事務員ら少数で構成された。

2) 実験動物の検疫・検査システムの構築、感染症の発生およびその対策

一つの動物実験施設棟で、多種類の微生物統御レベルが異なる実験用動物を共に飼育実験する。その際、感染症のトラブルがない状態で動物実験を恒常的に行うことを、少ないスタッフによって実施できるようにするため、動物種ごとに以下のような方針を示した。

- ・マウス、ラット：定期コロニー検査がされている市販の SPF 動物を検疫なしに搬入
- ・ウサギ、モルモット、その他の小動物：コンベンショナル動物を耳疥癬、鼻汁、呼吸器疾患などの臨床検査で選別して搬入
- ・イヌ：保健所由来のイヌを薬浴搬入後、ミクロフィラリアとブルセラ菌の検査で選別して使用
- ・ネコ：保健所由来のネコを、臨床検査で選別して使用
- ・サル類：検疫済みのものに限定して搬入

当初、最も力を入れざるを得なかったのは、主に外科系の研究に多用されたイヌの確保である。保健所由来のイヌが使用されていた頃で、京都市と京都府からのみでは不足ということで、滋賀県、岐阜県、後には兵庫県に由来するイヌを集めた。昭和 51 年度の記録によると、毎月平均 100 頭、年間 1,200 頭を使用していた。逃亡や咬傷事故がないように首輪を確実に付け代え、薬浴、採血によるイヌ心臓糸状虫のミクロフィラリア検査、およびイヌブルセラ病の検査を行った。現在は、保健所由来のイヌは一切使用せず、実験用に生産されたイヌに限定されている。保健所由来のイヌには、検査対象としていた感染症などにも罹患している例が多く、実験用として利用する上で望ましいものではなかった。従事するスタッフや研究者の安全確保と検疫検査あるいは治療に要する負担を考えると、費用対効果は極めて低いと評価せざるを得ない。最近では、イヌの利用数は激減して、実験用のイヌから実験用小型ブタに移行している。附属動物実験施設の開設当初、マウスとラットは SPF 動物に限定しようと提案したが、当時の現状を考慮して良質のコンベンショナル動物はクリーンコンベンショナル動物と称して、SPF 動物の飼育領域とは領域を分けて利用可能とした。飼育装置については、マウスケージはアルマイト製の靴箱タイプ、ラットはケージのメッシュ床から落ちる汚物を自走式のベルトコンベアで搬出する仕様の自動飼育装置と呼ばれたものが採用された。マウスでは、センダイウイルス対策が当初の最も大きな課題であった（文献 1）。その後、担癌試験などに多数のヌードマウスが利用されるようになった頃には、マウス肝炎ウイルスやニューモシスチスカリニ汚染とその対策が新たな課題となった（文献 2）。汚染を経験する度に、ケージを個別化するためのフィルタートップの利用、飼育領域の分割、滅菌着衣の交換回数の見直し、微生物モニタリングの強化などを行った。マウスとラットの SPF コロニーを微生物汚染から守るには、ハードとソフトの両面を厳格に整備しなければならない。しかしながら、実際には、予算とユーザーのおかれている状況に左右されるところが多く、それらを調整して進めざるを得なかった。

3) 専任教授の誕生とハンタウイルス汚染

藤原施設長の退官に伴い、昭和 54 年から薬理学教室の高折修二教授が附属動物実験施設長を併任された。ご存じのように山田淳三助教授は、関西地区において実験動物学ならびに関連諸科学の発達を図る事を目的として、昭和 55 年に「実験動物集談会」、そして昭和 59 年 3 月に「関西実験動物研究会」を設立され、初代会長として会の運営と発展に尽力されていた。しかし、当初、国立大学医学部附属動物実験施設に専任の教授ポストが配置されていなかった。旧 7 帝大を先頭にして、また、国立大学動物実験施設協議会を背景にして、その必要性を訴える活動が延々となされた。そして、昭和 61 年 6 月に山田先生が新たに配置された専任教授のポストに就任され、翌年の昭和 62 年度から動物実験施設長を併任された。この頃、具体的には昭和 45 年から 61 年のことであるが、我が国の大学研究機関等の動物実験施設においてハンタウイルスの汚染が大きな問題になっていた。その中でも、札幌医科大学において、動物飼育担当者が不幸にも感染後に亡くられるというショッキングな出来事があった。このラットにおける微生物汚染は、全国的な対策が講じられたことにより一段落したと思われていたが、平成 5 年 1 月に、京都大学でのハンタウイルス汚染が新聞やテレビで大きく報道された。発端は、附属動物実験施設棟とは異なる臨床研究棟で維持されていたラットの動物実験施設棟への搬入依頼であった。ルーチンに行っていた微生物検査の結果、複数の病原体が陽性であったので、阪大微研にハンタウイルス抗体の追加検査を依頼したところ、それらのラットがすべて陽性であると診断された。それらのラットが維持されていたコロニーから提供を受けた別の教室のラットにも汚染が見つかったことから、医学部のみならず京都大学の全部局のラットを対象に調査を実施した。その結果、汚染が疑われるコロニーが複数見つかった。それらは、すべて閉鎖して厳格な消毒処置を講じた。従事者の血清抗体検査を実施したところ、感染を疑われる例があったが、幸いにも臨床症状を示すものではなかった。医学部附属動物実験施設の実験用ラットコロニーも閉鎖対象としたので、ラットを用いる研究は全面的に中断した。ハンタウイルス汚染を完全に断ち、その後の安全安心な飼育実験環境を確保する上では必須なことであると判断した結果である（文献 3）。

4) 第二世代を担う

平成 5 年 3 月末に山田淳三教授が定年退官された後、動物実験施設長は病理学教室の日合弘教授が就任された。その後、平成 5 年 9 月に芹川が教授に就任し、平成 6 年度から動物実験施設長を併任した。同時期の平成 6 年 4 月に北田一博助手が赴任した。翌年の平成 7 年 1 月 17 日に阪神淡路大震災が発生した。京都は無事であったが被害の大きかった神戸大学医学部附属動物実験施設の救援活動を滋賀医科大学の鳥居隆三先生から呼びかけられ、平成 7 年 1 月 22 日から 24 日にかけて、教職員 5 名を派遣した。動物実験施設における震災対策については、地震国の日本においては大変悩ましい問題である。平成 23 年 3 月 11 日の東日本大震災とその後の電力供給不足から、自家発電装置などの拡充が医学研究科内

で審議された。如何に非常時のバックアップを持てるかが従前からの大きなテーマである。

5) 附属動物実験施設棟の増築と改修

平成 9 年 11 月 7 日に開催された動物実験施設の開設 25 周年の記念講演会において、昼夜フルタイムで稼働してきた動物実験施設棟の設備は、すでに改修の時期が到来していることを報告した。その後、平成 14 年 1 月 1 日に北田助手が北海道大学の助教授として転出され、同年 4 月 1 日に庫本高志講師が国立がんセンター研究所から赴任、5 年後の平成 14 年 4 月 1 日には准教授に就任した。開設 25 周年から 5 年を経て、約 30 年間利用した附属動物実験施設棟の耐震工事、および拡張工事の計画が平成 13 年度から始まり、平成 14 年度に施行された。初期の動物実験棟は、地下 2 階、地上 4 階であり、地下は地上階よりも東側に広いスペースがあり、その上に地上階を追加することが可能なように設計されていた。そこに、鉄骨製で地上 4 階の増築をしたのである。改修にあたっては、以下の方針を示した。

(1) 広く

- ・医学研究科の動物飼育実験スペースの確保

(2) 美しく

- ・内も外も他の建物よりも美しく衛生的に
- ・安全性の確保（従事者と環境への配慮）
- ・臭いと動物アレルギーの除去、軽減

(3) 使いやすく

- ・機能性（動線の単純性）
- ・防犯対策
- ・研究継続への配慮
- ・経費節約（低いランニングコスト）

(4) 建築基準順守

既設部分と増築部分を一体化して、用途に応じた模様替えを行い、老朽化した建物の大規模な増改築を行った。感染実験領域の設置、洗浄滅菌室の移転整備、マウスとラット飼育領域の作業側から動物飼育棚への一方向気流システムの導入が主な改善点であった。全館におよぶ改修工事と増築工事を約 1 年間で終える必要があったので、収容されていた動物とスタッフはすべて動物実験施設棟外に出され、学内外に一時的な飼育実験施設や仮の居室を得た。この期間、最小限の飼育実験を行うことができるようにと様々な準備をした。しかしながら、所詮いずれも十分なものではなく、ユーザーとスタッフには、大変なご苦労をおかけすることになった。理想的には別の場所に新築した後に動物等を移動させ、その後に既存の建物を解体することが良いのではあるが、それが叶えられなかったことは

残念であった。建物の延床面積は、6,400 平方メートルから 9,400 平方メートル、約 1.5 倍大きくなり、動物の収容可能数も増大した。そして、増築改修された新動物実験施設棟を平成 15 年 7 月 7 日から本格的に利用するにあたって、医学部キャンパス内のマウスは SPF 動物に限定することや、飼育管理経費を一律に 1.2 倍に値上げして、安定した運営を行うための基盤を確保した。そして、平成 15 年 8 月から同キャンパス内の A 棟地下 SPF マウス領域を附属動物実験施設の管理下に移行して、平成 16 年 11 月から翌年の平成 17 年 3 月まで改修工事を行った。同様に、F 棟 3 階に設けられていた SPF マウス飼育実験施設については、平成 17 年度から同様に附属動物実験施設の一体管理下に置いて改修整備工事を行った。

6) 京都大学動物実験委員会と医学部における動物実験環境の整備拡充

平成 19 年 4 月からは、「京都大学における動物実験の実施に関する規程」に基づく、動物実験に関する教育訓練の実施、実験動物の飼養保管施設と動物実験室の承認、および動物実験計画書の審査が、医学研究科・医学部動物実験委員会で行われるようになり、本局に属する研究者のすべての動物実験は京都大学動物実験委員会の下で行われる体制となった。マウスの収容スペースについては、F 棟 3 階の SPF マウス領域としての利用を終えたことにも関連して、さらに確保する必要が生じて、A 棟の地下 SPF マウス飼育領域と動物実験施設棟の地下 1 階を整備した。まず、平成 20 年 9 月から 11 月の期間、狭くて作業性の悪かった A 棟洗浄滅菌室の整備を行ったが、空調設備は旧式のままであり更新の必要性が緊急課題として残されている。次に、平成 22 年 8 月から 11 月の期間、動物実験施設棟の地下 1 階領域に、専用の入退室経路を設けて他とは完全に区分して、個別隔離飼育装置を備えた SPF マウスの飼育実験領域を設置する改修工事を行った。そして、イヌ、ブタ、ウサギの飼育室を大きく囲いこみ、クリーンラット飼育室、クリーンマウス飼育室、微生物クリーニングのためのマウス待機室を、それぞれ整備配置した。これにより SPF マウスの収容数は増えることになったので、洗浄滅菌室に 4 基目の大型の両扉式高圧蒸気滅菌装置を設置して対処することにした。

平成 25 年 7 月には、新動物実験棟を利用してから 10 年目を迎えることになるが、実験動物を用いる研究の必要性が増しており、さらなる飼育実験スペースの拡大が求められている。動物実験施設棟の洗浄滅菌領域のスペースと機能を考慮すると、現状以上に小動物を飼育することは困難であるように思われる。必要に応じて、別棟の建設が検討されるのであろう。

7) 動物実験施設の管理業務を振り返って

附属動物実験施設の運営においては、関係者に大変ご協力を頂いた。そして、大きな出来事が生じた節目、節目では、歴代の医学研究科長と動物実験施設長に叱咤激励を頂き、また、ご支援を頂いた。動物実験施設の運営は昼夜を問わず休息を与えてくれるものではない。教職員、非常勤職員、派遣職員、業務委託のスタッフには、献身的にそれぞれの職

務を担当して頂いた。この支えなしに、巨大な動物実験施設を運営することができなかった。深く感謝申し上げる。スタッフには継続的な努力を引き続き求めざるを得ないが、それと共に、如何に備えを充実させておくかが極めて重要である。それには費用負担が大きい。しかし、付加価値の大きい動物実験であり、やり直すと多大なコストを要することを十分に認識して、判断することが必要である。

医学生物学の基礎研究と応用研究において、実験動物と動物実験は、そう簡単に役割を終えそうではないと思う。優れた研究の成果が益々得られることを心から祈念する。

2. 京都大学での研究活動

1) 感染症研究

先に述べたように、昭和 50 年の夏から秋に、会計検査官の指摘による動物実験施設棟の手直し工事が行われた。その際に、マウスの微生物モニタリングに使用され始めていた ELISA 法の習得を目的に、東京大学医科学研究所（医科研）獣医学研究部に派遣された。その期間中に、上田雄幹先生と当時大学院生であり本研究会の会員である三枝順三さんから、イヌブルセラ病について教わった。昼休みには、佐々 学先生の寄生虫学研究室にも顔を出して、ダニや蚊の飼育法、およびフィラリアの感染実験を覗かせて頂いた。短い期間ではあったが、全てが新鮮で大変に中身の濃い日々であった。

イヌブルセラ病の研究は、動物実験施設の検疫業務を展開して実施したものであった。先に述べたように、当時、保健所由来のイヌが毎月約 100 頭前後搬入されていた。イヌブルセラ菌 *Brucella canis* の検出率は、約 2.8% (33 / 1,186 頭、岐阜県と滋賀県由来) であった (文献 4)。イヌブルセラ菌に感染した雄犬が抗精子自己免疫疾患を呈することを、自然感染犬と実験感染犬を用いて明らかにした (文献 5)。教務職員の村口武彦さんに加えて、大阪府立大学の同級生であった田辺製薬の高田 博さんが主な共同研究者であった。当時、田辺製薬安全性研究所の皆さんは、私たちの研究を随分サポートして下さい。不要となったビーグル犬を譲りうけるためにトラックで何度も出かけた。時には、採取した凍結組織片を持参して、クリオスタットによる標本作成と蛍光顕微鏡による観察を実施させてもらった。研究費はなく、ビーグル犬を購入することはできず、必要な実験機器を持っていなかったからである。研修に来ていた日本農産工業株式会社の入江泰浩さんの紹介で、横浜までビーグル犬をトラックで貰いに行ったこともあった。岩倉の開業獣医師で、ご逝去された中尾 登先生も若かりし頃、本病の調査研究に参加して頂いた。市販されていなかった FITC 標識抗イヌ IgA ウサギ抗体を、IgA の精製から手掛けて作製した。そして、イヌブルセラ感染犬の精管や尿沈査中に見つかる頭部対頭部の自己凝集精子に反応させた。凝集精子の頭部アクロソームが蛍光を発して見えた時は、期待どおりでバンザイをして喜んだ (文献 6)。血清中の精子凝集抗体の力価を調べるためには、正常な新鮮精子が必要であった。そこで、容易に精液を採取してくれる便利なビーグル犬を 2 頭準備して、いつでも研究することができるようにもした。しかし、イヌを用いた感染実験を本格的に実施で

きる環境を動物実験施設に求め続けることには無理があった。丁度その頃、ブルセラ病の国際学会がアルジェリアのアルジェで開かれることを知り、主な成果であるブルセラ感染犬の自己免疫性雄性不妊について発表することを区切りにして、本研究に一段落を付けた。

初めての外国旅行で、初めての国際学会の発表であった。学会参加後はサハラ砂漠に少し立ち寄り、英国とドイツの研究所を訪問して、その後の研究テーマを見つけようという計画であった。しかし、アルジェでは、WHO の人獣共通感染症担当の藤倉孝夫先生に手厳しく指導された。サハラ砂漠行きはキャンセルさせられ、アルジェのパスツール研究所でのブルセラ病会議にほぼ強制的に参加させられた。バスの窓から写真を撮るな、他の外人メンバーがいるところで自分（藤倉先生）に日本語で話しかけるな、見知らぬ外人からの頼まれごとは請け負うなと言われた。自分では気付かなかった平和ボケを叱られた。真剣に指導を受けたこと、大変ありがたかった。

英国では農水省のブルセラ病研究部門と MRC 毒性部門の Michael Festing 博士の研究室、ドイツではハノーファーにあった実験動物センターを訪れた。それぞれ、今後の研究テーマのヒントを見つけ出すための訪問であった。ハノーファーでは、Zitter rat を譲ってほしいと申し出た。京大で同じく体が震えるラット Tremor rat が発見されており（文献7）、両者の比較研究を帰国後にしたいと思ったからである。代わりに、Tremor rat を提供しようと言うと、日本では実験用ラットにおけるハンタウイルスが問題となっているようだから、要らないと言われた。独自でやれることになったのは、ラッキーだったかも知れない。

2) ラットの遺伝学研究

京都大学では、山田淳三先生が京都に赴任された時からラットの遺伝学研究を始められていた。農学部畜産学科の学生に対する卒論研究指導も行われていた。学生がやってくる前は、山田先生と二人で、Jan Klein 著の *Biology of the Mouse Histocompatibility-2 Complex*. (Springer-Verlag, 1975) を教科書にして勉強会を開いていた。勿論、その後は、先斗町の「チャップリン」や木屋町の「サンボア」でのウイスキーに浸った。そういった背景もあり、イヌブルセラ病研究の次の研究テーマとして、実験動物を用いた遺伝学研究を密かに候補として検討していた。

帰国後、待ち焦がれた Zitter rat がドイツから届き、Tremor hetero rat との交配実験によって得た F1 世代にミュータントが生じなかったことから、それぞれの原因遺伝子は異なると推定した。そして、両ラットの原因遺伝子を共にホモに持つラット SER（自然発症てんかんラット）の誕生に至った（文献8）。地下1階のラット飼育室で、ダブルミュータントと思われるラットがケージ内で激しいてんかん発作を次々起こすのを見て大変驚嘆した。誰かにすぐに知らせたくて、ウズウズしていた。28 年も前のことだが、よく覚えている。当時、附属動物実験施設長が初代の藤原元典先生から薬理学教室の高折修二先生にバトンタッチされていた。そこで、高折先生に相談して、薬理学教室の助教授だった笹 征史先生、大学院生であった大野行弘さんらとの共同研究が始まった。笹先生は広島大学の教授に就

任された後も、SER に大変興味を持っていただき、薬理学的解析と抗てんかん薬の評価系として確立する研究を継続して頂いた（文献 9）。大事な SER だということで、週の初めは京都のご自宅から京大に立ち寄り、待たせておいたタクシーに SER を乗せ京都駅へ、そして新幹線で広島大学まで出勤ということを普通にされていた。中国医科大学に SER をプレゼントしたことを感謝され、笹先生と私は共に瀋陽に招かれ客座教授の称号付与式典に参列するという機会も与えられた。現在まで、てんかん研究の指導を受けていること、大変感謝している。SER という名称は、高折先生、笹先生、そして私の 3 名が相談して決めた。高折先生は妙な略語ではないであろうかと、辞書と睨めっこで調べられ OK となった。一応、Spontaneously Epileptic Rat の略としているが、Sasa と Serikawa あるいは Shuji の S が加味されていて、気に入っている。大阪薬科大学の教授となられた大野先生とは、今もてんかんモデルラット研究の良きパートナーとして研究を展開していただけることは大変嬉しい。

私達のグループは、なぜ、SER がてんかん様の発作症状を起こすのかを知りたくて、原因遺伝子の同定を目指した。しかし、SER 誕生当時、ラットの遺伝多型マーカーは毛色遺伝子、生化学遺伝子、免疫関係遺伝子に限られており、ポジショナルクローニングは無謀な試みであった。そこで、山田先生の研究テーマ、ラットの遺伝マーカーの開発、ラット遺伝子地図の構築研究に参加した。研究生の二階堂浩子さん、近藤 靖さん、濱田修一さん、畜産学科の学部学生および修士の学生がそのプロジェクトを担当されていた。その後、森政之さんが医学研究科の博士課程に進まれることになった。山田先生は森さんにサザンハイブリダイゼーションによる RFLP（Restriction Fragment Length Polymorphism、制限酵素断片長多型）の系をラボで立ち上げるよう指示された。そして、ラットにおいて遺伝子に直結する DNA マーカーが取り扱えるようになった（文献 10）。

フランスのパスツール研究所の哺乳動物学部門への留学が、研究の大きな展開をもたらした。部門長の Jean-Louis Guénet 先生は、獣医師でありマウスの遺伝学者であった。Guénet 先生は、マウスのマイクロサテライトマーカーを解析するための PCR プライマーをラットに適用するというアイデアで、ラットにおける相同な領域の遺伝マーカーの開発と比較ゲノムマッピングを目指すことを提案された。確かに、マウスのマイクロサテライトを増幅するための PCR プライマーセットは、ラットにおいても PCR 産物が得られ、ラット系統間に多型も見つかった（文献 11）。しかし、マウスのマイクロサテライトマーカーのすべてが、ラットに適用できるわけではなかった。

そこで、直接的にラット遺伝子のシークエンスデータからマイクロサテライト領域を抽出して新規のラット遺伝子マーカーを開発したいと思った。留学中にロンドンで開催されたラット会議に参加した際、ベルギーの Joziane Szpirer 博士からパリのヒト多型研究所の Mark Lathrop 博士のチームがそのような試みをしていると教えてくれた。パリに戻るや Lathrop 博士を訪問して、イスラエルから来ていた Jacques Beckmann 博士にラット遺伝子シークエンスデータベースの調査状況を直接見せてもらい、共同研究を始めることにし

た。その後は、パスツール研究所とヒト多型研究所の両方に出入りすることになり、多忙な毎日が始まった。パスツール研究所では、Guénet 先生、助手の Xavier Montagutelli 博士、研究助手の Dominique Simon-Chazottes さんに変にお世話になった。毎日忙しいとは言え、研究だけをしておれば良いのだから、気楽で楽しいものであった。家族と共に日本人学校のあるベルサイユ近くの一軒家に住み、週末は、レンタカーでショッピングと小旅行を楽しんだ。

今では普通に利用されている 96 穴の PCR 装置が出始めた頃で、それをフル稼働させて解析を行った。夢の中にも電気泳動後のバンドが星空のごとく出てきた。京大チームが作製したラット系統間の交配データとゲノムサンプル、および大学院生の安江正明さんが作製したマウスとラット体細胞クローンパネルを活用して、ラットマイクロサテライトを利用した世界で最初の染色体番号が付いたラット遺伝子地図の基盤を作製した。我々ヨーロッパとの共同研究グループは Nature 誌（文献 12）に、米国グループは Cell 誌に高血圧モデルラットにおける血圧感受性遺伝子のマッピング論文を、ほぼ同時に発表した。そして、ラットの遺伝子地図およびラット・マウス・ヒト比較遺伝子地図として纏めた論文は、日本チーム（庫本高志さん、森 政之さん、山田淳三先生と私）とヨーロッパチームにより Genetics 誌に発表した（文献 13）。それ以降は、ラット遺伝子地図と比較ゲノム地図を高密度なものとするのに力が注がれた（文献 14）。さらに、染色体の位置情報を持つ遺伝子地図を作製（文献 15）した頃には、網羅的にマウスマイクロサテライトマーカーの開発が米国で進み、BN ラットの全ゲノムシーケンズプロジェクトに行き着いた。

ラットの遺伝多型マーカー、遺伝子地図、比較ゲノム地図が整備されると、自然発症ミュータントラットの原因遺伝子の染色体マッピングが進み、ポジショナルクローニング法あるいはポジショナル候補遺伝子探索法により原因遺伝子の変異を、私達の研究チームで次々と明らかにした。そして、対象あるいは関連するヒト疾患の発症機構の解明に大きく貢献した。

TRM ラット (Chr 10, *Aspa* 他, 文献 16)、*ZI/mv* ラット (Chr 3, *Atrn*, 文献 17; 文献 18)、KDP ラット (Chr 11, *Cblb*, 文献 19)、KZC ラット (Chr 4, *Reln*, 文献 20)、beige ラット (Chr 17, *Lyst*, 文献 21)、TM ラット (Chr 1, *Rab38*, 文献 22)、*cvd/hob* ラット (Chr 2, *Unc5h3*, 文献 23)、*qc* ラット (Chr 13, *Lmx1a*, 文献 24)、*dfk* ラット (Chr 1, *Kenq1*, 文献 25)、SCR ラット (Chr 15, *Fdft1*; Chr20, *Lss*; 文献 26)、groggy ラット (Chr 19, *Cacna1a*, 文献 27)、*dmy* ラット (Chr 17, *Mrs2*, 文献 28)、*swh* ラット (Chr 17, *Edaradd*, 文献 29)。

一方、研究室に戻ってきた真下知士さんが先導役になり、新規の疾患モデルラットを開発するプロジェクトを推し進めた。まず、化学変異原エチルニトロソウレア誘発ミュータジェネシスにより、約 1 万セットの精子と DNA のセットからなる Kyoto University Rat

Mutant Archive (KURMA) を作製して、DNA の変異スクリーニング法 (MuT-POWER 法、文献 30) と顕微授精法により新規疾患モデルラットを研究者の要望により開発するシステムを構築した。そして、私達の研究チームのメンバーや共同研究者の興味により作製した、大腸がん (*Apc* 遺伝子、文献 31, 32, 33)、熱性けいれん (*Scn1a* 遺伝子、文献 34, 35, 36)、てんかん (*Lgi1* 遺伝子、文献 37)、および高脂血症 (*Ldlr* 遺伝子、文献 38) のラットモデルについて、解析・応用研究の成果を発表した。さらに、脱毛、ライノ様皮膚、巣状糸状体硬化症を示すラットや発作性運動失調症 *Episodic ataxia type 1* のモデルと思われるラットが KURMA の作製過程において見出され、ポジショナルクローニングにより前者に *Hr* 遺伝子変異 (文献 39)、後者に *Kcna1* 遺伝子変異 (文献 40) を、それぞれ同定した。

次いで、人工ヌクレアーゼ ZFN を用いる方法により、*Ir2rg* と *Prkdc* を標的にして重度免疫不全ラットを作製した (文献 41, 42)。このような ES 細胞を介さない新規の遺伝子改変技術は、TALEN 法、さらに CRISPR/Cas システムへと、急速に発展している。これらの新技術においては、選抜育種によって開発された疾患モデルラットを対象にして、直接、標的遺伝子をつつあるいは複数同時に操作することができるので大変魅力的である。

3) ナショナルバイオリソースプロジェクト「ラット」(NBRP-Rat)

平成 14 年 7 月に、ナショナルバイオリソースプロジェクトが発足したが、そのうち、ラットの中核機関として附属動物実験施設が選ばれ、第 1 期 (平成 14~18 年度) と第 2 期 (平成 19~23 年度) は、芹川を課題管理者として、ラット系統の収集、保存、提供の事業を運営した (文献 43, 44)。平成 24 度からの第 3 期は庫本准教授が課題管理者を担い、現在、真下特定准教授、金子武人特定講師、竹鶴裕亮特定研究員、ビルガーフォークト研究員、吉見一人研究員 (平成 25 年度から) らが附属動物実験施設の技術系職員の支援を得て執行している。今や、収集したラットの系統数は 650 系統を超える世界最大規模のラットリソースセンターとなり、国内外のラット研究に貢献している。もちろん、飼育スペースに余裕がないので、選別した系統のみが生体で維持されており、他の系統は胚と精子による保存として、依頼に応じて個体復帰して提供している。収集したラット系統の体重、行動、血圧、血液、尿などについての 119 項目の検査値 (文献 45) と DNA 多型マーカー SSLP によるゲノムプロファイル (文献 46) を調べて、一般系統情報と共に NBRP-Rat のホームページにて公開している (<http://www.anim.med.kyoto-u.ac.jp/NBR>)。新規の遺伝子改変ラットも順次寄託して、提供できるようにしている。ラットの提供と保存に関連する技術やラットゲノム情報の整備も NBRP の公募課題に別途採択されて行ってきた。実験用ラットのゲノム情報基盤整備として、F344/Stm と LE/Stm の BAC クローンライブラリーの作製、その末端配列のシークエンス、並びに、全ゲノムシークエンスを順次行った。特に、F344/Stm のゲノムシークエンスデータは、非常に信頼性が高いと評価され、今後、実験用ラット系統の標準ゲノムシークエンスになると期待している。金子武人さんによるフリーズドライ精子の保存法の実用化も重要な技術基盤研究の成果である (文献 47)。

4) 研究活動を振り返って

山田淳三先生とたった二人で始まった研究室が京都大学医学研究科・医学部の基幹講座「実験動物学」となり、優秀な博士や修士を輩出するに至ったことは大変喜ばしい。ここに述べた研究業績は、文献に示したごとく実験動物学教室の歴代のスタッフ、研究生、大学院生、および国内外の大変多くの方々との共同研究によるものである。皆様の格別のご努力に敬意を表し、また、ご協力に心より感謝を申し上げる。そして、研究活動をご支援して頂いた関係機関、関係各位に深く御礼を申し上げる。

おわりに

本稿は、平成 24 年 12 月の第 116 回関西実験動物研究会における表題の講演記録として纏めたものである。前段の「京都大学における動物実験の管理業務」については、京都大学医学研究科附属動物実験施設報第 10 号に執筆した「附属動物実験施設の運営 40 年」から、後段の「京都大学での研究活動」については、定年退職時に纏めた研究業績集の「研究活動を振り返って」からの内容を取り込み、加筆、改訂した。

文献

1. 芹川忠夫、山田淳三：セミバリア方式のマウス、ラット共同利用実験施設におけるセンダイウイルス汚染事とその対策、中川雅郎他編、実験動物施設の微生物コントロールとその実際、p161-171、清至書院、東京、1984
2. Serikawa T, Kitada K, Muraguchi T, Yamada J: A survey of *Pneumocystis carinii* infection in research mouse colonies in Japan. *Lab Anim Sci*, **41**: 411-414, 1991
3. 芹川忠夫、山田淳三：「資料」京都大学医学部におけるラットおよびヒトの腎症候性出血熱ウイルス抗体陽性例の検出とその対策に関する報告、*Exp Anim* **42**: 665-671, 1993
4. Serikawa T, Muraguchi T, Nakao N: A survey of dogs from Gifu and Shiga areas for *Brucella canis*. *Jpn J Vet Sci* **39**: 635-642, 1977
5. Serikawa T, Muraguchi T, Yamada J, Takada H: Sperm agglutination and sperm agglutinating activity in male dogs experimentally infected with *Brucella canis*. *Jpn J Vet Sci* **43**: 469-490, 1981
6. Serikawa T, Kondo Y, Takada H, Yamada J: Head-to-head type auto-spermagglutination with IgA antibody to acrosome induced by *Brucella canis* infection. *Jpn J Vet Sci* **46**: 41-48, 1984
7. Yamada J, Serikawa T, Ishiko J, Inui T, Takada H, Kawai Y, Okaniwa A: Rats with congenital tremor and curled whiskers and hair. *Exp Anim* **34**: 183-188, 1985
8. Serikawa T, Yamada J: Epileptic seizures in rats homozygous for two mutations, zitter and tremor. *J Hered* **77**: 441-444, 1986

- 9 . Sasa M, Ohno Y, Ujihara H, Fujita Y, Yoshimura M, Takaori S, Serikawa T, Yamada J: Effects of antiepileptic drugs on absence-like and tonic seizures in the spontaneously epileptic rat, a double mutant rat. *Epilepsia* **29**: 505-513, 1988
- 1 0 . Mori M, Ishizaki K, Yamada T, Chen H, Sugiyama T, Serikawa T, Yamada J: Restriction fragment length polymorphisms of the angiotensinogen gene in inbred rat strains and mapping of the gene on chromosome 19q. *Cytogenet Cell Genet* **50**: 42-45, 1989
- 1 1 . Kondo Y, Mori M, Kuramoto T, Yamada J, Beckmann JS, Simon-Chazottes D, Montagutelli X, Guénet JL, Serikawa T: DNA segments mapped by reciprocal use of microsatellite primers between mouse and rat. *Mamm Genome* **4**: 571-576, 1993
- 1 2 . Hilbert P, Lindpaintner K, Beckmann JS, Serikawa T, Soubrier F, Dubay C, Cartwright P, De Gouyon B, Julier C, Takahashi S, Vincent M, Georges D, Lathrop MG: Chromosomal mapping of two genetic loci associated with blood-pressure regulation in hereditary hypertensive rats. *Nature* **353**: 521-529, 1991
- 1 3 . Serikawa T, Kuramoto T, Hilbert P, Mori M, Yamada J, Dubay CJ, Lindpaintner K, Ganten D, Guénet JL, Lathrop GM, Beckmann JS: Rat gene mapping using PCR-analyzed microsatellites. *Genetics*, 131: 701-721, 1992
- 1 4 . Yamada J, Kuramoto K, Serikawa T: A rat genetic linkage map and comparative maps for mouse or human homologous rat genes. *Mamm Genome* **5**: 63-83, 1994
- 1 5 . Andoh Y, Kuramoto T, Yokoi N, Maihara T, Kitada K, Serikawa T: Correlation between genetic and cytogenetic maps of the rat. *Mamm Genome*, 9: 287-293, 1998
- 1 6 . Kitada K, Akimitsu T, Shigematsu Y, Kondo A, Maihara T, Yokoi N, Kuramoto T, Sasa M, Serikawa T: Accumulation of N-acetyl-L-aspartate in the brain of the tremor rat, a mutant exhibiting absence-like seizure and spongiform degeneration in the central nervous system. *J Neurochem* **74**: 2512-2519, 2000
- 1 7 . Kuramoto T, Kitada K, Inui T, Sasaki Y, Ito K, Hase T, Kawaguchi S, Ogawa Y, Nakao K, Barsh GS, Nagao M, Ushijima T, Serikawa T: Attractin/Mahogany/Zitter plays a critical role in myelination of the central nervous system. *Proc Natl Acad Sci USA* **98**: 559-564, 2001
- 1 8 . Kuwamura M, Maeda M, Kuramoto T, Kitada K, Kanehara T, Moriyama M, Nakane Y, Yamate J, Ushijima T, Kotani T, Serikawa T: The myelin vacuolation (*mv*) rat with a null mutation in the attractin gene. *Lab Invest* **82**: 1279-1286, 2002
- 1 9 . Yokoi N, Komeda K, Wang HY, Yano H, Kitada K, Saitoh Y, Seino Y, Yasuda K,

- Serikawa T, Seino S: *Cblb* is a major susceptibility gene for rat type 1 diabetes mellitus. *Nature Genet* **31**: 391-394, 2002
- 2 0 . Yokoi N, Namae M, Wang HY, Kojima K, Fuse M, Yasuda K, Serikawa T, Seino S, Komeda K: Rat neurological disease creeping is caused by a mutation in the reelin gene. *Brain Res Mol Brain Res* **112**:1-7, 2003
- 2 1 . Mori M, Yamasaki K, Nakanishi S, Kitada K, Higuchi K, Namiki C, Hamada S, Serikawa T: A new beige mutant rat ACI/N-*Lyst^{bg-Kyo}*. *Exp Anim*, 52:31-36, 2003
- 2 2 . Oiso N, Riddle SR, Serikawa T, Kuramoto T, Spritz RA: The Rat Ruby (*R*) Locus is *Rab38* Identical Mutations in Fawn-Hooded and Tester-Moriyama Rats Derived from an Ancestral Long Evans Rat Sub-Strain. *Mamm Genome* **15**: 307-314, 2004
- 2 3 . Kuramoto T, Kuwamura M, Serikawa T: Rat neurological mutations cerebellar vermis defect and hobble are caused by mutations in the netrin-1 receptor gene *Unc5h3*. *Brain Res Mol Brain Res* **122**: 103-108, 2004
- 2 4 . Kuwamura M, Muraguchi T, Matsui T, Ueno M, Takenaka S, Yamate J, Kotani T, Kuramoto T, Guénet JL, Kitada K, Serikawa T: Mutation at the *Lmx1a* locus provokes aberrant brain development in the rat. *Brain Res Dev Brain Res* **155**: 99-106, 2005
- 2 5 . Gohma H, Kuramoto T, Kuwamura M, Okajima R, Tanimoto N, Yamasaki K, Nakanishi S, Kitada K, Makiyama T, Akao M, Kita T, Sasa M, Serikawa T: WTC deafness Kyoto (*dfk*): a rat model for extensive investigations of *Kcnq1* functions. *Physiol Genomics* **24**: 198-206, 2006
- 2 6 . Mori M, Li G, Abe I, Nakayama J, Guo Z, Sawashita J, Ugawa T, Nishizono S, Serikawa T, Higuchi K, Shumiya S: Lanosterol synthase mutations cause cholesterol deficiency-associated cataracts in the Shumiya cataract rat. *J Clin Invest* **116**: 395-404, 2006
- 2 7 . Tokuda S, Kuramoto T, Tanaka T, Kaneko S, Takeuchi IK, Sasa M, Serikawa T: The ataxic groggy rat has a missense mutation in the P/Q-type voltage gated Ca^{2+} channel α_{1A} subunit gene and exhibits absence seizures. *Brain Res* **1133**: 168-177, 2007
- 2 8 . Kuramoto T, Kuwamura M, Tokuda S, Izawa T, Nakane Y, Kitada K, Akao M, Guénet JL, Serikawa T: A mutation in the gene encoding mitochondrial Mg^{2+} channel MRS2 results in demyelination in the rat. *PLoS Genet* **7**:e1001262, 2011
- 2 9 . Kuramoto T, Yokoe M, Hashimoto R, Hiai H, Serikawa T: A rat model of hypohidrotic ectodermal dysplasia carries a missense mutation in the *Edaradd* gene. *BMC Genetics* **12**: 91, 2011

- 3 0 . Mashimo T, Yanagihara K, Tokuda S, Voigt B, Takizawa A, Nakajima R, Kato M, Hirabayashi M, Kuramoto T, Serikawa T: An ENU-induced mutant archive for gene targeting in rats. *Nat Genet* **40**: 514-515, 2008
- 3 1 . 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* **100**: 2022-2027, 2009
- 3 2 . Yoshimi K, Hashimoto T, Niwa Y, Hata K, Serikawa T, Tanaka T, Kuramoto T: Use of a chemically induced-colon carcinogenesis-prone *Apc*-mutant rat in a chemotherapeutic bioassay. *BMC Cancer* **12**: 448, 2012
- 3 3 . Yoshimi K, Tanaka T, Serikawa T, Kuramoto T: Tumor suppressor APC protein is essential in mucosal repair from colonic inflammation through Angiogenesis. *Am J Pathol* **182**:1263-1274, 2013
- 3 4 . Mashimo T, Ohmori I, Ouchida M, Ohno Y, Tsurumi T, Miki T, Wakamori M, Ishihara S, Yoshida T, Takizawa A, Kato M, Hirabayashi M, Sasa M, Mori Y, Serikawa T: A missense mutation of the gene encoding voltage-dependent sodium channel (Nav1.1) confers susceptibility to febrile seizures in rats. *J Neurosci* **30**: 5744-5753, 2010
- 3 5 . Ohno Y, Sofue N, Ishihara S, Mashimo T, Sasa M, Serikawa T: *Scn1a* missense mutation impairs GABAA receptor-mediated synaptic transmission in the rat hippocampus. *Biochem Biophys Res Commun* **400**: 117-122, 2010
- 3 6 . Hayashi K, Ueshima S, Ouchida M, Mashimo T, Nishiki T, Sendo T, Serikawa T, Matsui H, Ohmori I: Therapy for hyperthermia-induced seizures in *Scn1a* mutant rats. *Epilepsia* **52**:1010-1017, 2011
- 3 7 . Baulac S, Ishida S, Mashimo T, Boillot M, Fumoto N, Kuwamura M, Ohno Y, Takizawa A, Aoto T, Ueda M, Ikeda A, LeGuern E, Takahashi R, Serikawa T. A rat model for LGI1-related epilepsies. *Hum Mol Genet* **21**: 3546-3557, 2012
- 3 8 . Asahina M, Mashimo T, Takeyama M, Tozawa R, Hashimoto T, Takizawa A, Ueda M, Aoto T, Kuramoto T, Serikawa T. Hypercholesterolemia and atherosclerosis in low density lipoprotein receptor mutant rats. *Biochem Biophys Res Commun* **418**: 553-558, 2012
- 3 9 . Kuramoto T, Kuwamura M, Tagami F, Mashimo T, Nose M, Serikawa T: Kyoto rhino rats derived by ENU mutagenesis undergo congenital hair loss and exhibit focal glomerulosclerosis. *Exp Anim* **60**: 57-63, 2011.
- 4 0 . Ishida S, Sakamoto Y, Nishio T, Baulac S, Kuwamura M, Ohno Y, Takizawa A, Kaneko S, Serikawa T, Mashimo T: *Kcna1*-mutant rats dominantly display myokymia, neuromyotonia and spontaneous epileptic seizures. *Brain Res* **1435**:

154-166, 2012

- 4 1 . Mashimo T, Takizawa A, Voigt B, Yoshimi K, Hiai H, Kuramoto T, Serikawa T: Generation of knockout rats with X-linked severe combined immunodeficiency (X-SCID) using zinc-finger nucleases. *PLoS One* **5**: e8870, 2010
- 4 2 . Mashimo T, Takizawa A, Kobayashi J, Kunihiro Y, Yoshimi K, Ishida S, Tanabe K, Yanagi A, Tachibana A, Hirose J, Yomoda J, Morimoto S, Kuramoto T, Voigt B, Watanabe T, Hiai H, Tateno C, Komatsu K, Serikawa T: Generation and characterization of severe combined immunodeficiency rats. *Cell Rep* **2**: 685-694, 2012
- 4 3 . Serikawa T: Colourful history of Japan's rat resources. *Nature* **429**: 15, 2004
- 4 4 . Serikawa T, Mashimo T, Takizawa A, Okajima R, Maedomari N, Kumafuji K, Tagami F, Neoda Y, Otsuki M, Nakanishi S, Yamasaki K, Voigt B, Kuramoto T: National BioResource Project-Rat and related activities. *Exp Anim* **58**: 333-341, 2009
- 4 5 . Mashimo T, Voigt B, Kuramoto T, Serikawa T: Rat Phenome Project: the untapped potential of existing rat strains. *J Appl Physiol* **98**: 371-379, 2005
- 4 6 . Mashimo T, Voigt B, Tsurumi T, Naoi K, Nakanishi S, Yamasaki K, Kuramoto T, Serikawa T: A set of highly informative rat simple sequence length polymorphism (SSLP) markers and genetically defined rat strains. *BMC Genetics* **7**: 19, 2006
- 4 7 . Kaneko T, Serikawa T: Successful long-term preservation of rat sperm by freeze-drying. *PLoS One* **7**: e35043, 2012

Introduction of the Education Program for Animal Experiment in Seoul National University

Jung Sun MIN¹, Seung Hyeok SEOK², Su-Cheong YEOM², Jeong-Hwan CHE¹,
Chung-Gyu PARK^{1,2}, Hak CHANG^{1,2}, Kook Hyun LEE^{1,2}, Kang, Byeong-Cheol^{1,2,*}

¹*Department of Experimental Animal Research, Biomedical Research Institute, Seoul National University Hospital, Seoul, 110-744, Korea*

²*College of Medicine, Seoul National University, Seoul, 110-799, Korea*

* Corresponding author: Byeong-Cheol Kang

Graduate School of Immunology, Seoul National University College of Medicine, Seoul, 110-799, Korea
[Tel. : +82-2-2072-0841; Fax : +82-2-741-7620, E-mail : bckang@snu.ac.kr]

DEAR, BRI, SNUH supports various kinds of animal experiments from rodent to Non-human primates. Our institution has operated professional education program of animal experiment techniques for researchers who are planning animal experiments since 1998 opening era of institute. In Korea, since 2008, enforced "Animal Protection Laws" contained that the responsibility of completing an animal experimental techniques education before performing animal experiments. Following law amendment, the steering committee decide on policies of institution made it mandatory to finish the educational program include conforming to 3R standard strongly and emphasizing "Refinement". In other words, the policy was established that new researchers who want use our facility should complete "Animal Experimental Technique Workshop". It was divided into rodents or rabbits or dogs and pigs. Workshop with rodents is held once a month, and the others are held once a half-year. Educational contents were constituted that Introduction of IACUC and Ethical education, Sex classification, Individual identification, Observation, Restraints, Administration, Blood sampling, Anesthesia, Euthanasia and Necropsy with principle and practice. For 3 years, total 1,148 researchers were underwent this workshop. As managing the serial number of program completion strictly, researcher who did not take a course of program was forbidden to enter or leave our facility. Overall assessment items, for example, "Lecture contents", "Process method", "Level of occasion" and etc were showed high satisfaction through the survey against education participants. However opinions about the lack of practice time were expressed constantly by participants, so that we are considering adjustment of education time. Besides, it was determined that they want to know and learn about various surgical techniques, specific anatomical methods, recovery after anesthesia, organ dissection, tissue processing and etc. We lead researchers to be available to perform animal experiments with the establishment of right animal experiment culture and ethics 3R standards-based through our workshop program, and we're confident about operating educational workshop center which has the best level of know-how and history.

LGI1 変異ラット音刺激誘発けいれんモデルにおける c-Fos 免疫染色による解析

○麓直浩^{1,2}、真下知士¹、増井淳³、水口祐登³、南本翔子³、石田紗恵子¹、池田昭夫²、高橋良輔²、大野行弘³、芹川忠夫¹（¹京大院・医・動物実験施設、²同・臨床神経学、³大阪薬科大学・薬品作用解析学）

【背景・目的】ヒト常染色体優性外側側頭葉てんかん（ADLTE）は聴覚症状等から始まる部分発作を呈する遺伝性部分てんかんで、外側側頭葉に焦点が指摘される。LGI1 は ADLTE の原因遺伝子の一つで、これまで様々な挿入・欠失・置換変異が報告されている。近年、真下らは Gene-driven ENU (N-ethyl-N-nitrosourea) ミュータジェネシス法により、LGI1 遺伝子に L385R ミスセンス変異をもつラットを作製することに成功した。さらに、LGI1 変異ラットは音刺激でてんかん発作が誘発されることを発見した。本研究では、LGI1 変異ラットの音刺激発作時に脳で興奮する部位を明らかにするため、電極埋込み脳波や神経興奮のマーカー蛋白である c-Fos の免疫染色解析を施行した。また、発作のメカニズムを解明するため mRNA マイクロアレイ遺伝子発現解析を行なった。

【方法】LGI1 変異（ヘテロ）ラットと対照群の F344 ラットについて、音刺激無しの A 群（LGI1 変異 n=8、F344 n=6）、16 日齢プライム刺激（120 dB, 10kHz, 1min.）のみの B 群（各 n=7, 15）、プライム刺激及び 8 週齢音刺激（120dB, 10kHz, 5 min.）の C 群（各 n=7, 7）に分けた。A、B 群は 8 週齢時に脳を採取し、C 群は 8 週齢時の音刺激 2 時間後に脳採取した。4 % パラホルムアルデヒドで固定後、脳組織切片において c-Fos 免疫染色を行い、全脳 34 部位で染色陽性細胞数を計測した。LGI1 がてんかん原性に関与するメカニズムを更に検討するため、上記部位にて mRNA 発現量のマイクロアレイ解析を施行した。

【結果・考察】プライム刺激及び 8 週齢音刺激の C 群において、LGI1 変異ラット全頭が wild running 後に強直間代発作（GTCS）を示したが、F344 ラットは wild running のみを示した。発作時脳波では、外側側頭葉と前頭葉とでてんかん性放電発生に時間差を認めなかった。c-Fos 免疫染色解析の結果、LGI1 変異ラットでは F344 ラットと比較して 8 週齢時の音刺激により、聴覚皮質、嗅周皮質、嗅内皮質、感覚皮質、無顆粒性島皮質で染色細胞数に有意な上昇を認めた。これらの結果は、ヒト ADLTE で外側側頭葉の異常発火が指摘されている事実を考慮すると、ADLTE 動物モデルとしての LGI1 変異ラットの有用性を示唆している。また、LGI1 変異ラットで音刺激誘発 GTCS 後に c-Fos 染色細胞数が増加を示した部位は、従来報告されている聴覚性ニューロンネットワークと矛盾しておらず、2 次性の GTCS 発症メカニズムとの関連性が示される。マイクロアレイ解析では、LGI1 関連遺伝子は LGI1 変異や発作の有無での変動を認めない一方で、てんかんと関連が報告された 8 つの遺伝子が LGI1 変異ラットの発作に伴い変動した。現在、これらてんかん関連遺伝子と LGI1 変異ラットにおける音刺激誘発けいれん発症メカニズムについて検討している。

TRM ラットにおける欠神てんかんの遺伝要因

○庫本高志、横江繭子、芹川忠夫（京都大院・医・動物実験施設）

TRM ラットは、不妊、被毛異常、本態性振戦、欠神発作を示すミュータント系統である。垂系統の TRMR ラットは、不妊と被毛異常は示すが、本態性振戦や欠神発作を示さない。我々はこれまでに、TRM と TRMR を用いた遺伝解析から、本態性振戦の遺伝要因として、K⁺チャネルである Hcn1 遺伝子のミスセンス変異（チャネル機能喪失）とアセチルアスパラギン酸(NAA)の分解酵素である Aspa 遺伝子の欠失変異を見出した。TRM 系はこの両変異を有するために、本態性振戦を発症するが、TRMR 系は Aspa 変異のみ有するので本態性振戦を発症しない。

今回、欠神発作についても、同様の解析を行った。(TRM x TRMR)F1 x TRM 戻し交雑子 25 頭について、15 週齢時に硬膜上に埋め込んだ電極から脳波を測定(30 分間を 2 回)した。脳波上の spikes-and-waves discharge (SWD) を欠神発作発症の指標とし、出現回数と持続時間を測定した。

欠神発作を示す個体は 14 頭、示さない個体は 11 頭であり、欠神発作の有無と Hcn1 変異の有無は完全に一致していた。また、Aspa/Hcn1 ダブル KO マウスを作製し、その脳波を測定したところ、SWD が観察された。以上のことから、Aspa 変異のみ、Hcn1 変異のみでは欠神発作は発症せず、両者が組合わさることで、欠神発作が発症すると結論した。TRM ラットでは、欠神発作は 2 つの遺伝子変異の組み合わせで発症するオリゴジェニック疾患であることが示された。

ヒトの欠神てんかんの発症においても、オリゴジェニックモデルが提唱されている。今後、TRM 系とは異なる遺伝的背景を持つ系統に、Aspa 変異、Hcn1 変異を交配や遺伝子改変技術を用いて導入することで、欠神てんかんの発症に係る遺伝子の探索を進めていくことができる。

SM/J と A/J 系統を起源とするマウス体系的遺伝解析系を用いた 血中中性脂肪濃度を規定する遺伝子の解析

○大野民生¹、平井佳奈²、前川智樹¹、海野明広¹、井原邦夫³、柴田哲秀⁴、
大野欽司⁴、小林美里²、堀尾文彦² (1 名大院・医・実験動物、2 名大院
・生命農・動物栄養、3 名大・遺伝子施設、4 名大院・医・神経遺伝情報)

我々はマウス SM/J と A/J 系統を起源としてリコンビナント近交系(SMXA・RI系統群)やコンソミック系統群(A/J-NSM)等の体系的遺伝解析系を樹立し、それらを用いて糖脂質代謝に関係する遺伝的要因の解析を行っている。今回は、血中中性脂肪(TG)濃度を規定する遺伝子の解析について報告する。

上述のコンソミック系統群の血中 TG 濃度を解析したところ、A/J-11SM 系統は A/J 系統や他のコンソミック系統に対して有意に高い血中 TG 濃度を示した。そこで、Chr.11 に存在する血中 TG 濃度に関与する遺伝子の位置と効果を検証するために、A/J-11SM 系統を起源として SM/J 由来の Chr.11 を断片化させたコンジェニック系統群を作出し、各系統の血中 TG 濃度を解析した。その結果、血中 TG 濃度を支配する遺伝子は D11Mit360(103Mb) ～ D11Mit48(118Mb)に存在し、SM/J アレルが血中 TG 濃度を上昇させる事が判明した。これらの結果は、以前に我々が SMXA・RI 系統群や(SM/J × A/J)F2で行った血中 TG 濃度の QTL 解析の結果とよく一致していた。

一方、我々は SM/J と A/J 系統のゲノムのうちエキソン部分を市販のキットを用いて効率的に捕捉し、これを次世代シーケンサーで解読して両系統間のエキソン部分の変異を網羅的に解析した。このゲノム・データと上述の血中 TG 濃度の存在領域を照合させて候補遺伝子の抽出を試みると同時に、両系統間のゲノムの変異に基づいた新たな体系的遺伝解析系の利用方法についても検討している。

マウスを用いたストレプトゾトシン誘発糖尿病感受性遺伝子の解析

○前川智樹¹、小林美里²、海野明広¹、井原邦夫³、柴田哲秀⁴、大野欽司⁴、堀尾文彦²、高橋雅英⁵、大野民生¹ (1 名大院・医・実験動物、2 名大院・生命農・動物栄養、3 名大・遺伝子施設、4 名大院・医・神経遺伝情報、5 名大院・医・腫瘍病理)

ストレプトゾトシン (STZ) は膵 β 細胞に対する特異的な細胞毒性を有することから、マウス・ラットの実験的糖尿病モデルの作製に汎用されている。マウスでは古くから STZ 誘発糖尿病の感受性に系統差が存在することが知られているが、その原因遺伝子の解析は少なく、存在が報告されているのは *H2* (Chr.17), Chr.9, Chr.11 に限られている。そこで、我々は Chr.11 に絞り STZ 誘発糖尿病感受性遺伝子の解析を行った。

A/J、SM/J、A/J-11SM 系統に STZ (175mg/kgBW) を腹腔内に投与し、投与後 2 日間隔で血糖値と体重を測定し、投与後 14 日目に血中インスリン値を測定した。その結果、A/J 系統は他の 2 系統に対して顕著な高血糖、低インスリン値、体重減少を示した。したがって、A/J 系統の Chr.11 に STZ 誘発糖尿病感受性遺伝子が存在することが判明した。この遺伝子の位置を特定するために、A/J-11SM 系統を起源として SM/J 由来の Chr.11 を断片化させたコンジェニック系統群を作出し、各系統の STZ 感受性を解析した。その結果、目的とする遺伝子は D11Mit163 (28Mb) ~ D11Mit240 (53Mb) に存在する事が判明した。

この領域内には STZ 感受性に関与すると考えられる有力な候補遺伝子 (*Mpg*: N-methylpurine-DNA glycosylase) が存在しており、A/J 系統にはこの遺伝子にアミノ酸置換を伴う変異が存在していた。今後は、当該領域内のサブ・コンジェニック系統群を構築して遺伝子の存在領域を限局すると同時に、*Mpg* の変異と STZ 感受性との関係性について検証する予定である。

薬剤耐性 *H. pylori* 感染症に対する補完代替療法

○喜多正和^{1,2}、西家章弘²、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)

【緒言】*Helicobacter pylori* (*H. pylori*)感染が胃炎、消化性潰瘍や胃癌、さらには胃 MALT リンパ腫などの胃・十二指腸疾患の発症に関与していることが明らかとなってきた。2000 年 11 月、proton pump inhibitor (PPI) amoxicillin (AMPC) clarithromycin (CAM)による *H. pylori* 除菌療法が保険適応となり、積極的に除菌が行われている。しかし除菌療法が進むに従い除菌率が低下してきており、耐性菌に対する治療が問題となっている。今回我々は、補完代替療法としての *H. pylori* に対する生薬の効果につき検討したので報告する。

【材料と方法】

生薬として黄耆、半夏、甘草、人参、大黄、麻黄、芍薬、桂皮、牡丹皮、黄連、茵陳蒿、柴胡、蘇葉、防風、杏仁、葛根、丁子、厚朴（株ツムラより提供）を使用した

1) *in vitro*における抗菌効果の検討

H. pylori の菌液 (1×10^7 CFU) $900 \mu\text{l}$ と生薬の water extract ($6 \times 10^{-1}\text{mg/ml}$ 、 $6 \times 10^{-2}\text{mg/ml}$ 、 $6 \times 10^{-3}\text{mg/ml}$ 、 $6 \times 10^{-4}\text{mg/ml}$ 、 $6 \times 10^{-5}\text{mg/ml}$) $100 \mu\text{l}$ を 37°C 、微好気下 (80% N_2 , 15% CO_2 and 5% O_2) で混合し 24 時間振盪させた後、血液寒天培地に $10 \mu\text{l}$ を塗布し微好気下 (80% N_2 , 15% CO_2 and 5% O_2) に 7 日間培養し、コロニー数をカウントした。大黄、茵陳蒿、丁子について、接触時間を 0 時間、3 時間、6 時間、12 時間、24 時間とした場合の抗菌効果も検討した。

2) *in vivo*における抗菌効果の検討

6 週齢の C57BL/6 マウスに *H. pylori* の菌液 (1×10^7 CFU) 0.2ml を経口投与し感染させ、直後より大黄、黄連、茵陳蒿、丁子、甘草の water extract ($6 \times 10^{-1}\text{mg/ml}$) を自由飲水させた。経口感染より 4 週後に胃を摘出し、*H. pylori* 感染の有無を HP 選択培地による培養および PCR 法を用いて検討した。

【結果と考察】

1) 大黄、黄連、茵陳蒿、丁子、甘草では、濃度 $6 \times 10^{-1}\text{mg/ml}$ 、 $6 \times 10^{-2}\text{mg/ml}$ で *in vitro* における *H. pylori* に対する抗菌効果を認めた。大黄、茵陳蒿、丁子は、6 時間以上の接触で *H. pylori* に対する抗菌効果を認めた。

2) 黄連、茵陳蒿、丁子、甘草を *in vivo* でマウスに投与した群では、*H. pylori* 感染を有意に減少させることができた。

以上の結果、黄連、茵陳蒿、丁子、甘草は *in vivo*、*in vitro* で *H. pylori* に対する抗菌効果が認められ、*H. pylori* 除菌における補完代替療法としての生薬の可能性が示唆された。

6

インターロイキン6はカヘキシアの病態維持作用だけでなく、カヘキシア誘導能を付与する因子として作用する

○鈴木 昇、齋藤 浩充 （三重大・生命科学研究支援セ・動物機能ゲノミクス）

がん性悪液質（以下、カヘキシア）は、食欲減退と筋肉や脂肪組織の激減（るいそう）を特徴とする病態である。患者の生活の質（QOL）を低下させ、様々な抗がん療法を困難とする結果、がん死の20%の死因となっている。がん研究において、カヘキシアの基礎研究は、がん細胞の増殖異常や浸潤・転移の研究と比較し、発展途上である。どのような分子機序でがん細胞が宿主にカヘキシアを発症させる性質を獲得するのかについてはほとんど不明である。われわれの樹立した遺伝子改変型自家がんモデル動物は、p53 遺伝子機能欠損と活性型 ras 遺伝子のシナジーによって、100%の率で横紋筋肉腫を担い、すべての個体がカヘキシアの病態を経過し終末を迎える。われわれは、この肉腫から、腫瘍塊を形成し宿主にカヘキシアを発症させる細胞株（RMS3）と腫瘍塊は形成するが宿主にカヘキシアを発症させない細胞株（RMS6）を樹立した。今回、RMS3 由来腫瘍に発現亢進が認められるインターロイキン6（IL-6）について、われわれのモデルにおけるカヘキシアの病態の誘導と維持の観点からその作用を調べた。

「方法、結果、考察」

カヘキシアの病態の誘導・維持と IL-6 発現亢進の因果関係を調べるため、カヘキシア誘導能を持たない2種類の細胞株、RMS6 細胞株と悪性メラノーマ由来 B16F10 に遺伝子を導入して、IL-6 を構成的に発現させた細胞株 RMS6-IL6 と B16F10-IL6 を樹立した。各 100 万個を移植された動物は、RMS3 を移植された動物と同様に、約 14 日でいずれも重篤なカヘキシアを発症した。この時、血清 IL-6 濃度は、それぞれ約 800pg/ml、約 8400pg/ml と正常血清と比べ有意に高値を示した。カヘキシア発症後、抗 IL-6 受容体抗体の投与によって、B16F10-IL6 由来腫瘍によるカヘキシア症状は抑制されたが、より血清 IL-6 濃度が低値であるにもかかわらず RMS6-IL6 由来腫瘍によるカヘキシアは抑制されなかった。しかしながら、RMS6-IL6 由来腫瘍を担う動物では、抗 IL-6 受容体抗体を腫瘍形成の初期から投与することによって、発症プロセスが遅延し、抗 IL-6 受容体抗体投与の有意な治療効果を認めた。以上の結果、これまで示された IL-6 のがんカヘキシア病態を維持する作用のほか、新たに、IL-6 ががん細胞にカヘキシー誘導能を付与する作用もあることが示唆された。

自然免疫因子リポカリン2は細胞膜リン脂質フォスファチジルエタノールアミンに結合し、雌生殖路内で精子成熟を促進する

渡邊 仁美¹、竹尾 透²、東城 博雅³、中潟 直己²、Tak W. Mak⁴、
○近藤 玄¹

(京大・再生研¹、熊大・生命資源²、阪大院・医・分生化³、トロント大⁴)

哺乳動物の精子は、段階的な成熟過程を経て完全な受精能を獲得するが、雌生殖器内での詳細な分子メカニズムはわかっていない。今回我々は、雌生殖路内で精子成熟を誘導する因子としてリポカリン2 (Lipocalin2, Lcn2) を見出した。野生型マウスの卵管に遊走した精子では、細胞膜ラフトの再構成や GPI アンカー型タンパク質の遊離が起こるが、Lcn2 ノックアウトマウスではその変化が顕著に減少していた。また、Lcn2 は細胞膜を構成する主要リン脂質のひとつであるフォスファチジルエタノールアミン (PE) と直接結合し、さらにコレステロール遊離や今回見出した PE 集積領域 (PE-enriched domain, PED) の解消を引き起こし、精子のキャパシテーションを促進した。これらのことから、今回我々は、哺乳動物にはアルブミンを介するキャパシテーション経路に加えて、もう一つのキャパシテーションメカニズムをもつことを見出した。

喫煙曝露ラットに対する分子鎖アミノ酸の効果

○久保 薫¹、友田恒一²、吉川雅則²、児山紀子²、山本圭史²、木村 弘²
(奈良医大・¹動物実験施設, ²第二内科)

慢性閉塞性肺疾患（COPD）は喫煙を主因として発症する全身性疾患であり、栄養障害は COPD の重要な “systemic effect” であるとともに、発症や進展にも関与することが示唆されている。分子鎖アミノ酸（BCAA）は侵襲時や運動時に筋肉での需要が高まっており、COPD では血漿中 BCAA 濃度の低下が認められている。今回、実験動物を用いて筋肉内ならびに血漿中の BCAA 濃度に対する喫煙曝露の影響を検討した。

【材料と方法】

10 週齢の雄 Wistar-Kyoto (WKY/Izm) に対して MIPS 社製喫煙曝露装置を用いて、喫煙曝露（ハイライト®30 本/20 分、2 回/日）を 5 回/週（月から金曜日）、4 週間行った。喫煙曝露期間中、AIN-93G（通常食）あるいは BCAA を含む AIN-93G（BCAA 付加食）を不断給餌とし、非喫煙／通常食群、非喫煙／BCAA 付加食群、喫煙／通常食群と喫煙／BCAA 付加食群で検討した。毎週土曜日に体重を測定し、喫煙曝露 4 週目に摂餌量を計量した。最終喫煙曝露後、血液ならびにヒラメ筋を採取し、血漿中ならびに筋肉内アミノ酸、valine, leucin, isoleucine 濃度を HPLC 法で測定した。

【結果と考察】

体重と摂餌量は、非喫煙群に比して喫煙群で有意に低下した。喫煙曝露により筋肉重量は有意に減少したが、これに対して BCAA 付加食の摂取は筋肉重量を非喫煙／通常食群と同程度にまで回復させた。この傾向は筋肉中 BCAA 濃度ならびに valine 濃度の変化においても同様であった。喫煙曝露により血漿中 BCAA 濃度は減少し、また valine 濃度は有意に減少し、leucin 濃度と isoleucine 濃度も減少した。これらに対して BCAA 付加食の摂取は、血漿中 BCAA 濃度ならびに valine 濃度、leucin 濃度と isoleucine 濃度を有意に増加させた。非喫煙群においては、BCAA 付加食の摂取により筋肉重量ならびに血漿中 BCAA 濃度、valine 濃度、leucin 濃度と isoleucine 濃度が有意に増加した。

以上の結果、BCAA 補給は喫煙による筋肉重量および血漿中ならびに筋肉中の BCAA 濃度の減少に対して有効であり、COPD の併存症である骨格筋機能障害を軽減する可能性が示唆された。

ZFDM ラット：新規肥満・糖尿病モデルの確立

○横井伯英^{1,2}、星野雅行³、日高志保美²、清野 進²

(¹神戸大院・医・分子代謝医学、²細胞分子医学、³星野試験動物飼育所)

【目的】Zucker fatty (ZF) ラットはレプチン受容体 (*Lepr*) に突然変異 (*fatty*, *fa*) を有し肥満を発症する。Zucker diabetic fatty (ZDF) ラットは ZF ラットから分離・確立された肥満と糖尿病を発症する系統であり、肥満・糖尿病研究に広く用いられている。今回、ZF ラットを起源として新たに肥満と糖尿病を発症する系統が分離・確立されたので報告する。

【方法】2008 年に星野試験動物飼育所において維持されていた ZF ラットのコロニーに糖尿病を発症するラットが発見された。*fa/fa* ホモのオスが繁殖性を有していたことから、血糖値を選抜基準として *fa/+*ヘテロのメスとの選抜交配が繰り返し行われた。その結果、20 週齢前後で *fa/fa* ホモのオスのほぼ全例が糖尿病を発症するコロニーが確立され、Zucker fatty diabetes mellitus (ZFDM) ラット (正式名称 *Hos:ZFDM-Lepr^{fa}*) と名付けられた。今回は ZFDM 系統の *fa/fa* ホモと対照の *fa/+*ヘテロのオスについて 5 週齢から 22 週齢まで体重・血糖値を測定し、膵臓の組織学的解析を行った。

【結果】*fa/fa* ホモは *fa/+*ヘテロと比較して 6 週齢以降体重が有意に大きく、8 週齢以降は血糖値が有意に高かった。*fa/fa* ホモは 10 週齢から 21 週齢までの間に全例が糖尿病 (血糖値 300mg/dl 以上) を発症した。*fa/fa* ホモの膵臓には、膵島構造の消失、線維化、炎症細胞浸潤などの病理組織学的変化が認められた。

【結語】新たに確立された ZFDM ラットは、*fa/fa* ホモのオスが繁殖性を有することから、高い生産効率を実現した肥満・糖尿病モデルとして有用である。

ミエリン異常ミュータント **dmy** ラットのミエリン崩壊における神経細胞の病態
 ○長谷川 優子¹、山手 丈至¹、井澤 武史¹、庫本 高志²、芹川 忠夫²、桑村 充¹
¹大阪府立大学、²京大院・医・動物実験施設)

demyelination (dmy) ラットは、後肢の運動失調を特徴とする自然発症ミュータントで、7 週齢頃より中枢神経系の白質において急速なミエリン崩壊が進行する。その原因遺伝子はミトコンドリア内のマグネシム流入に関与する **Mrs2** 遺伝子であることが明らかにされている。**MRS2** は主に中枢神経系の神経細胞に分布しており、神経細胞のミトコンドリア異常がどのようにミエリン形成細胞であるオリゴデンドロサイトを障害し、ミエリン崩壊に至るかについては不明な点が多い。本研究は、**dmy** ラットの病理発生を明らかにする目的で、特に神経細胞の病態に注目して解析した。

【材料と方法】

6、7、8 週齢の **dmy** ラットのコモ型および対照ラット(野生型)の脊髄を腹索・灰白質・背索にわけて採材し、①**Real-time PCR** 法により、各部位におけるオリゴデンドロサイトの分化に関わる転写因子の **mRNA** 発現量を測定した。②抗ミトコンドリア **COXIV** 抗体を用いた免疫組織化学解析により、神経細胞におけるミトコンドリアの変化を比較した。③抗 **Golgi** 抗体、抗ユビキチン抗体を用いた免疫組織化学解析と、**PLP** に対する *in situ* hybridization 法によって、腹索のオリゴデンドロサイトの染色性を比較した。

【結果と考察】

①オリゴデンドロサイトの分化に関わる転写因子 (**PDGFR α** 、**Olig2**、**Nkx2.2**) は 6、7、8 週齢のコモ型ラットにおいて、特に灰白質で減少した。②7、8 週齢のコモ型ラットにおいて、神経細胞におけるミトコンドリアの免疫染色性が低下した。③コモ型ラットの腹索においてみられる腫大したオリゴデンドロサイトの細胞質内に **Golgi** の免疫染色性の増強がみられ、また、ユビキチンの免疫染色性も増加した。

以上より、神経細胞におけるミトコンドリアの異常に伴い、オリゴデンドロサイトの分化・成熟・機能異常が生じ、その結果、ミエリン形成障害がおこっている可能性が示された。

遺伝子改変肺がんモデルマウスを用いた発癌感受性関連遺伝子探索システムの作製と解析

○齋藤 浩充、鈴木 昇 (三重大・生命科学研究支援セ・動物機能ゲノミクス)

(背景) ヒト肺癌(35%)では、遺伝子に恒常的活性型 K-ras (癌型 K-ras) 変異が高率に検出される。我々は、Cre タンパクによる組み換えで、任意の時期、細胞で癌型 K-Ras 発現を誘導できる flox-癌型 K-Ras マウスを作成した。Cre 発現アデノウイルスベクターを用いた肺胞上皮細胞特異的な癌型 K-Ras 発現により、ヒトの肺胞上皮 2 型様の腺癌発症を誘導でき、自然発癌 (ヒトでの発癌) における「癌型 *K-Ras* 変異から腫瘍出現までの肺癌発症過程」を実験的に再現できる。異なる近交系マウスの遺伝子背景をもち、異なる癌型 Kras 誘導肺発癌感受性をもつマウス作製により、癌型 Kras 変異を原因とする肺発癌の抑制、促進因子を生体レベルで探索するシステムの作製を試みた。

(結果と考察) A/J 系統および C57BL/6J (B6) 系統の遺伝子背景をもった flox-癌型 Kras マウスを作製し、肺発癌感受性を比較検討した。癌型 K-ras 発現による発癌実験の結果、B6 系統 (142 ± 59.5) が A/J 系統 (11.4 ± 14.8) より肺発癌高感受性であった ($P < 0.05$)。この 2 系統において癌型 K-ras 発現誘導に用いているアデノウイルス感染効率に差は検出されず、2 系統の遺伝子背景の違いには癌型 K-Ras により誘導される肺発癌感受性を調節する因子が含まれていることが示唆された。まず、正常な *K-Ras* 遺伝子による肺発癌抑制効果が報告されているため検討を行った。2 系統の肺における内在性 K-Ras 遺伝子発現量を RTPCR 法により比較した結果、遺伝子発現量が高感受性を示す B6 系統は (0.73 ± 0.087)、A/J 系統 (1.00 ± 0.057) より有意に低く ($P = 0.01$)、発癌感受性に影響を与えている可能性が示唆された。そこで、2 系統から得られた F2 マウス 50 匹を用いて、K-Ras 遺伝子 2nd インترون中の polymorphism マーカーを用いて QTL 解析を行ったが有意な相関は得られなかった ($P = 0.60$)。この結果は、このモデルにおける 2 系統間の異なる発癌感受性の原因が K-Ras 遺伝子発現量の差では説明できず、他の因子が存在することを示唆している。現在、K-Ras シグナル経路に関連した遺伝子がコードされている染色体領域を中心にさらなる解析をすすめている。

内視鏡プローブを用いたマウスへの気管チューブ挿管と吸入麻酔

○今野兼次郎¹、畠山美香²、小川哲平³、塩谷恭子⁴

(¹京都産業大学・総合生命科学部、²株式会社AVS、³夏目製作所、⁴国立循環器病センター研究所)

【背景と目的】動物実験はヒトへの外挿を主目的として行われるが、マウスへの外科的処置を目的とした麻酔はヒトと異なり、麻酔深度の調節が困難な注射麻酔が一般的である。その一因は体サイズが小さい事である。特に気管チューブの挿管を要する吸入麻酔の導入が大きく遅れている。それを改善すべく、近年、内視鏡プローブを用いた実験動物への気管チューブ挿管システムが開発された。そこで、今回、マウスが出来るだけ苦痛を伴わず、動物愛護の精神に則った理想的な麻酔方法を開発する事を目的として、最近発売されたマウス気管チューブ挿管用の内視鏡システムと、それを用いた吸入麻酔の有用性の検討を行った。

【材料と方法】C57BL/6 マウスのオス 7 匹 (体重: 26.4~29.4g, 週齢: 15 週) を用いて行った。前投与として硫酸アトロピン 0.04mg/kg とペントバルビタール 40mg/kg を腹腔内投与し、「AVS 細径内視鏡システム TESALA 〈テサラ〉 AE-C1」を用いて挿管を試み、挿管後はげっ歯類用麻酔システム RC2 (VETEQUIP 社製) とマウス・ラット等小動物実験用人工呼吸器 SLA Ventilator (夏目製作所) に接続してイソフルランを 2% で吸入麻酔を維持した。なお、術中のマウスモニタリングは MouseOX Plus (STARR 社製) を用いてマウスの Vital Sign を確認・記録した。

【結果と考察】今回の実験では全ての個体で 2 分以内に挿管が成功した。また、麻酔回路へ接続後は動脈内酸素飽和度 (SpO₂) が 99% 以上を示し、その他の Vital Sign も非常に安定していた。以上の結果から、本システムを用いる事により安定した麻酔状態が得られる事が示唆された。

正常カロリーの高脂肪・高糖質食が WHHLMI ウサギに及ぼす影響

○ユウ イン¹, 寧 博², 王 小燕², Ahmed Bilal Waqar², 小池 智也¹,

塩見 雅志^{1,3}, 範 江林²

(¹神戸大院・医・動物実験施設, ²山梨大院・医・分子病理学,

³神戸大院・医・疾患モデル動物病態生理学,)

【背景と目的】

脂質や糖質の過剰摂取は、肥満やメタボリックシンドロームの要因となる。低比重リポ蛋白 (LDL) 受容体の遺伝的異常により発症する家族性高コレステロール血症 (FH) の患者は、環境要因（食習慣等）に対する影響も受けやすいことが知られている。しかし、食事量を制限しカロリーの過剰摂取にならぬよう脂質や糖質を摂取した場合の影響は不明である。本研究では、FH の動物モデルである WHHLMI ウサギを用いて、高脂肪・高糖質食の制限摂取が及ぼす影響について検討した。

【方法】

4 ヶ月齢のオスの WHHLMI ウサギに、10%ヤシ油と 30%のフルクトースを添加した餌を 16 週間投与し、血中脂質、インスリン感受性、内臓脂肪の変化を、同量のカロリーで通常食を摂取した WHHLMI ウサギと比較した。

【結果】

両群で同量のカロリー摂取となるよう給餌量を調整した結果、実験期間の体重の推移は同程度であった。しかし、高脂肪・高糖質食を摂取した WHHLMI ウサギにおいて、高脂血症の増悪、インスリン感受性の減弱、内臓脂肪量の増加、脂肪肝の発生が認められた。

【考察】

以上の結果より、カロリーの過剰摂取にならぬよう高脂肪・高糖質食を摂取した場合でも、FH モデルの WHHLMI ウサギにおいて、メタボリックシンドローム様の病態を発症することが明らかになった。そのため、環境因子への感受性が高いという遺伝的素因を有する場合、食事の量だけでなく質にも注意を払わなければならないことが示唆された。

急性冠症候群誘発モデル、WHHLMI ウサギ

○小池 智也¹、伊藤 隆¹、山田 悟士¹、国吉 信恵¹、小林 努¹、塩見 雅志^{1,2}

(¹神戸大院・医・動物実験施設, ²神戸大院・医・疾患モデル動物病態生理学)

【背景と目的】

心血管疾患は世界の死因の第一位であり、中でも急性心筋梗塞、不安定狭心症、心突然死の総称である急性冠疾患(**acute coronary syndromes, ACS**)が重要とされている。しかし、ヒト **ACS** に対応したモデル動物は開発されていないことから、その発症機序の詳細については不明である。本研究では、動脈硬化の進展による冠動脈閉塞が原因で心筋梗塞を発症する **WHHLMI** ウサギを用いて **WHHLMI** ウサギが **ACS** のモデル動物になるかどうかを調べた。

【方法】

麻酔下の **WHHLMI** ウサギを用い、ノルエピネフリンを持続静注下にエルゴノビン[®]を静注し、冠スパズムの誘発を試みた。冠スパズムの発生は心電図と冠動脈造影で確認した。心機能は心エコー装置を用いて左室の運動度を評価し、心筋の虚血傷害は血清中の **heart-type FABP**、トロポニン-I、ミオグロビン濃度で評価した。冠スパズム誘発後、麻酔薬の過量投与でウサギを安楽死し、冠動脈の病理組織標本作製した。

【結果】

血管収縮剤の併用投与により、心電図で **ST** 低下、**T** 波逆転、心室性不整脈が観察され、冠動脈造影でスパズムの発生を確認した。スパズムを誘発したウサギでは、左室の運動度が低下し、血清心筋虚血マーカーが上昇した。冠動脈の病理組織解析では、マクロファージ残渣に富む病変の破裂とそれに続く閉塞性の血栓を認めた。また、内皮細胞の消失と消失部位からのマクロファージの流出が観察された。スパズムを誘発できなかったウサギではこれらの変化は認められなかった。

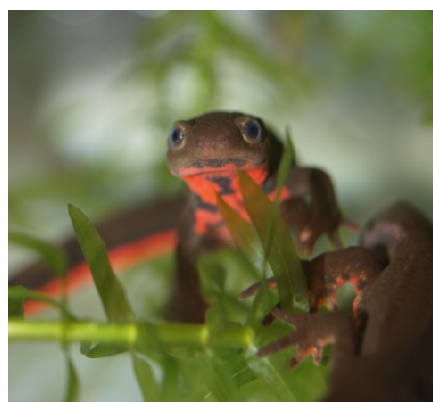
【結論】

WHHLMI ウサギにおいては、冠スパズムの誘発によって冠動脈プラークが破綻し、**ACS** のモデル動物になる可能性が示唆された。

アカハライモリのモデル動物化に向けた資源・技術・情報基盤の研究：外傷性疾患の治療と再生研究への適用を視野に

千葉 親文 （筑波大学 生命環境系・脳神経情報学分野・再生生理学研究室）

イモリは両生綱・有尾目に属す脊椎動物である。つまり、カエルやサンショウウオの仲間である。しかし、近縁のサンショウウオ類とは約1億6000万年前(ジュラ紀後期)に別れたと考えられており、独立した分類群「イモリ科 (Salamandridae)」を構成している。イモリ科の中でも、より進化した一群が、いわゆるイモリ (Newt) と呼ばれる (D. W. Weisrock et al., *Molecular Phylogenetics and Evolution* 41: 368-383, 2006)。



アカハライモリ *Cynops pyrrhogaster*

イモリは実験生物学が始まった 18 世紀から研究されている。イタリアの博物学者 **Lazaro Spallanzani (1729-1799)** によるイモリ・サンショウウオの再生実験は有名で、彼が見出した「動物の再生能力が齢とともに低下する」現象は「スパンツァーニの法則」として知られている。

イモリの細胞は他の脊椎動物モデルと異なり、大きな細胞体、大きくて明瞭な核と染色体 (24 本)、ゆっくりとした分裂周期、代謝が低くてタフ、などの特徴から、様々な生命現象に対する分子・細胞・生理レベルの研究において時間・空間分解能の高い解析に有利である。胚や成体組織の個体間移植が容易な点もこの動物を用いる利点であり、実際、**Hans Spemann** の胚操作によるオーガナイザーの発見（ノーベル医学生理学賞、1935 年）に寄与したと言える。また、先述のように、この動物の卓越した再生能力は有名で、体の主要な部分 (body-parts) が内在する組織幹細胞だけでなく、終分化体細胞の脱分化・分化転換 (ナチュラルなリプログラミング) を介して完全再生するため、イモリは脊椎動物における再生のモデル、あるいは‘**Master of Regeneration**’と呼ばれている (Casco-Robles et al., *Nature Protocols* 6: 600-608, 2011)。さらに、この動物は水から陸に進出した初期の脊椎動物（四足動物の祖先）の体制を備えており、脊椎動物の陸上適応・進化の歴史を知る

上でも重要な位置にある。このような利点・特徴から、イモリは数々の歴史的発見に貢献し、現在でも生命活動の普遍原理や新概念の探究において **breakthrough** につながる数多くの発見が期待される動物である。

1. 我が国のイモリ研究

我が国のイモリ研究は、‘お家芸’と評されるほど歴史と蓄積があり、数多くの著名な研究者を輩出してきた。例えば、再生研究の江口吾朗と岡田節人、受精研究の鬼武一夫、発生・分化研究の浅島誠（分化誘導因子「アクチビン」の発見）、生理・行動研究の菊山榮（脊椎動物で初めてのペプチドフェロモン「ソデフリン」の発見）等である。現在でも、生命科学の広範な領域でその質・量とも世界を圧倒している。例えば、安部眞一・江頭恒（熊本大）の精子形成機構の研究、渡邊明彦（山形大）の体内受精様式と精子運動調節機構の研究、田中滋康（静岡大）の生殖内分泌と水代謝の研究、岩尾康宏・上野秀一（山口大）の卵発生開始機構と初期胚細胞周期の研究、浅島誠・道上達男（東大）・有泉高史（玉川大）の器官形成機構と臓器創製研究、小畑秀一（北里大）の原腸形成と細胞運動機構の研究、竹島一仁（名大）の器官形成誘導シグナルネットワークの研究、芋川浩（福岡県立大）・阿形清和（京大）・近藤壽人（阪大）・牧信安（阪大・さきがけ）の四肢、脳および水晶体再生の研究、千葉親文（筑波大）・荒木正介（奈良女子大）・久富修（阪大）の網膜再生の研究、林利憲（鳥取大）の心臓再生の研究、豊田ふみよ（奈良県立医大）・筒井和義（早稲田大）の新規脳ホルモンの同定と行動発現・調節機構の研究、千葉篤彦（上智大）の日周期活動の分子機構の研究、倉橋隆（阪大）・中谷敬（筑波大）の感覚受容機構の研究、山下まり（東北大）のテトロドトキシン合成経路の研究、等々である。

イモリの高い有用性はこうした研究実績により証明されている。しかし、残念なことに、近年、イモリを扱う研究者（特に若手研究者）は減少している。その主な原因は、他のモデル動物に比べ利用できる遺伝子情報やツールが少ないこと、および遺伝子改変動物の利用が困難なことである。

我が国のイモリ研究にはアカハライモリ（*Cynops pyrrhogaster*）が使用されている（前頁の写真）。アカハライモリ（赤腹井守）は日本固有種であり、古くから農耕のシンボルとして日本人に親しまれてきた（「銅鐸の絵を読み解く」、1997年、国立民族博物館編、小学館）。しかし、生息数が減少し、2006年には準絶滅危惧種として記載された（環境省

レッドリスト)。生態・環境や系統・進化の視点から両生類の保護に取り組む研究者は少なく、松井正文・西川完途（京大）・富永篤（琉球大）が地道な活動を続けている。

このようにアカハライモリは様々な研究領域でその有用性が明らかであるにも関わらず、生息数（研究資源）や研究者数が減少している。このままでは、早晚、我が国のお家芸であるイモリ研究は途絶え、生命科学の進展にも大きく影響するに違いない。イモリ研究の展開を図り、ひいては我が国の生命科学水準の向上・強化につなげるためにも、遺伝子から生態・環境にいたる幅広い領域の研究者が、それぞれの分野の枠を超えて有機的に連携し、総力を挙げてアカハライモリの資源化とモデル動物化に取り組む必要がある。また同時に、これらを共通基盤として、各分野における新たな研究の創出を積極的に推進する必要がある。そのため、私達は生物学・医学を含む広範な領域の研究者（40 名、20 大学）・支援者（NPO や自治体を含む）を結集し、（新）イモリネットワーク（JNRC；日本動物学会のイモリネットワークを継承する新組織）を設立した（2008 年 10 月～；ホームページ <http://imori-net.org>）。現在、JNRC はこの目標に向けて活動している。

2. アカハライモリのモデル動物化の取り組み

私達 JNRC は、イモリ研究の最重要課題の一つであるアカハライモリのモデル動物化を目指し、資源・技術・情報基盤の研究を推進している。様々な活動をしているが、ここではその成果を 2 つご紹介する。

先述の通り、アカハライモリはその数を減らしている。また、地域ごとの遺伝的多様性が大きいことも分かっている（Tominaga et al., *Molecular Phylogenetics and Evolution* 66: 654-667, 2013）。そのため、野生イモリ（生物・遺伝資源）の保護・保全、および研究・教育用イモリの標準化と供給体制の整備が急務である。そこで我々は、将来に渡り、コミュニティー全体に十分な数のイモリ（私のラボだけでも年間 1000 匹以上が必要）が提供できるように、茨城県取手市に屋外自然繁殖施設「いもりの里」を地域住民・自治体と協働で設置した（2009 年 10 月 28 日）。具体的には、30 年以上耕作放棄されてきた里山に囲まれた湿地（谷津田；約 3 ヘクタール）を利用し、イモリが生息していた昭和 40 年代の水田を再現し、稲作サイクルを回すことで、イモリの繁殖に最適な環境づくりを始めたのだ。2010 年 11 月には、千葉県鴨川市系統（南関東系統）アカハライモリの成体 975

匹を水田に導入することができた。

東北地方太平洋沖地震（2011年3月）以降、湧水量の低下と水質の悪化が問題となったが、井戸を設置する等の工夫で何とか乗り越え、少数ではあるが着実に定着してきている。2016年からの提供を目指し、現在も成体や幼生・幼体の導入を継続している。



この活動は様々なメディアで紹介された。そのおかげで全国の自然保護活動家にも注目され、イモリを含む生物とそれらの生息環境の保護・保全が進んできていることは、JNRCの目的とも合致し、大変嬉しいことである。

[これまでの苦労と現在の活動の様子はホームページ（<http://imori-net.org>）をご覧ください。]

アカハライモリのモデル動物化を実現する上で、遺伝子改変技術の確立は急務である。しかし、イモリは遺伝子改変がたいへん困難な動物とされてきた。受精卵に DNA を打ち込む方法でのトランスジェネシスでは、モザイク個体も含めて、外来遺伝子を発現する個体を得る確立が 0.9~3.4% しかなく、実践レベルには達していなかった。また、それ以前に、卵や精子を野生個体に頼っているため十分な数と質の受精卵を得るのが難しく、さらには卵を成体まで室内で育てあげる方法も確立していなかった。

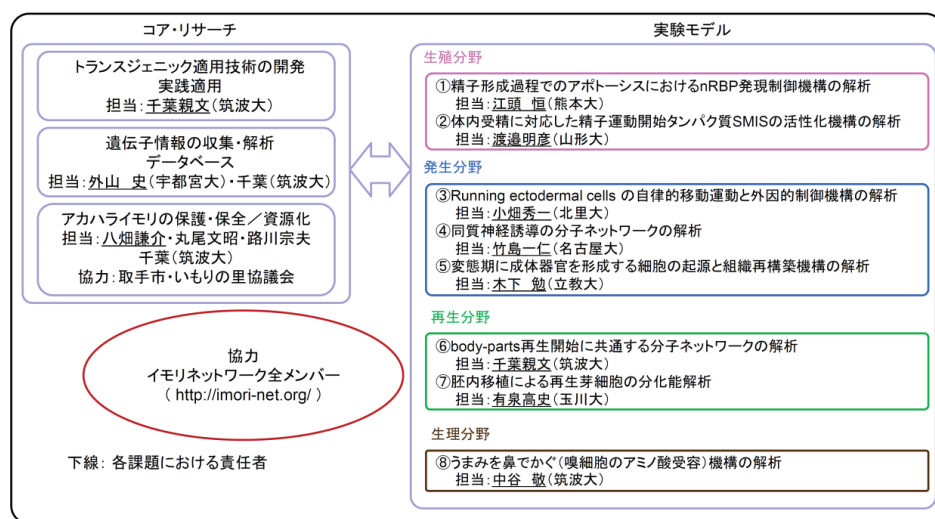


そこで私達は、まず室内で長期飼育した個体から効率よく受精卵を得る方法と、幼生・幼体の飼育法の検討を重ね、いずれにおいても様々なラボで実践可能な効率のよい方法を確立することができた。次に、様々なトランスジェニック技術の検討を行い、*I-SceI* メガスクレアーゼを用いた方法の有効性を証明した。この方法と先の飼育法を合わせると、全身に外来遺伝子を発現する成体個体を約 20% の確立で得ることができる。これらの技術は疑いなく **breakthrough** であると言える。

[これらの技術は、*Nature Protocols* 6: 600-608, 2011、研究者が教える動物飼育 第3巻-ウニ、ナマコから脊椎動物へー（日本比較生理生化学会編）、共立出版、2012、に掲載しました]

現在、これらの基盤研究を、イモリを用いる様々な研究分野に展開するために、イモリ研究を牽引する4分野（生殖、発生、再生、生理）に焦点をあて、トランスジェニック技術を活用する応用技術の開発を進めている。また、これら2つに加え、JNRCはアカハライモリの遺伝子情報の収集を進めている。この動物のゲノムサイズは約40Gbpと推定されているため、ゲノムにはそう易々とは手が出ない。そこで私達は、研究上より必要性が高い（利用価値の高い）転写産物の情報をmRNA-Seq解析により収集し、データベース化を進めている。

研究組織 統括(千葉@筑波大)



3. 外傷性疾患の治療と再生研究への適用：網膜を中心に

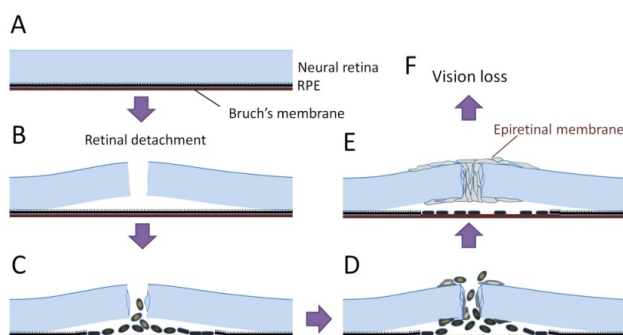
私のラボでは、JNRCが開発を進める資源・技術・情報基盤を、再生研究に適用している。既述の通り、イモリは体細胞の脱分化（リプログラミング）と再分化／分化転換を介したその卓越した再生能力から、脊椎動物における再生のモデルとされている。しかし、

これまで研究基盤が乏しかったことから、再生組織・器官の起源となる細胞種、再生開始メカニズム、脱分化メカニズム、再生起源細胞由来の多能性細胞の特徴、形態形成（パターンニング）メカニズム、再生組織・器官と本体との接続・統合による生理機能回復過程の詳細は未だ多くが謎のままである。すなわち、幹細胞研究と移植・再生医療が華々しく展開する現在においても、再生をナチュラルに実践する動物の戦略については、実はほとんど何も分かっていないと言っていい現状なのである。

私は、イモリとヒトを比較し、再生「できる」「できない」の違いを炙り出すことで、イモリの高い再生能力の理解と医療への応用を目指している。そのために、私は 10 年以上に渡り、イモリの網膜・視覚再生系に着目してきた。この再生系は、高次感覚・中枢神経系の再生モデルとなるばかりでなく、網膜色素上皮（RPE）細胞と呼ばれる単一種の細胞から再生が始まるため、イモリの様々な body-parts 再生の基本原理を単純化して解くよい実験系である。また、増殖性硝子体網膜症（PVR）という明確な治療目標が存在する点も重要である。

RPE は、神経性網膜と脈絡膜血管層との間にあり、神経性網膜の代謝や生理機能にとって欠かせない役割を担っている。成熟した RPE 細胞は、眼球内の生理的環境下では分裂していないが、網膜が外傷を被ると増殖し性質を変化させる。ヒトにおいて、RPE 細胞の増殖は、失明につながる増殖性硝子体網膜症の兆候である。再生能力の高いイモリでも、RPE 細胞は増殖するが、最終的に網膜を再生する。このように、ヒトでもイモリでも、RPE 細胞は網膜の損傷に応じて増殖するが、その帰結が全く異なる（失明か再生）。このため、イモリの網膜再生は、網膜の外傷性疾患の治療と再生のための基礎情報を得るよいモデルでもある。

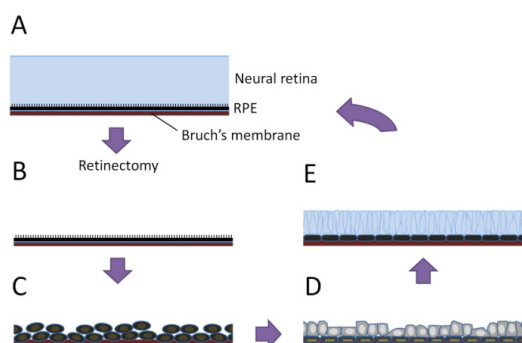
増殖性硝子体網膜症の過程を右図に示す。眼球が事故等により強い衝撃や外傷を被ると、網膜神経組織が RPE から剥離（いわゆる網膜剥離）し、網膜神経組織に裂口が生じる場合がある



(A, B)。網膜神経組織の内部や周囲の血管から流出した血液に RPE が暴露されると、RPE はこれに応答して上皮形態を失い、単離状態になった細胞は基底膜 Bruch's

membrane から離れて裂口に向けて遊走する (C)。遊走過程で RPE 細胞は筋線維芽細胞様の細胞に形質転換するとともに分裂能を獲得する。細胞が裂口に付着すると、増殖し、網膜神経組織中のグリア細胞等とともに裂口を覆う皮膜を形成する (D, E)。この過程は一種の創傷治癒過程と考えられている。しかし、皮膜はその発達とともに収縮し、神経性網膜を引き込むことで網膜剥離を進行させ、結果として失明につながってしまう (F)。このように、ヒト RPE 細胞は網膜の外傷に応じて間葉細胞様の細胞に姿を変え（いわゆる上皮間葉移行；EMT）、増殖し、この細胞が原因で最終的に失明に至る。

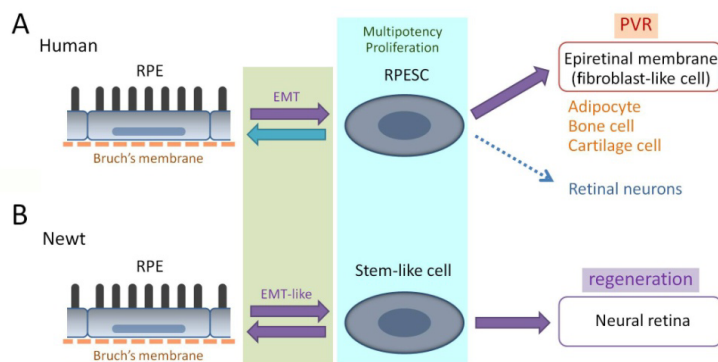
右の図は、成体イモリ網膜再生の模式図である。この動物の場合、眼球から網膜神経組織をすべて取り去っても、残った RPE 細胞から生理的な網膜組織 (RPE と網膜神経組織の両方) を再生できる。眼球から神経性網膜を除去する (A, B) と、RPE



はヒトの場合と同様に上皮形態を失い単離細胞状態になる (C)。これらの細胞は、分裂を開始するとともに、一様に網膜幹細胞のマーカー遺伝子 Pax6 を発現する（未公表）。その後、この細胞集団は色素を保持したまま 2 層に分離し、外層は RPE 層に、内層は網膜前駆細胞層となり (D)、最終的に網膜神経組織を再生する (E→A)。このように、イモリでも、RPE 細胞は網膜の外傷に応じて EMT 様の変化を被り増殖するが、この増殖細胞（私たちはこの細胞を Stem-like cells と呼んでいる）が、網膜を完全再生する起源細胞になるのである。

最近の研究から、ヒトの RPE 細胞も幹細胞 (RPE stem-cell; RPESC) に変わり得ることが示されている

(Salero et al., Cell Stem Cell 10: 88-95, 2012)。しかし、この細胞は、イモリとは異なり、筋線維芽細胞や脂肪細胞、骨



や軟骨細胞の形質を発現することはできるが、網膜神経細胞を生み出す能力は低い。すなわち、ヒト RPESC は、網膜のような外胚葉性組織ではなく、何らかの原因で中胚葉性の細胞・組織を生み出してしまうように見える（前頁の下図）。

イモリとの比較から、この点は非常に興味深い。もしかすると、ヒトの RPE 細胞は、イモリのような正常な（再生可能な）幹細胞を生み出せないのかもしれない。すなわち、ヒトが網膜を再生できない要因の一つに「幹細胞の形成異常あるいは機能異常」があるのかもしれない。もしそうであれば、網膜外傷後の RPE 細胞の挙動を分子レベルでイモリと比較することによって、その治療や再生誘導のヒントが得られるかもしれない。少なくとも、RPE 細胞の分裂開始にあたっては、ヒトもイモリも、MAP キナーゼ経路の一つである MEK-ERK 経路の活性上昇と、細胞間接着（あるいは接触阻止）からの解放が必要らしい（Yoshikawa et al., *Pigment Cell Melanoma Res.* 25: 66-82, 2012; Mizuno et al., *Neurosci. Lett.*, 523: 39-44, 2012）。イモリ RPE 細胞が如何にして網膜を再生する幹細胞にリプログラムされるかが今後の焦点である。

最近、ES/iPS 細胞から *in vitro* で RPE や神経性網膜を生み出し、移植により失った視覚機能を取り戻す試みが進んでいる。例えば、理化学研究所・発生再生科学総合研究センターの高橋政代氏（網膜再生ラボ）が中心となって、加齢黄斑変性症の治療に向け iPS 細胞由来の RPE 組織を患者の眼球内に移植する臨床試験を開始したことは周知のことである。また、同研究センターの笹井芳樹氏（器官発生ラボ）が、ES/iPS 細胞から眼胞・眼盃、さらには網膜組織を生み出すことに成功し、現在、その保存技術の開発や、高橋氏との共同で、眼球内への移植技術の開発を進めていることも周知のとおりである。こうした ES/iPS 細胞からの細胞・組織創製技術は、発生生物学の知見を総動員したものであり、この学問分野の貢献度は非常に高い。

一方、イモリを用いたこれまでの再生研究から、この動物が発生とは異なるやり方で網膜構造を生み出していることは明らかである。すなわち、イモリは、RPE という成熟した単一の細胞シートから、EMT のプロセスを介して幹細胞を生み出し、神経性網膜と RPE の3次元構造をまるっと作り上げるのである。この戦略を採用することで、イモリは失った組織と同じ大きさの組織を短期間に再生させることに成功している。しかも、外傷を被った眼球内で、である。こうしたイモリの示す再生原理を理解し、医療に応用できれば、移植再生にせよ *in vivo* 再生にせよ、次次世代型のもう一つの網膜再生技術につながると期待できる。

網膜再生だけではない。細胞間の結合や連絡を解く EMT と同様の現象は、心臓や四肢の再生でも観察される。このことから、このプロセスがイモリの **body-parts** 再生すべてに必要なメカニズムとして関わっている可能性が考えられ、網膜再生研究からの知見が他の組織・器官の再生研究に波及することも十分に予想される。

以上のように、私たちには、未だマクロではあるが、イモリ網膜再生とヒト外傷性網膜疾患（例えば、増殖性硝子体網膜症）の共通点と相違点が見えてきている。現在、これらの分子基盤を明らかにするために、トランスジェニック技術を駆使した単一 RPE 細胞レベルの転写解析および遺伝子機能解析を始めている。この研究の進展のために、JNRC による資源・技術・情報はその基盤として益々重要性が高まっていると言える。

[これらの内容の一部は、*Experimental Eye Research* に総説として掲載される予定です]

ゼブラフィッシュの色素細胞間相互作用とパターン形成

渡邊正勝 (阪大・生命機能)

はじめに

動物の持つ体表模様は、捕食者からの逃避や同種間の認識、生殖戦略など、種の生存に重要な役割を持っていると考えらる。そして、この体表模様に関して注目すべき点として、近縁種が全く異なる体表模様を示したり、一方で系統的に全く異なる生物種が類似な模様を示すという事象があげられる。スポット模様やストライプ模様が魚類から哺乳類に至るまで様々な動物でみられることが一例である。この事実から、動物の体表模様はその形成にかかわる細胞や分子、遺伝子は違っていても共通の原理のもとに成り立っている、ということが考えらる。我々のグループでは、生物の形態形成の中でも、特に細胞自律的なパターン形成という現象に注目し分子機構の理解を目指し研究を行っている。この問題に対して、我々は研究材料としてゼブラフィッシュを用いている。これは、ゼブラフィッシュは発生学、遺伝学のモデル生物であり、ゲノム解読も終了している点、遺伝子組み換え体の作製も容易に行える点、そして何よりストライプ模様を持つ点が大きな理由である。

ゼブラフィッシュのストライプ

ゼブラフィッシュ (図 1A) には 3 種類の色素胞が存在する (魚類の色素細胞は色素顆粒の放出は行わないため、哺乳類の色素細胞とは分けて色素胞と呼ばれる)。その中で黒色素胞と黄色素胞がいわゆるストライプパターンを形成する因子である。このほかに銀色の光沢をもつ色素細胞が存在し虹色素胞と呼ばれている。色素細胞はいずれも神経堤細胞由来の細胞で、ゼブラフィッシュの個体発生に伴い分化・発生・移動を行い体表模様を形作る。体幹部のストライプに注目すると、まず正中線に沿って、黒色素胞が一行に並んだ線ができ、その後、この黒色素胞の線に重なる形で黄色素胞が現れ、同時に黒色素胞は黄色素胞から逃げる形で背側あるいは腹側に移動する。この時、黄色素胞から逃げきれなかった黒色素胞は細胞死を起こす。このような異種細胞間の反発作用を伴う細胞移動により、黄色素胞、黒色素胞の領域分けがなされ、ストライプパターンが完成する¹。

ゼブラフィッシュ模様変異体

ゼブラフィッシュからは様々な変異体が単離され遺伝子機能の解析に用いられてきた。多くの場合、ENU 変異原により作製された変異体であり、この中には体表模様変異体も含まれる。ところで、今から 10 年程前までの体表模様変異体の解析は、色素細胞の分化・発生変異体の解析が主なものであり、単離された遺伝子は哺乳類色素細胞で解析が進められている遺伝子のホモログであることが多々見られました^{2; 3; 4; 5; 6; 7; 8; 9}。これに対して我々のグループでは、体表模様変異体の中でも、パターン変異体に注目し解析を行ってきた。つまり色素細胞の発生・分化はほとんど正常だが、その配置が野生型と異なる、という変異体の解析である。例を挙げると、野生型のストライプがスポットになる leopard 変異体¹⁰や seurat 変異体¹¹、黄色素胞と黒色素胞が混ざり合う jaguar 変異体¹²や dali 変異体などであるが、今回は leopard 変異体 (図 1B) と jaguar 変異体 (図 1C) について紹介する。

leopard 変異体

leopard 変異体は、野生型のストライプがスポットになる変異体で、野外で採集された変異体であり、採取された当初はゼブラフィッシュとは別種の魚だと考えられていたことは有名である。そして、このスポットパターンは細胞自律的なパターン形成のモデルケースになりうるということが多く議論されてきた^{13; 14; 15}。ポジショナルクローニングを行い遺伝子の特定を行ったところ、ギャップジャンクションの構成因子のひとつであるコネキシン 41.8 という遺伝子に変異が見つかった。3 つあるアليلともこの遺伝子に変異が存在し、劣性のアليلにはナンセンス変異が、優性のアليلにはミスセンス変異が存在した¹⁰。

次にパターン形成におけるギャップ結合の役割を検討した。しかしながら、ギャップ結合は通過する分子の選択性が低いため、詳細なメカニズムについては残念ながらまだ明らかにはなっていない。ところで、哺乳類には約 20 種類、魚類には約 40 種類のコネキシン遺伝子が存在する。これらのコネキシンの機能の差から何かヒントは得られないものかと考え、40 種類の中のいくつかの遺伝子を用いて leopard 変異体の相補実験を行った。その結果、コネキシン 41.8 に近縁な一群の遺伝子のみが表現型をレスキューできることがわかった (図 2)。これらの遺伝子がコードする蛋白質のアミノ酸配列を比較したところ N 末領域に ExxxE というモチーフが存在した (図 3)。こ

の領域はポリアミンが結合し、ギャップ結合に整流性を与えることが、*in vitro* の実験により確かめられているモチーフで、この配列を置換した場合、変異型コネキシンは **leopard** 表現型をレスキューできなかった (図3)。このことは、色素細胞間に形成されるギャップ結合に方向性のある流れが存在し、これがパターン形成に重要な意味を持つということを示唆している¹⁶。

コネキシンの N 末配列がパターン形成に重要だということから、この領域にいくつかの変異を導入したコネキシンを作製し、ゼブラフィッシュに導入する実験を行った。その結果、3 アミノ酸を余計に付加した変異型コネキシンでは、野生型のストライプが成長とともに割れ、結果として細いストライプが出来上がった。一方、6 アミノ酸短くした場合、不思議なことに迷宮模様が現れた¹⁷。

jaguar 変異体

jaguar 変異体は黄色素胞と黒色素胞が体表上で混ざり合ってしまう変異体である。この変異体については大学院生の岩下が遺伝子の単離を行い¹²、同じく大学院生の稲葉が細胞間相互作用における機能の解明を行ったのでここで紹介する¹⁸。 **leopard** 変異体と同様にポジショナルクローニングにより原因遺伝子の特定を行い、内向き整流性カリウムチャネルの一種、**Kir7.1** に変異が検出された。そして、**Kir7.1** 上に起こったアミノ酸置換により、カリウムイオンをほとんど通さなくなっていた。内向き整流性カリウムチャネルは、細胞の静止膜電位の形成を行い、また、この内向き整流性は細胞内ドメインにポリアミンが結合することにより形成されることが知られている。このチャネルが壊れることによって、黒色素胞は常に脱分極した状態になっていた。ところで、上述の黄色素胞 - 黒色素胞間の相互作用を膜電位感受性色素を用いて *in vitro* 培養系で観察したところ、黄色素胞が黒色素胞に接触したときに黒色素胞の脱分極が起こっていた。そして、この脱分極が引き金となって、黒色素胞の黄色素胞からの逃避行動が引き起こされていた。常に脱分極状態にある **jaguar** 変異体由来の黒色素胞では逃避行動は起こらず、この結果として、体表上で黄色素胞と黒色素胞が混ざり合うという表現型となるということが明らかとなった。

電子顕微鏡解析

ところで、上述のような相互作用が起こる場合、黄色素胞 - 黒色素胞間には直接

的な接触が起こっていることが必要である。しかしながら 2003 年に報告されたゼブラフィッシュ体表上における黄色素胞と黒色素胞の配置に関する電子顕微鏡解析では、これら色素胞の間に虹色素胞の層があり、両者を隔てていた。この結果、細胞間相互作用がどのような形で行われているのかははっきりしなかった。そこで、大阪大学超高压電子顕微鏡センター西田倫希博士の助けを借りて、色素胞の解析を行った。その結果、黒色素胞が非常に長い仮足を伸ばし、黄色素胞に接触している様子が明らかになった (図 4)。

反応拡散モデル

2 つの因子が相互作用により、空間パターンを作るという数理モデルが、今から約 60 年前にイギリスの数学者であるアラン・チューリングにより提唱されている¹⁹。本研究では 2 つの因子を 2 つの細胞、黄色素胞と黒色素胞に置き換え、その相互作用を探ってきた (図 5)。これまでのところ、両因子 (細胞) 間に存在する抑制性の相互作用が Kir7.1 によるものであることが明らかになった。また、黄色素胞から黒色素胞への活性化に関して、これについてはまだ確定してはいないが、長い仮足上に形成されるギャップ結合の持つ整流性によるものでないかと示唆される結果が得られた。上述した体表上に様々な模様を作る現象、特にストライプが割れる現象については、ギャップ結合を介した、黄色素胞から黒色素胞への活性化シグナルの減少に起因するのではないかと考えられる。今後は、この作用・表現型を手がかりに、ギャップ結合を介したシグナルの実態解明を行いたいと考えている。ところで、模様が割れる現象については、初期条件をストライプではなくスポット、つまり、スポットの魚に割れる遺伝子を導入することにより、ヒョウ柄を作ることができる (図 6、7)。この現象は、まさに反応拡散モデルで予想された通りの結果である。

まとめ

ゼブラフィッシュのストライプ模様を題材に細胞自律的なパターン形成の分子機構の解明を目指している。これまでのところ、コネキシンやカリウムチャネルといった、膜タンパク質が重要な機能を担っていることが明らかとなった。これらの分子は、まさに、反応拡散モデルの中核を担う分子である。また、これ以外にも細胞間相互作用を担う遺伝子の単離が進められており、近いうちに分子機構の全容解明ができるも

のと期待される。

謝辞

本研究は大阪大学大学院生命機能研究科近藤滋研究室で行われました。電子顕微鏡解析は、大阪大学超高压電子顕微鏡センター西田倫希博士との共同研究です。

文献

1. Kelsh, R. N., Harris, M. L., Colanesi, S. & Erickson, C. A. (2009). Stripes and belly-spots -- a review of pigment cell morphogenesis in vertebrates. *Semin Cell Dev Biol* **20**, 90-104.
2. Dutton, K. A., Pauliny, A., Lopes, S. S., Elworthy, S., Carney, T. J., Rauch, J., Geisler, R., Haffter, P. & Kelsh, R. N. (2001). Zebrafish colourless encodes sox10 and specifies non-ectomesenchymal neural crest fates. *Development* **128**, 4113-25.
3. Parichy, D. M., Mellgren, E. M., Rawls, J. F., Lopes, S. S., Kelsh, R. N. & Johnson, S. L. (2000). Mutational analysis of endothelin receptor b1 (rose) during neural crest and pigment pattern development in the zebrafish *Danio rerio*. *Dev Biol* **227**, 294-306.
4. Parichy, D. M., Ransom, D. G., Paw, B., Zon, L. I. & Johnson, S. L. (2000). An orthologue of the kit-related gene *fms* is required for development of neural crest-derived xanthophores and a subpopulation of adult melanocytes in the zebrafish, *Danio rerio*. *Development* **127**, 3031-44.
5. Parichy, D. M., Rawls, J. F., Pratt, S. J., Whitfield, T. T. & Johnson, S. L. (1999). Zebrafish *sparse* corresponds to an orthologue of *c-kit* and is required for the morphogenesis of a subpopulation of melanocytes, but is not essential for hematopoiesis or primordial germ cell development. *Development* **126**, 3425-36.
6. Parichy, D. M. & Turner, J. M. (2003). Temporal and cellular requirements for *Fms* signaling during zebrafish adult pigment pattern development. *Development* **130**, 817-33.
7. Rawls, J. F. & Johnson, S. L. (2001). Requirements for the kit receptor tyrosine

- kinase during regeneration of zebrafish fin melanocytes. *Development* **128**, 1943-9.
8. Lister, J. A., Close, J. & Raible, D. W. (2001). Duplicate mitf genes in zebrafish: complementary expression and conservation of melanogenic potential. *Dev Biol* **237**, 333-44.
 9. Lister, J. A., Robertson, C. P., Lepage, T., Johnson, S. L. & Raible, D. W. (1999). nacre encodes a zebrafish microphthalmia-related protein that regulates neural-crest-derived pigment cell fate. *Development* **126**, 3757-67.
 10. Watanabe, M., Iwashita, M., Ishii, M., Kurachi, Y., Kawakami, A., Kondo, S. & Okada, N. (2006). Spot pattern of leopard Danio is caused by mutation in the zebrafish connexin41.8 gene. *EMBO Rep* **7**, 893-7.
 11. Eom, D. S., Inoue, S., Patterson, L. B., Gordon, T. N., Slingwine, R., Kondo, S., Watanabe, M. & Parichy, D. M. (2012). Melanophore migration and survival during zebrafish adult pigment stripe development require the immunoglobulin superfamily adhesion molecule Igslf11. *PLoS Genet* **8**, e1002899.
 12. Iwashita, M., Watanabe, M., Ishii, M., Chen, T., Johnson, S. L., Kurachi, Y., Okada, N. & Kondo, S. (2006). Pigment pattern in jaguar/obelix zebrafish is caused by a Kir7.1 mutation: implications for the regulation of melanosome movement. *PLoS Genet* **2**, e197.
 13. Asai, R., Taguchi, E., Kume, Y., Saito, M. & Kondo, S. (1999). Zebrafish leopard gene as a component of the putative reaction-diffusion system. *Mech Dev* **89**, 87-92.
 14. Nakamasu, A., Takahashi, G., Kanbe, A. & Kondo, S. (2009). Interactions between zebrafish pigment cells responsible for the generation of Turing patterns. *Proc Natl Acad Sci USA* **106**, 8429-34.
 15. Yamaguchi, M., Yoshimoto, E. & Kondo, S. (2007). Pattern regulation in the stripe of zebrafish suggests an underlying dynamic and autonomous mechanism. *Proc Natl Acad Sci USA* **104**, 4790-3.
 16. Watanabe, M., Watanabe, D. & Kondo, S. (2012). Polyamine sensitivity of gap junctions is required for skin pattern formation in zebrafish. *Sci Rep* **2**, 473.

17. Watanabe, M. & Kondo, S. (2012). Changing clothes easily: connexin41.8 regulates skin pattern variation. *Pigment Cell Melanoma Res* **25**, 326-30.
18. Inaba, M., Yamanaka, H. & Kondo, S. (2012). Pigment pattern formation by contact-dependent depolarization. *Science* **335**, 677.
19. Turing, A. (1952). The Chemical Basis of Morphogenesis. *Phil. Trans. R. Soc. Lond. B* **237**, 37-72.

☒

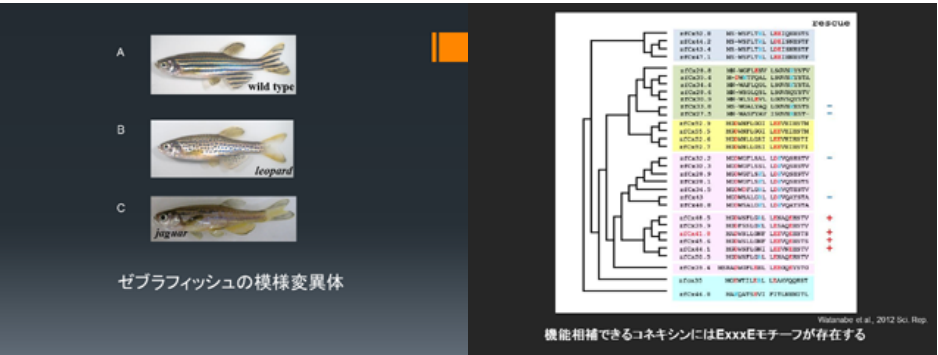


図 1

図 2

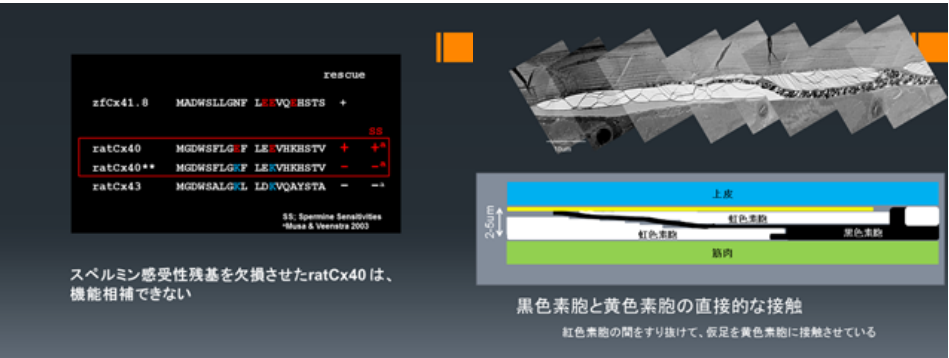


図 3

図 4



図 5

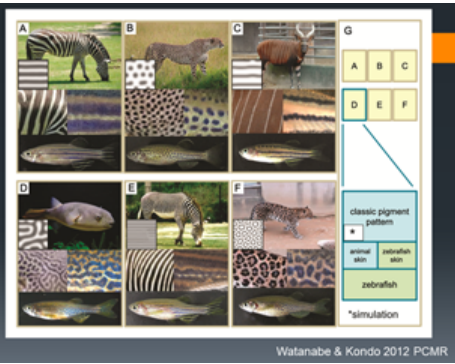


図 6

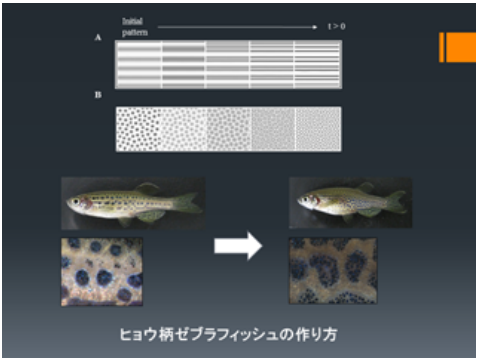


図 7

実験用シロネズミの起源

京都大・医・動物実験施設
ナショナルバイオリソースプロジェクト「ラット」
庫本高志

実験用シロネズミは、世界中でひろく用いられている代表的な実験動物です。しかし、その起源は知られていませんでした。我々は、全世界で利用されているシロネズミ 117 系統の DNA を調べて、すべての系統が共通してたったひとつのアルビノ突然変異を持っていることを突き止めました。さらに、このアルビノ変異は、まだら模様をもったラットに生じた可能性が非常に高いことがわかりました。ラットが実験動物化された 1850 年ごろのヨーロッパでは、シロネズミも、まだらネズミも実験に使われていました。両者が共に記されている最古の文献は、我々の調べた限り、大坂で出版された『養鼠玉のかけはし（1775）』です。ここでは、“まだら”や“目赤の白”といった珍しいネズミが愛玩動物として紹介されています。もしかしたら、日本で愛玩動物として飼育されていたネズミが江戸時代にヨーロッパに渡り、その後米国を経て、現在のように世界に広まったのかもしれない。

シロネズミとは、アルビノラットのこと。

ねずみ(鼠)という和語は、『和漢三才図会』(1712 年)によると、ラット(学名 *Rattus norvegicus*、和名ドブネズミ)のことをさす。ちなみに、マウス(和名ハツカネズミ)は、のらこ([鼠句][鼠青])と呼ばれていた(Kuramoto 2011)。



従って、シロネズミとは、白いラット。すなわち、毛色の白いラットのことである。毛色の白いラットの中にも、眼が赤いものと黒いものがある。目赤の白とは、現在でいう、アルビノである。また、目黒の白とは、現在では、Kit 遺伝子座の変異体に見られる。

実験用シロネズミ。先天的にメラニン色素が合成できないために、白い毛色、赤い眼となる。

ラットを用いた研究の歴史

ラットは 1850 年ごろから学術研究に用いられた。ラットを利用したもっとも古い学術論文は、栄養学に関するもので、英国人 Savory によって

1863 年に Lancet 誌に公表されている(Savory 1863)。1885 年には、ドイツ人 Crampe が、ラットを用いた交配実験で、メンデルの『遺伝の法則』が哺乳動物でも成り立つことを示している(Crampe 1885)。



実験用まだらネズミ。
Hooded 変異をホモにもつことで、体毛の色素分布が変わり、胸部から臀部が白くなる。頭部から上腕部にのみ色素が分布し、あたかも「頭巾」をかぶったかのような模様になる。そのためこのような模様を「頭巾斑」と呼ぶ。

彼らは、Grey ラット(野生色)、Albino ラット(アルビノ)、Piebald ラット(まだら、あるいは、頭巾斑)の 3 種類のラットを用いて実験した。つまり、1850 年ごろには、野生色ラットに加え、アルビノラットとまだらラットが存在していた。

Wistar 研究所と Donaldson

1900 年以降の、ラット系統の確立過程の歴史は、かなり明確な記録として残っている。なかでも、大きな役割を果たしたのは、Wistar 研究所である。1906 年 Donaldson が第 3 代の所長となり、アルビノラットの標準化に取り組んだ。その後、Wistar ラットは、アルビノラットの代表格として現在でも広く用いられている。世界で利用されているラットの約半数はウイスター研究所由来とされる。



WISTAR 研究所
1894 年、ペンシルベニア大・
医・解剖学教室 CASPER
WISTAR 教授を記念して設立。
1905 年、神経学、比較解剖学、発生学に焦点。
1906 年、DONALDSON が研究所長となり、アルビノラットの標準化に取り組む。
世界で利用されているラットの約半数はウイスター研究所由来とされる。

では、Wistar 研究所に持ち込まれたラットはどのようなものなのであったのだろうか？

Donaldson が述べている(Donaldson 1915)。“ラットは、野生または飼いに馴らされたものを入手できた。後者は、アルビノか、まだらが主であった。アルビノの由来は、ひとつなのか複数なのかわからなかった。ヨーロッパのコロニーに関係しているのかもわからなかった。”

つまり、Wistar 研究所に持ち込まれたラットの多くは、アルビノラットとまだらラットであったが、アルビノラットの起源はヨーロッパの研究室で使われていたアルビノラットであったのか、あるいは、米国で捕獲された野生ラットのアルビノ変異体であったのかは不明であったようだ。

分子遺伝学的なアプローチでシロネズミの起源を探る

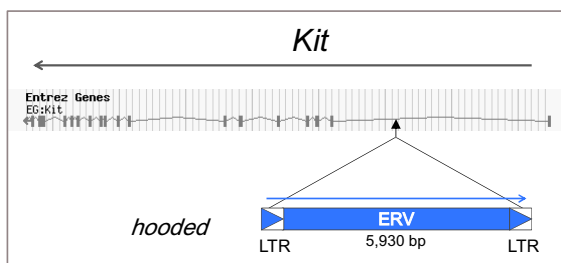
現在利用できるアルビノラットやまだらラットの大半が Wistar 研究所由来である。そこで、アルビノ変異と hooded 変異(まだら模様の原因変異)の遺伝子レベルでの変異を特定し、それらの変異の有無を現在存在しているラットが持っているかどうかを調べることにした。

アルビノ変異についてはチロシナーゼ遺伝子のミスセンス変異 (Arg299His) であることがすでに報告されていた (Blaszczyk et al. 2005)。ナショナルバイオリソースプロジェクト「ラット」を通じて世界各国から集められた 117 系統のアルビノラット系統を対象に、Arg299His 変異の有無を調べた。その結果、すべての系統が同一のアルビノ変異をもっていることが分かった。つまり、世界中でもちいられているアルビノラット系統には、起源となるアルビノラットがいたことが分かった。

一方の hooded 変異については、第 14 染色体の D14Rat84 と D14Got40 の間にマッピングされており、候補遺伝子として Kit 遺伝子が挙げられていた (Torigoe et al. 2011)。

そこで、hooded 遺伝子の同定を試みた。まず、897 頭の戻し交雑子とラット近交系の SNP マーカーによるハプロタイプ解析を行い、hooded 座位を Kit 遺伝子上流を含む約 92kb のゲノム領域に絞り込んだ。次いで、hooded 変異を見つけるために、hooded 座位をカバーする BAC クローンを単離し、その挿入配列を決定した。対象となる BAC クローンは、hooded 変異ホモである F344/Stm ラットと LE/Stm ラットから作製したものである。F344 由来の BAC クローン RNB1-043O06 と LE/Stm 由来の BAC クローン RNB1-272P10 が hooded 座位を含んでいることを確認し、挿入の配列を決定した。その結果、両系統では、Kit 遺伝子イントロン 1 内に 5,930bp の内在性レトロウイルス配列が挿入されていることが判明した。

ナショナルバイオリソースプロジェクト「ラット」を通じて集められた 55 系統の有色ラット系統を対象に、この挿入変異の有無を調べた。まだらラット 37 系統全てが、挿入変異を持っていた。一方、野生型毛色の系統 18 系統は、挿入変異をもっていなかった。すなわち、挿入変異の有無と、まだら模様の有無が完全に一致した。以上のことから、まだら模様の原因 (hooded 変異) の正体は、Kit 遺伝子内の挿入変異であると結論した。



Kit 遺伝子内の挿入変異

Hooded 遺伝子をホモに持つラットでは、Kit 遺伝子イントロン 1 に内在性レトロウイルスの挿入変異がみられた。

		チロシナーゼ 変異	
Kit 変異	あり <アルビノ>	117 	37 
	なし	0	18 

172ラット近交系の遺伝子型

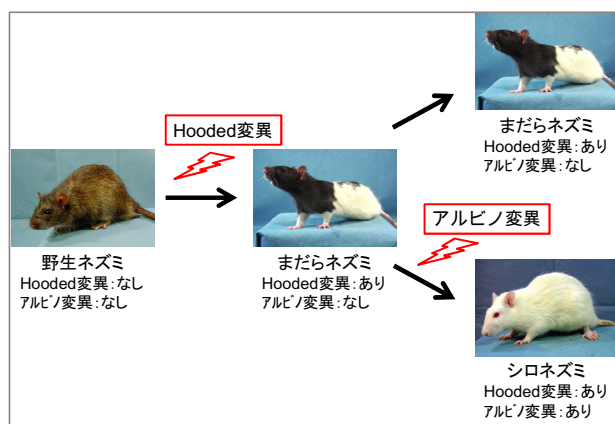
172 系統の遺伝子型を Kit 挿入変異の有無とアルビノ変異の有無で分類した。有色系統では、挿入変異の有無と、まだら模様の有無が完全に一致した。一方、アルビノ系統では、調べた全ての系統が Kit 挿入変異を持っていた。

全てのアルビノラット系統は、hooded 変異をもつ

Hooded 変異の正体が判明したことで、アルビノラット系統が hooded 変異を持つかどうかを遺伝子診断できるようになった(アルビノラットでは、色素そのものが作り出されない。そのため、hooded 変異を持っていても、その効果、すなわち、まだら模様が外に現われない)。そこで、アルビノラット系統 117 系統を調べた。その結果、全てのアルビノラット系統が、Kit 遺伝子の挿入変異をもっていることが分かった。(Kuramoto et al. 2012)

以上の結果から、以下の 2 点が考えられた。

- ①「シロネズミ」の起源となる一頭のネズミ(アダムあるいはイブ)がいた。
- ②その「シロネズミ」は、「まだらネズミ」から出現した。



「シロネズミ」と「まだらネズミ」との関係
世界中の「シロネズミ」は例外なく、Kit 遺伝子の変異をもつ。このことは、「まだらネズミ」にアルビノ変異が生じたと考えれば、説明が付きやすい。

新たな謎：「まだらネズミ」と「シロネズミ」の起源は？

それでは、1850 年以前のラットに関する記録には、まだらネズミとシロネズミに関する記載はあるのであろうか。

まず、19 世紀前半に人気のあった娯楽である Rat Baiting がある。これはギャンブルの一種で、テリア犬などの猟犬が、ピットに放たれた一定数(例えば 100 頭)のラットを全てかみ殺すまでの時間を賭けの対象とする。当然のことながら多数のラットが必要となる。ラットを捕獲あるいは繁殖したようであるが、その過程でアルビノラットが発見されたと考えられている(Richter 1954)。しかし、この話は我々の結果と相い入れない。我々の結果から、アルビノラットはまだらラットから出現したとなっているからである。



Rat baiting から半世紀ほど前の 1787 年には、日本の大坂で『珍翫鼠育草』が出版されている。この本は、珍翫鼠つまり、珍しい愛玩用ネズミの継代方法を記したものである。ここに、“ぶち(まだら)”あるいは“目赤の白”のネズミが紹介されている。

さらに、『珍翫鼠育草』より 12 年前の 1775 年に、『養鼠玉のかけはし』が大坂で出版されている。この本は、ネズミの飼育書の第一号であり、作者の春帆堂主人は、ネズミの愛好家で珍しいネズミを多数飼育していた。この中に、まだらネズミとシロネズミに関する記載がある。

“斑鼠(またらねすみ)は白黒のまだらなり。明和年中。大坂或養鼠家(ようそか)価を費して。奇品を玩(もてあそば)れしに。初て産す。”

“白鼠は年を歴て変ぜしものにはあらず。別に一種のものにて。其上品とするものは、尾長く毛うるはしく。耳大に顔長く眼赤し。”

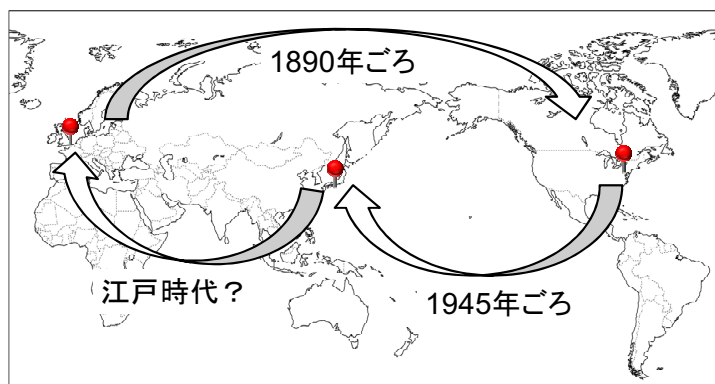


『養鼠玉のかけはし』の挿絵(部分拡大)
ネズミ屋の主人が手の上にまだらネズミをのせている。

このように、日本では江戸時代、ネズミを飼い馴らしてペットとして飼うという豊かな文化があった。

江戸時代、日本は長崎の出島を通じてヨーロッパとつながっていた。ひょっとしたら、よく飼い馴らされた珍しい毛色のネズミをヨーロッパ人たちが祖国に持ち帰り、それらが愛玩動物として大切に飼育されたのかもしれない。そして、その子孫が 1850 年ごろ、扱いやすいという理由で、実験用の動物に利用されたのではないか。シロネズミやまだらネズミの起源を探っていくと、案外、日本それも関西、とくに大坂に行き当たるかもしれない。

江戸時代の上方由来のシロネズミやまだらネズミが、現在の実験用ラットの祖先となり、21 世紀の研究を支えている。このように思いをめぐらすことができる。



1700 年後半、日本の上方では、ネズミを愛玩動物として飼う文化があった。珍しい毛色のネズミたちは、欧米に渡った可能性がある。その後、日本由来のラットたちはヨーロッパで飼育され、1850 年ごろ実験に用いられたのかもしれない。1890 年ごろには米国東部に導入され、本格的に実験動物として利用された。Wistar 研究所を通して、全世界に広まった。このように思いをめぐらすこともできよう。

謝辞

本研究はナショナルバイオリソースプロジェクト「ラット」の一環として行われた。ナショナルバイオリソースプロジェクト「ラット」の構成員、特に、芹川忠夫教授、Birger Voigt 研究員、中西聡技術専門職員に御礼申し上げます。

参考文献

Blaszczyk WM, Arning L, Hoffmann KP, Epplen JT (2005) A Tyrosinase missense mutation causes albinism in the Wistar rat. *Pigment Cell Res* 18, 144-145

Crampe H (1885) *Landwirtschaftliche Jahrbücher*.

Donaldson HH (1915) The Rat data and reference tables.

Kuramoto T (2011) Yoso-tama-no-kakehashi; the first Japanese guidebook on raising rats. *Exp Anim* 60, 1-6

Kuramoto T, Nakanishi S, Ochiai M, Nakagama H, Voigt B, Serikawa T (2012) Origins of albino and hooded rats: implications from molecular genetic analysis across modern laboratory rat strains. *PLoS One* 7, e43059

Richter CP (1954) The effects of domestication and selection on the behavior of the Norway rat. *J Natl Cancer Inst* 15, 727-738

Savory WS (1863) Experiments on food; its destination and uses. *Lancet* 1, 381-383

Torigoe D, Ichii O, Dang R, Ohnaka T, Okano S, Sasaki N, Kon Y, Agui T (2011) High-resolution linkage mapping of the rat hooded locus. *J Vet Med Sci* 73, 707-710

脂質代謝・動脈硬化研究におけるウサギの有用性
・ ヒト apoA-II トランスジェニックウサギの開発と応用

小池智也¹、北嶋修司²、西島和俊²、渡辺照男²、塩見雅志¹、範江林³

¹ 神戸大学大学院医学研究科附属動物実験施設

² 佐賀大学総合分析実験センター生物資源開発部門

³ 山梨大学大学院医学工学総合研究部分子病理学講座

はじめに

実験動物としてのウサギは、脂質代謝がヒトに類似しコレステロール食の投与により動脈硬化を容易に発症することから、脂質代謝・動脈硬化の分野で古くから活用されてきた。この利点を生かし、脂質代謝ならびに動脈硬化に関わる遺伝子の機能解析（因果関係の検討、分子機序の解明等）にウサギを応用すべく、当研究グループは遺伝子改変ウサギの開発と研究応用に本邦で初めて着手し、さらに、神戸大学にて樹立された WHHL ウサギを活用することで、脂質代謝ならびに動脈硬化の key molecule の機能解析を独自に推進してきた(1)。

本稿では、脂質代謝・動脈硬化研究にウサギの果たしてきた役割を概説し、当グループで推進しているウサギの遺伝子改変モデルによる成果を例示することで、ウサギモデルの有用性の一端をお示ししたい。

ウサギと脂質代謝・動脈硬化研究の歴史

動脈硬化が発生する要因を栄養学の観点から解明しようという試みが 1900 年代の前半から行われた。Ignatowski はヒトで得られた知見に基づき、ウサギに肉を与え動脈硬化を発生させることに成功した(2)。このウサギを使用した実験系は以降の多くの研究で採用され、動脈硬化を起こす食材（蛋白質・脂質）が絞込まれていった(3)。そして、今からちょうど 100 年前、ロシアの実験病理学者 Anitschkow らにより、コレステロール（植物油に混合）の投与でウサギに動脈硬化を惹起できることが観察され、現在定説となった「コレステロール - 動脈硬化」仮説の確立に大きく貢献した(4)。

その後も脂質代謝・動脈硬化研究の極めて重要な発見にウサギが貢献している。特に 1973 年には、大きな 3 つの発見があった。1 つは、WHHL ウサギの祖となる高脂血症ウサギが神戸大学動物実験施設の渡辺によって発見された(5)。2 つめは、細胞のコレステロール代謝に受容体を介する系が存在する可能性〔低比重リポ蛋白(LDL)受容体仮説〕が、米国テキサス大学の Goldstein, Brown らによって提唱された(6)。彼らはその後 LDL 受容体の発見によって仮説を実証し、細胞内コレステロール代謝調節

系の全容を解明した功績によって 1985 年にノーベル賞を受賞したが、その研究には彼らに分与された WHHL ウサギが大きく貢献していた。WHHL ウサギの変異遺伝子が LDL 受容体であったという偶然が、研究の完成を格段に早めた。3 つめは、高コレステロール血症の治療薬として現在世界で最も多く処方されるスタチン系薬剤（HMG-CoA 還元酵素阻害剤）が、三共製薬の遠藤らによって発見された。動物を用いた前臨床試験ではげっ歯類に投与しても血中コレステロールの低下は認められなかったが、中～大型動物のイヌ、サル、ニワトリ、ウサギに投与したところコレステロールが著明に低下し、その効果はウサギで最も顕著に見られた(7)。

脂質代謝・動脈硬化研究におけるウサギの利点

脂質代謝・動脈硬化の分野でウサギが貢献できた背景には、その脂質代謝が他のげっ歯類モデルと比べ、ヒトに近いことが強く関係している。表 1 に示すように、ウサギの血中にはリポ蛋白代謝に重要なコレステリルエステル転送蛋白(CETP)がある。この蛋白は、コレステロールを血管壁に運ぶ“悪玉”リポ蛋白の LDL と、血管壁のコレステロールを肝臓に戻す“善玉”リポ蛋白の HDL との間で脂質を交換させる蛋白である。この CETP が無いマウスの血中では HDL・コレステロールがほとんどだが、CETP があるヒトの血中では LDL・コレステロールが多い。ウサギにはこの蛋白があるため相対的な LDL・コレステロール量が多く、LDL 受容体を欠損すると(WHHL ウサギ)、大量の LDL が血中に滞留し、LDL 受容体を欠損したヒト（家族性高コレステロール血症）とよく似た脂質プロファイルとなる。一方で、マウスの LDL 受容体が欠損しても LDL を主体とした脂質プロファイルにはならず、高脂血症の程度も軽い。他にも、アポリポ蛋白(アポ)B48 という特殊な蛋白が産生される臓器が、げっ歯類とヒトの間で異なるが、その点でもウサギはヒトと一致している。

トランスジェニックウサギの開発と応用

このようなウサギの利点を生かし、脂質代謝・動脈硬化との関係が示唆される遺伝子の機能解析を行うべく、トランスジェニック (Tg) ウサギの開発が行われた。Tg マウスの報告から遅れること 5 年 (1985 年)、Hammer らによって Tg ウサギの初めての報告がなされた(8)。ウサギを含む家畜への遺伝子操作を目的に行われたこの研究では、遺伝子導入に成功したものの蛋白の発現量が少なく、明らかな表現型を示すウサギは得られなかった。しかしながら、ウサギでも遺伝子改変モデルが開発可能であることを示した画期的な報告であった。その 9 年後の 1994 年、当時カリフォルニア大学サンフランシスコ校(UCSF) のポスドクであった共著者（範江林）によって初めて、脂質代謝関連遺伝子を導入された Tg ウサギが報告されている(9)。また、同時期に UCSF に留学していた山中伸弥（2012 年ノーベル生理学・医学賞受賞）も遺伝子改変ウサギの開発に携わっていた。山中は範らとともに、ウサギとマウスへの遺伝子操作により脂質異常症の遺伝子治療の可能性を探ったが、治療効果を期待して肝臓に

脂質代謝関連遺伝子(APOBEC-1)を導入した結果、腫瘍が発生してしまい、その試みは失敗に終わっている(10)。その後、筑波大学に招聘された範らのグループが中心となって数多くの Tg ウサギが本邦で開発され、脂質異常症や動脈硬化の発症に重要な役割を果たす遺伝子・蛋白が明らかにされていった(1)。

Tg ウサギの研究例 1：リポ蛋白リパーゼ(LPL) Tg ウサギ

著者(小池)は範のもとで修士・博士課程の学生として、Tg ウサギの研究に携わった。博士論文の研究では、脂質代謝酵素のリポ蛋白リパーゼ(LPL)がエネルギー代謝やそれに派生した糖代謝にどのような役割を果たすかを検討した。特に、環境因子の影響が大きいとされるヘテロ型の家族性高コレステロール血症患者を模したヘテロ型 WHHL ウサギに、LPL 遺伝子を導入し (LPL Tg WHHL ウサギ)、環境負荷として高脂肪食を投与した。その結果、LPL 遺伝子を過剰発現した WHHL ウサギでは、高脂肪食を与えても、発症する肥満の程度が軽く、脂肪細胞の肥大が抑制されていた(図 1)(11)。さらに、高脂肪食負荷に伴い進行するインスリン抵抗性の程度も軽度であった。この Tg ウサギでは、chicken β -actin promoter によって全身的に LPL 遺伝子を過剰発現させていたが、詳細な検討の結果、エネルギー代謝の主要臓器である筋肉での LPL の発現量が最大であった(11,12)。このために、LPL によってリポ蛋白中のトリグリセリドから切り出された遊離脂肪酸が、脂肪組織よりも筋肉に多く取り込まれ酸化・消費されたことで、肥満とインスリン抵抗性の抑制につながったことが示唆された。

Tg ウサギの研究例 2：C 反応性蛋白(CRP) Tg ウサギ

C 反応性蛋白(CRP)は自然免疫に関わる古典的な蛋白(1929 年発見)だが、急性炎症時にその濃度が急激に上昇するため、現在もなお鋭敏な炎症マーカーとして臨床で用いられている。しかし 2000 年代初頭より、急性炎症のない人の血中に存在する微量の CRP を検出できる ELISA キットが開発され、微量の CRP 濃度が高い傾向にある患者では、その後の心筋梗塞発症率が高いことが判明し、一躍脚光を浴びた。特に、CRP と動脈硬化の間にどのような因果関係があるのか(心筋梗塞のリスクの高い人の血中で高値を示すマーカーなのか、CRP が直接的に動脈硬化・心筋梗塞発症に関与しているのか)が注目され、動物実験が計画された。しかしながら、CRP はげっ歯類においてほとんど発現・機能がなく、マウスモデルでは CRP と動脈硬化の関係を明らかにできないことが指摘されていた。一方、ウサギでは、CRP がヒトと同様に炎症によって発現が誘導され、生理機能も有しているため、ウサギを用いれば CRP と動脈硬化の関係が明らかになると考え、検討を行った。まず、正常ウサギならびに 2 種類の動脈硬化ウサギ(コレステロール食負荷ウサギと WHHLM I ウサギ)の血中 CRP を測定したところ、正常ウサギに比べ動脈硬化ウサギで血中 CRP 値が高く、動脈硬化の程度が最も強い WHHLM I ウサギでその値が最大となった(図 2)。WHHLM I ウサギの動脈硬化病変を免疫染色すると、CRP が病変内に染まり、動脈硬化病変内に CRP が存

在していることが明らかになった(13)。この検討により CRP と動脈硬化との密接な関係が示されたため、次に CRP Tg ウサギの開発により直接的な因果関係 (CRP が動脈硬化を発生・進展させるのか) を検証した。CRP は生理的には肝臓特異的な発現を示すため、ヒト CRP を肝臓で発現する Tg ウサギの開発を行い、発現量の異なる 2 系統の作製に成功した。これらにコレステロール食を与え動脈硬化を発生させたところ、大動脈、冠動脈のいずれの動脈硬化も、対照群との間に有意な差は認められなかった (図 2)。免疫染色の結果、トランスジェニックウサギのヒト CRP は動脈硬化病変に大量に沈着していた。この検討により、肝臓で産生された CRP は血中から動脈硬化病変へと漂着するが、病変の発生進展にはほとんど影響していないことが判明し、CRP は単なるマーカー蛋白であることが明らかになった(14)。

Tg ウサギの最近の成果：アポリポ蛋白 A-II Tg ウサギ

近年、脂質異常症・動脈硬化改善の標的として HDL が特に注目を集めている。HDL は抗動脈硬化作用のある“善玉”リポ蛋白としてよく知られ、その作用は主にアポ A-I (HDL の構成蛋白) が担っている。HDL には他にもアポ A-II が存在するが、アポ A-I に比べその機能は十分に解明されていなかった。その背景にまたしても脂質代謝の種差があった。アポ A-II の研究はマウスによって数多く行われてきたが、マウスの脂質代謝、特に HDL 代謝は、表 1 に示すごとく、CETP がいないことでヒトとは大きく異なっている。さらに、マウスには、ヒトのアポ A-II とは構造も機能も異なる内因性マウスアポ A-II が存在し、これを KO してもヒトアポ A-II の役割は分からない。また、マウスに遺伝子導入を行っても、ヒトとは機能の異なるマウスアポ A-II の濃度が変動してしまい、ヒトアポ A-II の作用だけを明らかにすることが困難であった(15)。一方、ウサギには、アポ A-II に相当する蛋白が発現していない。そのため、ウサギにヒトアポ A-II を発現することで、長らく不明であったアポ A-II の機能が明らかになると考え、研究を開始した。ヒトアポ A-II の発現調節系も含むゲノム配列をウサギの受精卵に注入し、ヒトアポ A-II Tg ウサギを開発した。発現量の異なる 3 系統の開発に成功し、これらを用いて、アポ A-II が脂質代謝に及ぼす影響について検討を行った。その結果、アポ A-II の血中濃度が高値になるほど、血中のトリグリセリド(TG)と総コレステロール(TC)が高値になり、一方で HDL・コレステロール(HDL-C)は低下した。最も発現量の高い系統の血中アポ A-II 濃度が 30 mg/dl 程度であり、健常ヒトの平均値と一致していたため、この系統を用いて詳しく解析した。雌雄のウサギを用いて、絶食時と摂食後で血中脂質を測定したところ、いずれにおいてもアポ A-II Tg ウサギでは TC、TG、リン脂質が高値を示し、HDL・コレステロールが低値であり、脂質異常症と呼ばれる動脈硬化惹起性の病態が生じていた(図 3)(16)。しかしながら、2 年間の長期観察を行った結果、アポ A-II Tg ウサギでは動脈硬化を自然発症しなかった。そこで、食餌でのコレステロール負荷により動脈硬化を発生させ、アポ A-II の動脈硬化に対する役割を検討した(17)。コレステロール投与期間中の脂質値は、Tg ウサギで TG が高

い傾向にあったが TC と HDL-C に顕著な差は認められなかった。16 週間のコレステロール投与終了後、大動脈病変を脂肪染色したところ、アポ A-II ウサギでは動脈硬化病変が著明に少ないことが明らかになった(図 4)。冠動脈硬化による狭窄率も Tg ウサギで軽度な傾向にあり、動脈硬化病変を免疫染色したところ病変内にアポ A-II が沈着していた。また、全身的な炎症状態の指標として血中 CRP を計測すると、対照群ではコレステロール投与後著明に増加し炎症状態の惹起が示唆されたが、アポ A-II ウサギでは投与後も CRP 値が低値のままであった。抗酸化能の指標となる血中 Paraoxonase 活性もアポ A-II ウサギのほうが高値であった。これらの結果から、アポ A-II には強力な抗炎症・抗酸化・抗動脈硬化作用があることが推察されたため、アポ A-II が HDL の機能にどのような変化を及ぼしたかを *in vitro* にて検討した。マクロファージ系細胞株の U937 にリポ多糖(LPS)を投与し炎症を惹起させる実験系に、Tg ウサギと対照群から採取した HDL を添加し抗炎症作用を検討した結果、両群の HDL がマクロファージからの炎症性サイトカインの分泌を著明に抑制した。2 群間でその効果を比較すると、アポ A-II ウサギ由来の HDL でより強い抗炎症作用が認められた。また HDL の直接的な抗動脈硬化作用として、病変からのコレステロール引き抜き能についても両群の HDL で検討し、アポ A-II ウサギの HDL でコレステロール引き抜き能が高いことが明らかになった。アポ A-I のコレステロール引き抜きには ABCA1 と呼ばれる脂質転送蛋白が必須となるが、ABCA1 を強制発現させた細胞実験ならびに ABCA1 阻害剤の投与実験により、アポ A-II のコレステロール引き抜きにも ABCA1 が関与していることが判明した。また、アポ A-II は高脂血症患者において HDL 以外のリポ蛋白にも存在していることが知られており、コレステロールを投与されたアポ A-II ウサギでも、HDL 以外の動脈硬化惹起性のあるリポ蛋白に少量ながらアポ A-II が存在していたため、これらのリポ蛋白の酸化感受性を検討した。すると、コレステロール投与ウサギで最も強い動脈硬化惹起性を持つ β -VLDL において、アポ A-II を含む β -VLDL は酸化されにくいことが判明した。これらの結果から、これまでその役割が不明であったアポ A-II に著明な抗動脈硬化作用があることが初めて明らかにされた。

Tg ウサギの展望

上述のように、脂質代謝系がヒトとよく類似したウサギモデルを活用して、脂質代謝や動脈硬化への作用が未知の遺伝子を解析することで、有益な知見が得られることを実証してきた。また、動物種の違いは、結果に大きく影響する場合がある。表 2 に示すごとく、同一の遺伝子を過剰発現した Tg モデルでも、マウスとウサギで動脈硬化に対する作用が正反対であったという事例が複数報告されている。このことから、研究目的に応じた動物種の選択の重要性が再認識される。今回のアポ A-II が示した著明な抗動脈硬化作用は、今後、さらなる検討を重ね、新たな動脈硬化の予防・治療法の開発へと発展させることにより、ウサギモデルのトランスレーショナルリサーチへの有用性についても追求していきたい。

1. Fan, J., and Watanabe, T. (2003) *Pharmacol Ther* **99**, 261-282
2. Ignatowski, A. (1908) *Arch. Med. Exp. Anat. Pathol.* **20**, 1-20
3. Kritchevsky, D. (1995) *J Nutr* **125**, 589S-593S
4. Anitschkow, N., and Chaladow, S. (1913) *Zentralbl. Allg. Pathol. Pathol. Anat.* **24**, 1-9
5. Shiomi, M., Koike, T., and Ito, T. (2013) *Atherosclerosis* **231**, 39-47
6. Goldstein, J. L., and Brown, M. S. (2009) *Arterioscler Thromb Vasc Biol* **29**, 431-438
7. 遠藤章. (1980) *生化学* **52**, 1033-1049
8. Hammer, R. E., Pursel, V. G., Rexroad, C. E., Jr., Wall, R. J., Bolt, D. J., Ebert, K. M., Palmiter, R. D., and Brinster, R. L. (1985) *Nature* **315**, 680-683
9. Fan, J., Wang, J., Bensadoun, A., Lauer, S. J., Dang, Q., Mahley, R. W., and Taylor, J. M. (1994) *Proc Natl Acad Sci U S A* **91**, 8724-8728
10. Yamanaka, S., Balestra, M. E., Ferrell, L. D., Fan, J., Arnold, K. S., Taylor, S., Taylor, J. M., and Innerarity, T. L. (1995) *Proc Natl Acad Sci U S A* **92**, 8483-8487
11. Koike, T., Liang, J., Wang, X., Ichikawa, T., Shiomi, M., Liu, G., Sun, H., Kitajima, S., Morimoto, M., Watanabe, T., Yamada, N., and Fan, J. (2004) *J Biol Chem* **279**, 7521-7529
12. Kitajima, S., Morimoto, M., Liu, E., Koike, T., Higaki, Y., Taura, Y., Mamba, K., Itamoto, K., Watanabe, T., Tsutsumi, K., Yamada, N., and Fan, J. (2004) *Diabetologia* **47**, 1202-1209
13. Sun, H., Koike, T., Ichikawa, T., Hatakeyama, K., Shiomi, M., Zhang, B., Kitajima, S., Morimoto, M., Watanabe, T., Asada, Y., Chen, Y. E., and Fan, J. (2005) *Am J Pathol* **167**, 1139-1148
14. Koike, T., Kitajima, S., Yu, Y., Nishijima, K., Zhang, J., Ozaki, Y., Morimoto, M., Watanabe, T., Bhakdi, S., Asada, Y., Chen, Y. E., and Fan, J. (2009) *Circulation* **120**, 2088-2094
15. Escola-Gil, J. C., Marzal-Casacuberta, A., Julve-Gil, J., Ishida, B. Y., Ordonez-Llanos, J., Chan, L., Gonzalez-Sastre, F., and Blanco-Vaca, F. (1998) *J Lipid Res* **39**, 457-462
16. Koike, T., Kitajima, S., Yu, Y., Li, Y., Nishijima, K., Liu, E., Sun, H., Waqar, A. B., Shibata, N., Inoue, T., Wang, Y., Zhang, B., Kobayashi, J., Morimoto, M., Saku, K., Watanabe, T., and Fan, J. (2009) *Arterioscler Thromb Vasc Biol* **29**, 2047-2053
17. Wang, Y., Niimi, M., Nishijima, K., Waqar, A. B., Yu, Y., Koike, T., Kitajima, S., Liu, E., Inoue, T., Kohashi, M., Keyamura, Y., Yoshikawa, T., Zhang, J., Ma, L., Zha, X., Watanabe, T., Asada, Y., Chen, Y. E., and Fan, J. (2013) *Arterioscler Thromb Vasc Biol* **33**, 224-231

表1. ウサギの脂質代謝系のヒトとの類似点

	マウス	ウサギ	ヒト
CETP	なし	あり	あり
apoB補集酵素 (apobec-1)	小腸/肝臓	小腸	小腸
apoB-48	chylomicrons VLDL	chylomicrons	chylomicrons
LDL受容体調節	常に高発現	フィードバック制御	フィードバック制御
LDL受容体ホモ欠損 血中コレステロール (mg/dl)	200-270 (LDLR KO)	500-1000 (WHHL)	500-1000 (FH)

(Fan and Watanabe, 2003 改変)

図1. LPLの抗肥満効果
(LPL Tg WHHLウサギ)

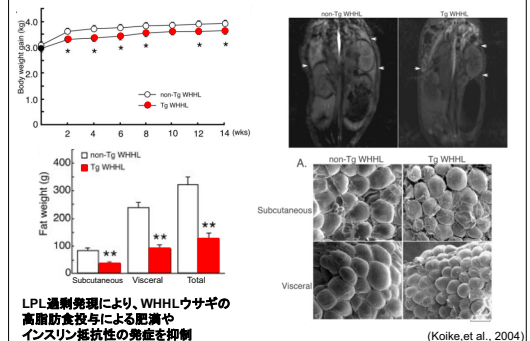


図2. CRPの動脈硬化における役割
(CRP Tgウサギ)

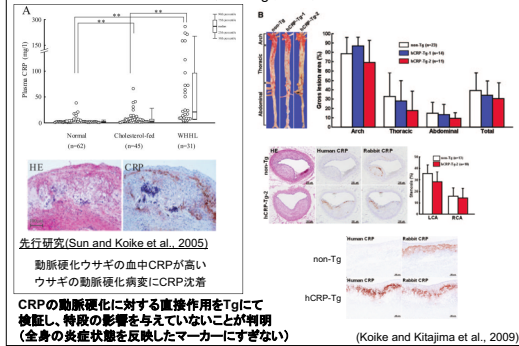


図3. アポA-II Tgウサギの脂質異常症

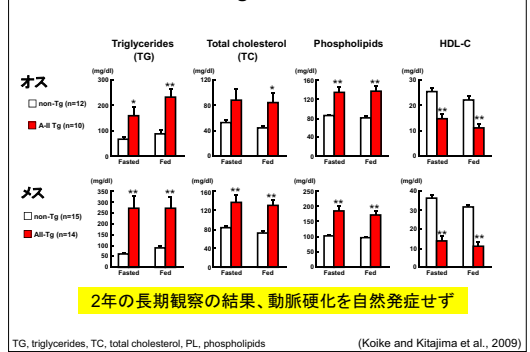


図4. ヒトアポA-IIが動脈硬化を抑制

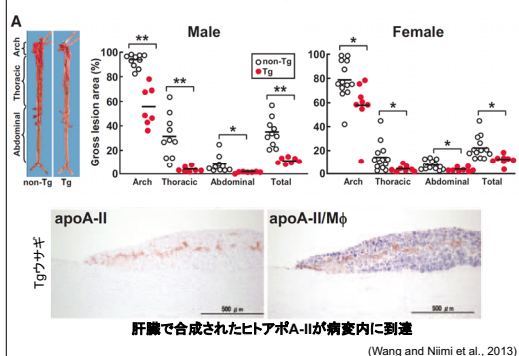


表2. トランスジェニックマウスとウサギの
表現型の乖離

脂質代謝関連 遺伝子	マウス	ウサギ
Hepatic lipase	動脈硬化 促進	動脈硬化 抑制
LCAT	動脈硬化 促進	動脈硬化 抑制
15-lipoxygenase	動脈硬化 促進	動脈硬化 抑制
apoE3	動脈硬化 抑制	動脈硬化 促進
Human apoA-II	動脈硬化 促進	動脈硬化 抑制

LCAT, Lecithin:cholesterol acyltransferase

(Fan and Watanabe, 2003 改変)

新たなインスリン分泌メカニズムと糖尿病治療薬開発における意義

神戸大学大学院医学研究科 分子代謝医学 清野 進

膵β細胞の研究は、生理的観点からはインスリン分泌機構やβ細胞の発生・分化・再生機構の解明に、また糖尿病の観点からはβ細胞不全、インスリン分泌促進薬の作用機構やβ細胞の再生医療、β細胞機能や量を反映する新たなバイオマーカー探索や技術の開発などに焦点があてられ、国内外で精力的に進められている。

インスリン分泌においてはグルコースによるインスリン分泌 (glucose-induced insulin secretion: GIIS) が最も基本となる。GIIS は惹起経路 (triggering pathway) と代謝性増幅経路 (metabolic amplifying pathway) からなる。一方、神経やホルモンによる GIIS の増強 (neuro-hormonal amplifying pathway) も生理的なインスリン分泌に極めて重要である。多くのペプチドホルモンはβ細胞膜上の G タンパク質共役受容体 (GPCR) を介して cAMP、ジアシルグリセロール (DAG) やイノシトール 1, 4, 5 三リン酸 (IP3) などの細胞内シグナルを惹起してインスリン分泌を増強する。現在使用されているインスリン分泌促進薬はこれらの細胞内シグナルを標的としている。例えば、インスリン分泌促進薬であるスルホニル尿素薬は K_{ATP} チャンネルと Epac2 を、グリニド薬は K_{ATP} チャンネルを、インクレチン関連薬は cAMP シグナルを介し Epac2 と PKA を標的としている。このようにβ細胞シグナリングの解明はインスリン分泌機構の解明のみならず糖尿病の病態やインスリン分泌促進薬の作用機構の解明、さらには新たな糖尿病治療薬開発の基盤となっている。インスリン分泌の研究はプロテオミクスやメタボロミクスなどの包括的な分析方法や様々な可視化技術の利用により研究が急速に進化している。本講演では最近の我々の研究成果をもとに、新たなインスリン分泌メカニズムと糖尿病治療薬開発における意義について考察する。

「高活性型 TALEN の開発と様々な動物におけるゲノム編集」

山本 卓

(広島大学・大学院理学研究科・数理分子生命理学専攻)

これまで多くの動物において、細胞内あるいは生物個体内において目的の遺伝子のみを改変（遺伝子ノックアウトあるいは遺伝子ノックイン）する技術は確立していなかった。マウスでは ES 細胞を用いて目的の遺伝子を改変し、改変した ES 細胞を利用した個体作製法が確立しているが、他の動物ではこの方法が困難なため化学変異原やトランスポゾンでゲノム遺伝子にランダムに変異を導入する方法が用いられてきた。しかしながら、ランダムな変異を導入された集団から目的の遺伝子を改変した変異体を選別する作業は多大な労力を必要とするため、遺伝子改変は飼育が容易で変異体スクリーニングが可能な限られた動物を中心に行われてきた。このような状況の中、任意の配列に対して設計可能な人工制限酵素（人工ヌクレアーゼ）の Zinc-finger nuclease (ZFN) や Transcription activator-like effector nuclease (TALEN) を用いた遺伝子改変技術（ゲノム編集技術）が開発され、基礎から応用までの広い分野での利用が期待されている。ゲノム編集技術は、人工ヌクレアーゼを細胞や受精卵に導入するだけで可能なこと、原理的に全ての生物に利用可能であることから、次世代の遺伝子改変技術と考えられている。さらに本年初めには、第 3 世代のゲノム編集技術として CRISPR/Cas システムが発表され、その方法の簡便さに多くの研究者が驚いた。

本講演では、TALEN を基盤とするゲノム編集技術を用いた様々な動物での遺伝子改変の現状と可能性について紹介する。2010 年に TALEN が初めて報告されて以来、様々な動物（ゼブラフィッシュやカエルなど）での遺伝子ノックアウトが成功する一方、マウスやラットでは期待される高い効率での変異導入が実現していなかった。そこで我々は、Voytas ラボの Golden Gate 法を改良し、TALE の N 末端と C 末端を欠失させた TALEN-NC の効率的作製方法（6 モジュール法）の開発と培養細胞での評価方法を確立してきた（Sakuma et al., 2013）。さらに、TALEN-NC と Exonuclease I との共導入によってラットでの変異導入に成功した（京都大学・真下先生の成果, Mashimo et al., 2013）。しかしながら、TALEN-NC のみのインジェクションでラット個体への変異導入が確認できず、さらなる改良が必要と考えられた。今回、TALEN の DNA 結合モジ

ュールに改良を加えた Platinum Gate 法を確立し、高活性型の Platinum TALEN を用いて培養細胞およびカエル、マウスでの変異導入効率を調べたので、その結果について紹介する。Platinum TALEN は培養細胞の SSA 活性評価において、これまで作製していた Voytas TALEN の 1.5~2.5 倍の高い活性を有し、培養細胞および個体においても高い変異導入を示すことが明らかになった。特にカエルにおいては F0 において完全な遺伝子破壊個体を得ることに成功した (Suzuki et al., 2013)。

[引用文献]

Sakuma T, Hosoi S, Woltjen K, Suzuki KI, Kashiwagi K, Wada H, Ochiai H, Miyamoto T, Kawai N, Sasakura Y, Matsuura S, Okada Y, Kawahara A, Hayashi S and Yamamoto T. Efficient TALEN construction and evaluation methods for human cell and animal applications. *Genes Cells*, **18**: 315-326 (2013)

Mashimo T, Kaneko T, Sakuma T, Kobayashi J, Kunihiro Y, Voigt B, Yamamoto T and Serikawa T. Efficient gene targeting by TAL effector nucleases coinjected with exonucleases in zygotes. *Scientific Reports*, **3**, 1253 (2013)

Suzuki KI, Isoyama Y, Kashiwagi K, Sakuma T, Ochiai H, Sakamoto N, Furuno N, Kashiwagi A and Yamamoto T, High efficiency TALENs enable F0 functional analysis by targeted gene disruption in *Xenopus laevis*. *Biology Open*, **2**, 448-452 (2013)

人工ヌクレアーゼ(engineered nucleases)とは?

・3個のZn finger をもつZFNを使った場合はZFNペアで、
 ・18モジュールのTALENを使った場合は片方のTALENで、
 $4^{18}=68719476736=6.87 \times 10^{10}$ に一カ所程度の特異性

・FokIのDNAヌクレアーゼドメインは、完全なモジュール構造をしており、人工ヌクレアーゼに広く利用されている

1

人工ヌクレアーゼは、任意の配列に DNA 二本鎖切断 (DSB) を導入する人工制限酵素である。

ゲノム編集に利用される2つの人工ヌクレアーゼ

Zinc finger nucleases (ZFNs)

Transcription activator-like effector nucleases (TALENs)

Medical Science Digest, Vol.38(8), p328-329(2012)より

2

主に、ZFN と TALEN の 2 種類の人工ヌクレアーゼが標的遺伝子の変改に使われている。

人工ヌクレアーゼを基盤とするゲノム編集 (Genome Editing)

標的遺伝子への変異導入

・Genome editingがNature Methods誌のMethod of the year 2011
 ・TALENがScience誌の2012年のBreakthroughのひとつに

3

人工ヌクレアーゼによって切断された DNA の修復過程において、変異導入やターゲティングなどのゲノム編集が可能となる。

TALE nuclease (TALEN)とは

(Cermak et al., 2011)

【Construction of TALENs using open-source toolbox】

- ・REAL assembly ... Restriction & Ligation & Subcloning
- ・FLASH assembly ... fast ligation-based automatable solid-phase high-throughput Assembly
- ・Golden Gate assembly ... 10-Module Assembly

4

TALEN は、作製が比較的簡便であることから、ゲノム編集に広く使われている。作製のためのオープンリソースが提供されている。

6モジュール連結法によるTALENの構築 (Sakuma et al., 2013)

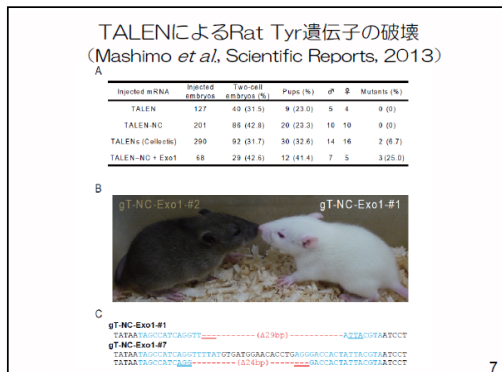
6

我々の研究室では、TALEN 作製の 6 モジュール連結法と培養細胞での活性評価法を確立してきた。

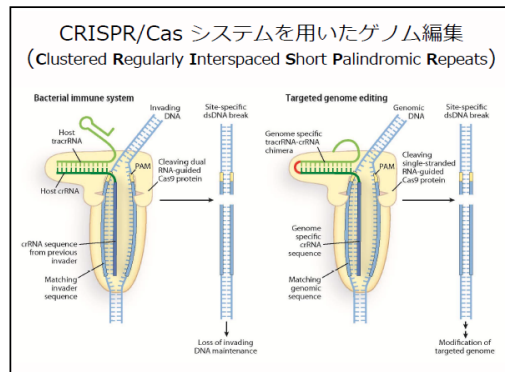
TALENを用いたアフリカツメガエルPax6遺伝子の破壊 (Suzuki et al., 2013, Biol open)

6

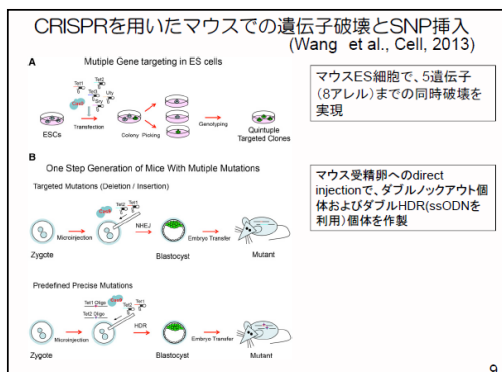
作製した TALEN のカエルでの効果を調べたところ、非常に高い変異導入が確認された。



作製した TALEN と ExoI との共導入によって効率的に変異導入が可能となった。さらに高活性型 TALEN (Platinum TALEN) によって、F0 ノックアウトも可能となっている。



CRISPR/Cas システムを用いたゲノム編集技術が本年始めに報告され、その簡便さから注目されている。



CRISPR/Cas システムによってマウス ES や個体において複数同時遺伝子破壊が報告された。

あの遺伝子を止めろ
ノックアウト動物作り手続に

食肉遺伝子を止めて、食肉生産マウスをつくりたい

ノックアウト動物のつくり方

これまでの方法(入れ換え方式)

新しい方法(切断方式)

マウスES細胞

ノックアウト動物のつくり方

朝日新聞科学面(2013年、4月29日)

ゲノム編集を用いた遺伝子改変技術が今後ライフサイエンスの基盤技術となっていく可能性が高い。

人エヌクレアーゼを用いたゲノム編集の有効性

(1)どんな生物にも利用できる。

- 動物や植物、微生物でもOK!!
- ES細胞やiPS細胞の遺伝子改変にも使える

(2)人エヌクレアーゼは消えてしまうので、痕跡は残らない。

- 小さな変異なら自然の突然変異との区別が難しい
- 新しい品種改良技術となる可能性 → バイオ産業の活性化?

(3)目的の遺伝子だけを変化させることができる。

- ランダム変異導入に比べて安全

(4)基礎研究の新たな展開を可能にする

- 進化研究(調節領域の改変など)
- 定量生物学(レポーター遺伝子のノックイン)
- 染色体レベルの改変

ゲノム編集技術を、国内の基礎研究および応用研究に積極的に使っていくことが重要である。

ゲノム編集コンソーシアム
Genome Editing Consortium

運営メンバー: 山本 卓、野地 遼清、芹川 忠夫、井川 敦雄、佐倉 謙徳、阿形 清和

活動目的

- 人エヌクレアーゼの作製・開発およびゲノム編集
- ゲノム編集に関する情報交換および共同研究の推進
- ゲノム編集を核とした産学官の連携

活動状況

- 第1回人エヌクレアーゼ(iZFN)作製講習会(2011.1.28-29, 岡山)
- 遺伝子改変技術シンポジウム開催(2011.7.11-12, 岡崎)
- 京都大学、徳島大学の大学院生受け入れ、指導(2011.11)
- 第2回人エヌクレアーゼ(TALEN)作製講習会(2012.1.23-26, 東広島)
- 第1回ゲノム編集研究会(2012.2.28-29, 東広島)
- 第3回人エヌクレアーゼ(TALEN)作製講習会(2012.1.23-26, 東広島)
- 第2回ゲノム編集研究会(2012.9.20, 岡崎)
- 第4回人エヌクレアーゼ(TALEN)作製講習会(2012.10.23-25, 東広島)
- 第5回人エヌクレアーゼ(TALEN)作製講習会(2013.1.29-31, 東広島)
- 第6回人エヌクレアーゼ(TALEN)作製講習会(2013.4.23-25, 東広島)
- 第3回ゲノム編集研究会(2013.10.26-27, 東広島)
- 日本分子生物学会でゲノム編集のワークショップ(2013.12.3, 神戸)

ゲノム編集コンソーシアムでは、技術講習会や研究会を通して、国内でのゲノム編集研究のレベルアップを支援している。

<その他>

関西実験動物研究会だより

関西実験動物研究会第34号に掲載した第114回研究会以後、以下の研究会が開催された。

1) 第115回研究会(平成24年9月7日(金)、大阪大学 銀杏会館)

<講演会> テーマ: 動物実験実施体制の課題

1. わが国の動物実験実施体制の課題と将来: 動物愛護法改正問題への製薬協の取り組み

中村 和市(日本製薬工業協会 医薬品評価委員会 基礎研究部会)

2. 動物実験の自主管理の推進に向けて - HS 財団の動物実験外部評価・検証制度 -
佐々木 弥生(公益財団法人 ヒューマンサイエンス振興財団)

3. Laboratory animal welfare might be resolved by education and laws

PARK, J.H. (Seoul National University)

<維持会員ニュース>

1. 女性労働基準規則の改正と環境改善製品
白井松器械(株)
2. 重度免疫不全動物(NSG マウス) 新規国内生産開始
日本チャールス・リバー(株)

2) 第116回研究会(平成24年12月14日(金)、聖護院御殿荘)

<会員による発表> 14題

<トピックス>

Introduction of the Education Program for Animal Experiment in Seoul National University

Jung Sun MIN, Byeong-Cheol KANG (Seoul National University)

<特別講演>

1. 獣医外科学、実験動物学、実験動物医学、動物実験代替法学
黒澤 努(大阪大学 医学部 実験動物医学教室)
2. 実験動物の領域に潜り込んで得たもの
芹川 忠夫(京都大学 大学院医学研究科 附属動物実験施設)

3) 第117回研究会(平成25年3月1日(金)、楽友会館)

<講演会> テーマ: アカハライモリとゼブラフィッシュを用いて生命原理を解き明かす

1. アカハライモリのモデル動物化に向けた資源・技術・情報基盤の研究: 外傷性疾患の治療と再生研究への適用を視野に

千葉 親文(筑波大学 大学院生命環境系 脳神経情報学分野・再生生理学研究室)

2. ゼブラフィッシュの色素細胞間相互作用とパターン形成

渡邊 正勝(大阪大学 大学院生命機能研究科 パターン形成研究室)

<トピックス>

実験用シロネズミの起源

庫本 高志 (京都大学 大学院医学研究科 附属動物実験施設)

<維持会員ニュース>

1. (株) トランスジェニック II 期棟稼働について- 可視化マウス、サル薬理試験 他
(株) トランスジェニック
2. 震災時の安全確保を目的とした実験動物研究施設の耐震対策
(有) キョウエー

4) 第 118 回研究会 (平成 25 年 6 月 14 日 (金)、神戸大学医学部会館シスメックスホール)

<講演会> テーマ：遺伝子改変技術を用いた糖尿病および動脈硬化研究

1. 脂質代謝・動脈硬化研究におけるウサギの有用性 -apoA-II トランスジェニック
ウサギの開発と応用-

小池 智也 (神戸大学 大学院医学研究科附属動物実験施設)

2. 新たなインスリン分泌メカニズムと糖尿病治療薬開発における意義
清野 進 (神戸大学 大学院医学研究科 分子代謝医学)

<トピックス>

高活性型 TALEN の開発と様々な動物におけるゲノム編集

山本 卓 (広島大学 大学院理学研究科 数理分子生命理学専攻)

<維持会員ニュース>

弱酸性次亜塩素酸水溶液の活用について

(株) エイチ・エス・ピー

5) 第 119 回研究会 (平成 25 年 9 月 13 日 (金)、大阪大学 銀杏会館)

<維持会員ニュース>

Zucker ラットより見出された新しい疾病モデル動物の紹介

日本エスエルシー (株)

<講演会> テーマ：生体イメージングの最前線・免疫の新たな世界

1. 生きた実験動物での生体イメージング～免疫細胞の動く世界の解析

石井 優 (大阪大学 大学院医学系研究科 免疫細胞生物学)

2. ライブイメージングにより明らかになった皮膚免疫の新世界

梶島 健治 (京都大学 大学院医学研究科 皮膚科学)

<トピックス>

CRISPR/Cas9 システムを用いたマウスゲノム編集

伊川 正人 (大阪大学 微生物病研究所 感染動物実験施設)

《幹事会、評議員会、総会の議事概要》

幹事会の概要

日時：平成 25 年 2 月 8 日（金）、午後 4 時～

場所：京都大学大学院医学研究科附属動物実験施設 4F セミナー室

出席者：阿部、飯田、喜多、久保、庫本、桑村、近藤、塩見、芹川、田島、坪田、中井
中村、松田、山添、横井、江南

欠席者：池田、岡田、黒澤、森本、山本

議事：

1. 平成 24 年度事業報告
 - ・ 芹川会長より平成 24 年度事業報告があった。
2. 平成 24 年度決算報告
 - ・ 庫本幹事より、平成 24 年度決算報告があった。
 - ・ 芹川会長より、会費未納者の取扱いについて説明があった。
3. 第 31 回評議員会、第 30 回総会の件
 - ・ 評議員会の議長は、会則により芹川会長が担当することを確認した。
 - ・ 総会の進行役は、横井幹事が担当することとなった。
4. 平成 25 年度事業計画案
 - ・ 阿部幹事より、平成 25 年度事業計画案について説明があった。
 - ・ 庫本幹事より、第 117 回研究会（平成 25 年 3 月 1 日、京都大学 楽友会館）の開催概要について説明があった。
 - ・ 横井幹事より、第 118 回研究会（平成 25 年 6 月 14 日、神戸大学 シスメックホール）の開催概要について説明があった。
 - ・ 田島幹事より、第 119 回研究会（平成 25 年 9 月 6 日、大阪大学 銀杏会館）の開催概要について説明があった。
 - ・ 芹川会長より、第 120 回研究会（30 周年記念大会、平成 25 年 12 月 6 日、聖護院御殿荘）の企画については、幹事から広く意見を募るよう依頼があった。
 - ・ 芹川会長より、機関誌第 34 号での落丁等について、説明があった。
 - ・ 34 号の訂正については、正誤表を会員に送付することとした。
 - ・ 今後、原稿の校閲を複数人で行うこととし、編集担当幹事がこれを所掌することとなった。
5. 平成 25 年度予算案
 - ・ 庫本幹事より、平成 25 年度予算案について説明があった。
 - ・ 30 周年記念大会と事務局の移転を考慮して、予備費を 10 万円とすることとした。

6. 事務局の移転について

- ・ 芹川会長から、事務局の移転について提案があり、了承された。
- ・ 会則の改正を、評議員会に諮ることとなった。

7. 日本実験動物学会学術集会委員会からのアンケートについて

- ・ 芹川会長から、日本実験動物学会学術集会委員会主催のシンポジウムの共催に関するアンケートについて説明があった。
- ・ 討議の結果、関西実験動物研究会の回答は、シンポジウムの共催ではなく、後援とすることとした。

8. その他

- ・ 喜多幹事から、第 62 回実験動物学会総会を平成 27 年 5 月に京都で大会長として開催する旨の説明があり、関西実験動物研究会への協力が求められた。

日時：平成 25 年 9 月 30 日(金)、午後 3 時～5 時

場所：京都技術科学センター B 会議室

出席者：阿部、喜多、久保、庫本、黒澤、桑村、近藤、塩見、芹川、田島、坪田、中井、中村、松田、森本、山添、横井

欠席者：池田、岡田、山本

議事：

1. 第 120 回研究会(30 周年記念大会について)

- ・ 喜多幹事より第 120 回研究会についてプログラム(案)の説明があった。
- ・ 阿部幹事長より、過去の記念大会に関する追加説明があった。
- ・ 午前中のプログラム(関西実験動物研究会の歴史と未来)に、一題追加することとなった。
- ・ 座長が決定された。
- ・ 事務局より会場について説明があった。

2. 第 11 期の役員選出について

- ・ 芹川会長より、役員の改選について説明があった。
- ・ 芹川会長より、会長退任の意向が示された。
- ・ 幹事の互選により、喜多幹事が第 11 期の会長候補として選出された

評議員会の概要

第 31 回関西実験動物研究会評議員会

日時：平成 25 年 3 月 1 日(金) 11:30～13:00

場所：楽友会館 2 階講演室

出席： 43 名

浅野裕三、阿部敏男、池田卓也、池田克己、今井良悦、上田正次、大野民生、岡田利也、岡本宗裕、沖本一夫、春日久男、喜多正和、北田一博、久保薫、倉林譲、庫本高志、黒木宏二、黒澤努、桑村充、近藤靖、佐加良英治、塩谷恭子、鈴木昇、芹川忠夫、高木貞明、高島俊行、竹之下誠、田島優、千葉薫、坪田裕司、中井伸子、中村紳一郎、橋本正晴、真下知士、増岡通夫、松田潤一郎、宮寫宏彰、森島英喜、森本純司、山添裕之、山中久、山本好男、横井伯英

議事：

1. 平成 24 年度事業報告及び決算報告

- ・ 阿部幹事より、平成 24 年度の事業報告があった。
- ・ 庫本幹事より、平成 24 年度収支決算書について報告があった。
- ・ 山本幹事より、会報 34 号における落丁と誤りについて訂正とお詫びがあった。
- ・ 平成 24 年度収支決算報告が全会一致で承認された。

2. 平成 25 年度 事業計画（案）及び予算（案）

- ・ 阿部幹事より、平成 25 年度の事業計画（案）が説明された。
- ・ 庫本幹事より、平成 25 年度予算（案）について説明があった。
- ・ 平成 25 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. 今後の予定について

- ・ 鈴木評議員より、12 月の研究会の日程について質問があった。
- ・ 芹川会長より、会長の都合、会場の都合を総合的に勘案し、決定しているとの回答があった。
- ・ 芹川会長より、関西実験動物研究会の今後の展望について広く意見を求められた。個々の意見をメールで問うこととした。

4. 事務局の移転について

- ・ 芹川会長より、芹川の定年退職に伴い、事務局を京都大学大学院医学研究科附属動物実験施設から公益財団法人京都科学技術センター 22 号室に移転することが提案された。
- ・ 全会一致で承認された。

5. その他

- ・ 喜多幹事より、第 62 回日本実験動物学会総会の大会長を担当するとの報告があった。
- ・ 宮寫名誉会員より、図書「日本実験動物研究会から法人学会への 12 年間」の紹介があった。

総会の概要

第 30 回関西実験動物研究会総会

日時：平成 25 年 3 月 1 日（金）13:00-13:30

場所：楽友会館 2 階講演室

司会の横井幹事より、総会の開催にあたり議長の推薦が求められた。
桑村会員が議長に選出された。

議事：

1. 平成 24 年度事業報告及び決算報告

- ・ 阿部幹事より、平成 24 年度の事業報告がされた。
- ・ 庫本幹事より、平成 24 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 24 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 25 年度事業計画及び予算案

- ・ 阿部幹事より、平成 25 年度の事業計画（案）が説明された。
- ・ 庫本幹事より、平成 25 年度予算（案）について説明があった。
- ・ 平成 24 年度事業計画（案）ならびに予算（案）が、全会一致で承認された。

3. 事務局の移転について

- ・ 芹川会長より、芹川の定年退職に伴い、事務局を京都大学大学院医学研究科附属動物実験施設から公益財団法人京都科学技術センター22 号室に移転することが報告された。また、それに伴う会則の変更が示された。
- ・ 事務局の移転、並びに、会則の変更が、全会一致で承認された。
- ・ 阿部幹事より、維持会員ニュースへの積極的な参加の依頼があった。

《会員の異動》

(平成 24 年 10 月～平成 25 年 10 月)

入会者

朝比奈 誠	武田薬品工業(株) 基盤技術研究所 動物モデルグループ
鷹野 正興	神戸学院大学 薬学部 生命薬学部門 細胞生物学研究室
二川 徹	(株) イナリサーチ 大阪支所
東端 裕司	石原産業(株) 中央研究所 安全科学研究室 安全性グループ

退会者

渡邊 仁美	京都大学 再生医科学研究所 附属再生実験動物施設
山崎 樹里	滋賀医科大学 動物生命科学研究センター
鳥取 潤一	(株) ジャパンファーム クラウン研究所
伊藤 友一	カイゲンファーマ(株)
藪内 かおり	(株) 新日本科学 安全性研究所
飯田 晶敏	

関西実験動物研究会 個人会員名簿（平成 25 年 10 月現在）

★会長、○評議員、◎幹事、△監事、☆名誉会員

		氏名	所属
あ	○	浅野 裕三	(株) ボゾリサーチセンター 函南研究所
		朝比奈 誠	武田薬品工業 (株) 基盤技術研究所 動物モデルグループ
		東 文男	(株) 紀和実験動物研究所
	◎◎	阿部 敏男	
		安倍 宏明	マーシャル・バイオリソーシス・ジャパン(株)
		安部 武	オリエンタル酵母工業 (株)
		新井 健史	エルエスジー (株)
		有富 博之	シオノギ製薬 (株) 新薬研 実験動物管理室
		安藤 健史	オリエンタル酵母工業 (株)
い		李 成一	関西医科大学 附属生命医学研究所 モデル動物部門
		池 郁生	(独) 理化学研究所 バイオリソースセンター
	○	池田 克己	武庫川女子大学 薬学部
	◎◎	池田 卓也	日本チャールス・リバー (株)
		池淵 一也	大鵬薬品工業 (株)
		井澤 武史	大阪府立大学 大学院生命環境科学研究科 獣医病理学
		石坂 和彦	テクニプラスト・ジャパン(株)
		巖原 美穂	(株) ビオスタ
		伊藤 隆康	武田薬品工業 (株) 薬剤安全性研究所
		乾 俊秀	田辺三菱製薬 (株) 研究推進部
		乾 公正	石原産業 (株) 中央研究所
		乾 雅臣	日本医科学動物資材研究所
		井上 勉	(株) ケー・エー・シー
	○	今井 良悦	武田薬品工業 (株) 湘南研究所
		今林 潤一	(株) DIMS 医科学研究所
		新比恵 啓志	田辺三菱製薬 (株) 法務部
		岩谷 千鶴	滋賀医科大学 動物生命科学研究センター
う	○	上田 正次	(株) フェニックスバイオ 宇都宮事業所
		上野 渉	(独) 放射線医学総合研究所 実験動物開発・管理課
		内尾 こずえ	(独) 医薬基盤研究所 疾患モデル小動物研究室
		外野 善弘	大阪大学医学部 附属動物実験施設
	○	海野 隆	(株) JCL バイオアッセイ 西脇ラボ
お		及川 弘	

		大島 五紀	塩野義製薬(株) 医薬研究センター
		大田 聖	(株) イブバイオサイエンス
		大竹 聡	(株) オリエンタルバイオサービス 南山城研究所
		大坪 義和	沢井製薬(株)
	○	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
か		岡崎 彰亮	エデストロムジャパン(株)
	○○	岡田 利也	大阪府立大学 大学院生命環境科学研究科 実験動物学
	○	岡本 宗裕	京都大学霊長類研究所 人類進化モデル研究センター
		荻野 信二	大日本住友製薬(株) 茨木工場
	○	沖本 一夫	(株) ケー・エー・シー バイオサイエンス事業部 病理部
		鍵山 壮一朗	大阪大学 医学部 附属動物実験施設
	○	春日 久男	(株) 武田ラビックス
		加藤 啓子	京都産業大学
		金子 武人	京都大学 大学院医学研究科 附属動物実験施設
		鐙木 力	清水実験材料(株)
		河合 澄子	大阪大学 医学部 附属動物実験施設
		河田 昭彦	日本エスエルシー(株) 受託研究部
		神田 政典	塩野義製薬(株) 新薬研究所
き		岸 成好	(株) レナテック
	○○	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 大学院理学研究院
		北野 光昭	(株) カネカ フロンティアバイオ・メディカル研究所
		北村 典	(株) ケー・エー・シー
		木下 邦明	
		木村 国雄	
く		日柳 章彦	(株) 日本医科学動物資材研究所
		久世 博	(株) ボゾリサーチセンター 函南研究所
		国友 一朗	エドストローム(株)
		国吉 信恵	神戸大学 医学部 附属動物実験施設
	○○	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	岡山大学 医学部
	○○	庫本 高志	京都大学 大学院医学研究科 附属動物実験施設
	○	黒木 宏二	大日本住友製薬(株)
	○○	黒澤 努	
	○○	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

		桑村 有規	(株) 新日本科学
こ		小池 智也	神戸大学 大学院医学研究科 附属動物実験施設
		小泉 清	(株) DIMS 医科学研究所
		甲田 彰	エルエスジー(株)
		小浦 美奈子	(独) 医薬基盤研究所 疾患モデル小動物研究室
		小谷 祐子	大阪大学 医学部 附属動物実験施設
		古藤 惇	京都産業大学
	○	小林 欣滋	(株) 新日本科学 鹿児島病理センター
		小山 公成	アステラスリサーチサービス (株) つくば研究センター
	○	近藤 靖	田辺三菱製薬 (株) 監査部
	○◎	近藤 玄	京都大学 再生医科学研究所 附属再生実験動物施設
		近藤 友宏	大阪府立大学 大学院生命環境科学研究科 実験動物学
		今野 兼次郎	京都産業大学
さ		齋藤 浩充	三重大学 医学部 附属動物実験施設
		三枝 順三	日本実験動物学会 事務局
		坂田 太二	(株) 田辺 R & D サービス 加島 実験動物管理部
		坂田 進	畿央大学
		坂本 雄二	千寿製薬 (株)
	○	佐加良 英治	兵庫医科大学 動物実験施設
		佐々木 昌志	大日本住友製薬 (株) 研究管理部
	○	佐藤 浩	自然科学研究機構 生理学研究所
		佐藤 秀蔵	
		鮫島 秀暢	
		澤浦 雅人	日本チャールス・リバー (株) カスタマーサポートセンター
し	○◎	塩見 雅志	神戸大学大学院医学研究科 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
	△	清水 英男	清水実験材料 (株)
		清水 大	(株) ケー・エー・シー
		清水 何一	清水実験材料 (株)
		白石 弘之	マルホ (株) 京都 R&D センター 医薬開発研究所
す		杉井 学	
		杉橋 裕道	(株) オリエンタルバイオサービス 神戸 BM ラボラトリー
	○	鈴木 昇	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	塩野義製薬(株) 創薬・探索研究所
		須藤 有二	アステラスリサーチテクノロジー(株)

せ	○★	芹川 忠夫	京都大学 大学院医学研究科 / 京都疾患モデル研究所
そ		曾我 正彦	塩野義製薬(株) 新薬研究所
た	○	高木 貞明	日本エス・エル・シー (株)
		高木 弓枝	日本エス・エル・シー (株)
		高木 康博	(株) 栄水化学
	○	高島 俊行	ハムリー (株) 国際事業部 大阪出張所
		鷹野 正興	神戸学院大学 薬学部 生命薬学部門 細胞生物学研究室
		高橋 尚士	(株) ビオスタ
		竹鶴 裕亮	京都大学 大学院医学研究科 附属動物実験施設
	○	竹之下 誠	(株) イブバイオサイエンス
	○◎	田島 優	大阪大学 医学部 附属動物実験施設
		田島 朋子	大阪府立大学 大学院生命環境科学研究科
		田中 卓二	(株) 東海細胞研究所
		田中 彰人	京都大学 iPS 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
		多根井 昌孝	(株) ケー・エー・シー 営業本部
ち	○	千葉 薫	(株) JT クリエイティブサービス 高槻事業所 動物管理課
つ		塚原 清志	シオノギテクノアドバンスリサーチ (株)
		辻 嘉昭	サンタサーロ&ステリ・プロ ソリューション(株)
		辻 正継	(株) ジェーエーシー
	○◎	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
		鶴田 恵三	(株) 新日本科学
て		出口 央士	京都大学 再生医科学研究所 附属再生実験動物施設
		寺嶋 昭夫	科研製薬(株) 総合研究所
と		土井 清弘	(株) ケー・エー・シー
		鳥居 国政	(株) ジェーエーシー
な		直井 国子	金沢大学 がん進展制御研究所
	○◎	中井 伸子	日本新薬(株) 研開企画統括部研開管理課
		中井 健史	塩野義製薬(株) 実験動物研究センター
		中西 聡	京都大学 大学院医学研究科 附属動物実験施設
		中原 愛	(株) ケー・エー・シー
	○◎	中村 紳一郎	滋賀医科大学 動物生命科学センター
		中村 正典	カルナバイオサイエンス (株) 研究開発部
		中山 亮	
		夏目 克彦	夏目製作所 (株)

		並河 知子	沢井製薬 (株) 生物研究部
に		西井 康恵	幾央大学 健康科学部
		西川 哲	京都薬科大学 動物研究センター
		西村 正彦	
		西村 弘道	(株) エーテック
		西山 瑛美	武庫川女子大学 薬学部
		西山 秀志	(株) 武田ラビックス
		新田 静香	シオノギテクノアドバンスリサーチ (株)
ね		根本 良夫	シオノギテクノアドバンスリサーチ (株)
の		野々口 和幸	(株) ケー・エー・シー
は	○	橋本 正晴	(株) ケー・エー・シー アニマルケア事業本部
		浜井 美弥	自然科学研究機構 生理学研究所 NBR 事業推進室
		浜田 修一	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	塩野義製薬 (株) 医薬研究センター
	○	原田 正史	大阪市立大学 大学院医学研究科 附属動物実験施設
ひ		東端 裕司	石原産業 (株) 中央研究所 安全科学研究室 安全性グループ
		引土 知幸	大日本除虫菊 (株) 中央研究所
		飛田 康孝	(株) ケー・エー・シー
	○	平川 公昭	(株) 新日本科学 安全性研究所 病理センター
	○	平沢 勉	シオノギテクノアドバンスリサーチ (株)
		平嶋 司	大塚製薬 (株) 徳島研究所
		廣瀬 清香	塩野義製薬 (株) 油日ラボラトリーズ
		廣田 暖奈	京都産業大学
ふ		福岡 俊文	大日本住友製薬 (株) 研究管理部
		藤沢 公忠	日本チャールス・リバー (株) カスタマーサポートセンター
		藤田 和隆	シオノギテクノアドバンスリサーチ (株)
		二川 徹	(株) イナリサーチ 大阪支所
		麓 直浩	南岡山医療センター 神経内科
ほ	○	星 信彦	神戸大学大学院農学研究科 応用動物学
		星野 雅行	(株) 星野試験動物飼育所
		堀 孝司	(株) オリエンタルバイオサービス
		堀江 信一	(株) トランスジェニック
ま		前川 智樹	名古屋大学 大学院医学系研究科 実験動物科学
		前田 敏宏	
	○	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) トランスジェニック
	○◎	松田 潤一郎	(独) 医薬基盤研究所 疾患モデル小動物研究室
		松本 耕三	京都産業大学 工学部 生物工学科
み		水内 博	田辺三菱製薬 (株) 薬物動態研究所
		水野 信哉	大阪大学 大学院医学系研究科 分子再生医学
		水野 洋子	大阪大学 蛋白質研究所 8F 動物室
	○	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
	○☆	宮脇 宏彰	(株) ケー・エー・シー
	○	宮嶋 正康	和歌山県立医科大学 実験動物施設
		宮地 均	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	
		宮脇 茂樹	
も		森 幹雄	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	
		森岡 一輝	ロート製薬 (株) 生物臨床研究部 開発支援 G
	○	森島 英喜	武田薬品工業 (株) 薬剤安全性研究所
	○◎	森本 純司	大阪医科大学大学院医学研究科 研究機構 実験動物センター
や		安場 正子	(株) ケー・エー・シー バイオサイエンス事業部
		矢野 英樹	(株) オリエンタルバイオサービス
		山口 修	(株) 大阪ビル管理 動物管理部
	△	山崎 章弘	オリエンタル酵母工業 (株) 東日本バイオ営業部
	○◎	山添 裕之	住友化学 (株) 生物環境科学研究所
	○	山田 宜永	新潟大学農学部 資源動物遺伝学分野
		山田 篤	アステラスリサーチテクノロジー (株) 安全性研究部
		山田 泰広	京都大学 iPS 細胞研究所
		山手 丈至	大阪府立大学 大学院生命環境科学研究科 獣医病理学
	○	山中 久	(株) イナリサーチ
	○◎	山本 好男	三重大学 社会連携研究センター 伊賀研究拠点
	○	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 博章	長浜バイオ大学 バイオサイエンス学部
ゆ		ユウ イン	神戸大学 大学院医学研究科 附属動物実験施設
よ	○◎	横井 伯英	神戸大学 大学院医学研究科 分子代謝医学
わ		若狭 芳男	(株) イナリサーチ 東京支所

関西実験動物研究会 維持会員名簿 (平成 25 年度)

(あいうえお順)

アステラスリサーチテクノロジー株式会社 動物管理部
エルエスジー株式会社
オリエンタル酵母工業株式会社 大阪バイオ営業所
株式会社アイセイ
株式会社イナリサーチ
株式会社イブバイオサイエンス
株式会社エイチ・エス・ピー
株式会社エーテック
株式会社大塚製薬工場 研究開発センター
株式会社オリエンタルバイオサービス
株式会社ケー・エー・シー
株式会社ジャパンファーム クラウン研究所
株式会社新日本科学 大阪支社
株式会社精研
株式会社トランスジェニック
株式会社夏目製作所
株式会社日本医科学動物資材研究所
株式会社ビオスタ
株式会社フェニックスバイオ
株式会社美濃ラボ
株式会社メディエート
株式会社レナテック
北山ラベス株式会社
財団法人動物繁殖研究所
三協ラボサービス株式会社
参天製薬株式会社 研究開発センター
シオノギテクノアドバンスリサーチ株式会社
清水実験材料株式会社
白井松器械株式会社
大日本住友製薬株式会社 研究管理部 管理グループ
高塚ライフサイエンス株式会社
日精バイリス株式会社
日本エスエルシー株式会社
日本クレア株式会社 大阪事業所
日本新薬株式会社 創薬研究所
日本チャールス・リバー株式会社
ハムリー株式会社 大阪営業所
丸石製薬株式会社 中央研究所
三浦工業株式会社 メディカル西日本営業部
有限会社キョウエー
有限会社メディア

関西実験動物研究会 評議員名簿（平成 23-25 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	
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
今井 良悦	武田薬品工業 (株) 湘南研究所
上田 正次	(株) フェニックスバイオ 宇都宮事業所
海野 隆	(株) JCL バイオアッセイ
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 実験動物学
岡本 宗裕	京都大学霊長類研究所 人類進化モデル研究センター
沖本 一夫	(株) ケー・エー・シー バイオサイエンス事業部 病理部
春日 久男	(株) 武田ラビックス
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 大学院理学研究院
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	岡山大学 医学部
庫本 高志	京都大学 大学院医学研究科 附属動物実験施設
黒木 宏二	大日本住友製薬 (株)
黒澤 努	
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
小林 欣滋	(株) 新日本科学 鹿児島病理センター
近藤 玄	京都大学 再生医科学研究所
近藤 靖	田辺三菱製薬 (株)
佐加良 英治	兵庫医科大学 動物実験施設
佐藤 浩	自然科学研究機構 生理学研究所
塩見 雅志	神戸大学 大学院医学研究科 附属動物実験施設
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 / 京都疾患モデル研究所
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 医学部 附属動物実験施設
千葉 薫	(株) JT クリエイティブサービス 高槻事業所 動物管理課
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
中井 伸子	日本新薬 (株) 研開企画統括部
中村 紳一郎	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
平川 公昭	(株) 新日本科学 大阪病理センター
平沢 勉	シオノギテクノアドバンスリサーチ (株)
星 信彦	神戸大学 大学院農学研究科 応用動物学
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) トランスジェニック
松田 潤一郎	(独) 医薬基盤研究所 疾患モデル小動物研究室
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
宮脇 宏彰	(株) ケー・エー・シー
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) 薬剤安全性研究所
森本 純司	大阪医科大学 大学院医学研究科 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
山田 宜永	新潟大学農学部 資源動物遺伝学分野
山中 久	(株) イナリサーチ
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 分子代謝医学

関西実験動物研究会 会長・幹事・監事名簿

(平成 23～25 年度、平成 25 年 10 月現在)

	氏名	所属
会長	芹川 忠夫	京都大学 大学院医学研究科 / 京都疾患モデル研究所
庶務・会計	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
	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 (幹事長)	阿部 敏男	
	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 実験動物学
	黒澤 努	
	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
(副幹事長)	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 附属再生実験動物施設
	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 医学部 附属動物実験施設
	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 疾患モデル小動物研究室
	森本 純司	大阪医科大学大学院医学研究科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
(副幹事長)	横井 伯英	神戸大学 大学院医学研究科 分子代謝医学
編集 (委員長)	山本 好男	三重大学 社会連携研究センター 伊賀研究拠点
	中村 紳一朗	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
監事	清水 英男	清水実験材料 (株)
	山崎 章弘	オリエンタル酵母工業 (株) 東日本バイオ営業部

平成24年度 収支決算書

費目		金額（円）	平成24年度予算	
			金額（円）	対比（円）
繰越金		1,747,375	1,747,375	0
収入の部	会費	2,112,000	2,134,000	△22,000
	普通会员（@3,000）	423,000(141)	474,000(158)	△51,000
	評議員（@5,000）	295,000(59)	290,000(58)	5,000
	評議員未入金（@2,000）	4,000(2)	0(0)	4,000
	維持会員（@30,000）	1,170,000(39)	1,170,000(39)	0
	参加費（非会員）（@2,000）	220,000(110)	200,000(100)	20,000
	会報代金（@1,500）	9,000(6)	1,500	7,500
	預金利息	143	250	△107
	旅費返金	30,000	0	30,000
	収入計	2,151,143	2,135,750	15,393
収入総計		3,898,518	3,883,125	15,393
支出の部	事務局経費	969,452	1,070,000	100,548
	人件費（2年度分）	700,000	700,000	0
	通信費	118,585	150,000	31,415
	事務費	32,763	40,000	7,237
	印刷費	118,104	180,000	61,896
	機関誌発行経費	564,100	630,000	65,900
	編集費	28,600	30,000	1,400
	印刷費	535,500	600,000	64,500
	集会経費	939,914	980,000	40,086
	会場費	64,700	100,000	35,300
	講演者招待費	578,995	550,000	△28,995
	幹事会・評議員会	242,219	250,000	7,781
	アルバイト費	54,000	80,000	26,000
	予備費	0	50,000	50,000
	支出計	2,473,466	2,730,000	256,534
繰越剰余金		1,425,052	1,153,125	271,927
支出総計		3,898,518	3,883,125	15,393

参考： 年度内収支（収入2,151,143 - 支出 2,473,466） = △322,323

繰越決算書

平成 24 年度

平成 23 年度	繰越金	1,747,375 円
平成 24 年度	収入金	2,151,143 円
平成 24 年度	支出金	2,473,466 円
平成 24 年度	繰越金	1,425,052 円

以上のように報告致します。

会長 芹川 忠夫



帳簿並びに証憑書類監査の結果、適正と認めます。

平成 25 年 2 月 6 日

監事：清水 英男



監事：山崎 章弘



平成25年度 関西実験動物研究会予算書

(普通会员費:3,000 円)

(評議員会費:5,000 円)

(維持会費:30,000 円)

(当日参加費:2,000 円)

費目		平成25年度予算	平成24年度決算(円)
繰越金		1,425,052	1,747,375
収入 の 部	会費収入	2,215,000	2,112,000
	普通会员費(口)	480,000(160)	423,000(141)
	評議員会費(口)	295,000(59)	299,000*(59)
	維持会費(団体)	1,230,000(41)	1,170,000(39)
	参加費(非会員)(口)	210,000(105)	220,000(110)
	会報代金	1,500	9,000
	預金利息	200	143
	旅費返金	0	30,000
収入計		2,216,700	2,151,143
収入総計		3,641,752	3,898,518
支出 の 部	事務局経費	645,000	969,452
	賃貸費	350,000	(2年度分人件費) 700,000
	通信費	130,000	118,585
	事務用消耗品費	40,000	32,763
	印刷費	125,000	118,104
	機関誌発行経費	650,000	564,100
	編集費	30,000	28,600
	印刷費	550,000	535,500
	会誌PDF化経費	70,000	0
	集会経費	945,000	939,914
	会場費	100,000	64,700
	講演者招待費	535,000	578,995
	幹事会・評議員会	250,000	242,219
	アルバイト費	60,000	54,000
	予備費	100,000	0
支出計		2,340,000	2,473,466
繰越剰余金		1,301,752	1,425,052
支出総計		3,641,752	3,898,518

参考： 年度内収支（収入2,216,700 - 支出 2,340,000） = △123,300

* 未入金 4,000円を含む

関西実験動物研究会会則

I. 総則

- (1) 本会は関西実験動物研究会 (Kansai Laboratory Animal Research Association) という。
- (2) 本会は関西地区において実験動物学ならびに関連諸科学の発達を図る事を目的とする。
- (3) 本会はその目的を達成するために以下の諸事業を行なう。
 - ① 学術集会の開催
 - ② 会誌の発行
 - ③ 関係諸機関・諸学会との情報交換・連絡
 - ④ 会員相互の連絡
 - ⑤ その他必要と認められる事業

II. 会員

- (4) 本会の会員は個人からなる普通会員と法人及びこれに準ずる団体からなる維持会員からなる。
- (5) 会員は本会の趣旨に賛同し、本会を維持するために会費を支払う。
- (6) 会費は前納とし、普通会員は年額 3,000 円、評議員は 5,000 円、維持会員は 30,000 円とする。
- (7) 会員は会誌の配付を受ける。
- (8) 本会に名誉会員をおくことができる。

III. 役員

- (9) 本会の役員は、会長 1 名、評議員若干名及び 監事 2 名とする。
- (10) 会長は評議員の互選によって選出する。
- (11) 評議員は普通会員 3 名以上の推薦によって選出し、総会の承認を受ける。
- (12) 監事は評議員の推薦によって選出し、会長が委嘱する。
- (13) 会長は本会を代表し、会務を統理する。会長に支障があるときは評議員の互選により 1 名を選出し、会長の職務を代行する。
- (14) 会長は評議員会を召集し、その議長となる。
- (15) 評議員は評議員会を組織し、本会に関する重要な事項を審議・決定する。また、評議員の互選により選ばれた幹事は、幹事会を組織し、会長の補佐及び庶務、会計、集会、会誌発行などの会務を実行する。
- (16) 監事は会計を監査する。
- (17) 役員の任期は 3 年とし、再任を妨げない。

IV. 総会

- (18) 会長は毎年 1 回普通会員で構成される総会を召集し、会務の必要事項を報告し、承認を受ける。

V. 会計

- (19) 本会の事業年度は毎年 1 月 1 日より 12 月 31 日までとする。
- (20) 本会の経費は会費、寄付金その他の収入をもってあてる。

VI. 附則

- (21) 本会則は昭和 59 年 3 月 16 日より施行する。
- (22) 本会則の改正は評議員会の議決を経て総会の承認を受ける。
- (23) 本会の事務局は京都市左京区吉田河原町 14、公益財団法人 京都技術科学センター 22 号室に置く。

VII. 附則

- (24) 本会則は平成 2 年 3 月 9 日より施行し、平成 2 年 1 月 1 日より適用する。
- (25) 本会則は平成 8 年 3 月 9 日より施行し、平成 8 年 1 月 1 日より適用する。
- (26) 本会則は平成 14 年 3 月 8 日より施行し、平成 14 年 1 月 1 日より適用する。
- (27) 本会則は平成 25 年 3 月 1 日より施行し、平成 25 年 4 月 1 日より適用する。

平成25年12月15日 印 刷
平成25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
〒606-8305 京都市左京区吉田河原町14
公益財団法人 京都技術科学センター 22号室
印 刷 所 プラスエー株式会社
〒525-0047 滋賀県草津市追分5丁目4番11号

関西実験動物研究会会報 第35号
Kansai Journal of Laboratory Animals
平成25年12月

第115回研究会：動物実験実施体制の課題

中村 和市：わが国の動物実験実施体制の課題と将来：動物愛護法改正問題への製薬協の取り組み 1

佐々木 弥生：動物実験の自主管理の推進に向けて－HS財団の動物実験外部評価・検証制度－ 2

Jae-Hak Park：Laboratory animal welfare might be resolute by education and laws 8

第116回研究会

＜特別講演＞

黒澤 努：獣医外科学、実験動物学、実験動物医学、動物実験代替法学 9

芹川 忠夫：実験動物の領域に潜り込んで得たもの 12

＜トピックス＞

Jung Sun MIN, Byeong-Cheol KANG et. al.：Introduction of the Education Program for Animal Experiment in Seoul National University 28

＜会員の発表 14題＞ 29

第117回研究会：アカハライモリとゼブラフィッシュを用いて生命原理を解き明かす

千葉 親文：アカハライモリのモデル動物化に向けた資源・技術・情報基盤の研究：外傷性疾患の治療と再生研究への適用を視野に 43

渡邊 正勝：ゼブラフィッシュの色素細胞間相互作用とパターン形成 52

＜トピックス＞

庫本 高志：実験用シロネズミの起源 60

第118回研究会：遺伝子改変技術を用いた糖尿病および動脈硬化研究

小池 智也 他：脂質代謝・動脈硬化研究におけるウサギの有用性－ヒトapoA-II トランスジェニックウサギの開発と応用－ 67

清野 進：新たなインスリン分泌メカニズムと糖尿病治療薬開発における意義 74

＜トピックス＞

山本 卓：高活性型TALENの開発と様々な動物におけるゲノム編集 75

＜関西実験動物研究会だより＞ 79

幹事会、評議員会、総会の議事概要 81 会員の異動 85

個人会員名簿 86 維持会員名簿 92 評議員名簿 93

会長、幹事、監事名簿 95 収支・予算 96 会則 99