

関西実験動物研究会会報

Kansai Journal of Laboratory Animals

平成30年12月 40号

関西実験動物研究会

Kansai Laboratory Animal Research Association

目 次

<第135回研究会（平成29年9月9日）>

テーマ：動物の心を探る

1. 自分の心、分かりますか？－動物におけるメタ認知研究－
中村 哲之（東洋学園大学人間科学部） 1
2. 動物の視知覚を探る
牛谷 智一（千葉大学大学院人文科学研究院） 25
3. 動物の心に配慮した飼育法：ラットの場合
清川 泰志（東京大学大学院農学生命科学研究科） 26
4. メダカの個体認知を介した配偶者選択とその分子神経基盤
竹内 秀明（岡山大学大学院自然科学研究科） 28

<第136回研究会（平成29年12月1日）>

<特別発言>

- Ten yaers' experiences of IACUC in SNUH 29
LEE, Kook Hyun（李 國賢）（韓国ソウル大学病院 九州大学病院）

<トピックス>

- 実験動物飼養保管基準解説書の概要
八神 健一（筑波大学 医学医療系） 30

<特別講演>

1. 感染症研究の過去、現在、未来
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）... 31
2. ゲノム編集技術の進展をキャッチアップ？
竹田 潤二（大阪大学医学系研究科ゲノム生物学） 36

<一般講演>

- 会員の発表15題 39

<第137回研究会（平成30年3月2日）>

テーマ：主要なバイオリソースであるメダカとラットの遺伝学

1. ラットの遺伝学

庫本 高志（京都大学大学院医学研究科 附属動物実験施設）…………… 57

2. メダカを用いた順遺伝学及び逆遺伝学的解析

—メダカ体色突然変異体の原因遺伝子同定を例として—

成瀬 清（基礎生物学研究所 IBBPセンター）…………… 62

<トピックス>

絶滅危惧種の特徴をiPS細胞と発生工学で解き明かす

本多 新（京都大学大学院医学研究科附属動物実験施設）…………… 77

<第138回研究会（平成30年6月22日）>

テーマ：実験動物学的見地から腸内細菌叢を考える

1. 疾患モデル動物を用いたシンバイオティクスの試み

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）…………… 83

2. 腸内細菌叢研究のツールとしての無菌動物とノトバイオート

平山 和宏（東京大学大学院農学生命科学研究科獣医公衆衛生学）… 86

3. 腸内細菌叢の網羅的な解析と、その考え方に基づく最近の話題

森田 英利（岡山大学大学院環境生命科学研究科動物応用微生物学）… 91

<関西実験動物研究会だより>…………… 93

<幹事会、評議員会、総会の議事概要>…………… 94

<維持会員名簿>…………… 99

<評議員名簿>…………… 100

<会長、幹事、監事名簿>…………… 101

<収支・予算>…………… 102

<会則>…………… 104

<第135回研究会（平成29年9月9日）>

テーマ：動物の心を探る

1. 自分の心、分かりますか？－動物におけるメタ認知研究－

中村 哲之（東洋学園大学人間科学部）

2. 動物の視知覚を探る

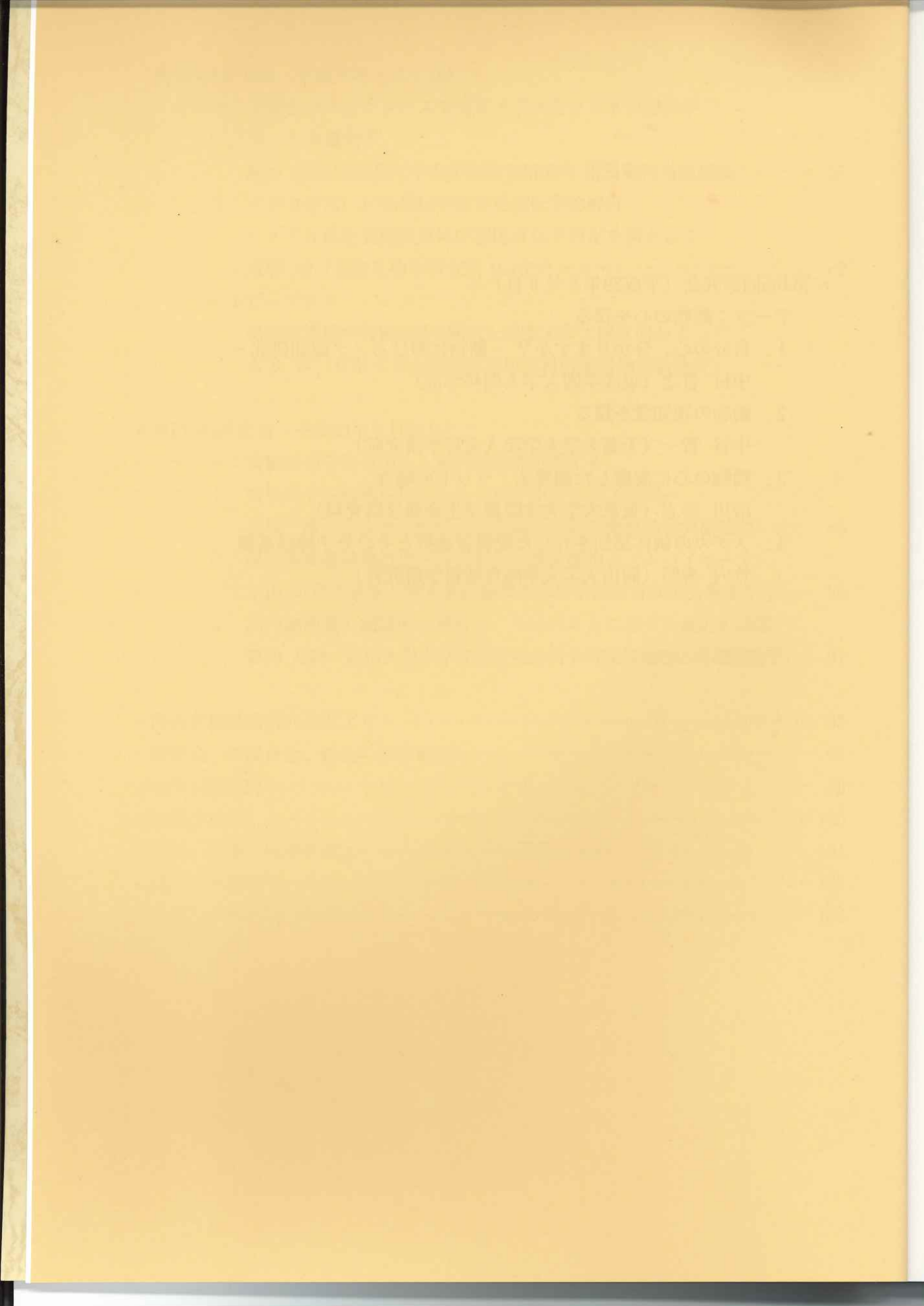
牛谷 智一（千葉大学大学院人文科学研究院）

3. 動物の心に配慮した飼育法：ラットの場合

清川 泰志（東京大学大学院農学生命科学研究科）

4. メダカの個体認知を介した配偶者選択とその分子神経基盤

竹内 秀明（岡山大学大学院自然科学研究科）



中村 哲之
東洋学園大学

「メタ認知」とは「認知に関する認知」、すなわち「自身が考えることについて考える」「自身が何を知っていて何を知らないかについて知っている」といった心的活動である。メタ認知について研究することは、ヒトを含めた動物の意識や内省といった高次認知プロセスの解明およびその進化の解明につながると考えられる。そうした重要性にもかかわらず、心理学におけるメタ認知研究の歴史は浅く、特にヒト以外の動物におけるメタ認知研究は、外的制御が難しい内的状態を手がかりとする認知的活動であることに起因する方法的な難しさもあってか、研究自体がおこなわれてこなかった。しかし、1頭のハンドウイルカに音の高さ弁別課題を訓練し、知覚的な「確信のなさ (uncertainty)」を有しているかどうかを行動実験によって調べることを試みた Smith et al. (1995) の研究を皮切りに、動物のメタ認知に関する研究が徐々に報告されるようになった。本講演では、以上に述べたような動物におけるメタ認知研究の流れを京都大学文学研究科でおこなわれてきた研究を中心に紹介した。

1. メタ認知とは

ヒトを含む動物にとって、適切な環境認識は生存していくうえで重要である。認識すべき環境には様々なものがあり、その1つは物理的な環境として定義できる (藤田、2010)。物理的な環境認識を担う脳の情報処理の仕方や速度の制約から、動物は物理的環境をありのまま認識することはできず、脳が解釈した世界を環境として認識している。そのため、物理的環境認識における“適切さ”は動物種間で必ずしも同一とは限らないことが、近年の比較認知科学の研究から明らかになりつつある。例えば図 1A のような図形を見たときに、多くのヒトにとっては、小さい円に囲まれた中心円の方が大きい円に囲まれた中心円よりも大きく見える。しかし、定規などで測ってみると実際には同じ大きさであることが分かる。それでは、全ての動物が同じようにこの図形を見ているかいうと、どうやらそういうわけではないようだ。霊長類の一種であるヒヒでは両円は同じ大きさに見える、つまりヒトのように「騙されない」という報告がある (Paron & Fagot, 2007)。さらにハトやニワトリでは、ヒトとは逆方向の錯視が生じる、つまり、小さい円に囲まれた中心円の方が

大きい円に囲まれた中心円よりも小さく見えていることが分かっている (Nakamura, Watanabe, & Fujita, 2008, 2014)。物理的な環境認識が動物種間で大きく異なる研究例は他にもある。図 1B の階層構造を持つ図形に対し、ヒトは左から“H”“S”と認識する傾向が非常に強い (Navon, 1977) が、ヒト以外の動物では“S”“H”と認識する傾向が強いという結果が多数報告されている (e.g., ハト: Cavoto & Cook, 2001; 関口・牛谷・実森, 2011、アカゲザル: Hopkins & Washburn, 2002、ヒヒ: Deruelle & Fagot, 1998; Fagot & Deruelle, 1997、フサオマキザル: Spinozzi, De Lillo, & Salvi, 2006、Spinozzi, De Lillo, & Truppa, 2003、チンパンジー: Fagot & Tomonaga, 1999。総論として後藤, 2009)。ヒトは他の動物との比較において「木よりも森を見る」傾向が強いといえる。図 1C の図形では、ヒトは正方形の背後に円があると認識するが、ハトやニワトリでは“重なり”の認識が生じず、正方形の背後に“バックマン (切り欠き円)”があると認識する (ハト: Fujita & Ushitani, 2005; ニワトリ: Nakamura, Watanabe, Betsuyaku, & Fujita, 2010)。これらの結果は、「神経系の処理速度の制約の関係から、外界をありのまま認識する動物はこの世にはいないこと」「各動物種が自身の生活環境に適応する形で各々の認知能力を進化させてきたこと」「特に鳥類は局所志向的な情報処理をする傾向が強いのにに対し、ヒトは他の動物との比較において大域優先的な情報処理がされやすいこと」を示している。

動物が認識すべき環境は物理的な対象だけではなく、社会的な対象もある (藤田, 2010)。「ヒトはひとりでは生きていけない」という言葉に示されるように、他者を認識し、適切なコミュニケーションを取っていくことは我々が生きていくうえで重要な認知能力である。このような社会的知性 (社会的対象を相手にした行動調整能力) は、ヒト以外の動物にとっても重要であることも、近年の比較認知科学の研究から明らかになりつつある。例えば藤田 (2009) は、第 101 回関西実験動物研究会「欺き・協力・優しさ・ねたみーフサオマキザルの社会的知性」の講演において、新世界ザルに属する霊長類の 1 種であるフサマキザル (*Cebus apella*) が他個体との関わり合いにおいて様々な社会的知性を発揮することを示した行動実験を紹介した。一連の研究結果から、系統発生的にヒトからは (チンパンジーやオランウータンなどの類人との比較において) 遠縁の新世界ザルにも他者の多様な心的状態を認識する能力が分有されていること、そしてヒトにおける読心の進化的起源が古いものである可能性が示唆された。さらに霊長類以外にも、ヒトとはさらに遠縁の種であるイヌ、イルカ、ゾウ、鳥類などを対象とした研究も行われており、社会的知性が広範な種において確認されている (e.g., 藤田, 2015)。

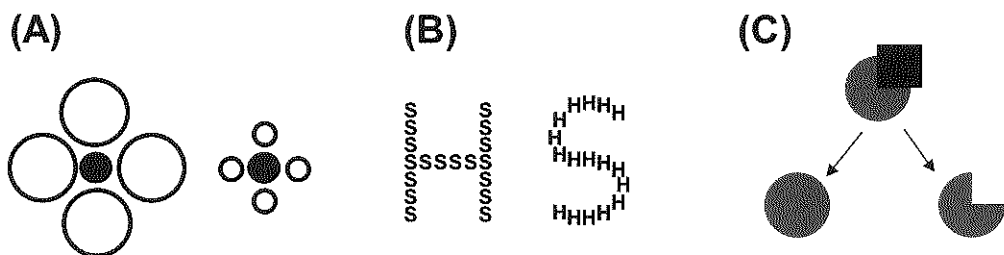


図 1. 物理的環境認識の種差が確認される図形の例

生体の外部にある環境認識の重要性についてここまで述べたが、動物が認識すべき対象はそれだけではない。少なくともヒトにとっては、自身の内的状態の認識も重要である。内的状態には末梢神経系で生じる現象と中枢神経系で生じる現象がある。前者には心拍、腹痛、体温などがある。そして後者のうち能動的に認識することができるものとして、自身の知識の有無、記憶の確かさ、願望、意図、判断の確信度などがある。喉まで出かかっているのに思い出せないといった経験は誰もがしたことがあるだろう。こうした認識を持つためには、自身の知識の有無を的確に認知することが必要である。また研究者であれば、研究発表資料作成時にうろ覚えの先行研究の論文を読み直すということもよくあると思うが、これを的確に遂行するには記憶の確かさの認知が必要である。もし、こうした認知が正常に機能しない場合、実際には知らないのに「知っている」と思い込んでしまうことで、事実とは異なることを発表したり記載したりしてしまう危険性がある。あるいは逆に、実際には知っているのに「知らない」と思い込んでしまうことで、全ての先行研究を1から調べ直すはめになるかもしれない。いずれにしても適応的な行動とはいえないだろう。ヒトは中枢神経系で生じる現象の一部を認知することによって行動を適応的に変化・調整することができる。こうした認知能力は「メタ認知」と呼ばれており、表象のモニタリングと制御がその機能と考えられている (Nelson & Narens, 1990, 1994)。

なお、「メタ」とは「～の上位にある」などを意味する接頭辞である。よってメタ認知は、「認知に関する認知 (cognition about cognition)」「知っていることを知っている (knowing about knowing)」といった意味になる。認知心理学において「認知」とは、見る、聞く、記憶する、考えるなどといった心のはたらきを意味するため、メタ認知の例としては、先に挙げた「自身が何を覚えていて何を忘れているかについて覚えている (=知っている)」という例の他に「自身が考えることについて考える」といった心的活動などを挙げることが

できる。「試験勉強をする際に、自分が理解していない部分や忘れてしまっている部分を重点的に勉強する」「スポーツ選手がスキルの向上を目指すために、自身の強みと弱みをきちんと理解し、弱点を重点的に克服するためのトレーニングをおこなう」「友人から悩みを相談されたときに、自分が精通している分野の話であればそのことについて躊躇なくアドバイスできる。しかしその分野に関して詳しくなければ、他者に相談するよう提案する」といった事例は全てメタ認知が無ければ実現しえないものばかりである。ヒトはメタ認知の能力を日常のあらゆる場面において活用していることが分かる。

2. メタ認知研究の意義と歴史

このようなメタ認知機能を心理学的に研究する意義は何だろうか。ヒトにおけるメタ認知に関する研究の場合、メタ認知は存在するものであるという前提のうえで、「メタ認知の正確さ」と「学習の効率性」との間の関連性を調べることが主要なテーマとなっている(三宮、2008)。「自分の強みや弱点はどこにあるのか」「あることを学習するためには、どの程度の時間が必要なのか」などといったことを正確メタ認知することで、学習の効率や意思決定の的確さを高めることができ、教育や発達支援という点において重要な研究意義があると考えられる。

一方で、ヒト以外の動物におけるメタ認知に関する研究の場合、研究対象となる動物がメタ認知能力を有しているかどうかから研究が始まる。ヒトを対象としたメタ認知研究が言語依存によるものであることから分かるように、メタ認知能力と言語能力との結びつきは強く、言語能力が未発達である新生児や乳児、そしてヒトの言語を用いることのない動物にはメタ認知能力は備わっていないと長年にわたって考えられてきた。しかし、メタ認知は「神経系内部の状態に対するアクセスの結果」であり、そうしたアクセスを手がかりとした行動の調整が動物でもおこなわれていることを行動実験として示すことができれば、言語を用いることなく、動物におけるメタ認知の存在を証明することは可能である(藤田、2009)。こうした研究の積み重ねは、メタ認知機能の進化的背景や生態学的意義を検討することにつながる。

さらに、“意識”や“内省”といった定義が難しい高次認知機能の一側面を検証可能な形で定義できるという研究的意義もある。動物の自己意識を調べるための具体的研究課題としては、長らく鏡映像自己認知課題(マークテスト、ミラーテストともいう; e.g., Gallup, 1970)が用いられてきた。この課題では、初めに被験体に気づかれないよう、被験体が目

で直接見ることができない身体部位に染料をつける。その後鏡を設置し、被験体が鏡に映った自身の姿を見たときに、鏡に映った自身の像に手をやるか、自身の身体につけられた染料に手をやるかを調べる。もし鏡に映った像を自分自身だと認識していれば、実験室に鏡を設置しない場合（統制条件）と比較して、自身の身体につけられた染料に手をやる行動をより多く示すと考えられる。実際に多くの動物種でこのテストが行われ、テストに成功した種、失敗した種が報告されてきた。ただし、自己意識を持っていたとしても何らかの原因でこのテストに成功しない可能性やその逆の可能性もありうるため、この課題の結果だけを以て当該動物種の自己意識の有無を論じるのは危険である。メタ認知課題は、鏡映像自己認知課題とは異なる側面から動物の自己意識を測定する機会を提供することで、刺激特異性による当該動物の認知機能の過大ないし過小評価を防ぐ役割を担っているのである。

以上に述べたような研究的重要性が高いメタ認知研究は、どのような歴史を刻んできたのだろうか。メタ認知という概念が心理学の世界で現れたのは 1970 年代で、用語としては Flavell (1976) が初めて用いたとされている。かの有名な「無知の知（自分が無知であることを知ること）」の重要性を説いた、古代ギリシャの哲学者・ソクラテスが生きていた時代が紀元前 5 世紀ごろであることを考えると、随分とのんびりした出現であるように思われるかもしれない。しかし、刺激－反応（S－R）の関係性を明らかにすることに心理学の研究は徹するべきであったとした行動主義、そして行動主義を発展させた（S－O－R）図式の新行動主義が全盛であった時代を経て、心理学の世界に「認知」という概念が定着し始めたのが 1960 年代のことであるから、メタ認知という言葉がこの年代に出現し、定着したことは自然な出来事であったと考えられる。そして 21 世紀に入ってから、メタ認知研究が国内外で盛んにおこなわれるようになった。例えば海外の場合、*Journal of General Psychology* 誌が 2005 年に、*European Journal of Cognitive Psychology* 誌が 2007 年に、それぞれメタ認知に関連する特集を組み、*Springer New York* 出版社は 2006 年に *Metacognition and Learning* を創刊している（三宮、2008）。こうした大きな流れもあって、認知心理学、教育心理学、学習心理学、発達心理学、言語心理学、臨床心理学、障害児心理学、神経心理学など、さまざまな領域の心理学研究者が、学習におけるメタ認知の研究を推し進めることとなった。ちなみに、ヒト以外の動物におけるメタ認知研究が盛んになってきたのも 21 世紀に入ってからのもので、*Metacognition in Humans and Animals* というタイトルの論文が発表されたのが 2009 年（Kornell, 2009）、Oxford 出版社が *The Missing Link In Cognition:*

Origins of Self-Reflection Consciousness を出版したのが 2005 年、*Animal Metacognition* を出版したのが 2012 年である。

国内でも、メタ認知に関するさまざまな研究が盛んにおこなわれ、多くの研究成果が報告されている。その一例として、北大路書房出版から、「メタ認知—学習力を支える高次認知機能—（三宮編著）」が 2008 年に、「メタ記憶—記憶のモニタリングとコントロール—（清水編著）」が 2009 年にそれぞれ出版された。「メタ認知—学習力を支える高次認知機能—」は 12 の独立した章から構成され、各章のタイトルは、「メタ認知研究の背景と意義（第 1 章）」「学習におけるメタ認知と知能（第 2 章）」「知識の獲得・利用とメタ認知（第 3 章）」「学習方略とメタ認知（第 4 章）」「学習における動機づけとメタ認知（第 5 章）」「文章の理解におけるメタ認知（第 6 章）」「数学的問題解決におけるメタ認知（第 7 章）」「科学的思考と科学理論の形成におけるメタ認知（第 8 章）」「談話の産出・理解におけるメタ認知（第 9 章）」「学習の障害とメタ認知（第 10 章）」「認知行動療法とメタ認知（第 11 章）」「メタ認知の神経科学的基礎（第 12 章）」となっている。「メタ記憶—記憶のモニタリングとコントロール—」も同じく 12 の独立した章から構成され、各章のタイトルは、「メタ記憶研究の歴史的展開（第 1 章）」「メタ記憶の理論とモデル（第 2 章）」「メタ記憶の測定（第 3 章）」「メタ記憶のモニタリング機能（第 4 章）」「メタ記憶のコントロール機能—記憶の意図的抑制（第 5 章）」「メタ記憶とワーキングメモリの脳内表現—社会脳をめぐる自己知（TOMS）と他者知（TOMO）の問題（第 6 章）」「メタ記憶の生涯発達（第 7 章）」「メタ記憶と社会・文化（第 8 章）」「メタ記憶と教育（第 9 章）」「メタ記憶の進化（第 10 章）」「メタ記憶の神経科学的基礎（第 11 章）」「健忘症と病識—神経心理学的臨床からみたメタ記憶（第 12 章）」となっている。このように、各章のタイトルはバラエティーに富んだものとなっており、メタ認知の問題が多様な領域の研究者の興味・関心を集めていることが分かる。

ヒトを対象とした研究、動物を対象とした研究ともに、21 世紀以降から盛んにおこなわれるようになってきたメタ認知研究であるが、これより以降は、京都大学文学研究科で行われてきた動物を対象とした研究を中心に紹介していく。

3. 動物のメタ認知研究例

後述する Smith らの研究が発表されてから、さまざまな動物種を対象にしたメタ認知研究が盛んにおこなわれるようになった。藤田（2010）によれば、動物のメタ認知の研究法

には共通した2つの特徴があるとされている。第1に、基礎課題として何らかの弁別課題が設定されており、その課題の難易度が何らかの形で操作されている特徴である。そして第2に、実験における試行の流れを時間軸に沿って見た場合、基礎課題の遂行前、遂行中、遂行後のいずれかの時点で基礎課題の遂行を回避し、別の容易な課題へと逃げることでできる選択肢 (escape)、追加情報を求める選択肢 (情報希求)、基礎課題の正誤に対する強化随伴性を選択する選択肢 (Risk/Safe 選択) が呈示されるという特徴である。

こうした研究法に則って行われた研究の結果、研究対象の動物が以下に挙げるような行動を示した場合に、当該の動物にメタ認知が存在するといった可能性が示唆される(藤田、2010)。第1に、escape 反応、情報希求反応、Risk/Safe の選択率が、基礎課題の成績 (正答率もしくは反応時間) と負の相関関係を示す場合である。つまり、基礎課題の成績が良いときほど、基礎課題を避けずに積極的に行う、ハイリスク・ハイリターンの随伴性を選択する、情報希求を避けるといった行動が出現されやすくなる場合である。第2に、基礎課題の遂行、情報希求の回避、ハイリスク・ハイリターンの選択といった行動を示した場合の基礎課題の正答率は、強制的に基礎課題を課せられたときの正答率に比べて高くなる場合である。

3-1. 基礎課題遂行中のメタ認知

3-1-1. 確信のなさ (uncertainty) の認知

動物のメタ認知研究の先駆けとなったのは、ハンドウイルカ (*Tursiops truncatus*) を対象とした Smith らの研究であった (Smith et al., 1995)。彼らは、1頭のハンドウイルカに音の高さ弁別課題を訓練し、知覚的な確信のなさ (uncertainty) をイルカが有しているか否かを行動実験によって確かめた。

まず初めに、2100 ヘルツの純音刺激が呈示されたときには左側のパドルを、それよりも低い純音が呈示されたときには右側のパドルを押すことをイルカに訓練した。正解試行ではイルカに餌の魚を強化として与え、不正解試行では軽い罰としてタイムアウトを課した。1セッションは約 60 試行から構成されており、その内訳として、58%が 2100 ヘルツの純音が呈示される試行 (左側のパドルを押すと正解となる試行)、8%が 1200 ヘルツの純音が呈示される試行 (右側のパドルを押すと正解となる試行。イルカにとって、2100 ヘルツとの違いを弁別することは容易であるため、この試行ではほぼ間違えることなく正解できる)、34%がプローブ試行となっていた。プローブ試行では、2100 ヘルツよりも少しだけ低い、弁別が難しい音が呈示された。最初は 2041 ヘルツで、正解すると音の高さが上げられ (2100

ヘルツに近くなるために違いを弁別しにくくなり、右側のパドルを選ぶことが困難になる)、逆に不正解だと、音の高さが下げられた(2100 ヘルツから遠ざかるために、違いを弁別しやすくなり、右側のパドルを選ぶことが容易となる)。通常の弁別課題は2選択課題でおこなうが、Smith らが本研究で工夫した点は、第3のパドルを導入した点であった。プローブ試行で、イルカがこの第3のパドル (escape) を押すと、試行がキャンセルされ、次に1200 ヘルツの純音が呈示された。ただし、この第3のパドルを頻繁に押すと、1200 ヘルツの音が出るまでの時間が次第に長くなるようにプログラミングされていた。つまり、この"escape"パドルを高頻度を使うのは得策ではないようになっていた。

イルカがこの第3の"escape"パドルを使うタイミングはどのようになっていたのだろうか。Smith らが示したデータによれば、高音を示す左側のパドルへの反応率と低音を示す右側のパドルへの反応率は約2085 ヘルツの辺りで逆転していたことから、この辺りの音の高さが弁別限界であると推測できた。そして、第3の"escape"パドルへの反応率は、この辺りをピークとする結果となった。学習心理学の知見から、こうした動物の反応は連合学習の結果として生じる可能性があることが分かっている。もしそうだとすれば、信号検出理論を当てはめた理論的な分析結果と、実際にイルカが示した結果が一致するはずである。しかし、信号検出理論によれば、イルカの弁別能力を用いて最大限の強化を得るためには、実際の結果(約2085 ヘルツ)よりも低い周波数のときから、第3の"escape"パドルへ反応すべきであることが示された。つまり、イルカが示した結果は、連合学習によるものではないことが示された。それでは、イルカの反応はどのように説明されるのだろうか。

Smith らは、ヒト(大学生)5人を対象に、イルカと同じ実験をおこなっている(ただし、ヒトの場合は、コンピュータ画面上の図形とジョイスティックを用いた課題)。ヒトの結果は、イルカの結果と類似したものであった。つまり、弁別限界付近で、第3の"escape"反応率が高くなった。信号検出理論から導き出された"最適解"もまた、イルカのそれと同じで、実際の結果よりも低い周波数のときから、第3の"escape"反応をおこなうべきであるというものであった。「高い」「低い」「escape」反応をどのようなときにおこなったかについて、実験協力者への内観報告を求めたところ、「高い」「低い」の反応をおこなうための手がかりとなっていたのは音の高さ、つまり「外的な」刺激の性質であった。一方で、「escape」反応をおこなうための手がかりとして、多くの実験協力者が挙げたのは、「(自身が出した回答への)疑い(doubt)や確信のなさ(uncertainty)」であった。つまり、「外的な」刺激の性質ではなく、自身の心的状態が反応の基準となっていたことが分かった。

イルカはヒトの言葉を使わないために、言語教示を求めることはできない。しかし、先に述べたように、イルカとヒトの結果が良く似たものであったことから、Smith らは、イルカもヒトと同様に「(自身が出した回答への) 疑い (doubt) や確信のなさ (uncertainty)」といった自身の心的状態を反応の基準に用いていたのではないかと考察している。

さらに Smith らは、2 頭のアカゲザル (*Macaca mulatta*) を対象にして、同様の研究をおこなっている。ただし音刺激の代わりに、コンピューター画面上のランダムドット密度の弁別課題を用いている。アカゲザルの示した結果は、イルカやヒトが示した結果と良く似たものであった。アカゲザルも「確信のなさ」といった自身の心的状態を反応の基準に用いていたのではないかと考察されている (Smith, Shields, Schull, Washburn, 1997)。



図 2. ハトを被験体とした実験で用いた装置。ニワトリを被験体とした実験装置も、基本的には同じであった。

3-1-2. 知識状態の認知と情報希求行動に関する研究

基礎課題の遂行中に追加情報を求める選択肢（情報希求）を設けた研究としては、チンパンジー・オランウータン（Call & Carpenter, 2001; Call, 2010）、ボノボ・ゴリラ（Call, 2005, 2010）といった類人の他、類人よりも系統発生的距離がヒトから遠い霊長類のアカゲザル（Hampton, Zivin, & Murray, 2004; Kornell, Son, & Terrace, 2007）、さらには鳥類のハト（Iwasaki, Watanabe, & Fujita, 2013）やアメリカカケス（Watanabe et al., 2014）で肯定的な結果が示されており、彼らにおいて知識状態の認知が可能なが示唆されている。ただし、フサオマキザルのようにあいまいな結果を示す種もいる（Paukner, Anderson, & Fujita, 2005; Basile et al., 2009）。以下、Iwasaki らによるハトの研究を紹介する。

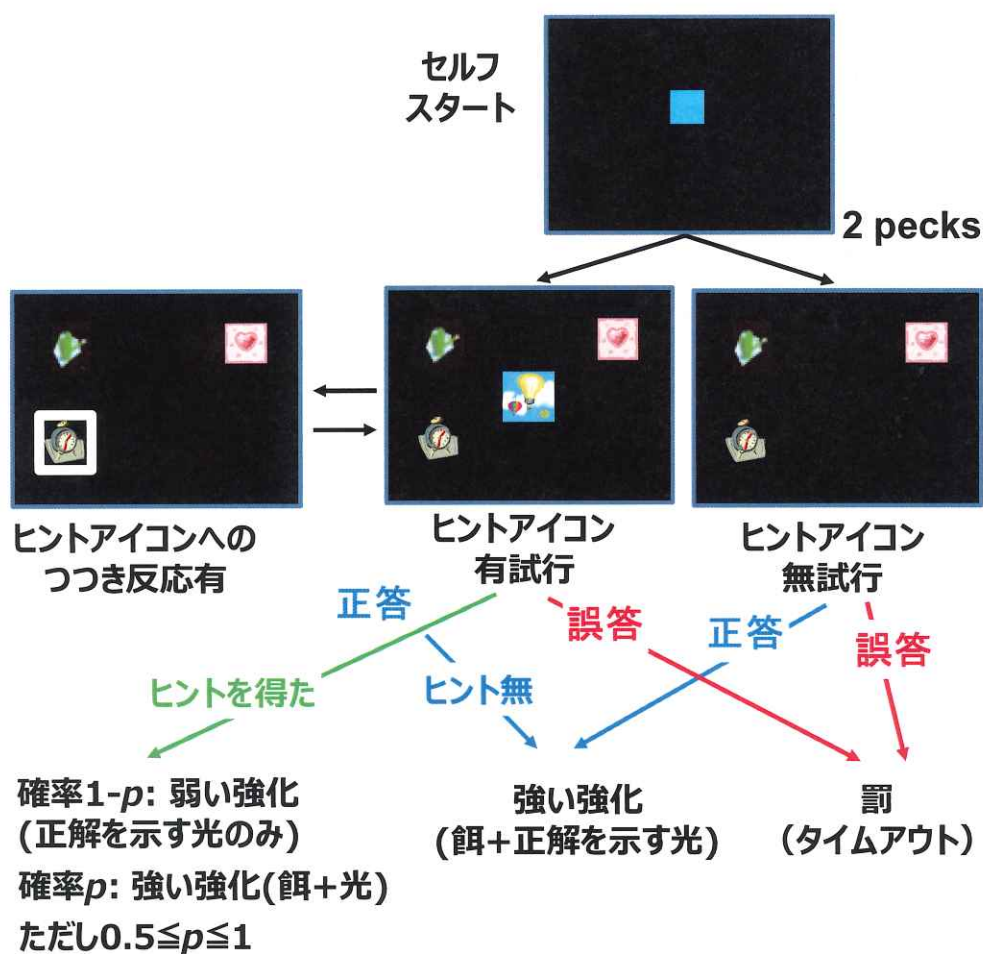


図 3. Iwasaki, Watanabe, & Fujita (2013)の実験 1 の流れ。
論文の図を基に著者が描いた。

実験 1：ヒント希求行動の獲得訓練

4 個体のハトが実験に参加した。実験装置は手製の典型的なオペラントボックス（スキナーボックス）を用いた。図 2 に示したのはハト用のオペラントボックスで、約 35cm 立方の箱に接するように（図 2 では奥側）、赤外線タッチパネル（Touch Panel systems 社製 UniTouch）を取り付けた液晶モニター（Sharp 社製 LLT1520、EIZO 社製 FlexScan L357）を設置した。実験に参加する動物は立方体の箱の中に入り、液晶モニター上に呈示されるさまざまな図形に対して嘴でつつく反応を求められた。このつつき反応は、ヒトやチンパンジー、サルでいえば手や指でタッチする反応に対応するものであった。画面のどの位置に反応が入ったかはタッチパネルによって検出し、その情報をパソコン（CPU: Intel Pentium 4 2.60 GHz; Intel Core2 Duo 2.93 GHz）に送った。後述するように、問題に正解した場合には、パソコンからの命令によって食物を呈示することによって動物のモチベーションを維持した。図 2 の装置の場合には、箱の左側に食物呈示装置が設置されていた（普段は装置が下がっているので動物は食物のある場所まで届かないが、問題に正解すると装置が上がり食物に嘴が届く仕組みとなっていた）。実験プログラムは Microsoft Visual Basic 6.0 を使って書かれていた。実験中はホワイトノイズを流すことで外部の音を遮断した。

予備訓練段階（Phase 1）では、3 秒の試行間隔（ITI）の後に、モニタ画面中央辺りに青い正方形（セルフスタートアイコン、13.4×13.4 mm）が出現した。被験体がそれに対して 2 回つつき反応をすると青い正方形は消え、強化子として餌が呈示された（2.5-3.0 秒）。2~3 セッションでこの行動を学習した被験体は、次に基礎課題の訓練（Phase 2: Basic task (simultaneous chaining)）に進んだ。セルフスタートアイコンに 2 回つつき反応があると、それが消え、セルフスタートアイコンのあった位置から見て左上、左下、右上、右下のいずれかの位置に 1 つの刺激アイテムが呈示された。その刺激アイテムにつつき反応をすると強化子として餌が呈示された。この行動を学習したら、次は 2 つの刺激アイテムが呈示される段階へ移行した。実験者によってあらかじめ決められた順序で 2 つの刺激アイテムへのつつき反応があった場合には強化子として餌が呈示されたが、誤った順序で反応した場合にはタイムアウト 20 秒が課せられた。タイムアウト中は画面に刺激は一切呈示されていないブランク状態であった。2 セッション連続で正答率が 75% 以上となった段階で学習したとみなし、3 つの刺激アイテムが呈示される段階へ移行した。刺激呈示位置は試行ごとにランダムに変えられた。2 セッション連続で正答率が 70% 以上（偶然正解レベルは 16.7%）となった段階で学習したとみなし、別の 3 つの刺激アイテムセットで訓練を実施

した。

その後、ヒントアイコン呈示段階 (Phase 4: Simultaneous chain with a hint option、図 3) では、通常の基礎課題 (Phase 2) 中に 3 つの刺激アイテムが呈示される画面でヒント希求アイコンも同時に出現する試行が設けられた。被験体がヒント希求アイコンにつつき反応をすると、次につつきべき刺激アイテムの周囲に白い点滅する枠がヒントとして出現した。ヒント無しで基礎課題に正答した場合は必ず (確率 100%) 1 次性強化子 (餌) を呈示されたが、ヒント有りで基礎課題に正答した場合は確率 p で 1 次性強化子 (餌) を呈示され、確率 $(1-p)$ で 2 次性強化子 (正答時に光るフィーダーライト) のみが呈示された (ただし $0.5 \leq p \leq 1$)。なお、この段階の前に、「刺激アイテムの周囲に白い点滅する枠が呈示される試行で構成されるセッション」と「ヒント希求アイコンが呈示される試行で構成されるセッション」を別途経験すること (Phase 3: Approximation to simultaneous chains with a hint option) で、これらの刺激に対して被験体がフリーズしたり、実験者が予期せぬ反応をしたりすることを未然に防いだ。「2 セッション連続でヒント無し試行の正答率が 70% 以上になる」か「最大 12 セッションを実施」したら、3 つの刺激アイテムリストを変えて、引き続き訓練をおこなった。3 羽のハトで 6 種類、1 羽のハトで 5 種類の刺激アイテムリストで本段階の訓練を実施し、ハトの行動結果を分析した。

もしハトが自身の知識状態を認知した上でヒント希求行動を示すのであれば、3 つの刺激アイテムリストが変わった直後の早い段階 (すなわち、どの順番で刺激アイテムをつつくべきかが十分に学習されていない段階) 時にヒント希求行動が多くなることが予測される。加えて、1 セッションごとに課題正答率とヒント希求率を求めた場合、両変数間で負の相関がみられる (課題正答率が低いセッションほどヒント希求率が高くなる) ことが予測される。Phase 4 の結果を個体ごとに分析したところ、4 羽中 2 羽のハトが予測に沿った結果を示した。

実験 2 : 般化テスト

実験 1 で予測に沿った結果を示した 2 羽の被験体が参加した。実験 1 では刺激アイテムのつつき順序に関する記憶課題を基礎課題として用いたが、実験 2 では画面に呈示される 4 つの色円の中から決められた標的色の円につつき反応をおこなう視覚探索課題 (詳細は、後述の「3-2. 基礎課題遂行後のメタ認知」の実験を参照) を用いた。基礎課題が変化しても実験 1 で示されたメタ認知能力を示唆する行動が般化するのかを確かめた。しかし、実験に参加したハト 2 羽において行動の般化を示す結果は得られなかった。

これら2つの実験から、決定的な結論は導き出すには至らなかったものの、ハトが自身の知識状態を認知した上で行動を変えることができる能力を有していることが示唆された。今後さらなる研究を重ねていくことが必要であろう。

3-2. 基礎課題遂行後のメタ認知

我々は日常生活のなかで数多くの行動をとるが、そのなかには自信があるものとそれほど自信がないものが存在する。後者の場合、その行動の是非を吟味し、場合によっては一旦とった行動を修正することで、より多くの利益や報酬を得たり、危険やトラブルに遭遇する率を減らしたりすることができる。「試験やクイズなどで一度書いた解答を書き直す行動」「論文執筆時にある先行研究に関して書いた文章に自信がなく、元の文献を読み直して再確認する行動」「スーパーで買うと決めて買い物かごに商品を入れたものの在庫があったかどうか不安になって、自宅で留守番している家族に当該商品の在庫の有無を確認する電話をする行動」などの例からも分かるように、「自信の有無を回顧的にメタ認知する能力」など様々な例が挙げられる。

このようなメタ認知の能力は、ヒトにとってはもちろん重要であるが、ヒト以外の動物にとっても有益なものであるかもしれない。こうした能力の有無を動物において検討するために開発されたのが、基礎課題の遂行後にリスク選択を求める選択肢を設けた実験方法である。アカゲザル (Son & Kornell, 2005; Kornell, Son, & Terrace, 2007) やハト・チャボ (Nakamura, Watanabe, Betsuyaku, Fujita, 2011)、ハシブトカラス (Goto & Watanabe, 2012) で肯定的な結果が示されており、彼らにおいて課題遂行後の自身の持つ自信の有無に関する認知が可能なが示唆されている。以下、Nakamura らによる実験を紹介する。ハト (6羽) とチャボ (3羽) が本研究に参加したが、これらの被験体は「実験装置に慣れる」「餌呈示口から餌を食べることを学習する」「コンピューターモニター画面上に呈示された刺激に対してつつき反応をおこなう」といった行動を実験前に十分に訓練されていた。

実験1：自身の選択行動に応じた、Risk/Safe 選択の獲得

基礎課題として、実験1では視覚探索課題を用いた。視覚探索課題とは、例えば、コンピューターモニター画面上に4つの色円が呈示され、そのうちの1つだけ他の3つとは色が異なる場合に、色の異なる色円 (標的刺激) を迅速かつ正確に検出し、それに反応する課題である。初めに、一般的な視覚探索課題を訓練した。3秒の試行間隔 (画面上には何も呈示されていない状態) 後、セルフスタートアイコン (灰色正方形) が画面中央上部

に現れた。被験体がこれを2回つくとアイコンが消え、1〜3秒後、視覚探索画面が現れた。異なる色円（標的的刺激）に対してつつき反応をした場合には強化（餌呈示装置を作動させ、一定時間餌を摂取することができる）を与え、それ以外の色円（妨害刺激）に対して反応した場合には軽い罰（タイムアウトが課せられることで、次の試行開始が遅くなる）を与えた。標的刺激の色は常に同じ紫[R(188), G(128), B(188)：ただし、各値はマイクロソフト社製ペイントソフトのRGB値を示す]であった。妨害刺激の色は、訓練初期段階では、標的刺激の色とはかけ離れた色として、くすんだ赤[R(248), G(128), B(128)]もしくはくすんだ青[R(128), G(128), B(248)]を用いた。1セッションは192試行で構成され、2セッション連続で正答率90%以上もしくは3セッション連続で正答率85%以上となるまで訓練を実施した。その後、正答率の調整をおこなうために、妨害刺激の色数を6種類に増やし（標的刺激に近い色のものを4種加え）、同様の訓練をおこなった。

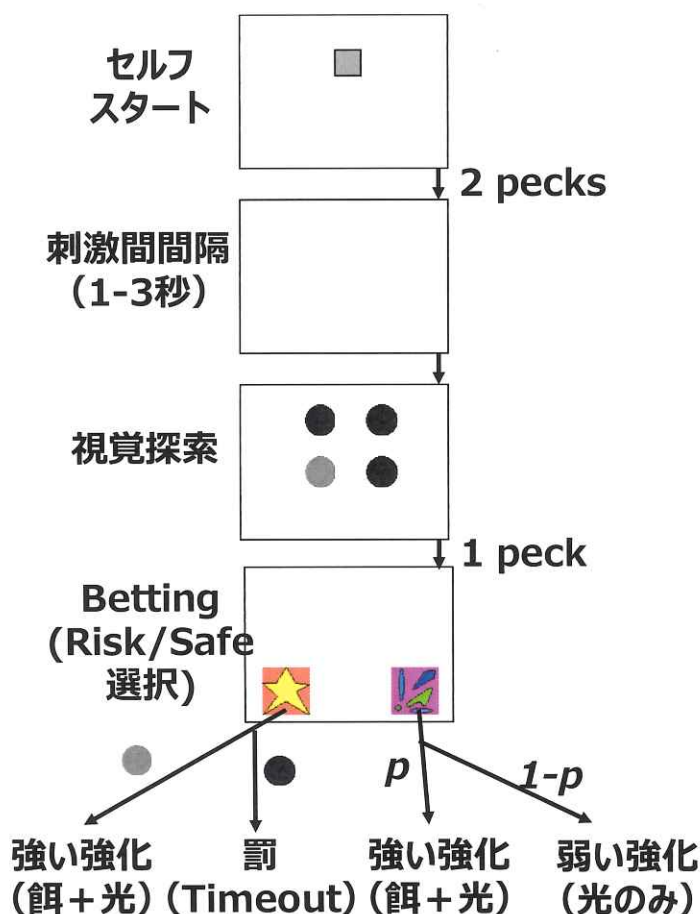


図4. Nakamura, Watanabe, Betsuyaku, Fujita (2011)の実験1、2の流れ。

その後、視覚探索画面直後に Betting アイコンを呈示する画面を挿入した課題でテストをおこなった（図 4）。視覚探索画面でどれかの色円に反応すると、色円は消え、Risk と Safe のアイコンのどちらか一方もしくは両方が現れた。Risk アイコンに反応した場合、直前の視覚探索時に正答（標的刺激に反応）していれば常に餌を獲得できたが、探索時に誤答であればタイムアウトが課せられた。Safe アイコンに反応した場合、探索時の正誤に関係なく、ある確率 p で餌を獲得できた。

もし被験体が探索課題における自身の選択行動の自信度をメタ認知できるならば、自信がないときにより多く Safe を選択するため、結果的に正答試行よりも誤答試行での Safe 選択率が高くなるという仮説を立てた。テストの結果、最終的にハト 6・ニワトリ 2 個体で仮説を支持する結果が得られた。仮説と逆方向の結果を示す個体はいなかった。

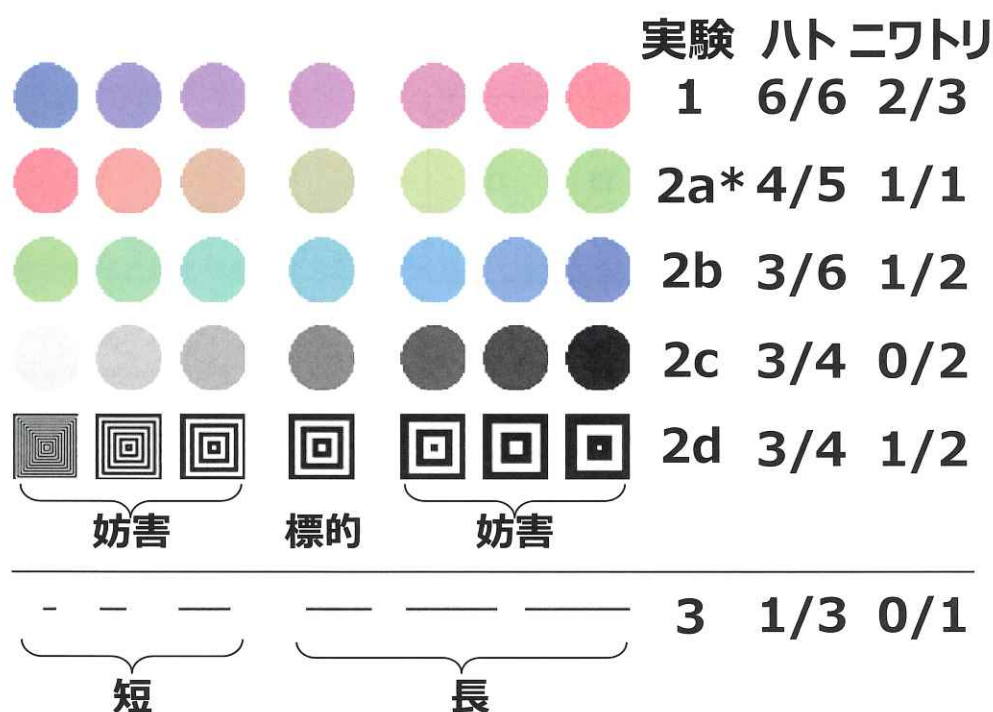


図 5. Nakamura, Watanabe, Betsuyaku, Fujita (2011) の各実験で用いた刺激例(左)と、仮説通りの結果を示した個体数/実験に参加した個体数(右)。

*一部の個体は、実験2a欄に示した刺激を用いて実験1を行った。

実験 2 : 自身の選択行動に応じた、Risk/Safe 選択の獲得

実験 1 の結果は、メタ認知以外の何らかの外的刺激（例えば、視覚探索画面内の刺激の知覚的特徴など）を手がかりとした連合学習によって生じた可能性がある。そこで実験 2 では、実験 1 同様に視覚探索課題を基礎課題として用い、標的刺激と妨害刺激の色や形を変えた新奇な刺激（図 5）を用いた般化テストを行った。実験 1 同様の予備訓練実施後、すぐにテストを行った。般化テストで先に述べた仮説通りの結果を示さなかった個体は、実験 1 をやり直した後、再テストした。最終的に、全個体が最低 1 度は般化を示した（図 5）。仮説と逆方向の結果を示す個体はいなかった。

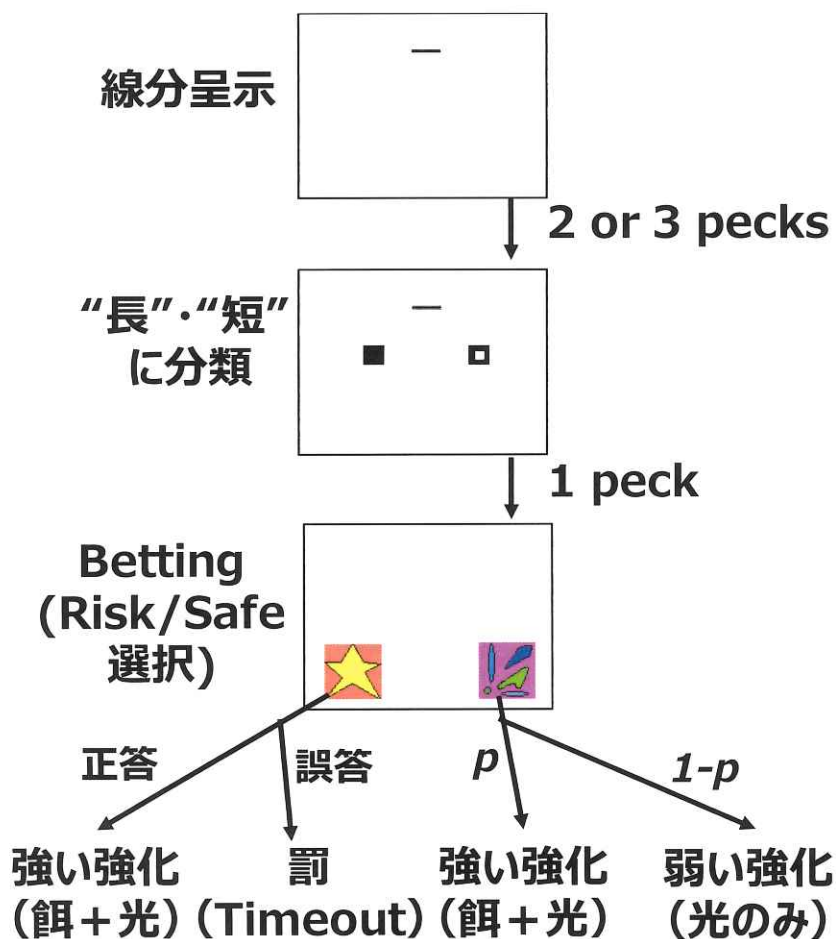


図 6 . Nakamura, Watanabe, Betsuyaku, Fujita (2011) の実験 3 の流れ。

実験3：異なる基礎課題（視覚探索→条件性位置弁別）を用いた、学習の般化の検討

実験2で示された自信の有無の認知能力が知覚課題全般においてみられるものであるかを検討するため、基礎課題を視覚探索課題から条件性位置弁別課題に変えた般化テスト(図6)を行った。3秒の試行間隔後、6種類の長さの黒色水平線分（短・長各3種）のうちの1つが画面中央上部に現れた。被験体がこれを2-3回つくと、2つの線分長報告アイコン（一方を“短”、もう一方を“長”に割り振った）が現れた。短（長）線分に対して“短（長）”を選べば正答であった。どちらか一方のアイコンに反応すると、線分とアイコンが消え、Betting画面が現れた。Risk/Safe選択時の結果は、実験1と同じであった（図4, 6）。実験2dで般化を示したハト3・ニワトリ1個体でテストした結果、ハト1個体で般化を確認した。

考察（実験1～3）

本研究の一連の実験結果から、一部の霊長類でのみ示されてきた自信の有無をメタ認知する能力が鳥類にも備わっていることが明らかとなった。この結果は、このようなメタ認知能力が、これまで想定されていた以上に進化的に古い起源を持つことを示唆するものである。

3-3. 基礎課題遂行前のメタ認知

私たちはこれまで生きてきた中で獲得してきた記憶に基づいて様々な行動をとることができる。さらに、ある特定の事実について、どの程度自分自身が正確に憶えているか、その知識や記憶の状態を認知することができる。こうした認知能力はメタ記憶と呼ばれており、日常における効率的・適応的な行動の支えとなっている（例えば、本稿の冒頭で述べた「記憶の確かさの認知」が研究発表資料作成時に役立つ事例などが挙げられる）。このようなメタ記憶は、ヒト以外の動物にとっても有益であると考えられるが、実際に共有された認知機能なのであろうか。これを検証するための研究方法として、主に基礎課題の遂行前に基礎課題を遂行するか避けるかに関する選択を求める方法が確立されてきており、アカゲザル (Hanpton, 2001)、オランウータン (Suda-King, 2008)、フサオマキザル (Fujita, 2009)、ラット (Foote & Crystal, 2007) など肯定的な結果が示されている。一方、ハト (Sutton & Shettleworth, 2008) やハシブトガラス (Goto & Watanabe, 2012) では否定的な結果となっている。

ここでは、Fujita によるフサオマキザルを対象とした研究の一部を紹介する。この研究

では、動物の記憶実験で頻繁に用いられる「遅延見本合わせ課題」が基礎課題として用いられた。先行呈示された図形（見本刺激）と同じものを後続呈示された図形群（比較刺激）の中から選ぶ課題を「見本合わせ課題」と呼び、その課題のなかでも見本刺激の呈示と比較刺激の呈示の間にブランク時間が設けられている場合を「遅延見本合わせ課題」と呼ぶ。本研究では、見本合わせ課題の経験が豊富なフサオマキザル 2 個体が実験に参加した。

初めに基礎課題となる遅延見本合わせ課題の訓練をおこなった。被験体がセルフスタートレバーを引いた状態を 1 秒間保持すると、モニタ画面上に 9 種類（形 3 種類（●、▲、✦）×内部模様 3 種類）のうちの 1 種類の図形が見本刺激として呈示された。見本刺激に対して被験体が 5 回接触反応を入れると、見本刺激が画面上から消え、直後（遅延時間 0 秒経過後）に 9 種類の図形が比較刺激として呈示された。見本刺激と同じ図形に接触反応があった場合には正答を知らせる音とともに餌が呈示された一方で、それ以外の図形に接触反応があった場合には不正答を知らせるブザー音の後で 5 秒間のタイムアウトが課せられた。その後、遅延時間を徐々に長くする手続きと課題選択画面を挿入する手続きがなされた後で、テスト段階に入った。

テスト段階（図 7）では、「上述した遅延見本合わせ課題における遅延時間が 2, 4, 8, 16 秒のいずれかとなった点」「遅延時間経過後に課題選択画面が挿入された点」が先の基礎課題と異なった。課題選択画面では以下の 3 パターンがあった。ピンクの花のアイコンが画面に呈示される試行では、被験体がこのアイコンに反応すると、そのアイコンが消えた後で 9 種類の図形が比較刺激として呈示され、見本刺激と同じ図形を選択すれば必ず 1 次性強化子（餌）が呈示された（強制的に見本合わせ課題に移行する試行）。赤い花のアイコンが画面に呈示される試行では、被験体がこのアイコンに反応すると、そのアイコンが消えた後で灰色の長方形が呈示され、被験体がそれに触れると確率 p で 1 次性強化子（餌）を呈示され、確率 $(1-p)$ で 2 次性強化子（正答を知らせる音）のみが呈示された（強制的に逃げ（Escape）の意味を持つ単純キー押し課題に移行する試行）。 p の値は訓練中の被験体のパフォーマンスを見ながら微調整を重ねた結果、1 頭のサルで 0.5、もう 1 頭のサルで 0.65 でテストを実施した。ピンクの花のアイコンと赤い花のアイコンが両方同時に呈示される試行では、見本合わせ課題・単純キー押し課題のどちらを選ぶかが被験体に委ねられた。

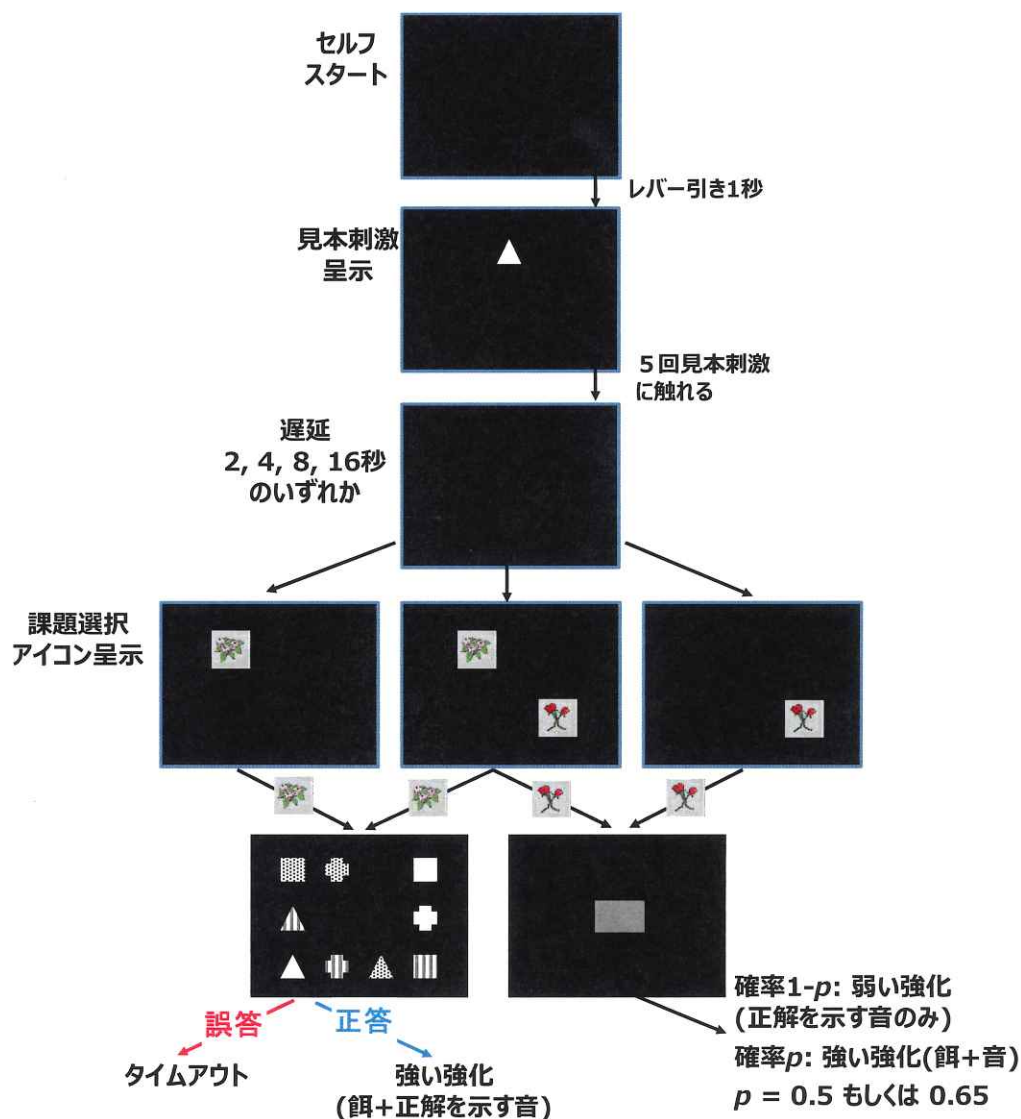


図7. Fujita (2009)の実験1の流れ。論文の図を基に著者が描いた。

もしフサオマキザルがメタ記憶能力をこの課題において発揮すると仮定した場合、結果の予測は以下の通りとなる。課題選択前に呈示されていた見本刺激の記憶痕跡が強く残っていると自覚している場合ほど、見本合わせ課題（記憶課題）を選択しそれに正解して確実に餌を獲得することを目指すだろう。逆に、見本刺激の記憶痕跡が弱いと自覚している場合には、見本合わせ課題（記憶課題）を選択すると間違った比較刺激を選んでしまう可能性が高いので、単純キー押し（escape）課題を選択する方が得策である。これを数値的に取り出すために、遅延時間（2, 4, 8, 16 秒）別に「強制的に見本合わせ課題に移行した試

行の正答率」と「課題選択が許可された試行における単純キー押し (escape) 課題選択率」との相関を調べた。その結果、2 頭の被験体の結果いずれにおいても両変数の間に有意な負の相関が認められ、先の仮説を支持する結果が確認された。

さらにもう 1 つの結果の予測として、同じ見本合わせ課題 (記憶課題) でも、強制的にそれをさせられた場合に比べて、被験体が自ら選んでその課題をおこなった場合の方が正答する確率は高くなるというものも立てられる (課題選択権がある後者では、自らの記憶痕跡が弱く課題に正答する可能性が低いと認識した場合には、単純キー押し (escape) 課題に逃げるができるため)。分析の結果、1 個体においてこの仮説を支持する結果が得られた。遅延時間が 2, 4 秒と短い場合には強制時と選択時との間で有意な差は確認されなかったが、遅延時間が 8, 16 秒と長い場合には選択時の正答率の方が有意に高くなった。

4. まとめ

‘認知に関する認知’を意味する‘メタ認知’を研究する意義、動物におけるメタ認知研究の動向、そして具体的な実験例を紹介した。直接アプローチすることが難しいとされた意識や内省といった、高次認知プロセスおよびその進化の解明に寄与するメタ認知研究は、具体的な研究法がいくつか考案されていることも手伝って、今後も心理学の重要な一研究分野となるに違いない。

しかし、メタ認知研究にはいくつかの課題も存在している。モーガン公準に関する問題はその一つである。「ある心理現象を説明する場合、単純なレベルで説明可能な場合はそちらを採用すべきであり、別の高次のレベルでの説明を採用してはならない」という考え方である。‘メタ認知’とラベル付けされている現象のなかには、単純な学習の組み合わせでの説明を完全に排除できないものも存在する。少なくとも、Hampton (2009) が掲げる 3 つの説明可能性 (環境的手がかり連合、行動的手がかり連合、反応競合) に関しては検討する必要がある、こうした要因を排除できる新たな実験方法の確立を目指さねばならないであろう。

- 後藤和宏 (2009). 視覚認知における全体処理と部分処理—比較認知科学からの提言. 心理学研究, 80, 352-367.
- Goto, K., & Watanabe, S. (2012). Large-billed crows (*Corvus macrorhynchos*) have retrospective but not prospective metamemory. *Animal Cognition*, 15, 27-35.
- Hampton, R. R. (2001). Rhesus monkeys know when they remember. *Proceeding of the National Academy of Sciences*, 98, 5359-5362.
- Hampton, R. R. (2009). Multiple demonstrations of metacognition in nonhumans: Converging evidence or multiple mechanisms? *Comparative Cognition & Behavior Reviews*, 4, 17-28.
- Hampton, R. R., Zivin, A., & Murray, E. A. (2004). Rhesus monkeys (*Macaca mulatta*) discriminate between knowing and not knowing and collect information as needed before acting. *Animal Cognition*, 7, 239-254.
- Hopkins, W. D., & Washburn, D. A. (2002). Matching visual stimuli on the basis of global and local features by chimpanzees (*Pan troglodytes*) and rhesus monkeys (*Macaca mulatta*). *Animal Cognition*, 5, 27-31.
- Iwasaki, S., Watanabe, S., & Fujita, K. (2013). Do pigeons (*Columba livia*) seek information when they have insufficient knowledge? *Animal Cognition*, 16, 211-221.
- Kornell, N. (2009). Metacognition in humans and animals. *Current directions in psychological science*, 18, 11-15.
- Kornell, N., Son, L. K., & Terrace, H. S. (2007). Transfer of metacognitive skills and hint seeking in monkeys. *Psychological Science*, 18, 64-71.
- Navon, D. (1977). Forest before trees: The precedence of global features in visual perception. *Cognitive Psychology*, 9, 353-383.
- Nakamura, N., Watanabe, S., Betsuyaku, T., & Fujita, K. (2010). Do bantams (*Gallus gallus domesticus*) experience amodal completion? An analysis of visual search performance. *Journal of Comparative Psychology*, 124, 331-335.
- Nakamura, N., Watanabe, S., Betsuyaku, T., & Fujita, K. (2011). Do birds (pigeons and bantams) know how confident they are of their perceptual decisions? *Animal Cognition*, 14, 83-93.
- Nakamura, N., Watanabe, S., & Fujita, K. (2008). Pigeons perceive the Ebbinghaus-Titchener circles as an assimilation illusion. *Journal of Experimental Psychology: Animal Behavior Processes*, 34, 375-387.

引用文献

- Basile, B. M., Hampton, R. R., Suomi, S. J., & Murray, E. A. (2009). An assessment of memory awareness in tufted capuchin monkeys (*Cebus apella*). *Animal Cognition*, 12, 169-180.
- Call, J. (2005). The self and other: a missing link in comparative social cognition. In: Terrace, H. S., Metcalfe, J. (eds). *The missing link in cognition: origins of self-reXective consciousness*. Oxford University Press, New York, pp. 321-341.
- Call, J. (2010). Do apes know that they could be wrong? *Animal Cognition*, 13, 689-700.
- Call, J., & Carpenter, M. (2001). Do apes and children know what they have seen? *Animal Cognition*, 4, 207-220.
- Cavoto, K. K., & Cook, R. G. (2001). Cognitive precedence for local information in hierarchical stimulus processing by pigeons. *Journal of Experimental Psychology: Animal Behavior Processes*, 27, 3-16.
- Deruelle, C. & Fagot, J. (1998). Visual search for global/local stimulus features in humans and baboons. *Psychonomic Bulletin & Review*, 5, 476-481.
- Fagot, J. & Deruelle, C. (1997). Processing of global and local visual information and hemispheric specialization in humans (*Homo sapiens*) and baboons (*Papio papio*). *Journal of Experimental Psychology: Human Perception and Performance*, 23, 429-442.
- Fagot, J., & Tomonaga, M. (1999). Global and local processing in humans (*Homo sapiens*) and chimpanzees (*Pan troglodytes*): Use of a visual search task with compound stimuli. *Journal of Comparative Psychology*, 113, 3-12.
- Fujita, K. (2009). Metamemory in tufted capuchin monkeys (*Cebus apella*). *Animal Cognition*, 12, 575-585.
- 藤田和生 (2009). メタ記憶の進化. 清水寛之 (編著) メタ記憶—記憶のモニタリングとコントロール (pp. 173-199). 北大路書房
- 藤田和生 (2010). 比較メタ認知研究の動向. 心理学評論, 53, 270-294.
- 藤田和生 (編著) (2015). 動物たちは何を考えている? -動物心理学の挑戦-. 技術評論社
- Fujita, K., & Ushitani, T. (2005). Better living by not completing: a wonderful peculiarity of pigeon vision? *Behavioural Processes*, 69, 59-66.
- Fravell, J. H. (1976). Metacognitive aspects of problem solving. *Nature of intelligence*, 12, 231-236.
- Gallup, G. G. (1970). Chimpanzees: Self-recognition. *Science*, 167, 86-87.

- Nakamura, N., Watanabe, S., & Fujita, K. (2014). A reversed Ebbinghaus-Titchener illusion in bantams (*Gallus gallus domesticus*). *Animal Cognition*, 17, 471-481.
- Nelson, T. O., & Narens, L. (1990). Metamemory: A theoretical framework and new findings. In G. H. Bower (Ed.), *The psychology of learning and motivation*, 26, 125-173, New York: Academic Press.
- Nelson, T. O., & Narens, L. (1994). Why investigate metacognition? In J. Metcalfe & A. P. Shimamura (Eds.), *Metacognition: Knowing about knowing* (pp. 1-25). Cambridge, MA, US: The MIT Press.
- Parron, C., & Fagot, J. (2007). Comparison of grouping abilities in humans (*Homo sapiens*) and baboons (*Papio papio*) with the Ebbinghaus illusion. *Journal of Comparative Psychology*, 121, 405-411.
- Paukner, A., Anderson, J. R., & Fujita, K. (2005). Redundant food searches by capuchin monkeys (*Cebus apella*): a failure of metacognition? *Animal Cognition*, 9, 110-117.
- 三宮真智子 (編著) (2008). メタ認知—学習力を支える高次認知機能. 北大路書房.
- 関口勝夫・牛谷智一・実森正子. (2011). ハトにおける階層的複合刺激の部分優先処理効果. 動物心理学研究, 61, 95-105.
- 清水寛之 (編著) (2009). メタ記憶—記憶のモニタリングとコントロール. 北大路書房.
- Smith, J. D., Schull, J., Strote, J., McGee, K., Egnor, R., & Erb, L. (1995). The uncertain response in the bottlenosed dolphin (*Tursiops truncatus*). *Journal of Experimental Psychology: General*, 124, 375-387.
- Smith, J. D., Shields, W. E., Schull, J., Washburn, D. A. (1997) The uncertain response in humans and animals. *Cognition*, 62, 75-97.
- Son, L. K., & Kornell, N. (2005). Metacognitive judgments in rhesus macaques: Explicit versus implicit mechanisms. In: Terrace H, Metcalfe J (eds) *The missing link in cognition: origins of selfreflective consciousness*. Oxford University Press, New York, pp 296-320.
- Spinuzzi, G., De Lillo, C., & Salvi, V. (2006). Local advantage in the visual processing of hierarchical stimuli following manipulations of stimulus size and element numerosity in monkeys (*Cebus apella*). *Behavioural Brain Research*, 166, 45-54.
- Spinuzzi, G., De Lillo, C., & Truppa, V. (2003). Global and local processing of hierarchical visual stimuli in tufted capuchin monkeys (*Cebus apella*). *Journal of Comparative Psychology*, 117,

15-23.

- Suda-King, C. (2008). Do orangutans (*Pongo pygmaeus*) know when they do not remember? *Animal Cognition*, 11, 21–42.
- Sutton, J. E., & Shettleworth, S. J. (2008). Memory without awareness: pigeons do not show metamemory in delayed matching to sample. *Journal of Experimental Psychology: Animal Behavior Processes*, 34, 266-282.
- Watanabe, A., Grodzinski, U., & Clayton, N. S. (2014). Western scrub-jays allocate longer observation time to more valuable information. *Animal Cognition*, 17, 859-867.

動物の視知覚を探索

牛谷智一

千葉大学 大学院人文科学研究院

目に見えない内的な情報処理過程を客観的に探究するため、認知科学は、その過程についてのモデルを構成し、そのモデルの予測する反応が得られるかどうかでモデルの妥当性を評価する。複数のモデルが考えられる場合は、妥当性の高さを比較し、より高い方を採用することになる。この方法では内観報告が必要ないため、ヒト以外の動物の視覚情報処理過程、すなわち、彼らにとってこの世界がどのように見えているか、をヒトを対象とする研究同様の妥当性で解明できる。本発表では、オペラント条件づけを利用し、行動指標を用いてハトがどのように視覚情報を処理しているか調べた発表者自身の実験を紹介し、比較認知科学と呼ばれる領域の方法論と意義について考察する。

視覚情報処理過程の代表的なモデルに、Treisman & Gelade (1980) による特徴統合モデルがある。このモデルでは、視界にあるオブジェクトの様々な属性がまず同時並行でマッピングされ、必要に応じてそれら複数のマッピングを比較照合して標的となるオブジェクトが探索されると想定している。背景とは異なるテクスチャ領域の探索をハトに訓練した Cook (1992) の実験では、探索正答率のパターンがこの特徴統合モデルに合致していた。しかし、発表者が Treisman & Gelade (1980) により近い場面でハトをテストした実験で得られた反応時間のデータは、特徴統合モデルでは完全には説明できなかった。ヒトの視覚研究では、特徴統合モデルを修正した Wolfe (1989) の誘導探索モデルが提唱されている。3つの属性次元で標的刺激とディストラクタを構成した実験におけるハトの反応時間データは、ハトにおいても特徴統合モデルより誘導探索モデルの妥当性が高いことを示していた。

より高次の視覚情報処理過程として、欠損した輪郭や表面の情報を、実際に見えている情報を使って補う知覚的補間（補完）が知られている。知覚的補間は、ある物体が別の物体の一部隠蔽されているとき、その隠蔽された部分の輪郭や表面を補間して認識するアモーダル補間と、手前にある物体が背景と類似しているため見えにくくなっているとき、その物体と背景との間にある別の物体の輪郭情報を利用して、手前にある物体が実際にあるように知覚されるモーダル補間（主観的輪郭）とに大別される。モーダル補間には、アモーダル補間が伴うため、アモーダル補間を実現するメカニズムがモーダル補間を実現しているという説（同一説）がある。発表者は、ハトにおけるアモーダル補間とモーダル補間を調べた。ハトに一本につながった長方形と中央が分断された長方形の弁別を訓練し、テストでは中央が別の図形によって隠された長方形を呈示したところ、ハトはこのテスト長方形を、中央が分断された長方形であると報告した。この結果は、異なる結果となったチンパンジーやオマキザルとは対照的に、ハトが別の物体に隠蔽された長方形の中央部分をアモーダルに補間していないことを示している。一方、ヒトではモーダル補間によって三角形や四角形だと知覚できる図形の弁別をハトに訓練したところ、ハトはこれを学習し、また新たなパターンへも弁別が転移したことから、ハトはモーダル補間することが示唆された。両実験の結果は、モーダル補間の実現に、アモーダル補間の過程は必ずしも必要ではないことを示しており、同一説を支持しない。この一連の研究は、動物実験による知見が、ヒトの認知モデル研究に貢献する例を示している。

動物の心に配慮した飼育法：ラットの場合

清川泰志

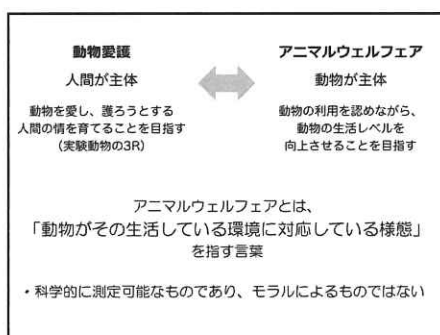
東京大学・獣医動物行動学研究室

動物の心を考える時に問題となるのは、心が目に見えないことです。そのため、ある動物の心を推測したとしても、その推測が正しいのか間違っているのかを検証することができません。また心は脳から生み出されていることはほぼ間違いないにもかかわらず、脳活動は必ずしも心の状態（感情）を反映していないことが知られています。ヒトの心考えた時でさえこのような問題が生じるのに、ヒト以外の動物たちではさらに「その動物が心を持っているか？」という根本的な、しかし解決できない問題が生じます。このような問題を乗り越えるために、行動主義という考え方が100年以上前に提唱されています。すなわち、科学は目に見えるものだけを対象としよう、という提案です。

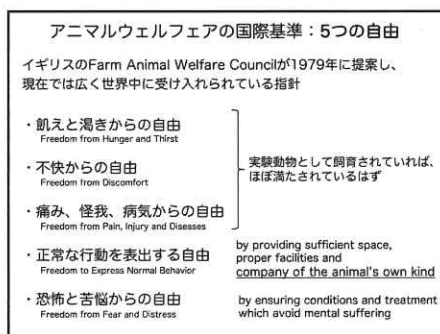
このような考え方をもって、例えばラットにとって好ましい飼育法を考えた場合、「単独飼育を避ける」ことが特に重要な要素として挙げられます。ラットは社会性の高い動物種であるため、1)仲間と一緒にいることを常に求めています。例えば野生のラットであるドブネズミを野外の大きな囲の中に放すと、複数の雄と複数の雌、時には雄だけや雌だけで群れをつくることが分かりました。また餌や水は豊富にある無人（ラット）島に1頭で放たれたドブネズミが、おそらくは仲間を捜し求めて、およそ400m離れた隣の島まで海を泳いで渡ったことも観察されました。このような性質は研究室にいるラットにも見られ、ラットは筒の中に捕らわれている仲間を放してあげる行動を示し、1頭でいるより他のラットと過ごすことを好み、また他のラットと過ごすことが報酬になることなどが知られています。そして、2)ラットは仲間がいるとストレスが緩和されます。ラットがストレスに曝される際に他のラットがそばに居ると、扁桃体という脳領域が活性化することを抑えられるため、様々なストレス反応が減少することが明らかとされています。さらに3)ラットにとって、仲間がいないことはストレスになります。仲間がいないことは脳の遺伝子発現に影響を与え、ホルモン分泌を変容させ、性行動が減少したり、不安や抑うつ

を表していると考えられている反応が増加したりするなど、様々な行動反応が変容することが知られています。

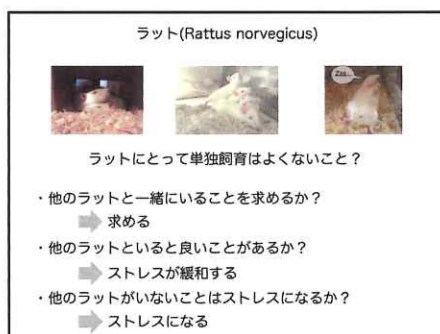
以上のことからラットの場合、「単独飼育を避ける」ことはアニマルウェルフェアへの配慮というだけではなく、「病原菌に感染させない」ことと同様に、正しい実験データを得るために要求される要件であるといえます。ただし一方で、単独飼育の方が好ましい動物種がいることも確かです。社会性に応じた飼育をされた、より健康的な動物が研究に用いられることを願っています。



動物愛護や実験動物の3Rは人間を主体とした考え方であるのに対し、アニマルウェルフェアは動物を主体とした考え方です。しかし、両者は対立するものではなく、目指すことは同じであると考えられます。



単独飼育を避けることは、「正常な行動を表出する自由」を向上させるための具体的な方法として明記されるほど、動物にとって重要なことだと考えられています。



ラットは仲間と一緒にいることを求め、仲間といるとストレスが緩和され仲間がいないと様々な悪影響が現れることが、様々な研究により示されています。

メダカの個体認知を介した配偶者選択とその分子神経基盤

竹内 秀明

岡山大学 大学院自然科学研究科

個体認知能力を持つ動物は、集団内の他メンバーを記憶・識別して、他者との関係を理解した上で、自らの行動を適切に選択する。このような社会適応に関わる脳機能（社会的コンピテンス）の研究はヒトやサルを中心に進められていた。長い間、魚類は原始的な脳しか持たないと信じられてきたが、近年になって高度な社会的認知能力を持つことが示された。例えばヒエラルキーを持つシクリッドの一種は仲間を見分けて、上位の個体が現れると逃避する一方で、下位の個体には接近する傾向がある。私たちはメダカの社会性行動を解析する過程で、メダカも個体認知に基づく高度な社会性を示すことを発見した。メスメダカは性行動の前に長時間見ていたオスを視覚記憶し、「見知ったオス」を性的パートナーとして選択し、「見知らぬオス」を拒絶する傾向がある。さらに行動異常を示す変異体を検索し、行動異常の原因となる神経細胞を同定することで、メスのオスの受入れ・拒絶の意思決定に関わる神経機構を解明した。本シンポジウムでは、メダカの研究が社会的コンピテンスを生み出す分子神経基盤の理解にどのように貢献できるかについても議論したい。

参考文献：Wang & Takeuchi *eLife* (2017) 6:e24728, Yokoi *et al.*, *PLoS Genetics* (2015) 11:e1005009, Okuyama *et al.*, *Science* (2014) 343: 91-94

<第136回研究会（平成29年12月1日）>

<特別発言>

Ten yaers' experiences of IACUC in SNUH

LEE, Kook Hyun（李 國賢）（韓国ソウル大学病院 九州大学病院）

<トピックス>

実験動物飼養保管基準解説書の概要

八神 健一（筑波大学 医学医療系）

<特別講演>

1. 感染症研究の過去、現在、未来

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）

2. ゲノム編集技術の進展をキャッチアップ？

竹田 潤二（大阪大学医学系研究科ゲノム生物学）

<一般講演>

会員の発表15題

「特別発言」

Ten years' experiences of IACUC in SNUH

LEE, Kook Hyun, MD (李 國賢)

Clinical Professor, Kyushu University

Since 2007 in Korea, animal testing facilities have been required to have the Institutional Animal Care and Use Committee (IACUC; the committee). Seoul National University Hospital (SNUH) has been running the committee since 2005. All animal experiments done in Yeon-gon medical campus should be reviewed by members of the committee. The committee evaluates and oversees the animal research protocol, institution's laboratory animal care and use programs, testing procedures, and facilities. It has the right to require animal laboratory operators and workers to take measures needed for the protection and humane care of laboratory animals. After the employment of an assistant administrator in 2014, the committee can perform its role to the fullest such as protocol review professionalism, communication between the committee and researchers, and consultation on animal testing models and protocols.

In SNUH, the number of protocol review increased more than twice over 10 years from 232 in 2005 to 574 protocols in 2014. As protocol submission has increased, the size of research projects, the content of experimentation, the type of animals used, and the major of the head researchers have been diversified. Operational effectiveness has been promoted by introducing a computerized review program in 2008 and expanding the organization into two committees. As a result, protocol review process has been efficient. In addition, SNUH animal research facility has met the international criteria for facility operation and management with the AAALAC accreditation since 2007.

The committee has been striving to become one of international hubs by leading the management of domestic integrated database, promotion of committee activities, and education. The committee will realize ideas, such as holding international seminars and supporting international study activities with respect to protocol review and humane care of laboratory animals.

「トピックス」

実験動物飼養保管基準解説書の概要

八神健一

筑波大学医学医療系・特命教授

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（以下、実験動物飼養保管等基準）（平成 18 年環境省告示）が制定されて 11 年、やっと同基準の解説書が刊行されることとなった。旧基準の解説書が昭和 55 年に発行されているため、実に 37 年ぶりの改訂ともいえる。改訂作業は、平成 27 年に環境省自然環境局内に設置された「実験動物飼養保管等基準解説書研究会（委員長：浦野徹）」で行い、10 名の執筆担当者と 7 名の有識者および関係省担当者で校正を繰り返し、近く刊行の運びとなった。本書は、B5 版カラー刷り、本文だけで約 170 ページとなる詳細な解説書である。

序章では、動物愛護管理法および実験動物飼養保管等基準の沿革、国際的な動向と我が国の状況、解説書作成にあたっての基本的方針が述べられている。本解説書は、実験動物の管理や動物実験を実施する実務者が現場で行う業務を想定し、実験動物の福祉向上と動物実験の再現性の確保の視点を考慮して作成した。第 1 に、実験動物の適正管理の観点を主とするが動物実験の観点も含めて解説することとした。第 2 に、実験動物飼養保管等基準以外にも、動物実験基本指針や日本学術会議の動物実験ガイドラインの内容も取り上げ、健康管理や動物実験の実施上の配慮では最新の知見や海外のガイドライン（ILAR ガイド、AVMA 安楽死ガイドライン等）も参考とした。したがって、遵守しなければならない最低限の基準にとどまらず、バイオメディカル研究分野で求められる高度な内容にまで言及している。また、実験動物の飼養保管や動物実験の実施に関連するその他の法令についても、必要に応じて解説した。第 3 に、典型的に事例だけでなく、解釈の難しい少数事例も考慮し、参考文献や図書等も提示することとした。

序章のあと、実験動物飼養保管等基準の内容に沿って、第 1 章 一般原則、第 2 章 定義、第 3 章 共通基準、第 4 章 個別基準、第 5 章 準用及び適用除外の本文とその解説が記述される構成となっている。しかし、実験動物飼養保管等基準は、動物愛護管理法第 7 条第 7 項と第 41 条第 4 項を拠り所として定められているが、基準自体の構成は複雑である。例えば、「飼養及び保管の方法」や「施設の構造」は「動物の健康及び安全の保持」と「危害等の防止」の二つの項目で各々の観点で取り上げられている。このため、全体の構成と観点を意識して読み解く必要がある。項目ごとに解説したが、解説の理解を助けるため、その項目の趣旨を挿入した。

本講演では、項目ごとに注目していただきたい箇所を中心に、解説書の概要を紹介する。

感染症研究の過去、現在、未来

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

新興感染症 (Emerging Infectious Disease) とは、世界保健機関 (WHO) の定義によると「かつては知られていなかった、この 20 年間に新しく認識された感染症で、局地的に、あるいは国際的に公衆衛生上の問題となる感染症」とされている。また、再興感染症 (Re-Emerging Infectious Disease) とは、「かつて存在した感染症で公衆衛生上ほとんど問題とならないようになっていたが、近年再び増加してきたもの、あるいは将来的に再び問題となる可能性がある感染症」とされている。

このように、国際的に感染症は医学・医療の進歩や社会環境などにより著しく変化しており、我が国でも感染症をとりまく環境の変化に対応するため、明治 30 年に制定されて以来 100 年にわたって効力を発揮していた感染症 (伝染病) に関する法律「伝染病予防法」が改訂され、平成 11 年 4 月、「性病予防法」および「後天性免疫不全症候群の予防に関する法律」を廃止・統合し「感染症の予防及び感染症の患者に対する医療に関する法律 (感染症法)」が制定された。その主な改正点は、1) 緊急時における感染症対策の強化、2) 動物由来感染症に対する対策の強化と整理、3) 感染症法対象疾患および感染症類型の見直しである。

私が初めて感染症研究に足を踏み入れたのは昭和 51 年に大阪府立大学大学院修士課程に入学した時であり、*Mycobacterium avium* 感染における Macrophage migration inhibitory factor (MIF) と Macrophage activating factor (MAF) に関するものであった。その後、京都府立医科大学の博士課程に入学し、現在までに研究対象となった主な細菌としては *Corynebacterium* 属、*Salmonella* 属、*Mycoplasma* 属、*Helicobacter* 属、*Porphyromonas* 属、*Lactobacillus* 属などであり、ウイルスでは Herpes simplex virus (HSV), Human immunodeficiency virus (HIV), Simian/human immunodeficiency chimeric virus (SHIV), Rabies virus, Influenza virus などがあり、感染症の変遷とともに非常に多種類の病原体に関する研究を行ってきた。また、この間フランスのパスツール研究所に留学する機会を得ることができ、研究面以外にもヨーロッパの芸術や音楽などの文化的刺激を受ける良い経験をした。本講演では、その中からいくつかの感染症に関する問題を取り上げ、感染症の過去、現在、未来について話題を提供したいと思う。

新興感染症(Emerging Infectious Diseases)

かつては知られていなかった。この20年間に新しく認識された感染症で、局地的に、あるいは国際的に公衆衛生上の問題となる感染症

例、ウイルス:エボラ出血熱、AIDS など

細菌:腸管出血性大腸菌感染症(O157)

Helicobacter pylori 感染症 など

再興感染症(Re-emerging infectious diseases)

既知の感染症で、既に公衆衛生上の問題とならない程度までに患者が減少していた感染症のうち、この20年間に再び流行しはじめ、患者数が増加したもの。

例、結核 など

1

明治30年(1897)	平成11年(1999)2003	平成19年6月(2007)
伝染病予防法 法定伝染病 ・腸チフス ・パラチフス ・赤痢 ・コレラ ・猩紅熱 ・ジフテリア ・ペスト ・流行性脳脊髄膜炎 ・発疹チフス ・伝染性 ・日本脳炎 指定伝染病 届出伝染病 性病予防法 エイズ予防法	感染症法 一類感染症 ・エボラ出血熱 ・クリミア・コンゴ出血熱 ・ペスト ・マールブルグ病 ・ラッサ熱 ・SARS ・炭疽 二類感染症 ・急性灰白髄炎 ・コレラ ・細菌性赤痢 ・ジフテリア ・腸チフス ・パラチフス 三類感染症 ・腸管出血性大腸菌感染症 結核予防法	改正感染症法 一類感染症 ・エボラ出血熱 ・クリミア・コンゴ出血熱 ・ペスト ・マールブルグ病 ・ラッサ熱 ・痘瘡 ・新興出血熱 二類感染症 ・SARS ・急性灰白髄炎 ・ジフテリア ・結核 三類感染症 ・コレラ ・細菌性赤痢 ・ジフテリア ・腸チフス ・パラチフス ・腸管出血性大腸菌感染症

2

現在までに研究対象とした主な微生物

細菌

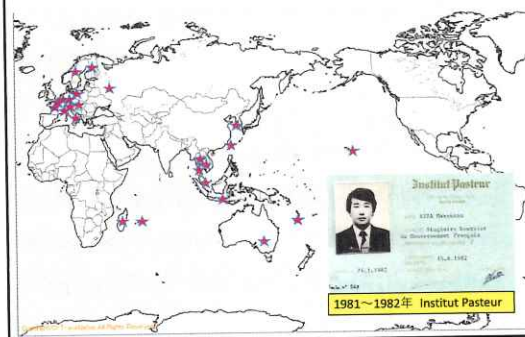
- 1) *Mycobacterium*
- 2) *Corynebacterium*
- 3) *Mycoplasma*
- 4) *Helicobacter*
- 5) *Porphyromonas*
- 6) *Actinobacillus*
- 7) *Prevotella*
- 8) *Salmonella*
- 9) *Lactobacillus*

ウイルス

- 1) Herpes simplex virus (HSV)
- 2) Encephalomyocarditis virus (EMV)
- 3) Human immunodeficiency virus (HIV)
- 4) Simian/human immunodeficiency chimeric virus (SHIV)
- 5) Hepatitis E virus
- 6) Influenza virus
- 7) Rabies virus

3

現在までに訪れた国(地域) 23か国



4



5



6

パスツール博物館



7



8

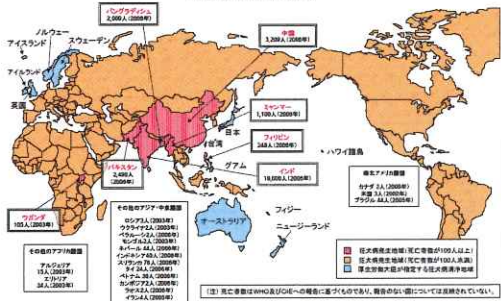
狂犬病

Rabies



9

狂犬病の発生状況



10

狂犬病 (Rabies)

狂犬病は、狂犬病ウイルスを保有するイヌ、ネコおよびコウモリを含む野生動物に咬まれたり、引っ掻かれたりしてできた傷口からの侵入、および極めて稀ではあるが、濃厚なウイルスによる気道粘膜感染によって発症する人獣共通感染症である。狂犬病は4 類感染症全数把握疾患に定められており、診断した医師は直ちに保健所に届け出る必要がある。

世界保健機関 (WHO) によると、全世界で毎年3万5,000～5万人が狂犬病によって死亡している (図1)。狂犬病はアジアでの発生が大部分で、アジア、アフリカでは狂犬病のイヌから多く感染している。また、南米では、吸血コウモリによる家畜の狂犬病が経済的な被害を及ぼしている。北米およびヨーロッパ等ではヒトの狂犬病は少ないが、アライグマ、スカンク、キツネ、コウモリ等の野生動物の狂犬病を根絶できないでいる。

11

主な狂犬病危険動物

アジア: イヌ、ネコ

アフリカ: イヌ、ネコ、ジャッカル、マングース

ヨーロッパ: キツネ、ネコ

米国、カナダ: アライグマ、コウモリ、スカンク、キツネ、ネコ

中南米: イヌ、コウモリ、ネコ、コヨーテ



12

臨床症状

感染から発症までの潜伏期間は咬まれた部位等によってさまざまであるが、一般的には1~2カ月である。発熱、頭痛、倦怠感、筋痛、疲労感、食欲不振、悪心・嘔吐、咽頭痛、空咳等の感冒様症状ではじまる。咬傷部位の疼痛やその周辺の知覚異常、筋の攣縮を伴う。脳炎症状は運動過多、興奮、不安狂躁から始まり、錯乱、幻覚、攻撃性、**恐水発作**等の筋痙攣を呈し、最終的には昏睡状態から呼吸停止で死にいたる。
狂犬病は一度発症すれば、致死率はほぼ100%である。



13

治療と予防

海外、特に東南アジアで狂犬病が疑われるイヌ、ネコおよび野生動物にかまれたり、ひっかかれたりした場合、まず傷口を石鹸と水でよく洗い流し、医療機関を受診する。**狂犬病ワクチンと抗狂犬病ガンマグロブリン**を投与する。狂犬病は一旦発症すれば特異的治療法はない。このためできるだけ早期に、ワクチンと抗狂犬病ガンマグロブリンを投与する必要がある。

WHO およびわが国では、暴露後免疫（治療用としてのワクチン）は接種開始日を0として3、7、14、30、90日の6回を推奨している。予防用としてのワクチン接種は4週間隔で2回、さらに、6~12カ月後に追加免疫をする。



14

H. pylori感染症

1. H. pyloriの病原因子の解析

- 1) ウレアーゼ
- 2) 外膜蛋白

2. H. pylori感染症における病態形成の解析

- 1) サイトカインの役割
- 2) その他

3. H. pylori感染症に対する補完・代替療法

- 1) 漢方
- 2) アロマセラピー

Masakazu KITA

15

Helicobacter 属菌の菌種と宿主

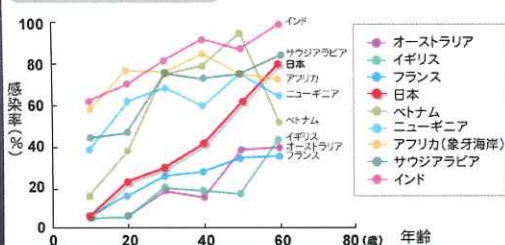
菌種	宿主	感染部位
<i>H. pylori</i>	ヒト、サル	胃
<i>H. mustelae</i>	フェレット	胃
<i>H. felis</i>	ネコ、イヌ	胃
<i>H. helmannii</i>	ヒト、サル、イヌ、ネコ	胃
<i>H. rappini</i>	マウス、イヌ	腸、胃
<i>H. canis</i>	イヌ	腸、肝臓
<i>H. pullorum</i>	トリ	腸
<i>H. hepaticus</i>	マウス	腸、肝臓
<i>H. bilis</i>	マウス、ラット、イヌ	腸、肝臓
<i>H. muridarum</i>	マウス、ラット	腸、胃
<i>H. cinaedi</i>	ヒト、ハムスター	腸
<i>H. cholestys</i>	ハムスター	腸、肝臓

16

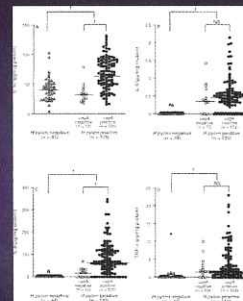
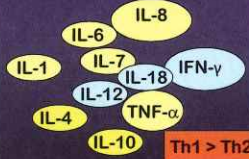
先進国と開発途上国の年代別H. pylori感染率

(Graham D.Y. Gastroenterol. Clin. Biol. 1989を改変)

H. pyloriの年代別感染率

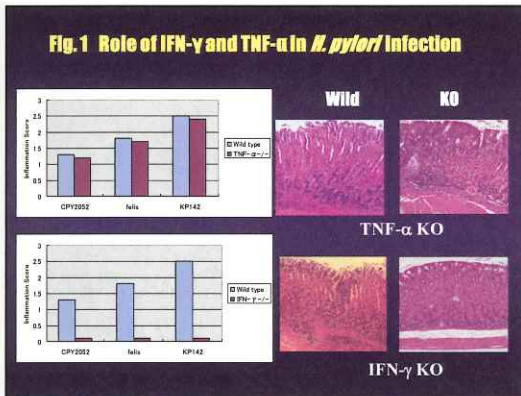


17

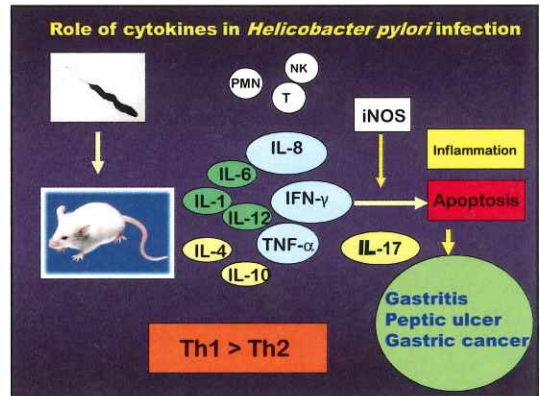


Scand J Gastroenterology, 1995
Gastroenterology, 1996
Gut, 1997, 1998, 1999
Infection and Immunity, 1999

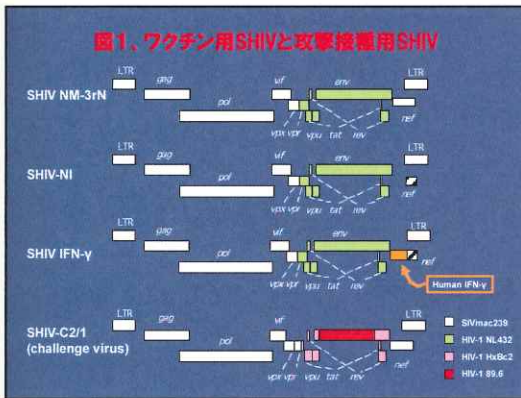
18



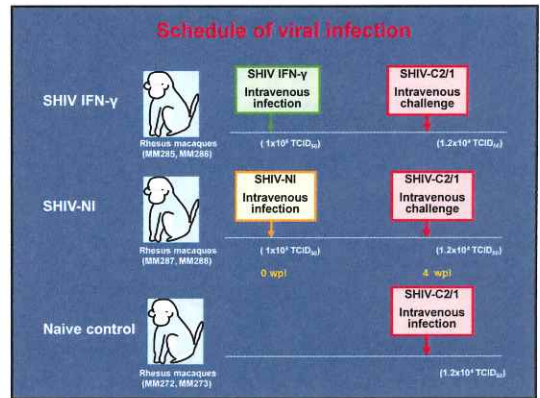
19



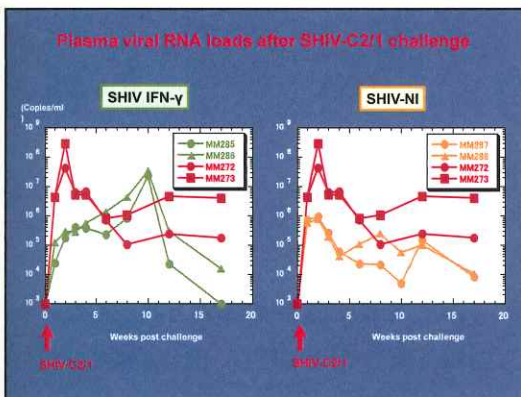
20



21



22



23

宇宙環境が人体や精神に与える影響

- 1、心臓循環器への影響
- 2、骨カルシウムへの影響
- 3、筋肉への影響
- 4、宇宙酔い
- 5、血液・免疫への影響
- 6、宇宙放射線による影響
- 7、閉鎖環境による精神心理面への影響

24

ゲノム編集技術の進展をキャッチアップ？

竹田潤二

大阪大学医学系研究科 ゲノム生物学

(現 大阪大学 微生物病研究所 招へい教授)

私が研究を始めた約30年前には、ゲノム編集という言葉は少なくとも一般的ではなく、多くの研究者はゲノムエンジニアリング、ゲノム改変という言葉がよく用いられていた。CRISPR/Cas9 システムが登場以来、ゲノム編集という言葉が一般的になり、分子生物学を席卷する技術になってきている。それでは、なぜその技術は画期的なのかを本稿にて概説したいと思う。

ゲノム編集の進展は標的遺伝子を思い通りに編集できるようになったということである。それを達成するためには標的遺伝子ゲノム DNA に傷を挿入すればいい。ゲノム DNA の傷は一般的に DNA 二重鎖切断である。DNA 二重鎖切断を放置すると DNA 複製がストップしてしまい、細胞は死滅してしまうので、細胞はその DNA 二重鎖切断を修復するシステムを有している。その修復システムは大きく分けて2種類に分類される。

一つ目は細胞周期の G1 期に起こる非相同性末端結合 (Non-homologous end joining NHEJ) であり、DNA 二重鎖切断が起きた末端を強引に結合させる。その際に DNA 二重鎖切断が起こった領域のゲノム情報を失う可能性が高い。その性質を利用して遺伝子ノックアウトを遂行する。

二つ目は細胞周期の S-G2 期に起こる相同組み換え (Homologous recombination HR) である。DNA 二重鎖切断が起こった領域の失ったゲノム情報は、姉妹染色分体あるいは相同染色体より供給され、遺伝情報を失わない方向に向かう。その際、DNA 二重鎖切断領域と相同配列を有するドナーDNA を供給すると遺伝子ノックインが起こる。

多くの研究者は随分以前より DNA 二重鎖切断が起こった後の細胞内ゲノム修復機構を意識していた。Maria Jasin 博士らは酵母由来のエンドヌクレアーゼである I-SceI の 18 塩基認識部位を哺乳細胞のゲノムに導入する系を構築した。その導入細胞に対して I-SceI を発現させ DNA 二重鎖切断を起こさせると、相同組み換えの効率がすさまじく上昇することを発見した (文献1)。しかし、内在性

遺伝子座に対して自由自在に相同組み換えを起こさせるためには、前もって I-SceI の 18 塩基認識部位をゲノムに挿入する必要性があった。

20 世紀末になると、内在性のゲノム配列に直接 DNA 二重鎖切断を起こさせる技術が登場した。ジンクフィンガーヌクレアーゼ(Zinc finger nuclease ZFN)と呼ばれる人工制限酵素である。ジンクフィンガーヌクレアーゼは、3 塩基を認識するジンクフィンガードメインと II 型制限酵素の融合タンパク質からなっている。様々な異なった 3 塩基配列を認識するジンクフィンガードメインを有するタンパクをタンデムに並べることにより特異的なゲノム配列を認識し融合タンパクの別な部位に存在する II 型制限酵素で DNA 二重鎖切断を起こさせる。原理上、ゲノム上のどんな標的配列にも対応可であるはずであるが、すべての組み合わせの 3 塩基を認識する効率のよいジンクフィンガードメインが存在しないこととか、ジンクフィンガードメインタンパクをタンデムに並べる時に隣り合うジンクフィンガードメインを干渉することがあり、ジンクフィンガーヌクレアーゼの設計は簡単ではなかった。その後 2010 年頃になると、1 塩基を認識できる TALEN(Transcription activator like effector nuclease)というより設計のしやすい技術が登場してきた。

2012 年夏に画期的な論文が発表された(文献 2)。Jinek らは細菌由来の Cas9 タンパクと標的 DNA、その DNA に対して相補 RNA の 3 者を試験管内で混ぜることで標的 DNA に二重鎖切断を特異的に導入できることを示した。しかもそのシステムが哺乳細胞で効率良く働くことがすぐに示された(文献 3、4)。この CRISPR/Cas9 システムは、標的配列に対して相補 RNA を設計するだけなので非常に簡便であり、しかも効率がよかった。標的に DNA 二重鎖切断を導入できること以外に、標的 DNA をエピジェネティックに改変することや塩基置換を Cas9 タンパクのヌクレアーゼ活性を消失したものに様々な酵素活性を融合することで可能になっている。これらの応用範囲の広さから、CRISPR/Cas9 は多くの研究者が利用する重要なツールとして汎用されている。

文献

- 1, Rouey P. et al. Expression of a site-specific endonuclease stimulates homologous recombination in mammalian cells. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 91; 6064-6068, 1994.
- 2, Jinek M. et al. A programmable dual-RNA-guided DNA endonuclease in adaptive bacterial immunity. *Science* 337; 816-821, 2012
- 3, Mali P. et al. RNA-guided human genome engineering via Cas9. *Science.* 339; 823-826, 2013
- 4, Cong L. et al. Multiplex genome engineering using CRISPR/Cas system. *Science.* 339; 819-823, 2013

第136 回 関西実験動物研究会 講演要旨

平成29 年12 月1 日 (金) 10:00~17:00 京都大学 楽友会館

1. マウスの亜系統差が生殖腺に及ぼす影響の遺伝学的研究
三浦由佳, 山本 杏, 川西航平, 長谷川千夏, 横山俊史, 星 信彦 (神大院・農・動物分子形態学)
2. マウス精子成熟における遺伝的背景の影響について
○渡邊仁美、竹田理恵、廣田圭司、近藤 玄 (京大・ウイルス・再生研・統合生体プロセス)
3. CRISPR/Cas9 を利用した遺伝子編集マウス作製実績
○宮地 均¹、北野さつき¹、伊藤克彦²、生田宏一¹ (1 京大・ウイルス・再生研・2 京大・院・医学研究科)
4. エレクトロポレーションと凍結胚を用いたゲノム編集マウスの作出
○刃野善弘¹、小谷祐子¹、山内祐子¹、國廣弥生¹、吉見一人^{1・2}、真下知士^{1・2} (阪大院・医・1 附属動物実験施設、2 共同研・ゲノム編集センター)
5. 骨格形成におけるヒストンH3 リジン27 (K27) 脱メチル化酵素の機能
○成瀬智恵¹、柴田進和²、田村 勝³、若菜茂晴³、伊川正人⁴、浅野雅秀¹
(1 京大院・医・動物実験施設、2 金沢大・学際セ・遺伝子改変動物、3 理研BRC・マウス表現型解析開発チーム、4 阪大・微研・遺伝情報実験センター)
6. ラクトシルセラミド合成に関わるガラクトース転移酵素群欠損マウスの中樞神経系の組織学的解析
○吉原 亨¹・八田稔久²・佐武寛之³・杉原一司¹・沖野 望⁴・伊藤 信⁴・古川鋼一⁵・浅野雅秀¹ (1 京大院・医・動物実験施設、2 金沢医科大学分子細胞形態科学、3 金沢大学学祭科学実験センター、4 九州大学農学研究院、5 中部大学生命健康科学部)
7. 癌型*K-ras*・*p53*^{-/-}多形型横紋筋肉腫 (pRMS) 細胞株の樹立
○齋藤 浩充、鈴木 昇 (三重大・地域イノベーション推進機構・先端科学研究支援センター・動物機能ゲノミクス)
8. 抗生剤投与による*Pasteurella pneumotropica* の除染
○坂本 匠、谷川亜里紗、水野洋子、安藤理恵子、小谷祐子、金子司郎、鍵山壮一朗、田島 優 (阪大・医・附属動物実験施設)
9. 肥満糖尿病における膵島機能障害の機序-ZFDM ラットを用いた検討ー
○横井伯英^{1,2}、速水智英^{1,2,3}、本田洗平¹、マヒラ アシム¹、川畑綾子¹、日高志保美¹、星野貴一⁴、星野雅行⁴、清野 進^{1,2} (1. 神戸大院・医・分子代謝

医学、2 関西電力医学研究所、3 愛知医科大・糖尿病内科、4 星野試験動物飼育所)

10. WHHLMI ウサギにおける冠動脈病変の進行に関わる血漿マーカー

○塩見雅志1、竹田浩章2、入野康宏3、山田悟士1、国吉信恵1、ユウ イン1、小池智也1、和泉自泰2、篠原正和4、馬場健史2、石田 達郎5 (1 神戸大・医・動物実験施設、2 九州大・生体防御医学研・トランスオミクス医学研究センター、3 神戸大・医・立証検査医学分野、4 神戸大・医・疫学分野、5 神戸大・医・循環器内科学分野)

11. Phf24-KOラットにおける遺伝子発現プロファイル-Noda Epileptic Ratの原因遺伝子座領域を標的にして-

○芹川忠夫1、2、國澤直史2、Higor Alves Iha 2、金星匡人2、清水佐紀2、庫本高志3、金子武人4、山本 卓5、真下知士6、笹 征史1、7、大野行弘2 (1京都疾患モデル研、2大阪薬科大、3京大、4岩手大、5広島大、6大阪大、7渚クリニック)

12. カナバン病モデルAspa ノックアウトラットの病態解析

○星合里香1、井澤武史1、山手丈至1、西谷あい2、田中美有2、庫本高志2、桑村 充1 (1 大阪府立大・獣医病理学教室、2 京大院・動物実験施設)

13. 遺伝性ミエリン変性モデルVF ラットの病態および原因遺伝子*Dopey1* の機能解析

○安井 彩1、田中美有2、竹中重雄3、井澤武史1、山手丈至1、桑村 充1 (1 大阪府立大・獣医病理学教室、2 京大院・動物実験施設、3 大阪府立大・栄養療法学)

14. SK2 チャネル遺伝子にミスセンス変異を持つ振戦ラット

○庫本高志1、横江繭子1、国澤直史2、大橋佳奈3、三宅崇仁3、樋口裕城1、吉見一人4、真下知二4、田中美有1、5、桑村 充5、金子周二3、清水佐紀2、芹川忠夫1、2、大野行弘2 (1 京大院・医・動物実験施設、2 大薬大・薬品作用、3 京大院・薬、4 阪大院・医・動物実験施設、5 大府大・獣医病理)

15. *Hcn1* ノックアウトラットの運動機能の評価

○西谷あい1、吉原 亨1、吉田裕作2、鈴木登志郎2、佐久間哲史3、山本 卓3、浅野雅秀1、庫本高志1 (1 京都大・医・附属動物実験施設、2 日本エスエルシー、3 広島大・院・理学研究科)

マウスの垂系統差が生殖腺に及ぼす影響の遺伝学的研究

○三浦由佳, 山本 杏, 川西航平, 長谷川千夏, 横山俊史, 星 信彦
(神大院・農・動物分子形態学)

C57BL/6J (B6J) に *Mus musculus domesticus poschiavinus* 由来の Y 染色体 (Y^{POS}) を導入したマウス B6J- XY^{POS} は, 正常な精巢を形成せず, 卵精巢 (OT) または卵巢 (O) を有する [Eicher *et al.*, 1982]. しかし, 当研究室の B6N 背景に組換えた XY^{POS} マウス (B6N- XY^{POS}) は, 既報とは異なり, 両側に精巢を有する (T/T) 個体や真性半陰陽 (O/T) 個体も出現する性スペクトラムな表現型を呈する [Umamura *et al.*, 2015]. 近年, マウスの垂系統間には様々な表現型の差異が認められ, 実験によっては大きな影響を与えることが明らかにされていることから, B6J- XY^{POS} , B6N- XY^{POS} 間にみられた生殖腺の表現型の差異は, 遺伝的背景に依存することが想定された.

そこで, B6N- XY^{POS} を B6J 背景に戻し交配し, 精巢を有する個体が出現するか否かならびに各表現型の出現率の検討を行った.

【材料と方法】

B6J 雌マウスを用いて, B6N- XY^{POS} 系統の雄マウスに 6 世代戻し交配を行った. 得られた産子から生殖腺を摘出し, 表現型を鑑別した. その後, 各表現型の出現率を解析した.

【結果と考察】

戻し交配数が進むにつれて, T/T 個体の出現頻度の低下ならびに O/O 個体の出現頻度が上昇した. また, 戻し交配 3 世代目以降, T/T 個体は出現しなくなった. このことから, B6J と B6N の遺伝的背景の差が, 生殖腺の表現型に影響を及ぼすことが示唆された.

マウス精子成熟における遺伝的背景の影響について

○渡邊 仁美、竹田 理恵、廣田 圭司、近藤 玄

(京都大学 ウイルス・再生医科学研究所)

哺乳類精子は射出直後には受精能を持たないが、段階的な精子成熟過程を経ることで受精能を獲得することが知られている。先行研究において受精能獲得過程にある精子の膜表面では GPI アンカー型タンパク質 (GPI-AP) 遊離とラフトの局在変化が連動して起こり、これが受精に重要な反応であることを見出した。本研究では、実験用近交系マウスで妊孕性に差がある C57BL/6 系統と BALB/c 系統に着目し、2 系統間の精子受精能獲得過程における分子挙動を比較し、受精能との相関を検討した。【材料と方法】 1) 受精能獲得誘導による GPI-AP 遊離の観察: 精子受精能獲得の誘導物質である Methyl- β -cyclodextrin を培養液に加え、EGFP-GPI 遊離の観察を行った。2) 精子受精能獲得誘導に伴うラフトの動きの観察: 同精子を蛍光標識したコレラトキシン B フラグメントにより染色し、GM1 の挙動を観察した。3) 精子奇形率の測定。4) 先体反応の観察: Izumol の免疫染色を行い、先体反応の進行を観察した。5) 精子膜からのコレステロール遊離の測定: filipin で精子を染色し、FACS を用いて、コレステロール遊離の観察を行った。6) 体外受精率と産仔率の測定。7) 同一場での受精能の比較: 両系統の精子を様々な比率で混合して体外受精を行い、偽妊娠マウスに全ての受精卵を移植し、得られた産仔の眼色から両系統精子の優位性とその割合を測定した。8) 体内における GPI-AP 遊離とラフトの動きの観察: BALB/c Tg 雄マウスを野生型雌マウスと交配し、卵透明帯に接着した精子の GPI-AP 遊離の有無とラフトの挙動を観察した。【結果】 GPI-AP 遊離: 両系統ともに GPI-AP 遊離が同じ程度に見られ、有意な差はなかった。ラフトの局在変化: C57BL/6 では、ラフトの局在変化が見られたが、BALB/c はほぼ見られず、統計学的有意差が認められた。奇形精子: C57BL/6 の奇形精子率は 3.5%であったが、BALB/c 系統の奇形精子率は 21%であり、統計学的有意差がみられた。先体反応: 両系統間で有意な差は見られなかった。コレステロール遊離: 両系統間で、コレステロール遊離に有意な差は見られなかった。体外受精率: C57BL/6 の体外受精率は 80.5%であったが、BALB/c 系統では 39.3%であり、統計学的有意差がみられた。同一場での受精能の比較: 両系統精子の受精能の違いを詳細に比較するため、同一の体外受精培養液に両系統精子を混合して体外受精を行なった。その結果、BALB/c 精子を C57BL/6 に対して 9 倍量加えないと同等以上の受精が成立しないことがわかった。雌体内での BALB/c 精子の GPI-AP 遊離およびラフトの動きの局在変化: C57BL/6 精子は、90%以上の精子が EGFP-GPI 遊離と GM1 分布が頭部全体型を示したが、BALB/c では、90%近くの精子で GPI-AP 遊離が見られたが、ラフト局在変化は 17.9%の精子でしか認められなかった。【考察】本研究で、我々は新たに、両系統間で受精能獲得過程でのラフトの可動性の違いを見出し、この現象と体外受精能との相関を示唆した。

CRISPR/Cas9 を利用した遺伝子編集マウス作製実績

○宮地 均¹、北野さつき¹、伊藤克彦²、生田宏一¹

(¹京都大学ウイルス・再生医科学研究所、²京都大学大学院医学研究科)

CRISPR/Cas9 システムはマウスを始め他の種においても多くの成果を上げており、ゲノム編集技術の主流となっている。

これまで我々は、京都大学ウイルス・再生医科学研究所附属感染症モデル研究センターのサービスとして、CRISPR/Cas9 システムを用いて、総数 30 種類ほどの遺伝子編集マウスの作製を行ってきた。主に、Mashiko ら (2013) (伊川研) の方法に準じて実施し、標的部位ゲノムの単純欠損を持つマウスは、効率良く作製する事が可能であった。また、同時に合成塩基配列をインジェクションする事で、2-3 塩基の置換 (アミノ酸の点変異) を持つマウスも、比較的効率良く作製する事が可能であった。一方、数十塩基配列を標的部位にノックインさせたマウスは、上記に比べ頻度が低い傾向にあるが、作製可能であった。しかし、数キロベースの塩基配列を、標的部位にノックインさせる事はかなり難しい状況である。

今回紹介する我々の結果が、ゲノム編集マウス作製の参考になれば幸いである。

○ 郊野善弘¹、小谷祐子¹、山内祐子¹、國廣弥生¹、吉見一人^{1,2}、
真下知士^{1,2}

¹大阪大学医学部附属動物実験施設

²大阪大学大学院医学系研究科附属共同研ゲノム編集センター

近年、我々は短時間かつ簡便に多くの受精卵でのゲノム編集が可能となるエレクトロポレーション(EP)による受精卵への RNA 導入方法を確立した。しかしながら、RNA を導入する受精卵は、その導入当日の採卵が一般的であるが、多数のゲノム編集マウス作製の依頼がある当施設では、飼育スペース不足や毎回の過排卵処理・採卵作業が大きな負担となる。そこで、我々は品質も安定し、融解するだけですぐに使用できるマウス凍結保存胚を用いたエレクトロポレーション法を確立したので報告する。

【材料と方法】

前核期凍結胚 (C57BL/6JJcl, 日本クレア)は、EP を行う 30-60 分前に融解する。EP 培地の RNA 濃度は、Cas9 mRNA 400 ng/ μ l、gRNA 200 ng/ μ lとした。また、KI の場合、lssDNA は Long ssDNA Preparation Kit、ssODN は IDT 4nmol Ultramer® DNA Oligo を使用した。それぞれの終濃度は、50 ng/ μ l、300 ng/ μ lとした。エレクトロポレーター NEPA21®に接続した白金プレート電極「CUY505P5」に 40 μ l の RNA 溶液と前核期胚をいれ、EP を行った。前核期胚は翌日まで培養し、2 細胞期になった胚を偽妊娠 0.5 日目 ICR マウス(日本クレア)の卵管内に移植した。生まれた F0 マウスは出産 2.5 週目にサンプリングし、遺伝子解析を行った。

【結果と考察】

gRNA/Cas9 mRNA を導入する条件を凍結胚用に最適化することで、ほぼ全ての系で KO マウスが得られた。また、lssDNA または ssODN を同時に導入することにより 13~95% の確率で KI マウスを得られるが、作出率にはばらつきが見られた。エレクトロポレーションと凍結胚の組み合わせで、より簡単にゲノム編集マウスの作製が可能であると示された。

骨格形成におけるヒストン H3 リジン 27 (K27) 脱メチル化酵素の機能

○成瀬 智恵¹, 柴田 進和², 田村 勝³, 若菜 茂晴³, 伊川 正人⁴, 浅野 雅秀¹

(¹ 京大院・医・動物実験施設, ² 金沢大・学際セ・遺伝子改変動物, ³ 理研 BRC・マウス表現型解析開発チーム, ⁴ 阪大・微研・遺伝情報実験センター)

生物の体を正確に形づくるためには多くの遺伝子が適切な時期および場所で働くことが必要である。脊椎骨や肋骨など前後軸に沿った構造体は Hox 群が適切な時期および場所で発現することによって正しく形成される。Hox 遺伝子群には、適切な時期が来るまで Hox タンパク質を作り出さないように H3K27 がメチル化されており、適切な時期に脱メチル化されることで Hox タンパク質が作られるようになると考えられているが、脊椎骨や肋骨の形成過程において、どのタンパク質が H3K27 を脱メチル化するのか、または自然に外れてしまうのか等、詳しいことは不明であった。

【材料と方法】

H3K27 脱メチル化酵素 Utx および Jmjd3 それぞれの単純欠損マウスおよび Jmjd3 脱メチル化ドメイン欠損マウスを作製し、骨格標本およびマイクロ CT にて骨格を解析した。また、Hox 遺伝子の発現とヒストン修飾の状態を、それぞれ定量的 RT-PCR およびクロマチン免疫沈降-定量的 PCR を用いて解析した。

【結果と考察】

Utx 欠損マウスの骨格には明らかな異常は認められなかったが、Jmjd3 欠損マウスは脊椎後弯および肋骨の異形成を示した。骨格標本解析やマイクロ CT 解析により、Jmjd3 欠損マウスでは脊椎および肋骨の前方ホメオティック変異が生じていると考えられた。また、Jmjd3 欠損マウスでは Hox 遺伝子群の発現する時期が正常マウスに比べて遅れていた。

Jmjd3 には H3K27 を脱メチル化する機能の他に、転写因子をリクルートする機能などがある。Jmjd3 脱メチル化ドメイン欠損マウスは、ヒストン脱メチル化の遅延を含め Jmjd3 単純欠損マウスと同じ表現型を示したので、脱メチル化酵素活性が、脊椎骨や肋骨の正常な形成に必須であると考えられた。

ラクトシルセラミド合成に関わるガラクトース転移酵素群欠損マウスの中枢神経系の組織学的解析

○吉原 亨¹・八田稔久²・佐武寛之³・杉原一司¹・沖野 望⁴・伊藤 信⁴・
古川鋼一⁵・浅野雅秀¹

¹京都大学大学院医学研究科附属動物実験施設, ²金沢医科大学分子細胞形態科学, ³金沢大学学祭科学実験センター, ⁴九州大学農学研究院, ⁵中部大学生命健康科学部,

【背景】 β -1,4-ガラクトース転移酵素 (β 4GalTs) は, 糖鎖の非還元末端に β 1 $\rightarrow$ 4 結合様式でガラクトースを付加する糖転移酵素である. β 4GalT 遺伝子群のうち, 我々は脳において β 4GalT-5 および β 4GalT-6 を欠損したダブルノックアウト (DKO) マウスを作出した. この DKO マウスは脳内のラクトシルセラミド (LacCer) 合成酵素活性と, LacCer 以降のガングリオシドは完全に消失していた. したがって, 中枢神経系では β 4GalT-5 と β 4GalT-6 が LacCer 合成酵素をコードすることが明らかとなった. また, DKO マウスは運動障害をともなう著しい成長遅延を呈し, 離乳期付近で死亡することから, 脳・脊髄の組織学的解析と培養系による神経系細胞の増殖・分化能について検討を行った.

【結果・考察】DKO マウスの脊髄の軸索はミエリン鞘が希薄であり, 真円度が低く, また極端に細いものが多数存在していた. 大脳皮質では, ミエリン形成に関わる MBP, MOG, PLP の軸索への分布が希薄であり, 特に MAG はオリゴデンドロサイトの細胞体に集積していた. 他方, 胎生期の大脳基底核原基を用いた Neurosphere 法による検討からは, DKO マウス由来の神経幹細胞の増殖は正常であったものの, 細胞外マトリクスをコートしたスライド上で分化誘導を行った場合, ラミニンに対する接着性が顕著に減少していた. 分化誘導後の DKO マウス由来のニューロンでは, 神経突起の伸長・分岐が充分になされていないことも観察された. これらの結果は, LacCer と, 以降に形成されるガングリオシドが脳や脊髄の形成過程において重要な役割を担うことを示唆するものである.

癌型 *K-ras*・*p53*^{-/-}多形型横紋筋肉腫 (pRMS) 細胞株の樹立

○齋藤 浩充、鈴木 昇 (三重大・地域イノベーション推進機構・先端科学研究支援センター・動物機能ゲノミクス)

【目的、方法】横紋筋肉腫は、四肢軟部、頭頸部、泌尿生殖器に好発する悪性度の高い軟部肉腫であり、desmin 等の筋原性マーカーが発現しており、組織学的に、多形型、胎児型、胞巣型、紡錘型に分類される。多形型は、成人での発症が多く成人型とも呼ばれる。RMS は、由来となる細胞、治療に重要な腫瘍幹細胞の性質が不明である。とりわけ、多形型は発症頻度も低く、患者からの検体のみでは治療のための研究を進めることが困難である。そこで我々は遺伝子改変により、ヒトの RMS でも報告されている遺伝子型が癌型 *K-ras* 遺伝子発現・*p53*^{-/-}の pRMS のモデルマウスを作製し、発症腫瘍から、安定に pRMS 形成能を維持した細胞株の樹立を試みた。

【結果】遺伝子改変型モデルの摘出腫瘍塊から腫瘍細胞を培養、継代し、細胞株 RMS3 を樹立した。RMS3 を正常マウスに静脈注射し肺転移した腫瘍塊から得た細胞を限界希釈し、1 細胞由来の細胞株 RMS310 を樹立した。さらに GFP 遺伝子発現ベクターを導入した RMS310 を正常マウスに静脈注射し肺転移した腫瘍塊から得た細胞を限界希釈し 1 細胞由来の細胞株 RMSg2 を樹立した。いずれも、正常マウスへの皮下移植で、モデルマウスと同じ pRMS 形成能を維持していた。この結果から、これらの細胞株は、腫瘍幹細胞に近い性質を保持していることが示唆された。正常骨格筋に存在する幹細胞、サテライト細胞 (SC)、間葉系幹細胞 (FAP/MS)、PW1 陽性間質細胞 (PIC) のマーカー遺伝子発現を RTPCR で検討した結果、FAP/MS に近いマーカー発現を示し、Oil-Red O 染色により、移植腫瘍組織内での脂肪細胞分化も検出された。比較のため、発癌物質メチルコラントレーンにより化学発癌肉腫モデルからも細胞株 RMS2299 を樹立した。RMS2299 移植腫瘍は、RMS3 同様の多形型を示したが、幹細胞マーカー発現パターンは異なっており、肺発癌モデルで報告されている化学発癌モデルと遺伝子改変モデルの違いが、pRMS モデルにおいても示された。

抗生剤投与による *Pasteurella pneumotropica* の除染

○坂本匠、谷川亜里紗、水野洋子、安藤理恵子、

小谷祐子、金子司郎、鍵山壮一朗、田島優

(大阪大学医学部・附属動物実験施設)

【背景】 *Pasteurella pneumotropica* (*P. p.*) はマウスやラットに重大な肺炎を起こす病原体であるとされてきた。しかし、アメリカでは単独での感染では重篤な肺炎を発症しないとして SPF 検査項目から除外されており、国内でも除外の動きがある。その一方で、近年、免疫不全動物飼育の増加に伴い、この病原体が再重要視されている。この病原体による汚染が確認されると胚移植によるクリーンナップが行われるが、近年、抗生物質を用いたクリーンナップが可能との報告が散見されている。一昨年当施設マウス室において *P. p.* の感染が確認された。今回我々は、抗生物質投与による *P. p.* の除染を試みたのでその概要と経過を報告する。

【目的】短期間で飼育規模を縮小せずに、再立ち上げが可能な *P. p.* の除染方法の確立を目指した。

【対象動物】当施設の定期モニタリングで *P. p.* 陽性と判定された 2 飼育室 マウス 429 ケージ 約 1700 匹を収容の回動物と抽出動物を対象とした。

【方法】エンロフロキサシン（商品名：パイトリル 10% 液）170 mg/l（25.5mg/kg/day）を給水ビンにて全ケージ 2 週間、連続投与、1 週間の休薬期間を挟んで 2 回行った。休薬期間中は自動給水に切り替え、飼育室内、ケージ、ラック、その他器材の一斉清掃を実施した。除染状況の確認については、投薬前、投薬直後（治療確認）、投薬終了後 1 か月、4 か月、7 か月、10 か月 12 か月（経過観察）の計 7 回を実施した。また、投薬後 1 年間は要観察期間としたが、通常の飼育室と同様の方法で使用した。

【結果】抗生剤投薬直後から治療後 1 年間、自家検査とともに検査機関にモニター動物を委託して検査も行ったが全て陰性であった。

これらの結果から、当施設の抗生物質を用いた *P. p.* の除染 プログラムが有効であることが確認できた。

肥満糖尿病における膵島機能障害の機序
—ZFDM ラットを用いた検討—

○横井 伯英^{1,2}、速水 智英^{1,2,3}、本田 洸平¹、マヒラ アシム¹、川畑綾子¹、日高 志保美¹、星野 貴一⁴、星野 雅行⁴、清野 進^{1,2}

(¹神戸大院・医・分子代謝医学、²関西電力医学研究所、³愛知医科大・糖尿病内科、⁴星野試験動物飼育所)

【背景と目的】肥満糖尿病モデル ZFDM ラットのオスは 10 週齢から 20 週齢の間にはほぼ全例が糖尿病を発症する。膵島からのインスリン分泌不全が病態の基盤であると考えられるが、その障害機構は不明である。

【目的】ZFDM ラットにおける膵島機能障害の機序を解明する。

【方法】血糖値が正常な 7-8 週齢と血糖値の上昇がみられる 11-12 週齢のオス ZFDM ラットから膵島を単離し、非肥大膵島と肥大膵島に区別してインスリン分泌、RNA-seq 解析により遺伝子発現の変動、メタボローム解析によりグルコース刺激時の代謝物の変動を評価した。

【結果】11-12 週齢の肥大膵島において、インクレチン応答性インスリン分泌の障害が認められた。RNA-seq 解析では、肥大膵島においてグルコース感受性、解糖系ならびに乳酸産生の亢進、TCA 回路とリンゴ酸-アスパラギン酸シャトルの減弱が示唆された。メタボローム解析では、遺伝子発現の変動と一致する代謝物の変動が認められた。特に、インクレチン応答性インスリン分泌の鍵シグナルであるグルタミン酸の産生が障害されていた。

【結語】肥満糖尿病におけるインスリン分泌障害の原因として、肥大膵島における未分化細胞様の糖代謝変化とそれに伴うグルタミン酸の産生障害が示唆された。

WHHLMI ウサギにおける冠動脈病変の進行に関わる血漿マーカー

○塩見 雅志¹、竹田 浩章²、入野 康宏³、山田 悟士¹、国吉 信恵¹、ユウ イン¹、
小池 智也¹、和泉 自泰²、篠原 正和⁴、馬場 健史²、石田 達郎⁵

¹ 神戸大学医学研究科附属動物実験施設

² 九州大学生体防御医学研究所附属トランスオミクス医学研究センターメタボロミクス分野

³ 神戸大学医学研究科立証検査医学分野

⁴ 神戸大学医学研究科疫学分野

⁵ 神戸大学医学研究科循環器内科学分野

【目的】冠動脈病変の進行に関わる血中マーカーはいまだ確立されていない。本研究では、冠動脈に動脈硬化が自然発症する WHHLMI ウサギを用いて冠動脈病変の進行に関わる血中マーカーの探索を試みた。

【方法】20匹の WHHLMI ウサギを実験に使用し、標準飼料で飼育した。4月齢から4か月ごとに20月齢まで絶食下で採血し、血漿を調整した。リポタンパクは超遠心法で分画し、脂質値を測定した。血漿のメタボローム解析はガスクロマトグラフィ/マススペクトロメトリ法を用いて実施した。血漿のリピドーム解析は supercritical fluid chromatography mass spectrometry 法を用いて実施した。20月齢あるいは死亡時に冠動脈と大動脈の動脈硬化病変を評価した。冠動脈病変の重症度は平均狭窄率で評価し、重症群と軽症群に区分した。大動脈病変は内膜表面に占める病変面積の割合で評価した。

【結果】冠動脈病変の程度には大きな個体差が認められたが、リポタンパク脂質と大動脈病変では両群間に統計的な差は認められなかった。メタボローム解析では、冠動脈病変が軽度のウサギで N-forminylglucose の相対濃度が高値を示した。リピドーム解析では、冠動脈病変が重度のウサギで ceramide の相対濃度が高値を示し、triacylglycerol 44:1 の相対濃度が低値を示した。また、冠動脈病変が軽度のウサギでは phosphatidylcholine 16:0-18:3, phosphatidylcholine 16:1-18:1, phosphatidylinositol 16:0-18:1, sphingomyelin d18:1-22:1, diacylglycerol 16:1-16:1 の相対濃度が高値であった。

【結論】メタボローム解析とリピドーム解析で検出されたこれらのパラメータは冠動脈病変重症化の血中マーカーとして有用であると考えられる。

Phf24-KOラットにおける遺伝子発現プロファイル
-Noda Epileptic Ratの原因遺伝子座領域を標的にして-

○芹川忠夫^{1,2}、國澤直史²、Higor Alves Iha²、金星匡人²、清水佐紀²、庫本高志³、金子武人⁴、山本 卓⁵、真下知士⁶、笹 征史^{1,7}、大野行弘²

¹京都疾患モデル研究所、²大阪薬科大学、³京都大学、⁴岩手大学、⁵広島大学、⁶大阪大学、⁷渚クリニック

[背景] Noda Epileptic Rat (NER) の全般性強直間代けいれん発作GTCSの発症時期は、第1染色体上の*Ner1*と第5染色体上の*Ner3*の2つの遺伝子座領域をF344/DuCrIj由来の染色体断片で共にホモに置換えると明らかに遅延する。このダブルコンジェニックラットNF-Chr1e/5dとNERを比較すると、*Ner1*領域においてはcholecystokinin B receptor (*Cckbr*) と suppression of tumorigenicity 5 (*St5*) の遺伝子発現が有意に低かった。また、NERの*Ner3*領域に位置するPHD finger protein 24 (*Phf24*) には内在性レトロウイルス配列の挿入変異があり、PHF24蛋白はほとんど検出されなかった。*Phf24* はGABA_B受容体のG蛋白を標的とするGai-interacting protein (GINIP)をコードしているので、NERのGTCSにはGABA作動性介在ニューロンの機能低下が関わっていると考えられた (Kuramoto et al. Behav Genet, 2017)。[目的] 今回、*Ner1* (Chr1e) と*Ner3* (Chr5d) 領域において、*Phf24*により遺伝子発現に影響を受ける遺伝子を探索するため、*Phf24*-KOラットの遺伝子発現プロファイルを調べた。そして、過去に行ったNERとNF-Chr1e/5dとの遺伝子発現データを比較検討した。[材料と方法] F344/Stm-*Phf24*^{Δ3992/Δ3992}ラット (*Phf24*-KO) は、TALEN法にて作製した。*Phf24*-KOラットと対照のF344/Stmラット (各6週齢、雄、3頭) の扁桃体RNAを試料とした。遺伝子発現解析にはAgilent社のSuper Print Rat GE 8x60K Microarray Kitを用いた。[結果] *Phf24*-KOラットの*Cckbr*遺伝子と*Gabbr2*遺伝子 (GABA_B受容体構成サブユニットGABA_{B2}をコード) は、F344に比べて発現上昇が認められた。一方、*Phf24*-KOラットの*St5*遺伝子の発現変化は顕著ではなかった。[考察] *Phf24*変異によってGABA作動性介在ニューロンの機能異常が生じることが示唆された。NERのGTCSには、*Cckbr*は*Phf24*と共に関わるが、*St5*は*Phf24*とは独立して関わりと推測された。*Phf24*-KOラットの遺伝子発現を網羅的に調べることで、*Phf24*遺伝子機能の全容を推定できると思われる。

カナバン病モデル *Aspa* ノックアウトラットの病態解析○星合里香¹, 井澤武史¹, 山手丈至¹, 西谷あい²,田中美有², 庫本高志², 桑村 充¹

(1大阪府立大学獣医病理学教室, 2京大院・動物実験施設)

【背景・目的】

カナバン病は、ヒトの中枢神経系の白質変性症で、有効な治療法が確立されていない難病である。カナバン病は常染色体劣性遺伝し、原因遺伝子アスパルトアシラーゼ (*Aspa*) が同定されている。ASPA はオリゴデンドロサイトに多く分布する酵素で、基質である N-アセチルアスパラギン酸 (NAA) を加水分解し、その分解産物がミエリン構成物質の原料として利用される。最近、TALEN を用いた遺伝子編集技術により *Aspa* ノックアウト (*Aspa* KO) ラットが開発され、カナバン病のモデル動物として期待されている。本研究では、主に病理学的な手法を用いて *Aspa* KO ラットの病態解析を行った。

【材料・方法】

Aspa KO ホモ型ラット、およびコントロールラット (野生型) の中枢神経系組織を、4, 8 および 12 週齢で各 3 例ずつ採材した。それらのパラフィン切片に対して、HE 染色と各種グリア細胞およびミエリン関連蛋白に対する抗体を用いた免疫組織化学を行った。また、脊髓のエボン包埋サンプルを用いて厚切りトルイジンブルー染色および透過型電子顕微鏡観察を行った。

【結果・考察】

Aspa KO ホモ型ラットの一般状態は良好であり、いずれの週齢でも無症状であった。

HE 染色では、ホモ型の大脳、小脳、脊髓といった中枢神経系の広範囲で空胞形成が認められた。空胞病変は小脳や脳幹で特に重度であったが、週齢を経るごとにやや改善傾向がみられた。ホモ型ラットでは脊髓全体のミクログリアと脊髓灰白質のアストロサイトの活性化がみられ、脊髓全体で未熟オリゴデンドロサイトの増加および成熟オリゴデンドロサイトの減少も認められた。またミエリン構成蛋白抗体に対する染色性は、やや低下していた。

透過型電子顕微鏡では、脊髓の白質および灰白質の軸索内でミトコンドリアの腫大や増数、軸索の水腫、ミエリンの離解が認められた。白質の水腫状となった軸索内に、電子密度の高い糸くず状およびドーナツ状の異常な構造物も散見された。

Aspa KO ラットでは神経症状はみられなかったが、ヒトのカナバン病と同様に空胞病変が中枢神経系組織において広範囲に認められ、電子顕微鏡レベルでは軸索内に異常な構造物が見られることが分かった。また、オリゴデンドロサイトの分化異常と、それに伴う代償性の未熟オリゴデンドロサイトの増加が考えられた。以上の結果より、*Aspa* KO ラットはカナバン病のモデル動物として有用であることが示唆された。

遺伝性ミエリン変性モデル VF ラットの病態および 原因遺伝子 *Dopey1* の機能解析

○安井 彩¹, 田中美有², 竹中重雄³, 井澤武史¹, 山手丈至¹, 桑村 充¹

(¹大阪府立大学 獣医病理学教室, ²京大院・動物実験施設, ³大阪府立大学 栄養療法学)

ミエリン疾患は難治性の神経疾患であり, 発病メカニズムが不明な疾患が多く有効な根治療法がないことから, 病態の解明と治療戦略の構築が求められている。ミエリン疾患モデル動物が精力的に開発され, 病態解明に用いられている。本研究は, 振戦症状を発症後, その症状が徐々に回復するというユニークな特徴を持つ VF ラットを用いた。VF ラットは, *Dopey1* 遺伝子の変異により, オリゴデンドロサイト (OL) においてミエリン構成タンパクの細胞内輸送が障害され, OL の分化・成熟異常が起こると考えられている。ミエリン疾患の病態と回復メカニズムを解明することを目的として, VF ラットの詳細な病態解析および DOPEY1 蛋白の機能解析を行った。

【材料と方法】

①VF ラットの病態解析: 10 週齢の VF ホモ型発症ラット 3 匹, 野生型対照ラット 6 匹を 4%パラホルムアルデヒドで浸漬固定後, パラフィン包埋し, 組織切片を作製した。作製した切片に対してオリゴデンドロサイト前駆細胞 (OPC) マーカー *Pdgfra* (血小板由来成長因子受容体) mRNA に対する *in situ* hybridization を行い, *Pdgfra* 陽性細胞数をカウントした。

②DOPEY1 蛋白の機能解析: 野生型対照ラットの脳ライセートから, 共免疫沈降法により DOPEY1 蛋白複合体を精製した。SDS 化した DOPEY1 蛋白複合体に対して Western blot 法と銀染色を行った。銀染色で検出されたバンドを細切して LC/MS 解析を行い, DOPEY1 蛋白と相互作用する蛋白の同定を行った。同定された蛋白に対する逆共免疫沈降法を行った。

【結果と考察】

①脊髄 *Pdgfra* 陽性 OPC 数は, 野生型対照ラットと比較して VF ホモ型発症ラットで, 増加傾向にあった。②DOPEY1 蛋白と複合体を形成している蛋白として Fibromodulin や ADP-ribosylation factor-like protein 2 (ARL2) を候補蛋白として実験を進めたが, DOPEY1 蛋白との結合性を証明することができなかった。先行研究より, VF ホモ型発症ラットでは正常な OL に比べ形態学的に突起の乏しく未熟な OL が出現し, その数が増加していることが示されている。本実験で白質の *Pdgfra* 陽性 OPC 数の増加傾向が示され, VF ラットの病態に OPC からの OL の成熟異常が関与する可能性が示唆された。また, DOPEY1 蛋白と相互作用する因子の探索を行ったが, Fibromodulin や ARL2 の可能性は低いと考えられた。

SK2 チャネル遺伝子にミスセンス変異を持つ振戦ラット

○庫本高志¹、横江繭子¹、国澤直史²、大橋佳奈³、三宅崇仁³、樋口裕城¹、吉見一人⁴、真下知二⁴、田中美有^{1,5}、桑村 充⁵、金子周二³、清水佐紀²、芹川忠夫^{1,2}、大野行弘²

(1 京大院・医・動物実験施設、2 大薬大・薬品作用、3 京大院・薬、4 阪大院・医・動物実験施設、5 大府大・獣医病理)

ENU ミュータジェネシスによって振戦を示すラット変異体を得た。振戦は優性遺伝し、原因遺伝子は Tremor dominant Kyoto (*Trdk*) と名付けられた。本研究では、*Trdk* ラットの振戦の行動薬理学的評価と原因遺伝子の同定を行った。

【材料と方法】

5-7 週齢の *Trdk* ラットに本態性振戦の治療薬 (Propranolol, Phenobarbital)、パーキンソン病振戦の治療薬 (Trihexyphenidyl) を投与し、振戦の抑制効果を判定した。BN ラットとの戻し交雑子を作製し、遺伝子マッピングを行った。

【結果と考察】

Trdk ラットの振戦は、Trihexyphenidyl により抑制されなかったが、Propranolol と Phenobarbital で抑制された。*Trdk* 座位は、18 番染色体にマッピングされた。候補遺伝子として SK2 チャネルをコードする *Kcnn2* 遺伝子が挙げられた。*Trdk* ラットの *Kcnn2* 遺伝子にミスセンス変異 (I289N) を見出した。電気生理学的解析により、I289N 変異をもつ SK2 チャネルは機能異常を示すことを明らかにした。以上、*Trdk* ラットはヒト本態性振戦のモデルになり得ることが示唆された。また、*Trdk* ラットの振戦の原因遺伝子は、*Kcnn2* 遺伝子であると結論した。

Hcn1 ノックアウトラットの運動機能の評価

○西谷あい¹、吉原 亨¹、吉田裕作²、鈴木登志郎²、佐久間哲史³、山本 卓³、浅野 雅秀¹、
庫本高志¹

(1, 京都大学大学院医学研究科附属動物実験施設、2, 日本エスエルシー、3, 広島大学大学院理学研究科)

Hyperpolarization- activated cyclic nucleotide-gated 1 (*Hcn1*) 遺伝子は、律動的な膜電位の伝達やシナプス伝達に重要な HCN1 チャネルをコードしている。*Hcn1* ノックアウト(KO)マウスでは、運動協調、運動学習の低下が報告されている。今回、我々は *Hcn1* KO ラットを作製し、筋力、運動協調、歩行等の運動機能の評価した。

【材料と方法】

遺伝子改変ラットの作製には、TALEN 法を用い、*Hcn1* 遺伝子のエクソン 4 を標的とした。運動機能評価は以下の項目を行った。〈Grip strength test〉ロープを握らせ、落下するまでの時間及び体勢をスコア付けした。〈Incline place test〉板上のダンボールにラットを乗せ、角度を上昇し、体勢を維持できた最大の角度を記録した。〈Balance beam test〉4 種類の幅の棒を歩行させ、渡りきれた場合得点を与え、合計点を求めた。〈Rota rod test〉回転しているローター上から落下するまでの時間を測定した。〈Foot print〉後肢の歩幅、歩隔を測定した。

【結果と考察】

Hcn1 遺伝子エクソン 4 を 7 塩基、24 塩基欠損している KO ラットがそれぞれ得られた。運動機能評価は、7 塩基欠損 KO ラットのみ行い、以下の結果を得た。〈Grip strength test〉落下時間が早く、スコアが低かった。〈Incline place test〉体勢維持できた最大の角度が小さかった。〈Balance beam test〉幅 2.0 cm と 1.5cm の棒では、渡りきれない場合があり、合計点が低かった。〈Rota rod test〉落下するまでの時間が短かった。〈Foot print〉歩幅は短く、歩隔が広がっていた。これらの結果から、*Hcn1* KO ラットは、筋力の低下、運動協調性の低下、歩行異常を示すことが明らかとなった。*Hcn1* KO マウスでは、筋力の低下や歩行異常は報告されていない。本研究から、*Hcn1* 遺伝子が、筋力の維持に関わる事が示唆された。

<第137回研究会（平成30年3月2日）>

テーマ：主要なバイオリソースであるメダカとラットの遺伝学

1. ラットの遺伝学

庫本 高志（京都大学大学院医学研究科 附属動物実験施設）

2. メダカを用いた順遺伝学及び逆遺伝学的解析

ーメダカ体色突然変異体の原因遺伝子同定を例としてー

成瀬 清（基礎生物学研究所 IBBPセンター）

<トピックス>

絶滅危惧種の特徴をiPS細胞と発生工学で解き明かす

本多 新（京都大学大学院医学研究科附属動物実験施設）

<第137回研究会（平成30年3月2日）>

テーマ：主要なバイオリソースであるメダカとラットの遺伝学

1. ラットの遺伝学

庫本 高志（京都大学大学院医学研究科 附属動物実験施設）

2. メダカを用いた順遺伝学及び逆遺伝学的解析

ーメダカ体色突然変異体の原因遺伝子同定を例としてー

成瀬 清（基礎生物学研究所 IBBPセンター）

<トピックス>

絶滅危惧種の特徴をiPS細胞と発生工学で解き明かす

本多 新（京都大学大学院医学研究科附属動物実験施設）

（一）
（二）
（三）
（四）
（五）
（六）
（七）
（八）
（九）
（十）
（十一）
（十二）
（十三）
（十四）
（十五）
（十六）
（十七）
（十八）
（十九）
（二十）
（二十一）
（二十二）
（二十三）
（二十四）
（二十五）
（二十六）
（二十七）
（二十八）
（二十九）
（三十）
（三十一）
（三十二）
（三十三）
（三十四）
（三十五）
（三十六）
（三十七）
（三十八）
（三十九）
（四十）
（四十一）
（四十二）
（四十三）
（四十四）
（四十五）
（四十六）
（四十七）
（四十八）
（四十九）
（五十）
（五十一）
（五十二）
（五十三）
（五十四）
（五十五）
（五十六）
（五十七）
（五十八）
（五十九）
（六十）
（六十一）
（六十二）
（六十三）
（六十四）
（六十五）
（六十六）
（六十七）
（六十八）
（六十九）
（七十）
（七十一）
（七十二）
（七十三）
（七十四）
（七十五）
（七十六）
（七十七）
（七十八）
（七十九）
（八十）
（八十一）
（八十二）
（八十三）
（八十四）
（八十五）
（八十六）
（八十七）
（八十八）
（八十九）
（九十）
（九十一）
（九十二）
（九十三）
（九十四）
（九十五）
（九十六）
（九十七）
（九十八）
（九十九）
（一百）

庫本高志

京都大学 大学院医学研究科 附属動物実験施設

東京農業大学 農学部 動物科学科 動物栄養学研究室

2002 年から現在まで 16 年間、京都大学で行った研究について報告した。強調すべきは以下の 2 点である。第一は、多様な実験材料（リソース）を持っていることは研究を進める際の強みとなるということ。第二は、複数の遺伝子の組合せで病態が現れるというコンセプトを確立したことである。

第一の多様な実験材料（リソース）を持っていることは研究を進める際の強みとなるという点は、2002 年から始まったナショナルバイオリソースプロジェクト「ラット」（NBRP-Rat）に参画することで実感した。例えば、NBRP-Rat では様々な系統が集められ、約 150 系統からなるゲノム DNA のパネルを作製することができた。このパネルは、実験用ラットにおける多様性を知るうえで非常に役に立った。すなわち、病態に関与するアレルが、ラット系統間でどのように分布しているかを知ることができた。

また、NBRP-Rat とは別に、ペットとして飼われていたラットを実験動物化し、ラットリソースの拡充を行った。具体的には、2006 年、米国より 6 頭のラットを導入し、6 系統を確立した。その中から、毛色や被毛の変異、アトピー性皮膚炎、白内障、耳介形態異常のモデルを樹立した。そして、それらの形質を支配する原因遺伝子を同定した。

このように、独自のリソースを開発・保有することで、独自性のある研究を進めることができた。

第二の複数の遺伝子の組合せで病態が現れるというコンセプトの確立は、2 個の遺伝子の組み合わせで病態が発現するモデルラットの解析により得られた。例えば、本態性振戦のモデルである TRM ラットでは、*Aspa* と *Hcn1* という 2 個の遺伝子の変異が組合わさっ

た時に、本態性振戦が発症する。また、強直間代発作のモデルである NER ラットでは、第 1 染色体上の遺伝子と第 5 染色体の *Phf24* という遺伝子の変異が組合さった時に、強直間代発作が発現する。つまり、本態性振戦や強直間代発作の発症には、1 個の変異だけでは不十分で、2 個の変異が同時に組み合わさることが必要であった。

これらの研究から、疾患の発現には、2 個あるいは数個の遺伝子変異が必要であるという「オリゴジェニックモデル」を提唱した。

以上、京都大学における 16 年間で学んだことは、独自のリソースの重要性、そして、遺伝子の組合せの重要性の 2 点である。

2018 年 4 月より東京農業大学に異動した。東京農業大学においても、独自のリソースを開発・発掘し、それらを用いることで東京農業大学ならではの研究を進めて行きたい。今後とも、ご指導ご鞭撻のほどよろしくお願いいたします。

第1回 東京農業大学動物学研究会

ラットの遺伝学
- From 2002 to 2018 in Kyoto -

堀本高志
京都大学大学院医学研究科
附属動物実験施設



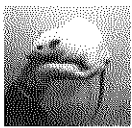

本日伝えたいこと

1. 多様な実験材料を持っていることは、研究を進める際の強みとなる
2. 複数の遺伝子の組合せで、病態が現れる



そもそもラット (*Rattus norvegicus*) とは

- ・ 長い歴史を持つ
- ・ 哺乳類モデル
- ・ 再現性
 - 遺伝と環境
 - 手技(大きさ、取扱い)
- ・ リソースセンター



そもそも遺伝学とは

- ・ Variation と heredity を研究する学問

Variation
多様性、変動

Heredity
継承、相統

法則性があるのか？
それを担っている因子は何か？



ラットの遺伝学 in Kyoto

- 実験用ラットにおける variation と heredity を研究する
- 系統間の variation
 - どのような？
 - どの程度？



ラットリソースの
整備と拡充

ラットの遺伝学 in Kyoto

- Variation は、変異 (mutation) も含む
 - 変異の実体は？
 - また、その heredity の様式はどのようなもの？



ラット変異体の
原因遺伝子の同定

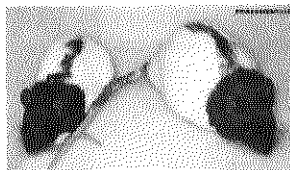
ラットリソースの整備

Variationを知るために
たくさんラットを集めよう

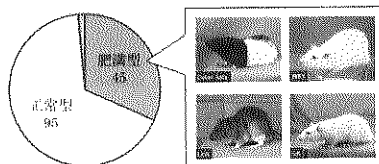
ナショナルバイオリソースプロジェクト「ラット」



過食・肥満の原因遺伝子・Gpr10



ラット近交系内のGpr10遺伝子の多型

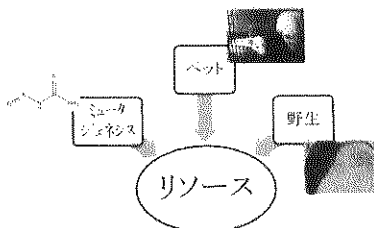


病態に関するアレルの分布状況を知ることができた

ラットリソースの拡充

Variationを知るために
たくさんラットを集めよう

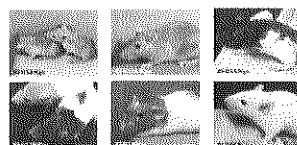
ラットリソースの拡充



Kyoto Fancy Rat Stock (KFRS) strains

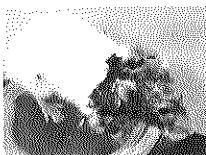


KFRS strains



6 strains 11 mutations 8 papers

アトピー性皮膚炎ラット (KFRS4/Kyo)



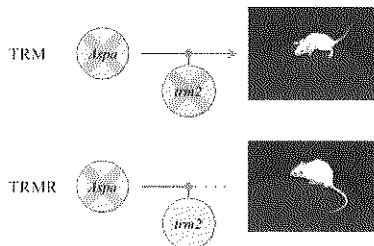
- 痒みを作る遺伝子
- 高IgE
- 皮膚・呼吸機能障害
- ステロイド投与前で改善

既存のラットにはなかった病態モデルを樹立できた

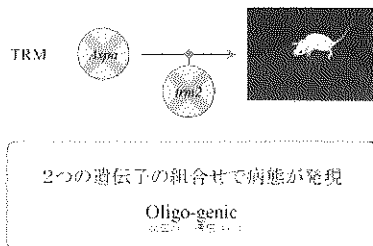
ラット変異体の 原因遺伝子の同定

変異の実体とその
Heredityの様式を知ろう

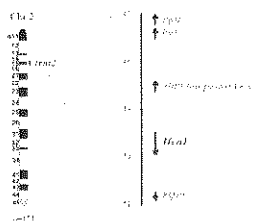
TRM ラット: 本態性振戦のモデルラット



TRM ラット: 本態性振戦のモデルラット

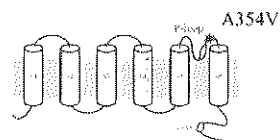


trm2 のポジショナルクローニング

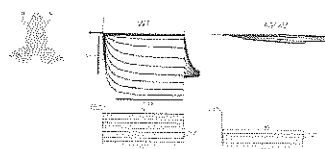


HCN1

- hyperpolarization-activated cyclic nucleotide-gated potassium channel 1
- 過分極で活性化
- 陽イオンチャネル (K^+ , Na^+)



A354V 型 HCN1 チャンネル

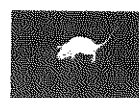


A354V 変異 → 陽イオンを通さない



TRMラットの振戦

TRM



TRMラットの振戦は、
Oligo-genic で説明できる

ひとつの変異だけでは、振戦は現れない

TRMR



振戦なし

WTC



振戦なし

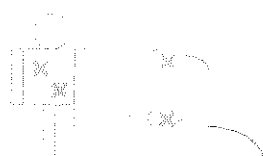
オリゴジェニックの疾患

- 原因遺伝子を持っているからといって、疾患が発症するわけではない
- 相互作用によって、初めて力を発揮できる



オリゴジェニックの疾患

- ヒト疾患の原因遺伝子と同じ変異をもつマウスやラットを作製しても、ヒトと同じ病態を示すとは限らない



まとめ

- マウス・ラットの整備と拡充を促して、器量間の variation を知り、利用することになった
- 多様な実験材料は強みとなる
- マウス変異体の原因遺伝子の同定を通じて、病態の heredity がオリゴジェニックモデルで説明できることを示した
- 複数の遺伝子の組み合わせが重要

メダカを用いた順遺伝学及び逆遺伝学的解析

成瀬 清

基礎生物学研究所 IBBP センター/バイオリソース研究室 特任教授

要旨

メダカは遺伝学的解析が適用できる脊椎動物のモデルとして長く利用されてきた。1970 年頃から名古屋大学の富田英夫博士によって野生のメダカや市販のヒメダカを用いて、3 世代交配によって自然界に存在する隠れた自然突然変異を同型化することで 80 系統をこえる突然変異体(富田コレクション)が発見され、ほとんどの系統はメダカナショナルバイオリソースプロジェクト (NBRP Medaka) に寄託され系統維持・提供されている。また ENU を用いた大規模な誘発突然変異体の同定実験も実施され、現在では 150 系統以上が精子凍結保存され、人工受精胚として提供可能である。2000 年頃からメダカ BAC ライブラリーの作成、EST 解析、ゲノム配列の決定などメダカバイオリソースが整備されるにつれて、これらの突然変異体の原因遺伝子の同定が次第に容易となり、興味深い発見が次々となされてきた(新規メラニン形成遺伝子 *slc45a2* の発見とヒト体色への関与、メダカとその近縁種の性決定遺伝子 *Dmy*、*Gsdf* 及び *Sox3* の同定とその進化、DNA 型転位因子 *Tol2* の発見とゼブラフィッシュ遺伝子導入系への応用、*zic1/zic4* の背側エンハンサーの発見、抗重力因子としての *YAP* の発見、ヘルペスウイルスと *PiggyBac* 転位因子との融合型トランスポゾンである超大型 DNA 型トランスポゾン *Teratorn* の発見等)。逆遺伝学的手法では ENU によるランダムな突然変異誘発を基礎とした TILLING ライブラリーが樹立され利用されてきたが、近年のゲノム編集技術の進展により逆遺伝学的研究手法はゲノム編集による新規アレルの生成やノックイン系統の作成に移行している。今回はメダカを用いた順遺伝学的解析の例として自然突然変異体や ENU によって作成した初期発生・器官形成期の突然変異体の原因遺伝子同定とその原因となった新規転位因子の発見や逆遺伝学的解析法として現在利用可能な TALEN や CRISPR-Cas9 によるノックアウトやノックインなどの研究についてご紹介する。

実験動物としてのメダカとその研究

メダカは我が国において江戸時代から愛玩動物として飼育されてきた。1835 年に毛利梅園によって刊行された梅園魚譜には野生のクロメダカとともにヒメダカやシロメダカが描かれている(図 1)。シロメダカは *b* 遺伝子座と *r* 遺伝子座の 2 重突然変異体であることを考えると黒い体色の野生のメダカから突然シロメダカが表れるとは考えにくい。考えられるシナリオとしてヒメダカを多数飼育する中からシロメダカが発見されたのではと思われる。このことから江戸時代の人々は体色により品種を区別して飼育していたことが予想される。1900 年に植物を用いて再発見された「メンデルの法則」は日本においても非常に注

目され、動物においてもメンデルの法則な成り立つのかと言うことは当時多くの研究者が注目する課題であった。東京帝国大学の教授であった石川千代松と外山亀太郎（カイコ遺伝学の創始者としても有名でカイコを用いて動物ではじめてメンデル遺伝を証明した）（図 2(A)と(B)）は野生のクロメダカに加えて江戸時代から知られていたヒメダカやシロメダカを用いてメンデルの法則が脊椎動物でも成り立つのかを調べた。その結果 1910 年ころにはメダカを用いて、脊椎動物でもメンデルの法則が成り立つことを完全に証明している（図 3）。外山はその研究を「一二の MENDEL 性質に就いて」とのタイトルで 日本育種学会会報第一巻第一号（1916）に報告している。一連の研究は世界的にみても高い水準の研究であったが日本語で発表されたこともあって国際的に十分に注目されたとは言えなかった。国際的にメダカが注目されるきっかけとなった研究は會田龍雄によって発表された「限性遺伝」に関する研究である。會田（京都高等工芸学校教授）（図 4）はメダカの黄色の体色が性と連鎖していることを発見するとともに Y 染色体上にもメダカの体色を決める「機能」がある遺伝子があることを証明した。またメダカの性決定システムが XX-XY 型であることを明確に示した。さらにメダカでは X 染色体と Y 染色体の間でも乗換えが起こるも明らかにしている。当時ショウジョウバエを用いた研究から X 染色体と Y 染色体では乗換えは起こらないことが常識であったことからこの研究は当時の常識を覆す重要な研究であった。一連の研究は *On the inheritance of color in a fresh-water fish, Aplocheilichthys latipes Temminck and Schlegel, with special reference to sex-linked inheritance. Genetics 6, 554-573 (May 27, 1921)* として発表された(1)。これらの研究によって會田は 1932 年に帝国学士院賞を受賞している。名古屋大学教授山本時男（図 5）は會田が発見した限性遺伝を用いて d-rR 系統を樹立した（図 6 (A)）。この系統はメダカ性決定遺伝子と連鎖する R 遺伝子によって遺伝的メスが白色で遺伝的オスが赤色の体色となる。このため体色をマーカーとしてその遺伝学的な性を判別することができる。この系統を用いてエストロゲンやアンドロゲンを餌と混ぜて与えることで遺伝的なオスを生殖能力のあるメスに或いは遺伝的なメスを生殖能力のあるオスに性転換できることを示した（図 6 (B)）(2, 3)。一連の研究は脊椎動物の性を性ホルモンにより転換できることを世界で初めて示した研究であった。一連の業績によって山本もまた 1976 年に日本学士院賞を受賞している。山本時男の弟子である富田英夫は野生メダカから見いだしたアルビノメダカの発見をきっかけに野生集団から 3 世代の交配によって突然変異体を分離するという研究を開始した。富田は変異源処理を行うこともなく野生集団に潜在する劣性突然変異を交配によってホモ化することで 80 系統以上の生存可能な自然突然変異体を同定した(4)。これらの突然変異体は 1970 年代から名古屋大学において連鎖と系統保存されてきたが現在ではほとんどの系統が NBRP medaka に寄託され重要なリソースとして利用されている。

メダカを用いた順遺伝学解析

メダカでは 1970 年代から興味深い突然変異体が多数報告されていたがその原因遺伝子を

同定することができるようになったのは2000年頃からであった。この頃からマウスやヒトで利用されてきたBACライブラリーがメダカでも構築され物理地図を作成する基礎が築かれた(5)。また突然変異体のマッピングに必要な高密度連鎖地図とその連鎖地図上の特定のゲノム領域を増幅できるPCRプライマーが公開された(http://mbase.nig.ac.jp/mbase/medaka_top.html)。これにより、染色体の特定領域に突然変異体の原因遺伝子座をマッピングすることが可能となった(6-9)。もっとも初期に行われたメダカ突然変異体のポジショナルクローニングによる同定はヒメダカ b 遺伝子座の原因遺伝子解明である(10)。高密度連鎖地図の作成と松田らによって作成されたBACライブラリーを用いた原因領域の物理地図の作成及び当該BACクローンの配列決定によって、深町らはヒメダカの原因遺伝子は *slc45a2* (*AIM-1*) であることを明らかにした。この遺伝子はヒトにも保存されていて、人種間の皮膚の色を決定する重要な要因となっている(11)。松田らは會田以来の研究課題であるメダカの性決定遺伝子座のポジショナルクローニングをおこなった。その結果メダカの性決定遺伝子は多くの動物で性決定システムとの関連が示されている転写因子である *DMRT1* が重複し、染色体1番に挿入された遺伝子であることが明らかとなった。この遺伝子は現在では *DMY/DMRT1Y^o* と呼ばれている(12) (13)。ポジショナルクローニングによる性決定遺伝子の同定はその後、メダカ近縁種にも応用され近縁種BACライブラリーも作成されている。それらのリソースを用いてルソンメダカやインドメダカにおいても性決定遺伝子が決定された。ルソンメダカではメダカでは *DMY/DMRT1Y^o* の下流でオスにおいて発現が特異的に上昇する *TGFβ family* に属する増殖因子 *Gsdf* がオスの性決定を担っていることが明らかとなった(14)。またインドメダカでは哺乳類の性決定遺伝子 *Sry* のX染色体上の対立遺伝子と考えられてきた *Sox3* が性決定遺伝子であった(15)。2007年にはメダカゲノムの塩基配列情報が公開された(16)。これによって高密度連鎖地図を作るだけで突然変異体の原因領域に存在する遺伝子を同定することが可能となりポジショナルクローニング法による原因遺伝子の同定が格段に容易となった。このようなゲノム情報の蓄積を背景にして、おもに富田コレクションを用いることで様々な突然変異体の原因遺伝子が決定され、その結果、興味深い新たな遺伝子機能が明らかとなっていった。例えば神経系の発生に重要な転写因子である *zic1/zic4* 遺伝子が成魚の腹側と背側の属性を決める重要な因子であることが明らかとなった(17) (18)。これは *zic1/zic4* の新規機能である。また椎骨の規則正しい発生は *floor plate* での *wnt4b* の発現が不可欠であることも明らかとなった(19)。これもまた *wnt4* の新規機能と言える。体色突然変異体の研究からは白色素胞と黄色素胞は共通の前駆細胞を持ち、前駆細胞からの運命決定を *sox5* 遺伝子の発現が担うなど色素細胞の分化と増殖に関する新たな遺伝子機能も体色突然変異体の表現型解析から明らかとなっている(20, 21)。このような新規遺伝子機能の同定に加え、突然変異の原因が解明されるにつれ突然変異の原因に関しても興味深い現象も明らかとなりつつある。それはメダカからの新規転位因子の発見である。現在原因遺伝子が判明している自然突然変異体の半分程度が転移因子の挿入による変異である。このアルビノ遺伝子座の解析からその

原因となった DNA 型トランスポゾン *Tol2*(22)が発見されている。*Tol2* は脊椎動物ではじめて発見された *hAT* (*hobo/Activator/Tam3*) transposable element family に属する自立型の転移活性を保持したトランスポゾンである。*Tol2* トランスポゾンによる遺伝子導入系はゼブラフィッシュやゼノパス、マウス、ニワトリ、ヒトにおいても効率の良い遺伝子導入法として多く利用されている(23, 24)。*zic1/zic4* の変異体である *Double anal fin(Da)*の研究からは、全長が 150kbp に及ぶヘルペスウイルスと *PiggyBac* 転位因子との融合型トランスポゾンである *Teratorn* が発見されている(25)。*Teratorn* は現在知られているトランスポゾンでは最大であり、*PiggyBac* トランスポゼースによるゲノムへの組み込みと細胞内のエピゾームとして存在し、必要に応じてウイルス粒子として水平伝播できるヘルペスウイルスとしての機能に必要なすべての遺伝子を備えている。さらに新骨類の系統では複数の系統で独立してヘルペスウイルスと *PiggyBac* 転位因子が融合していることも明らかとなっており、新しい転位因子誕生のメカニズムが明らかになりつつある(26)。それ以外にも他の脊椎動物では報告されていなかったユニークな転位因子がメダカゲノムから次々と発見されている。メダカゲノムには他の脊椎動物に比べ多くの転位因子を含むのかもしれないが、もう一つの考えとして生存可能な自然突然変異の原因は、多くの場合タンパク質コード領域の単純な機能欠損ではなく転移因子の非コード領域への挿入と特定のエンハンサー活性を阻害することで初めて生ずる場合が多いからかもしれない。富田は私の最初の師匠であるが野生集団を用いた 3 世代交配でも、多くの致死突然変異体が見つかるが、致死変異体は系統保存ができないためすべて捨てていると語っていた。富田コレクションが生存可能な自然突然変異体を集めたことから結果的にユニークな転移因子の同定につながっていったのかもしれない。我々が最近ポジショナルクローニングした富田コレクションの一つ *few melanophore(fm)*変異体の原因もメダカではまだ報告されていなかった新しいタイプの DNA 型転位因子であったことも付け加えたい。自然突然変異体に加えてメダカでも大規模な *ENU* による初期発生から器官形成期の突然変異体の同定プロジェクトも行われた(27)。そのプロジェクトで同定された変異体からも原因遺伝子が次々に明らかにされ興味深い遺伝子機能が発見されている。*ENU mutagenesis* によって得られた *hirame* 突然変異体は一旦形成された組織が平板状に再配列するというユニークな表現型を示す。この変異体の原因遺伝子が解析された結果、その原因は *YAP* 遺伝子の *WW1 domain* におけるナンセンス変異であった。*YAP* は細胞増殖を介して組織のサイズ制御を担う *Hippo* 経路の重要な因子であるが、この研究からさらに細胞骨格系の制御を通じて重力に抗して組織のテンションを保ち形態を保持するという新規機能があることが明らかとなった(28)。「変異体から遺伝子へ」という順遺伝学的研究は現在でももっとも強力な遺伝子機能解析法である。メダカでは様々なリソースの整備によってメンデル遺伝する様な突然変異形質ならばマッピングパネルの作成を含めても 1~2 年程度でその変異体の原因遺伝子に至ることが可能となっている。

メダカの逆遺伝学

メダカでは 2010 年頃までは特定の遺伝子の突然変異体を作成する逆遺伝学的方法としては ENU によるランダムな突然変異の誘発と 5760 個体 (96 サンプル x 60 枚) の F1 オスに由来する凍結精子とゲノム DNA からなる TILLING (Targeting Induced Local Lesion IN Genome) ライブラリーが利用されてきた(29)。この TILLING ライブラリーでは 500bp のコード領域を探索した場合にはアミノ酸置換変異を 5 つ程度、また 30% 程度の確率でヌル変異体 (pre mature stop 変異) を得ることができる。変異を同定するためのスクリーニングは High resolution melting (HRM) 法や PCR ダイレクトシーケンス法が用いられている(29, 30) (図 7)。このライブラリーを用いて *p53*、*ATR*、*ATM*、*FSHR*、*Sox9*、*Arom* など様々な遺伝子の変異体が同定されその表現型解析が論文として発表されている。一方で TILLING 法による変異体は多くはアミノ酸置換型の変異なので、表現型が明確でない場合にはアミノ酸置換にかかわらず機能が保全されているのか何らかの補償機構が働いているのかという点が評価しにくいこともあり論文発表までに至らない研究も多く見られた。

2000 年頃から特定のゲノム塩基配列を認識できる Zinc Finger タンパク質と FokI nuclease を融合させた Zinc Finger nuclease (ZFN) が開発され利用されはじめた。この ZFN では Zinc Finger タンパク質がゲノムの任意の配列を認識し結合し、FokI nuclease が二重鎖切断を入れることで特定の遺伝子に突然変異を誘導することができる。ZFN はその後培養細胞から受精卵まで様々な実験系に応用され、多くの成果を上げるようになった。メダカでも 2012 年には安齋らによって外来の GFP 遺伝子に対する ZFN を導入することで GFP 遺伝子を破壊することができることが示された(31)。一方で ZFN では特定の塩基配列を認識する Zinc Finger タンパク質の認識率が十分ではないことから活性のある ZFN を作成するためにはかなりのテストが必要であった。この欠点を補うシステムとして Transcription activator-like effector nucleases (TALENs) が開発された。TALEN は植物病原細菌キサントモナス属から分泌される TALE タンパク質の DNA 結合ドメインと FokI nuclease を融合させた人工制限酵素である。TALE タンパク質の DNA 結合は正確なことから TALEN の開発によって特定のゲノム配列に 2 重鎖切断を入れることが可能となった。メダカでは安齋らによって TALEN を用いて *DJ-1* (*PARK7*) 遺伝子座のノックアウトが作成された (図 8 (A))。この研究をきっかけにメダカでも TALEN を用いたゲノム編集が可能であることが示され、(32) (33) TALEN による変異体が次々と作られた。次にさらに容易にゲノムを改変できるシステムとして CRISPR/Cas9 法が開発された。メダカでは 2014 年にはこのシステムによってメダカゲノムの改変が可能なことを安齋と木下は示した (図 8 (B)) (34)。現在では CRISPR/Cas9 を用いることで理論的にはどのような遺伝子でもそのノックアウト個体を作成することができる。CRISPR/Cas9 によるゲノム編集を応用した技術としてドナーベクターを利用したノックイン法による遺伝子導入も可能となっている(35) (36)。村上らは 2 種類の g RNA (1 つはゲノムの配列挿入領域を認識し、2 つめはドナープラスミドの bait 配列を認識する) と Cas9 とともに図 9 (A) に示

された約 500bp のホモロジー領域と Bait 配列をもつドナープラスミドをメダカ 1 細胞期胚に顕微注射した。その結果ターゲットとした *gap43* 遺伝子座にドナープラスミドは相同組み換えによって正確に挿入され、*gap43* 遺伝子座のプロモーターによって正確に転写翻訳されることを確認している(図 9)(35)。渡我部らは図 10 に示されたメダカ *heat-shock* プロモーターを基本プロモーターとして GFP 或いは RFP-GFP フラグメントをもつドナープラスミドを非相同末端修復によって当該遺伝子の 5'領域に挿入するノックイン法を報告している(図 10) (36)。この方法では村上らの方法に比べるとホモロジー領域を必要としないことからどのような遺伝子座でも同一のドナープラスミドを用いてノックイン法により基本プロモーターを持った GFP/RFP 断片を挿入できる。5'領域に挿入できたドナープラスミドは当該遺伝子のエンハンサーの影響を受けることから高い確率で *de novo* 遺伝子の発現を GFP/RFP の発現として模倣することが可能となる(図 11(A)及び(B))。一般に転写開始点下流で翻訳開始点より上流にドナープラスミドをノックインした場合には内在性の遺伝子機能が欠損する(図 11 (C) (D) (E) (F)) のに対し、転写開始点上流にノックインした場合には内在性遺伝子と GFP/RFP がともに発現すると期待される(36)。しかしノックインによってプロモーター領域が破壊される事や組織によってはプロモーターそのものが異なることもあるため、系統作成に際しては GFP/RFP 発現とともに *de novo* 遺伝子の発現についても検証が必要である。今まで述べたようにメダカでは単純な欠失変異による突然変異体の作成もドナープラスミドによる GFP/RFP フラグメントの挿入も実用レベルで可能である。

終わりに

メダカは遺伝学の材料として 20 世紀初頭から実験動物として用いられ、現在では順遺伝学と逆遺伝学をともに適応できるモデル動物としてゼブラフィッシュとともに世界的に用いられている。遺伝子導入が世界で初めて成功した魚類もメダカである(37)。突然変異体を用いた順遺伝学的手法とともにゲノム編集技術の進展とともにノックアウトとノックインの逆遺伝学的手法が可能となったことから今後さらに多くの研究に利用されると考えている。また 2002 年より開始されたナショナルバイオリソースプロジェクトを通じて材料としてのメダカとともに cDNA/BAC/Fosmid クローンや孵化酵素などの生物遺伝資源と様々な情報が一元的に収集・保存・提供できる体制も整備されている。1985 年ころからメダカの起源を探るため東南アジアの研究者との共同研究・野外調査によって 20 種をこえる近縁種が採集され、現在では NBRP Medaka から提供されている(38)。これらの近縁種はメダカとともに全世界の研究者が自由に利用できる研究材料でもある。またメダカで樹立されたゲノム編集などの基盤的技術はメダカ近縁種にも適応可能であるので、近縁種を用いた進化遺伝学的研究も可能となっている。温帯性のメダカはゼ

ブラフィッシュと異なり低温に対する耐性や日長に应答してその生理をダイナミックに変化させ精巧な季節適応することができる。このようなメダカが持つ種としての特徴を上手く利用した今後の研究が期待される。

1. Aida T (1921) On the Inheritance of Color in a Fresh-Water Fish, APLOCHEILUS LATIPES Temmick and Schlegel, with Special Reference to Sex-Linked Inheritance. *Genetics* 6(6):554-573.
2. Yamamoto TO (1953) Artificially induced sex - reversal in genotypic males of the medaka (*Oryzias latipes*). *Journal of Experimental Zoology Part A: Ecological Genetics and Physiology* 123(3):571-594.
3. Yamamoto TO (1958) Artificial induction of functional sex - reversal in genotypic females of the medaka (*Oryzias latipes*). *Journal of Experimental Zoology Part A: Ecological Genetics and Physiology* 137(2):227-263.
4. Tomita H (1982) Gene analysis in the Medaka (*Oryzias latipes*).
5. Matsuda M, *et al.* (2001) Construction of a BAC library derived from the inbred Hd-rR strain of the teleost fish, *Oryzias latipes*. *Genes & genetic systems* 76(1):61-63.
6. Naruse K, *et al.* (2000) A detailed linkage map of medaka, *Oryzias latipes*: comparative genomics and genome evolution. *Genetics* 154(4):1773-1784.
7. Naruse K, *et al.* (2004) A medaka gene map: the trace of ancestral vertebrate proto-chromosomes revealed by comparative gene mapping. *Genome research* 14(5):820-828.
8. Kimura T, *et al.* (2004) Large-scale isolation of ESTs from medaka embryos and its application to medaka developmental genetics. *Mechanisms of development* 121(7-8):915-932.
9. Kimura T, *et al.* (2005) Genetic linkage map of medaka with polymerase chain reaction length polymorphisms. *Gene* 363:24-31.
10. Fukamachi S, Shimada A, & Shima A (2001) Mutations in the gene encoding B, a novel transporter protein, reduce melanin content in medaka. *Nature genetics* 28(4):381.
11. Nakayama K, *et al.* (2002) Distinctive distribution of AIM1 polymorphism among major human populations with different skin color. *Journal of human genetics* 47(2):92.
12. Matsuda M, *et al.* (2002) DMY is a Y-specific DM-domain gene required for male development in the medaka fish. *Nature* 417(6888):559.
13. Nanda I, *et al.* (2002) A duplicated copy of DMRT1 in the sex-determining region of the Y chromosome of the medaka, *Oryzias latipes*. *Proceedings of the National*

- Academy of Sciences* 99(18):11778-11783.
14. Myosho T, *et al.* (2012) Tracing the emergence of a novel sex-determining gene in medaka, *Oryzias luzonensis*. *Genetics*:genetics. 111.137497.
 15. Takehana Y, *et al.* (2014) Co-option of Sox3 as the male-determining factor on the Y chromosome in the fish *Oryzias dancena*. *Nature communications* 5:4157.
 16. Kasahara M, *et al.* (2007) The medaka draft genome and insights into vertebrate genome evolution. *Nature* 447(7145):714.
 17. Ohtsuka M, *et al.* (2004) Possible roles of zic1 and zic4, identified within the medaka Double anal fin (Da) locus, in dorsoventral patterning of the trunk-tail region (related to phenotypes of the Da mutant). *Mechanisms of development* 121(7-8):873-882.
 18. Moriyama Y, *et al.* (2012) The medaka zic1/zic4 mutant provides molecular insights into teleost caudal fin evolution. *Current Biology* 22(7):601-607.
 19. Inohaya K, Takano Y, & Kudo A (2010) Production of Wnt4b by floor plate cells is essential for the segmental patterning of the vertebral column in medaka. *Development* 137(11):1807-1813.
 20. Nagao Y, *et al.* (2014) Sox5 functions as a fate switch in medaka pigment cell development. *PLoS genetics* 10(4):e1004246.
 21. Kimura T, *et al.* (2014) Leucophores are similar to xanthophores in their specification and differentiation processes in medaka. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 111(20):7343-7348.
 22. Koga A, Suzuki M, Inagaki H, Bessho Y, & Hori H (1996) Transposable element in fish. *Nature* 383(6595):30.
 23. Kawakami K, Shima A, & Kawakami N (2000) Identification of a functional transposase of the Tol2 element, an Ac-like element from the Japanese medaka fish, and its transposition in the zebrafish germ lineage. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 97(21):11403-11408.
 24. Kawakami K (2007) Tol2: a versatile gene transfer vector in vertebrates. *Genome biology* 8(1):S7.
 25. Inoue Y, *et al.* (2017) Complete fusion of a transposon and herpesvirus created the Teratorn mobile element in medaka fish. *Nature communications* 8(1):551.
 26. Inoue Y, *et al.* (2018) Fusion of piggyBac-like transposons and herpesviruses occurs frequently in teleosts. *Zoological letters* 4(1):6.
 27. Furutani-Seiki M, *et al.* (2004) A systematic genome-wide screen for mutations affecting organogenesis in Medaka, *Oryzias latipes*. *Mechanisms of development* 121(7-8):647-658.
 28. Porazinski S, *et al.* (2015) YAP is essential for tissue tension to ensure vertebrate 3D

- p>body shape.
- Nature*
- 521(7551):217.
29. Taniguchi Y, *et al.* (2006) Generation of medaka gene knockout models by target-selected mutagenesis. *Genome biology* 7(12):R116.
 30. Ishikawa T, *et al.* (2010) High-resolution melting curve analysis for rapid detection of mutations in a Medaka TILLING library. *BMC molecular biology* 11(1):70.
 31. Ansai S, *et al.* (2012) Targeted disruption of exogenous EGFP gene in medaka using zinc - finger nucleases. *Development, growth & differentiation* 54(5):546-556.
 32. Ansai S, *et al.* (2013) Efficient targeted mutagenesis in medaka using custom-designed transcription activator-like effector nucleases (TALENs). *Genetics:genetics*. 112.147645.
 33. Ansai S, *et al.* (2014) Design, evaluation, and screening methods for efficient targeted mutagenesis with transcription activator - like effector nucleases in medaka. *Development, growth & differentiation* 56(1):98-107.
 34. Ansai S & Kinoshita M (2014) Targeted mutagenesis using CRISPR/Cas system in medaka. *Biology open* 3(5):362-371.
 35. Murakami Y, Ansai S, Yonemura A, & Kinoshita M (2017) An efficient system for homology-dependent targeted gene integration in medaka (*Oryzias latipes*). *Zoological letters* 3(1):10.
 36. Watakabe I, *et al.* (2018) Highly efficient generation of knock-in transgenic medaka by CRISPR/Cas9-mediated genome engineering. *Zoological letters* 4(1):3.
 37. Ozato K, *et al.* (1986) Production of transgenic fish: introduction and expression of chicken δ -crystallin gene in medaka embryos. *Cell differentiation* 19(4):237-244.
 38. Sasado T, *et al.* (2010) The National BioResource Project Medaka (NBRP Medaka): an integrated bioresource for biological and biomedical sciences. *Experimental animals* 59(1):13-23.



図 1. (A) 鈴木春信「めだかすくい」と (B) 毛利梅園「梅園魚譜」
 (国会図書館デジタルコレクションより引用)
 江戸時代にはすでに野生のクロメダカとともにヒメダカやシロメダカが知られていた。

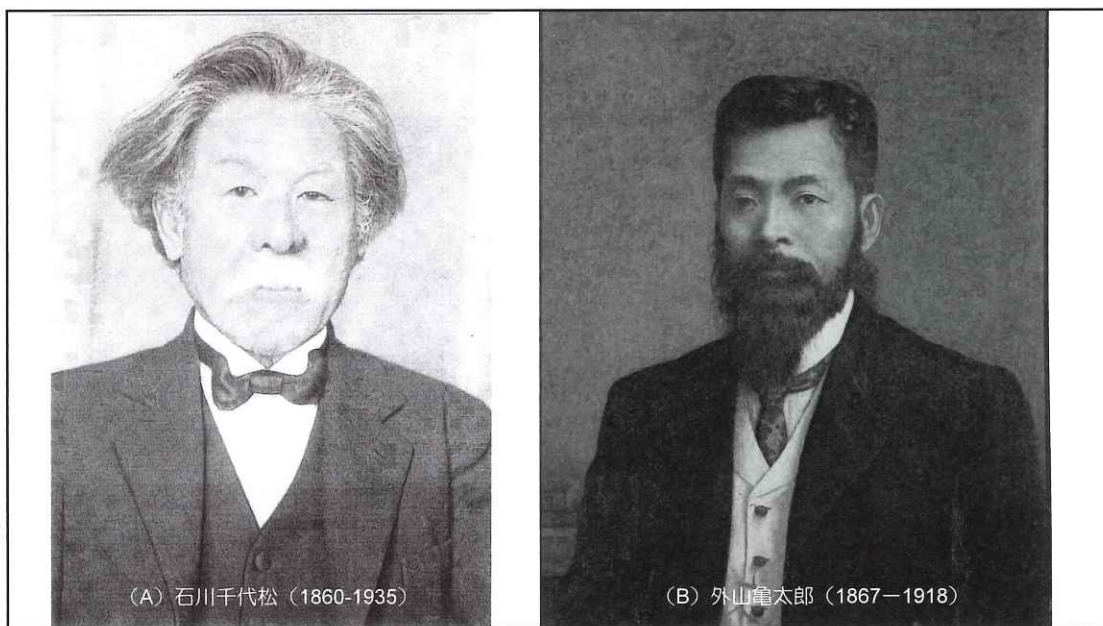


図 2. (A) 石川千代松 東京帝国大学農科大学教授東京動物学会（現在の日本動物学会）
 会長と (B) 外山亀太郎 東京帝国大学農科大学教授 カイコ遺伝学の創始者

外山亀太郎

一ニのMENDEL性質に就いて 日本育種学会会報第一巻第一号（1916）
メダカとアサガオを使ってメンデル遺伝を証明した論文

1. 普通暗色魚	60=56.25	9
2. 赤色魚	20=18.75	3
3. 青色魚	15=18.75	3
4. 白色魚	5=6.25	1
100		

白色魚 × 暗色魚

次世代の子供は暗色魚（F1）

次次世代（F2）は左記の割合で誕生した メ
ンデルの両性雑種で説明ができる

1. 普通暗色魚	41	1
2. 赤色魚	35	1
3. 青色魚	46	1
4. 白色魚	40	1

♀純白色魚 × ♂（♀白×♂普色暗色魚）F1
各色のメダカが同じ割合で誕生

図 3. 外山と石川の業績

論文は日本語で記載されている。1900年に植物で再発見されたメンデル遺伝（メンデルの法則）を、
1910年には、メダカを用いて動物（脊椎動物）でも成り立つことを完全に証明している。



図 4. 會田龍雄（1871-1957）と自宅庭のメダカ飼育施設

メダカ遺伝学が国際的に知られるきっかけとなった「限性遺伝（sex limited inheritance）」を発見した。



図 5. 山本時男（1906-1977）とニューヨーク州立大学ハミルトン教授
自宅での感謝祭のポートレート

山本とともに若き日の富田も同席している。名古屋大学教授 受精波説の提唱、d-rR 系統をもちいた人
為的性転換体の作出を行った。

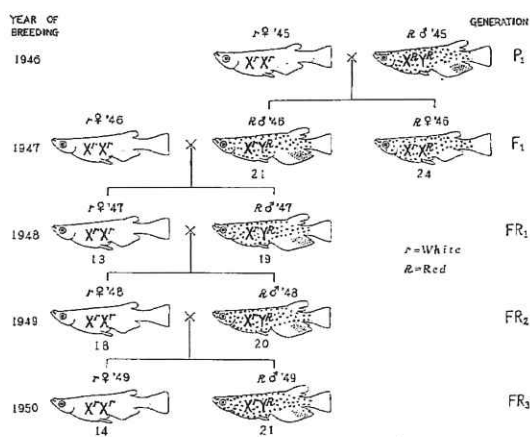


Fig. 1 Genealogical diagram of the *Oryzias latipes* used in the experiments.

(A) d-rR系統の樹立

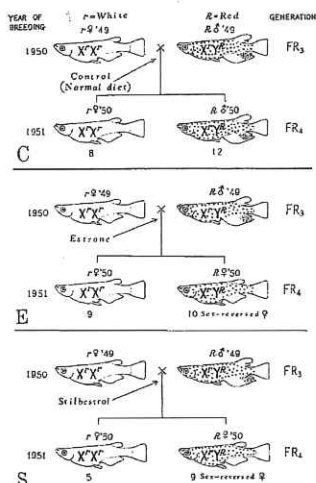


Fig. 2 Diagrams of the effect of estrone on sex-differentiation in *Oryzias latipes*.

(B) 男性ホルモンと女性ホルモン投与による人為的性転換

図 6. 山本時男の業績

(A)d-rR 系統(遺伝的メスが白色で遺伝的オスが赤色)の樹立体色で遺伝子型が分かると(B)エストロゲンにより遺伝的オスから機能的メスへの性転換が起こる。またアンドロゲンにより遺伝的メスから機能的オスへの性転換も起こる

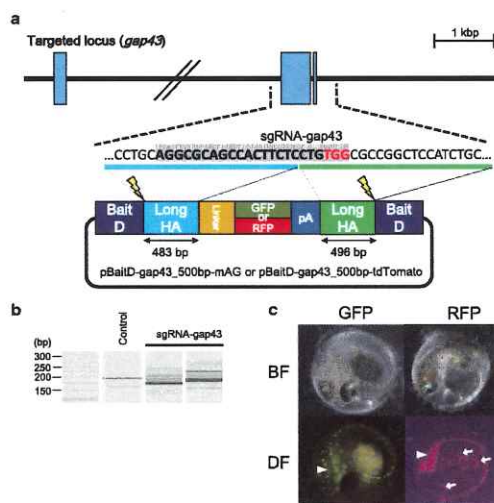


図 9. 相同組換えによるノックイン法の概要

Germ-line transmission rate は 7 ~ 9% (2/28)(1/11)

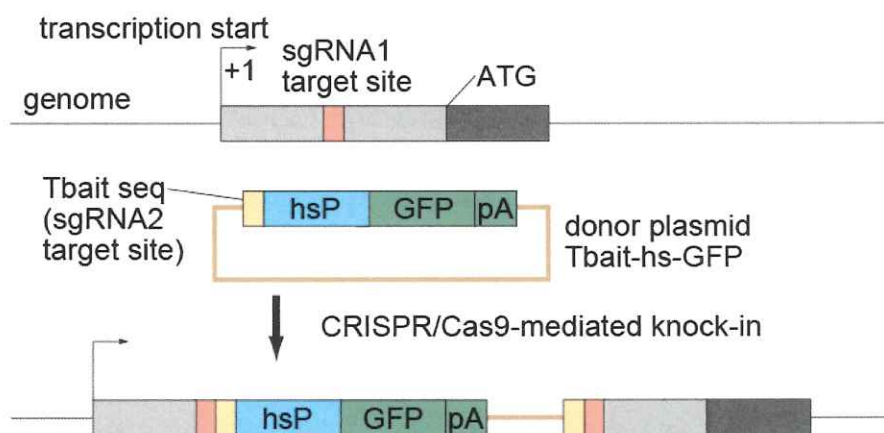
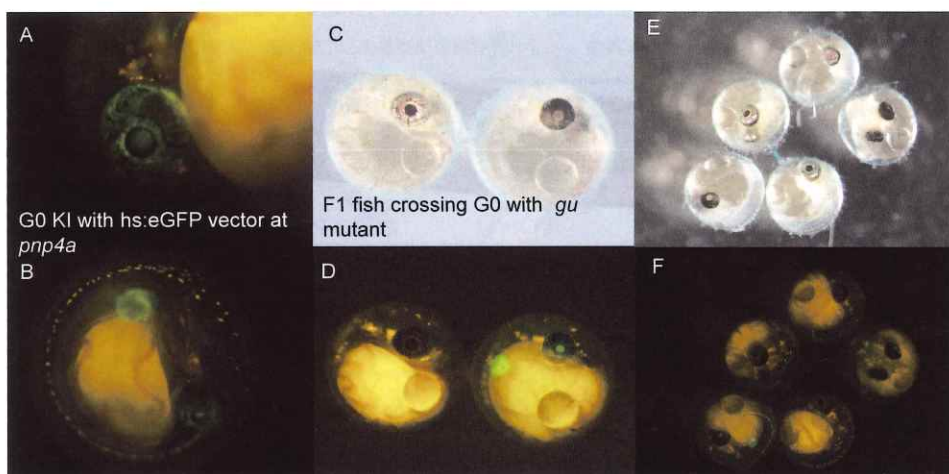


図 10 非相同末端結合によるノックイン法の概要

Germ-line transmission rate は ~ 67.6 % (5/10) (1/1)(7/10)(6/7)(3/6)



Medaka with KI of the eGFP plasmid at the *pnp4a* locus showed less pigmented iridophores resembling the *gu* phenotype

図 11 *pnp4a* 遺伝子座にノックインした eGFP の発現

(A) 及び (B) *pnp4a* が発現する虹色素胞において eGFP の発現が見られる。(C)(D)(E)(F) *pnp4a* の変異体である *gu* とノックインアレルの F1 では虹色素胞でグアニン形成が抑制される。またグアニン形成が抑制された胚はすべて eGFP 発現が観察される。

絶滅危惧種の特徴を iPS 細胞と発生工学で解き明かす

本多 新

京都大学大学院医学研究科附属動物実験施設

【はじめに】

哺乳動物の雌雄は性染色体によって規定されています。メスならば XX 型、オスならば XY 型であり、オスとして発生するためには Y 染色体（上の遺伝子）が必要不可欠です。Y 染色体は、雄性決定遺伝子の器として機能していますが、進化に伴い短縮し続けており、もしかすると将来は、Y 染色体自体が消失してしまう可能性もあります。もしも、Y 染色体が消失してしまった種は、どのように性決定するのでしょうか？オスという性はなくなってしまうのでしょうか？

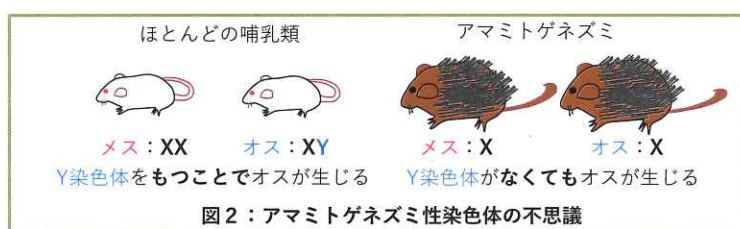
奄美大島のみに生息する絶滅危惧(IB)類のアマミトゲネズミ^{*1}は、進化の過程で Y 染色体を失っており、極めて稀な性染色体構造（雌雄共に XO 型^{*2}）をもつ不思議な動物です。つまり X 染色体 1 本のみで雌雄が区別されるのです。ゲノム間雌雄差は見いだされておらず、性決定様式や染色体構成、あるいは種の進化など様々な観点から、非常に興味深い研究ターゲットですが、その希少性から、野生にいるトゲネズミの胚や個体を使った解析は現実的ではありません。

我々の研究チームは、フィールド調査の過程で得られた、メスのアマミトゲネズミの尾部先端から体細胞を増やし、そこからナীব型^{*3}の iPS 細胞を樹立しました。ナীব型 iPS 細胞は「キメラとして胚に寄与できる」そして「生殖細胞に分化できる」という特徴をもちます。そこで、アマミトゲネズミの iPS 細胞をマウス胚に注入し、マウスとの異種間キメラ^{*4}を作製しました。メスのアマミトゲネズミから作られた iPS 細胞は、マウスとの異種間キメラとして胚や産仔の体中に寄与し、成獣の卵巣では卵子に分化^{*5}していました。さらに驚くべきことに、オスの異種間キメラにおいて、精子細胞にも分化していることが判明しました。一般的な哺乳動物の場合、メス(XX 型)の iPS 細胞が精子として分化・維持されることがありません。しかしながら、トゲネズミの細胞は Y 染色体非依存的にオスが生じるように進化してきたため、メスの(XO 型)の細胞であっても精子細胞に分化できる柔軟性があることが明らかになりました。今回の研究成果は、哺乳動物における性決定様式進化に迫るだけでなく、種の完全絶滅に備えるための一手段として iPS 細胞の活用が有効であることも示唆^{*6}しています。

【背景】

ヒトを含むほとんどの哺乳動物は性染色体によってその雌雄が決定されます。性染色体は X 染色体と Y 染色体から成り、性染色体が XX 型ならばメスが XY 型ならばオスが生じます。つまり Y 染色体（の遺伝子）があるか否かでオスになるかメスになるかが決定します。しかしながら、Y 染色体は進化の過程でどんどん退縮しており、X 染色体に比べて非常に小さいことが知られています。このまま退縮していけば、将来 Y 染色体が消失してしまう可能性もあります。Y 染色体が消失したその先の未来は誰にもわかりません。しかし、奄美大島のみに生息するアマミトゲネズミは、その進化の過程ですでに Y 染色体を失っており、雌

雄共に XO(エックスオー)型という極めて珍しい動物です。つまり、X 染色体一本で (Y 染色体なし) でもオスが生じます。個体の外見から雌雄は明確に判別できるものの、ゲノム間の雌雄差はこれまでほとんど見いだされておらず、哺乳動物進化にとってはるかに進んだ動物なのかもしれません。たいへん興味深い研究対象ですが、森林伐採やノネコ・マングースの影響により個体数が激減し、レッドデータブック絶滅危惧種 IB に選定されていることから、アマミトゲネズミの胚や個体を用いた研究は非現実的です。



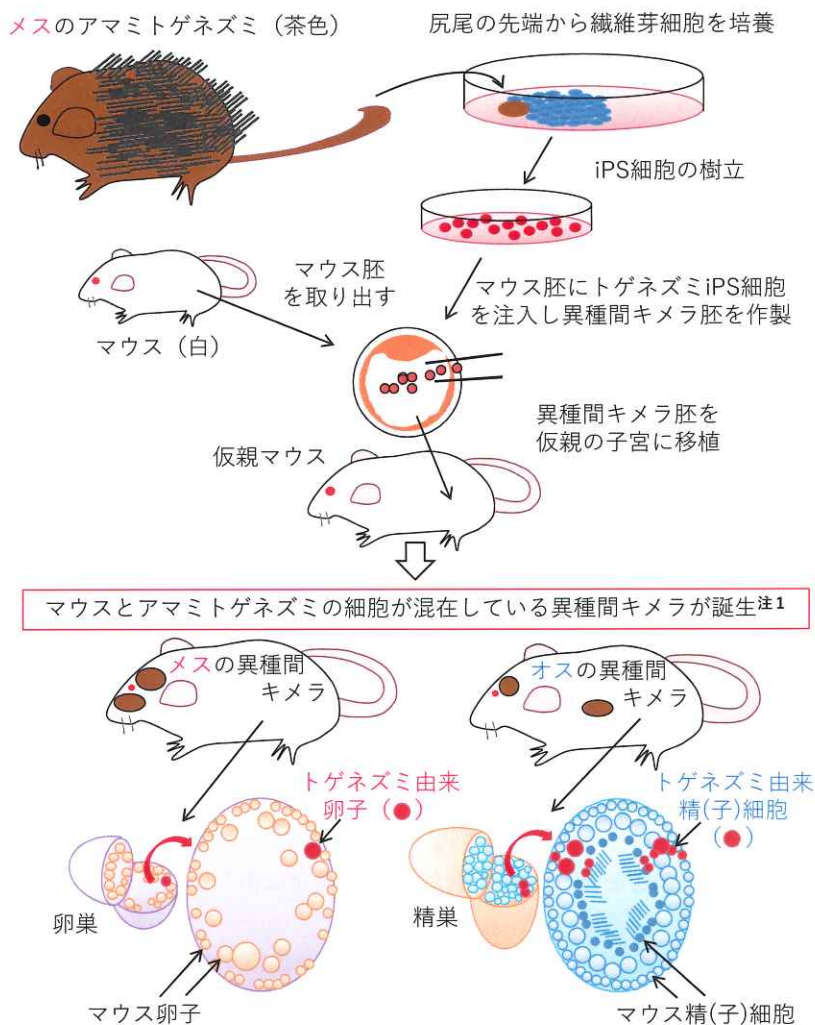
【研究成果とその意義】

私達の研究チームは、このような制限を克服するために、フィールド調査で得られたメスのアマミトゲネズミ尾部先端の細胞を増やし、それをもとにナイーブ型の iPS 細胞を樹立しました。次に研究チームはトゲネズミの iPS 細胞を体を含むキメラ動物を作製することに挑戦しました。もしもアマミトゲネズミ iPS 細胞がキメラとして個体の様々な細胞・組織に寄与すれば、アマミトゲネズミ細胞の特徴的な生体内挙動を捉えることができるかもしれないからです。しかしながら、絶滅危惧種のトゲネズミの胚や代理母は用意できないため、マウス胚とマウス代理母を用いて、トゲネズミとマウスの異種間キメラを作製しました。メスのアマミトゲネズミ iPS 細胞はマウス細胞と混ざり合い、異種間キメラとして全身に寄与しただけでなく、メスのキメラ卵巣では卵子に分化していました。これまで、マウスとラット以外の iPS 細胞がキメラとして成体に寄与し生殖細胞にまで分化した例はなく、また当然絶滅危惧種の細胞を体を含んでいる個体が作製されたのも世界で初めてです。さらに驚くべきことに、メス由来のトゲネズミ iPS 細胞がオスのキメラに寄与した場合、精子細胞にも分化していました。マウスなどではメスの iPS 細胞が精子として分化・維持されることはありません。精子として維持されるためには Y 染色体 (の遺伝子) が必要不可欠だからです。しかしながら、もともと Y 染色体がなくても、オスとして精子が生じるように進化してきたアマミ

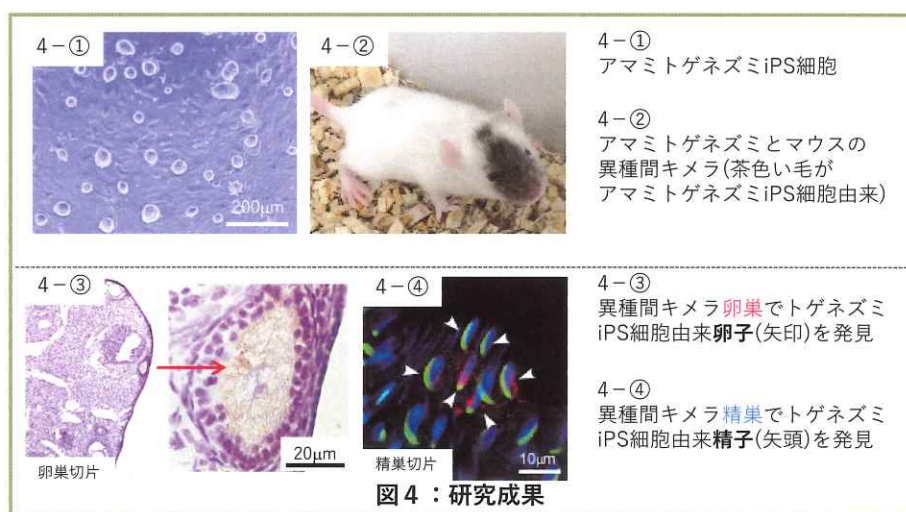
トゲネズミの場合、メスの細胞からでも精子細胞が生じるような柔軟性を獲得していると考えられます。

また、本研究ではもう一つ大きな示唆が得られました。現在、地球は深刻な生物の絶滅期にあり、その多様性が脅かされています。種の完全喪失は生命誕生から約40億年かけて培われた命の営みの一つが途絶えることを意味し、一度失われてしまえば、そこからの生物資源復活は容易ではありません。我々は一個体の絶滅危惧種由来 iPS 細胞から卵子と精子を生じさせることに成功しています。種の完全喪失の備えとして iPS 細胞が非常に効果的であることも証明されました。

図3：本研究の概要



注1 | 一般的に、生まれてくる異種間キメラの性別は、トゲネズミ iPS 細胞が注入されるマウス胚の性別に依存します。オスのマウス胚にメスの iPS 細胞を注入すれば、オスの異種間キメラが生まれ、メスのマウス胚に注入すればメスの異種間キメラが生まれます。



【今後】

本研究では絶滅危惧種アマミトゲネズミの一個体から iPS 細胞を樹立し、異種間キメラの生殖巣内で卵子と精子を生じさせることに成功しました。しかし異種間キメラ内で生殖細胞が生じる効率はまだ低いため、今後は体外で効率良くアマミトゲネズミの卵子や精子を作出して初期胚をつくり、その性染色体構成と発生メカニズムの相関を調べる研究を行います。また、他の絶滅危惧種でも同様の研究を行うことにより、iPS 細胞を経由した稀少生物資源の保護への展開も期待されます。

【本研究成果論文】

Arata Honda, Narantsog Choijookhuu, Haruna Izu, Yoshihiro Kawano, Mizuho Inokuchi, Kimiko Honsho, Ah-Reum Lee, Hiroki Nabekura, Hiroshi Ohta, Tomoyuki Tsukiyama, Yasuhide Ohinata, Asato Kuroiwa, Yoshitaka Hishikawa, Mitunori Saitou, Takamichi Jogahara, and Chihiro Koshimoto. Flexible adaptation of male germ cells from female iPSCs of endangered *Tokudaia osimensis*. *Science Advances* (2017) 3: e1602179

【用語解説】

※1『アマミトゲネズミ』 鹿児島県の奄美大島のみに生息するトゲネズミ属の一種で、国指定天然記念物です。環境省のレッドデータブックでは絶滅危惧 IB 類に選定されています。森林の伐採やノネコ・マングースによる影響で個体数が減少しています。最近ではノネコ・マングースの捕獲駆除が功を奏し、個体数が増加の傾向にあります。

※2『XO 型』 ヒトを含めほとんどの哺乳動物は性染色体が雌/雄=XX/XY 型です。Y 染色体を持てば雄に、Y 染色体がなければ雌として生まれてきます。一方、アマミトゲネズミは進化の過程で Y 染色体を失っており、雌雄共に XO (エックスオー) 型であるため、ゲノム上の雌雄差がほとんど見いだされていない不思議な動物です。しかしながら、それでも明確に雄と雌が存在しています。

※3『ナイーブ型』 iPS 細胞などの多能性幹細胞は二つのタイプに分類することができます。ナイーブ型とプライム型です。ナイーブ型 iPS 細胞ならば、キメラ動物や生殖細胞を作ることができると考えられていますが、現在マウスとラット以外でキメラ作製や生殖細胞の作製にまで至った例がないことから、真のナイーブ型幹細胞はマウスとラット以外からは樹立されていないとされています。一方、ヒトを含む多くの哺乳動物の iPS 細胞はプライム型であるため、キメラや生殖細胞を作るとは非常に困難と考えられています。

※4『異種間キメラ』 キメラとは一つの個体内に異なる遺伝情報をもつ細胞が混ざりあった状態、あるいはその個体のことをいいます。異種間キメラとはマウスとラットなど、別の動物種の細胞が混ざり合った一つの個体のことを意味し、これまで iPS 細胞で作製された異種間キメラで成体にまで成長したのはマウスとラットの異種間キメラのみです。

※5『分化』 iPS 細胞などの多能性幹細胞は様々な細胞に変化する能力をもっています。幹細胞が他の細胞に変化することを「分化」といいます。本研究ではトゲネズミ iPS 細胞が異種間キメラ内で全身の細胞だけでなく卵子や精子にも分化しました。

※6『“個体再生へ”という期待に対する注意』 本研究では絶滅危惧種アマミトゲネズミの iPS 細胞から卵子と精子細胞を生じさせることに成功しました。今後は他の絶滅危惧種への展開も期待されますが、このように作製された絶滅危惧種の卵子や精子から個体を生み出す研究は、さらに研究を発展させる必要があり、現在の技術では非常に困難です。また、もしも将来個体が作出されたとしても、その個体は貴重な生物資源として厳重に管理された屋内環境などでのみ、復活・飼育されるべきであり、そのような個体を野生に放つような展開は、野生個体群への新たな悪影響を与えかねないため、現段階では行われるべきではありません。絶滅危機への最も有効な手段は生息域内での保護活動に他なりません。

<第138回研究会（平成30年 6 月22日）>

テーマ：実験動物学的見地から腸内細菌叢を考える

1. 疾患モデル動物を用いたシンバイोटイクスの試み

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）

2. 腸内細菌叢研究のツールとしての無菌動物とノトバイオート

平山 和宏（東京大学大学院農学生命科学研究科獣医公衆衛生学）

3. 腸内細菌叢の網羅的な解析と、その考え方に基づく最近の話題

森田 英利（岡山大学大学院環境生命科学研究科動物応用微生物学）

大正四年四月廿五日
東京府立第一高等學校
校長 大島 正
教員 大島 正
生徒 大島 正
（以下略）

疾患モデル動物を用いたシンバイオティクスの試み

久保 薫

奈良県立医科大学先端医学研究機構施設部 動物実験施設

「内なる外」である腸管内には、数百種類以上、およそ 100 兆個に及ぶ腸内細菌が生息し、この集団を腸内細菌叢 (gut microbiota) と呼び、これらは宿主が摂取した食物等の量や質などに大きく影響を受けて、その構成が最適化されている。逆に、腸内細菌の構成自体や腸内発酵により産生される代謝物 (短鎖脂肪酸など) が腸管の上皮細胞、免疫細胞、(中枢・抹消) 神経細胞、内分泌細胞や脂肪細胞に作用し、腸管環境を含めた生体機能全体に影響を与え、それが再び腸内細菌叢の構成に影響を与えている。宿主-腸内細菌叢間クロストークに基づく複雑な腸内生態系、すなわち「腸内エコシステム」が形成されている。この腸内エコシステムは、宿主の遺伝的素因や過度の外的環境要因によりその恒常性が破綻 (dysbiosis) すると、炎症性腸疾患や大腸癌といった腸管関連疾患、肥満や糖尿病など代謝疾患、関節リウマチなどの自己免疫疾患にまで影響することが知られている。

一方、慢性閉塞性肺疾患 (COPD) は、肺の炎症反応に基づく進行性の気流制限を呈し、慢性の咳、痰、労作性呼吸困難を主症状とする疾患で、主因は喫煙であり、世界保健機構は、2020 年には全世界で死亡原因の 3 位に入ると予測している。高齢化が進み、喫煙率が高い本邦では、患者の大幅な増加が危惧され、発症・進行の予防が急務とされる。しかし禁煙以外に有用なものは確立されていない。最近、食物繊維が受動喫煙者に対して鎮咳効果をもたらすことが大規模な疫学的調査により明らかされた。COPD の発症予防の観点から注目されているが、その機序は未だ解明されていない。食物繊維は小腸まで消化されずに腸内菌叢により有機酸へと代謝される。その有機酸の中で短鎖脂肪酸は大腸で吸収され、消化管粘膜の再生だけでなくエネルギー源としても活用され、抗炎症作用や抗酸化ストレス作用を持つことも報告されている。

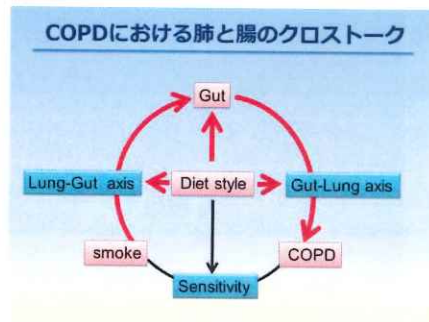


図 1

以上の背景から、友田博士 (現在、川崎医科大学総合内科学 1、教授) らと喫煙と食生活を環境因子とした肺-消化管ネットワーク仮説 (図 1) を基に喫煙曝露による腸内環境

への影響ならびに食物繊維除去食による肺気腫への影響を検討した。その結果、Wistar-Kyoto ラットに対する4週間の喫煙曝露 (Hi-Lite®20 本/回, 2 回/日, 12 回/週) により、①体重増加の抑制、②糞便中のビフィズス菌量の有意な減少と短鎖脂肪酸 (酢酸、酪酸、プロピオン酸) 濃度の有意な減少などが認められた。また、常法により作成した Wistar-Kyoto ラットにおけるエラスターゼ誘発肺気腫が AIN-93G よりセルロースを除去した飼料 (以下、セルロース除去飼料) の摂取による増悪し、さらに不規則な摂餌により増長することが認められた。そこで、これらの実験成績を踏まえ Wistar-Kyoto ラットよりも喫煙に感受性の高い SHR (spontaneously hypertensive rat: 高血圧自然発症ラット) に8週間の喫煙曝露 (Hi-Lite®20 本/回, 2 回/日, 12 回/週) とともにセルロース除去飼料の不規則な摂餌を実施したところ、肺気腫が誘発され (図2)、腸内環境においてはビフィズス菌と総有機酸濃度の減少がみられ、体重減少に加え、病理組織所見から炎症性浸潤細胞の肺泡マクロファージ、好中球とリンパ球の浸潤に有意な増加が認められた。加えて、血液内 BCAA (Branched Chain Amino Acid; 分岐鎖アミノ酸^{注1)}) 量の減少と大腿骨骨塩量の減少を特徴とした。この肺気腫モデル動物に対して腸内細菌叢の改善効果に基づく肺気腫を改善する食材を模索した結果、プレバイオティクス^{注2)} として補助栄養食品である GFO® (GFO: Glutamine Fiber Oligosaccharide, 大塚製薬 (株)) とプロバイオティクス^{注3)} として特定保健用食品であるビフィズス菌 BB536® (*Bifidobacterium longum*, 森永乳業 (株)) を組み合わせたシンバイオティクス^{注4)} としての食材 (以下、GFOB) を摂取することが腸内細菌叢と肺気腫の改善に有効であることを見出した (図3)。

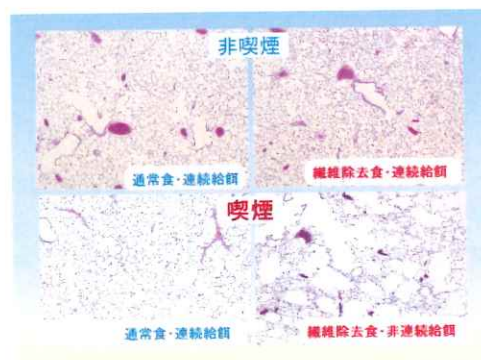


図2

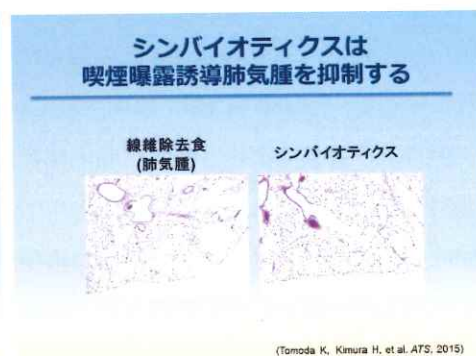


図3

次に、このシンバイオティクスの更なる有用性を求めて腸内細菌叢のアンバランスを背景に全身性炎症を伴うⅡ型糖尿病モデルマウス (BKS.Cg-*Lep^{db}/+* *Lep^{db}*) における難

治性創傷に対する GFOB の効果を検討し、腸内細菌叢および創傷遅延の改善が得られた (図 4)。このとき、GFO にも腸内細菌叢の改善が得られるものの、創傷遅延の改善に至らなかったこと及び BB536 単独では腸内細菌叢および創傷遅延を改善しなかったことから、GFO による腸内環境の改善が BB536 の特異的な働きを活かすに必要なであると推察された。一方、GFOB は Lewis 系ラットを用いたアジュバント関節炎に効果はなかった。そこで、改変シンバイオティクス (グルタミン、ポリデキストロース、ラクチュロースと BB536 の混合) を考案し、アジュバント関節炎に有効な混合比を見出した。このとき、腸内細菌叢の改善に伴う、短鎖脂肪酸 (酢酸、酪酸) 産生の亢進を認めた (図 5)。更に、自己免疫疾患である乾癬に対する改善の可能性をイミキモド軟膏で誘導される乾癬様皮膚炎を Lewis 系ラットで検討し、改善効果を得た。

組成成分と創傷治癒効果

Compound	Relative wound area (%) on day				
	2	4	7	11	14
Cellulose deficient diet	99.4 ± 1.3	96.0 ± 1.4	99.1 ± 3.1	78.7 ± 3.4	66.5 ± 8.7
Cellulose deficient diet + 5%GFO	101.1 ± 2.0	98.9 ± 1.7	90.4 ± 3.4	78.6 ± 9.5	65.6 ± 15.0
Cellulose deficient diet + 5%GFO + 0.1%BB	98.6 ± 2.5	96.5 ± 3.1	90.4 ± 1.8	78.7 ± 1.6	62.2 ± 4.6
Cellulose deficient diet + 5%GFO + 1%BB	102.2 ± 2.1	97.3 ± 2.6	90.0 ± 3.5	71.9 ± 11.4	52.6 ± 17.3*
Cellulose deficient diet + 5%GFO + 5%BB	100.9 ± 0.9	100.2 ± 4.1	94.7 ± 3.4	80.8 ± 0.4	67.6 ± 2.8
Cellulose deficient diet + 5%FO + 1%BB	100.1 ± 2.9	95.3 ± 4.3	88.9 ± 2.7	77.5 ± 4.9	63.1 ± 7.7
					52.7 ± 8.7

Each figure indicates the mean ± S.D. for three to five animals.
The mean wound area was about 19.5 cm² on day 0.
*P<0.05; significant relative to the cellulose deficient diet group.

図 4

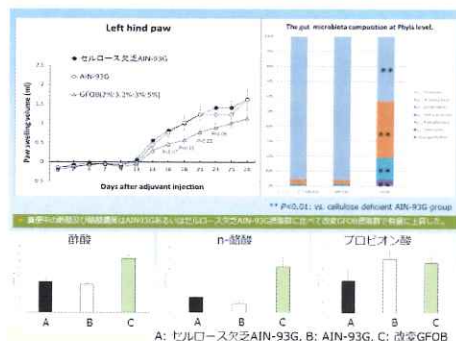


図 5

以上より、食物繊維欠乏食と不規則な食生活を背景とした肺-消化管ネットワーク仮説に基づき、喫煙曝露により SHR で肺気腫モデルを作成した。この肺気腫モデルに対して GFOB が腸内細菌叢と肺気腫の改善に有効であることが明らかとなった。更に、GFOB が II 型糖尿病動物における難治性創傷を、改変 GFOB が Lewis 系ラットのアジュバント関節炎や乾癬様皮膚炎の改善が得られた。作用機序については、短鎖脂肪酸 (酢酸、酪酸) 産生の亢進やグルタミン及び BB536 の特性の他、更なる解析が必要である。

注 1) 運動時の筋肉でエネルギー源となる必須アミノ酸である、バリン、ロイシン、イソロイシンの総称で、ヒトが体内で作ることができないアミノ酸。

注 2) ヒトに有益な作用をもたらす生きた微生物群であるプロバイオティクスの働きを助ける物質とそれらを含む食品。

注 3) 英国の微生物学者 Fuller による 1989 年の定義「腸内フローラのバランスを改善することにより人に有益な作用をもたらす微生物」また、「十分量を摂取した時に宿主に有益な効果を与える生きた微生物」とも定義されている。なお、その微生物を含む食品 (ヨーグルトや乳酸菌飲料) 自身をプロバイオティクスと呼ぶこともある。

注 4) 英国の微生物学者 Gibson により提唱された用語。

平山和宏

東京大学大学院農学生命科学研究科獣医公衆衛生学教室

はじめに

我々の腸内には膨大な数の細菌が住んでいる。特に大腸には内容物 1g 当たり 10^{11} 個以上の多様な細菌がおり、細菌同士あるいは宿主と密接な相互関係を持って安定した生態系、腸内細菌叢を構成している。腸内細菌叢は、宿主の代謝を上回るといわれる活発な代謝活性を有し、宿主の健康や疾病、生理機能に重要な役割を果たしている。その役割は宿主に有益なものもあれば、有害に働く場合もある。近年では免疫系の正常な発達に重要な役割を持つことや、肥満や糖尿病への関与、行動や脳の機能への影響など、腸管以外の全身への影響についての報告もみられる。しかし、腸内細菌叢は細菌同士および宿主と密接な相互関係を持った複雑な生態系であるため、腸内細菌叢の役割を研究することは容易ではない。そのため、腸内細菌叢の生態や代謝を研究するための様々な技術が開発されてきた。

表 1. 腸内細菌叢研究に用いられる手法

In vitro モデル

試験管または培養槽による培養

連続流動培養

In vivo モデル

ヒトボランティアを用いた研究

投与経路の違いによる比較

菌叢の有無による違い

抗生物質処理

無菌動物

研究方法には大きく分けて、培養を基礎とする方法と、培養を必要としない分子生物学的手法がある。近年の分子生物学的手法の進歩はめざましく、特にいわゆる次世代シーケンサーの登場により、腸内細菌叢の網羅的な解析が飛躍的に進んでいる。一方で、腸内細菌叢の代謝や宿主におよぼす影響の解明には、培養を基礎とした *in vitro* および *in vivo* における研究も依然として不可欠である。

培養を基礎とした研究方法

In vitro モデルには、試験管または培養槽中における培養やこれらを発展させた連続流動培養装置がある。ただし、*in vitro* モデルだけでは宿主からの要因や腸内細菌叢が宿主におよぼす効果などの研究はできない。

In vivo の研究方法として、対象とする動物そのもの、ヒトの腸内細菌叢の研究であれば、ヒトのボランティアを用いた研究がある。これは最も直接的な方法ではあるが、例えばヒトを対象とした研究のように、対象の遺伝的背景や食餌をはじめとした各種環境要因の制御が難しいなどの様々な困難がともなう。発癌物質などの有害物質や病原菌を投与する実験などは倫理的に行うことができない。また、消化管各部の採材はしばしば困難である。従って、ヒトの腸内細菌叢の研究であっても、実験動物を用いた研究は必要である。

抗生物質処理と無菌動物

研究対象となる物質を実験動物に、腸内細菌叢に接触する経路（経口投与）と接触しない経路（静脈内投与や腹腔内投与）で投与して比較することにより、腸内細菌叢の役割を *in vivo* で推定することができる。ただし、腸管を経由しない経路であっても、必ずしも腸内細菌叢の影響を受けないとは限らないため、腸内細菌叢の役割や代謝を研究するためには、腸内細菌叢を持つ動物と持たない動物の比較が有用である。

腸内細菌叢を持たない動物を作出する簡便な方法は、非吸収性の抗生物質を経口投与することである。適切な抗生物質を使用することにより、腸内細菌叢をかなり抑制した状態に保つことができる。ただし、実験期間を通して抗生物質を投与し続ける必要があり、抗生物質の投与を中止すれば腸内細菌叢が速やかに再定着を始めてしまう。投与を継続していても、しばしば真菌や耐性菌などの耐性のある微生物が定着し始めてしまうため、抗生物質処理による研究は短期間の実験に限られ、発癌実験などの長期間を要する研究には適さない。また、抗生物質そのものが宿主に影響を与える可能性も考慮しなければならない。

より確実にあるいは長期にわたって腸内細菌叢が存在しない動物を用いる研究には、無菌動物が必要となる。無菌動物とは検出できる微生物や寄生虫が一切存在しない動物である。無菌アイソレータ内で外界と完全に隔離して飼育し、飼料や飲水、飼育器材等はすべて滅菌したものをを用いなければならないが、長期間にわたって無菌状態を保つことができる。繁殖も正常に行うことができる。無菌動物を用いれば、1 種類あるいは複数の既知の細菌のみを定着させて、それらの菌（群）の役割や生体への影響、相互作用などを観察することも可能である。無菌動物に既知の菌株のみを定着させた動物をノトバイオート動物

と呼ぶ。

無菌動物の歴史

無菌動物の研究は 1890 年代にモルモットを用いて始まった。その後、モルモット以外にニワトリやヤギなどで無菌動物作出の試みが続き、飼育器材や人工保育技術の改良などが行われた結果、1940 年代から 50 年代に米国、スウェーデンおよび日本の研究グループによってニワトリ、ラット、モルモットなどの無菌長期飼育が成功した。

現在では、家畜を含めた様々な動物で無菌化が成功しており、実験動物として最も一般的なマウス、ラットを中心として多くのコロニーが確立されている (1)。

現在最も広く用いられている無菌動物は、実験動物として汎用されるマウスとラットであるが、無菌動物研究の初期には、出生時における新生子の成熟度が高く、人工保育が比較的容易であることからモルモットが多く用いられた。ウサギの無菌化はモルモットよりも困難であり、ハムスターでは無菌化が極めて難しい。ブタ、ヤギ、ヒツジ、ウシ、ウマといった家畜も無菌化されている。家畜は人工保育が比較的容易であり、サイズが大きいので血液などの試料の採取にも有利である。一方で、その大きさのために成体まで飼育することは困難であり、無菌飼育下での繁殖の報告はない。ニワトリは卵の表面を滅菌しアイソレータ内で孵化させることにより、比較的容易に無菌化することができる。孵化直後から自ら餌をとることができ、人工保育の必要もないが、その大きさのために無菌状態での長期の飼育は困難である。体型がより小さいウズラでは無菌環境下での繁殖の報告もある。

無菌動物の特徴

無菌動物には腸内細菌叢が存在しないため、形態学的あるいは機能的に様々な点で腸内細菌叢を持つ動物とは大きく異なる (2)。よく知られている特徴の一つが盲腸の肥大である。無菌動物の盲腸は著しく肥大し、液体状の内容物で満たされている。盲腸壁の筋層の発達も悪い。ニワトリやイヌなどのげっ歯類以外の無菌動物では盲腸の肥大が起こらないことも報告されている。

小腸では粘膜固有層が薄く、絨毛は細くて均一であり、陰窩は短く数が少ない。無菌動物の上皮細胞のターンオーバーは通常の細菌叢を持つ動物の約半分であることも報告されている。腸内細菌叢からの抗原刺激を欠くため、免疫学系の発達の度合いも大きく異なっ

ている。腸管の上皮内リンパ球や形質細胞は著しく少なく、リンパ節も細菌叢を持つ動物の約半分で活性中心を欠く。血中のイムノグロブリン量も低い (3, 4)。

無菌動物の利用

無菌動物研究の初期には、無菌動物を作製すること自体が研究の目的であり、宿主にとって腸内細菌叢は不可欠であるか、あるいは有害であるかが興味を中心であった。現在では、生理学、栄養学、感染症研究など様々な分野の研究に応用されている。最近では免疫学の分野での応用が目立つが、メタボリック・シンドロームや行動学などの研究にも広く応用されている。脳神経、精神活動に関する分野などでも利用され始めた。商業的には、SPF 動物を作り出すためにも無菌動物は用いられている。

無菌動物を用いることにより、宿主の生理や健康、疾病などに腸内細菌叢がどのような役割を持っているのかを研究することが可能となる。また、現在ではすでに確立された無菌動物コロニーを里親とすることにより、様々な疾患モデル動物を煩雑な人工保育をすることなく比較的容易に無菌化することが可能となっている。無菌化することにより、発症や症状の重篤度が変化したりすることが報告されているモデル動物も多い。

無菌動物に既知の菌 (群) のみを定着させたノトバイオート動物は、その菌 (群) が宿主に与える影響を明らかにすることに役立つ。無菌動物には各種細菌の定着や感染が成立しやすく、病原細菌の病原性や病態、他の菌株との同時投与による感染抑制効果などを研究する動物モデルとすることもできる。近年では、細菌だけでなくウイルスの感染についても、無菌動物を用いた研究によって腸内細菌叢が感染防御や逆に感染増悪に働くことがあることが明らかとなりつつある。

実験動物とヒトの腸内細菌叢は、その構成菌種やバランス、代謝活性などが大きく異なるため、動物実験で得られた腸内細菌叢に関する知見をヒトへ外挿することには問題があることも多い (図 1)。無菌動物にヒトの糞便懸濁液を経口投与することにより、ヒトの腸内細菌叢を実験動物の腸内に移植することができる (図 2)。ヒトの腸内細菌叢の特徴を完全に再現できない場合もあるが、ヒトの腸内細菌叢の重要性を *in vivo* で研究するための有用な実験系の一つと考えることができる。腸内細菌叢をそのまますべて投与しているので保有する微生物が全て既知とは言えず、厳密にはノトバイオートとは呼ぶことはできないが、無菌動物の応用の一例と言える (5)。

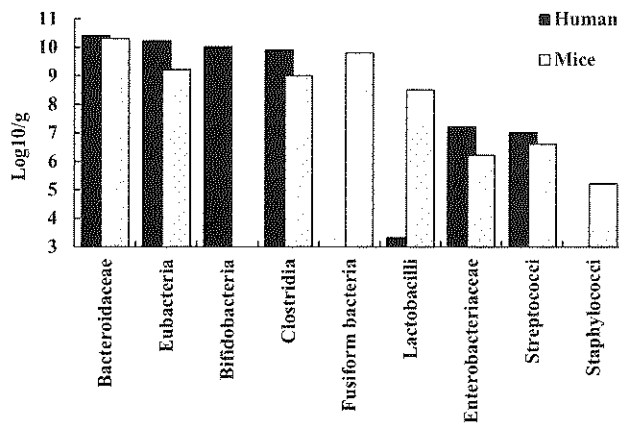


図 1. ヒトとマウスの腸内細菌叢の構成の違い

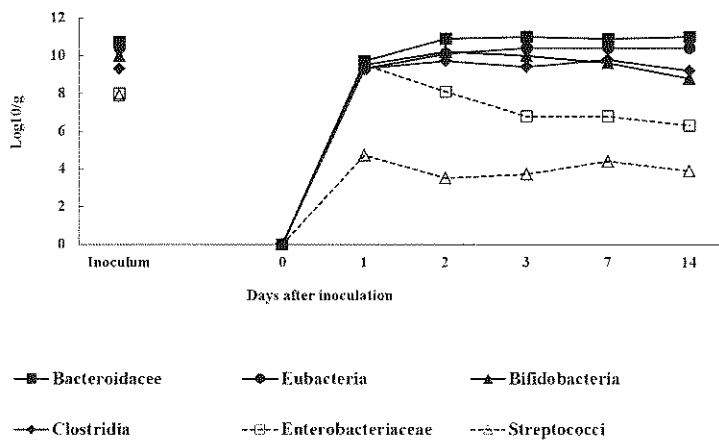


図 2

文献

- (1) Hirayama K & Itoh K: J Germfree Life Gnotobiol, 39: 35-37, 2009
- (2) Heneghan JB: The Germ-free Animal in Biomedical Research (Coates ME & Gustafsson BE/eds), pp. 169-191, Laboratory Animals LTD, 1984
- (3) Coates ME & Fuller R: Microbial Ecology of the Gut (Clark RTJ & Bauchop T/eds), pp. 311-346, Academic Press, 1977
- (4) Gustafsson BE: Scand J Gastroenterol, 17:117-131, 1982
- (5) Hirayama K: Bioactive Foods in Promoting Health (Watson RR & Preedy VR/eds), pp. 531-540, Academic Press, 2010

腸内細菌叢の網羅的な解析と、その考え方に基づく最近の話題

森田 英利

岡山大学大学院環境生命科学研究科

腸内細菌叢（腸内フローラ）は、細菌学的な視点からの構成細菌に関する研究、そして予防医学や健康指向の高まりから宿主への影響を考慮した機能面から多くの研究が進められてきた。腸内細菌叢は宿主にとって有害にも有益にもはたらくが、バイオサイエンス分野における新たな知見や新しい実験手技が開発され、新たな展開をみせている。メチニコフの不老長寿説とパスツールの動物生存における腸内細菌有用論に端を発し、レイヤニスらによるラットの無菌繁殖（無菌動物の確立）ならびに光岡による腸内嫌気性菌を培養技術の開発などのステップを経て、腸内細菌叢に関する研究が進展してきた。マイクロアレイを用いた宿主側や細菌側の遺伝子発現レベルでの解析や *in situ* hybridization (FISH) 法を用いた腸内細菌の検出、実験動物側においても遺伝子改変動物やノックアウト動物の作出、人工腸管を用いた *ex-vivo* システムの開発、ゴードンらによる 16S リボソーム遺伝子アンプリコン解析の進展があった。さらに、腸内細菌叢のメタゲノム解析も導入され、宿主免疫系に及ぼす腸内細菌叢の研究に関しては上記の手法が駆使されて研究が進められている。

Kado らは、がん自然発症モデルマウスにおいて、そのモデルマウスを無菌化するとがんの自然発症が起らないという興味深い内容を報告している。また、Honda らにより、宿主でのヘルパーT細胞の形成に、腸内細菌叢の構成細菌が関与していることを明らかにした。また、アルツハイマー型認知症についてはヒト腸内細菌叢の視点からの研究、さらにトランスジェニックマウスを用いてのアミロイド β の蓄積と腸内細菌の相関についての報告がなされている。

本講演では、上記の概要に加え、最近では宿主腸管粘膜内と腸管便内の細菌叢を区別した研究、また宇宙環境における健康管理に向けた免疫や腸内環境に関する総合評価の研究も進められており、それらの研究分野について話題を提供する。

関西実験動物研究会だより

<その他>

関西実験動物研究会だより

関西実験動物研究会会報第 39 号に掲載した第 134 回研究会以降、以下の研究会が開催された。

1) 第 135 回研究会 日本実験動物技術者協会関西支部 合同大会

(平成 29 年 9 月 9 日 (土)、大阪大学 医学部講義棟 1 階 A 講堂)

関西実験動物研究会

<維持会員ニュース>

ミニブタ新施設「彩都ラボ」の竣工について 一新施設って大変!

有限会社 浜口動物

<講演会> テーマ: 動物の心を探る 第 1 部

1. 自分の心、分かりますか? —動物におけるメタ認知研究—

中村 哲之 (東洋学園大学 人間科学部 専任講師)

2. 動物の視知覚を探る

牛谷 智一 (千葉大学 大学院人文科学研究院 准教授)

日本実験動物技術者協会関西支部

<講演会> テーマ: 動物の心を探る 第 2 部

1. 動物の心に配慮した飼育法: ラットの場合

清川 泰志 (東京大学 大学院農学生命科学研究科 助教)

2. メダカの個体認知を介した配偶者選択とその分子神経基盤

竹内 秀明 (岡山大学 大学院自然科学研究科 准教授)

2) 第 136 回研究会 (平成 29 年 12 月 1 日 (金)、京都大学 楽友会館)

<特別発言>

Ten years' experiences of IACUC in SNUH

LEE, Kook Hyun, MD (李 國賢) (韓国ソウル大学病院・九州大学病院)

<トピックス>

実験動物飼育養保管基準 (環境省) 解説書について

八神 健一 (筑波大学医学医療系 実験動物学研究室)

<特別講演>

1. 感染症研究の過去、現在、未来

喜多 正和 (京都府立医科大学動物実験センター)

2. ゲノム編集技術の進展をキャッチアップ?

竹田 潤二 (大阪大学大学院医学系研究科)

<会員の発表> 15 題

3) 第 137 回研究会 (平成 30 年 3 月 2 日 (金)、京都大学 楽友会館)

<維持会員ニュース>

万能型洗浄機 "ATLANTIS" の活用方法

テクニプラスト株式会社

<トピックス>

絶滅危惧種の特徴を iPS 細胞と発生工学で解き明かす

本多 新 (京都大学大学院医学研究科 附属動物実験施設)

<講演会> テーマ: 主要なバイオリソースであるメダカとラットの遺伝学

1. ラットの遺伝学 — From 2002 to 2018 in Kyoto —

庫本 高志 (京都大学大学院医学研究科 附属動物実験施設)

2. メダカを用いた順遺伝学及び逆遺伝学的解析—メダカ体色突然変異体の原因遺伝子同定を例として—

成瀬 清 (基礎生物学研究所 IBBP センター/バイオリソース研究室)

4) 第 138 回研究会 (平成 30 年 6 月 22 日 (金)、奈良春日野国際フォーラム 薈〜I・RA・KA〜

<維持会員ニュース>

マウス飼育ラックによる省エネの提案

望月一正 (セオービット株式会社) 杉田清隆 (東洋熱工業株式会社)

<講演会> テーマ: 実験動物学的見地から腸内細菌叢を考える

1. 疾患モデル動物を用いたシンバイオテイクスの試み

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)

2. 腸内細菌叢研究のツールとしての無菌動物とノトバイオート

平山 和宏 (東京大学大学院農学生命科学研究科獣医公衆衛生学教室)

3. 腸内細菌叢の網羅的な解析と、その考え方に基づく最近の話題

森田 英利 (岡山大学大学院環境生命科学研究科動物応用微生物学研究室)

《幹事会、評議員会、総会の議事概要》

幹事会の概要

日時: 平成 30 年 2 月 23 日 (金)、午後 4 時～午後 6 時

場所: 京都大学ウイルス・再生医科学研究所 1 号館 1 階会議室

出席者: 近藤、庫本、久保、桑村、真下、浅野、岡田、喜多、塩見、塩谷、
芹川、田島、坪田、山添、中井、中村

欠席者: 山本、伊川、佐加良、横井

議事:

1. 平成 29 年度事業報告について

・平成 29 年度の事業報告について確認した。

2. 平成 29 年度決算報告について

・平成 29 年度の決算報告について確認した。

3. 平成 30 年度事業計画 (案) について

・平成 30 年度の事業計画 (案) について確認した。(説明担当: 近藤)

今後の研究会の日時、内容および進捗状況について確認し、討議した。

4. 平成 30 年度予算 (案) について

・平成 30 年度の予算案 (案) および平成 29 年度会費未納者を確認した。

5. その他

1) 第 36 回評議員会、第 35 回総会の進行について

評議員会および総会の進行について確認した。

総会にて、会報の発送費の節減のため、配布物を可能な限り直接配布することを説明することとした。

2) 支出の削減に関して討議した。外部講師の交通費は可能な限り節減することが確認された。

3) 会費未納者に対しては、メールにて督促することとなった。

4) 会報印刷が完了時点で、ホームページ上に PDF にて掲載することとした。

5) 集会経費のうち、会場費と講演者招聘費を事務局が事前にチェックし、予算内に収まるよう努めることとした。

6) 庫本幹事から転出の挨拶があり、幹事留任の報告があった。

日時：平成 30 年 11 月 9 日（金）、午後 4 時 30 分～ 午後 6 時

場所：京都大学ウイルス・再生医科学研究所 1 号館 1 階会議室

出席幹事：近藤、久保、浅野、喜多、塩見、塩谷、芹川、坪田、山添、横井、中村

欠席幹事：山本、庫本、桑村、真下、伊川、岡田、佐加良、田島、中井

議題ならびに審議：

1. 第 140 回研究会について

一般演題 12 題、トピックス 1 題、特別講演 2 題によりプログラムを構成し、座長を決定した。（別添参照）一般演題の発表時間は 1 題につき 15 分（口演 13 分、質疑応答 2 分）とした。なお、一般講演にエントリーされた Jeong Hun Kim 先生（ソウル大学）の発表時間は 20 分とした。

2. 第 141 回研究会（評議員会、総会 2019 年 3 月 15 日）について

担当幹事、浅野幹事、岡田幹事、庫本幹事、塩見幹事、坪田幹事により維持会員ニュース、特別講演で構成するとし、詳細について検討中であることが報告された。なお、浅野幹事より今年のノーベル生理学・医学賞を受賞された本庶 佑先生のご研究における PD-1 に関する基礎系あるいは臨床系の特別講演ならびに斎藤通紀先生（京都大学 生体構造医学講座）によるゲノム・エピゲノム制御機構を含む生殖細胞研究に関する特別講演が提案され、幹事会で承認された。

3. 来年度の予定について

下記の通り、開催場所、日時、担当幹事等が審議され、承認された。プログラムについては、担当幹事で検討され、幹事会で審議することとした。

1) 第 142 回（2019 年 6 月） 大阪 久保幹事、桑村幹事、佐加良幹事、横井幹事近藤会長より、開催場所として大阪府立大学（りんくうキャンパス）が提案され、承認された。

2) 第 143 回（2019 年 9 月） 大阪 伊川幹事、塩谷幹事、田島幹事、真下幹事、山添幹事

開催日程、場所等は今後検討する。

3) 第 144 回 (2019 年 12 月) 京都 近藤幹事、喜多幹事、芹川幹事、中井幹事、中村幹事

開催日程、場所等は今後検討する。

4) 第 145 回 (2020 年 3 月) 京都 浅野幹事、岡田幹事、庫本幹事、塩見幹事、坪田幹事

開催日程、場所等は今後検討する。

4. その他

(1) 2020 年の日本実験動物学会総会の大会長を担当する塩谷幹事より、以下の報告なされ、関西実験動物研究会の協力が要請され、承認された。

- ・大会テーマ：動物実験の医療への貢献（仮題）
- ・場所：グランキューブ大阪（大阪府立国際会議場）
- ・実行委員長：真下幹事、事務局：大阪大学生協、懇親会：佐加良幹事と久保幹事が担当。
- ・市民公開講座の内容は未定ではあるが、「動物実験と医療」ということで患者目線での講演内容を想定している。
- ・海外招聘：Understanding Animal Research (UAR) (英国) の Wendy Jarrett 氏を予定している。

(2) 山添幹事より、National Anti-Vivisection Society のカエルを用いた学校教育の廃止運動、英国化粧品ブランドのラッシュ (LUSH) の化粧品開発における動物実験廃止運動、PEACE による東京大学の痩せた実験用ヤギの摘発など、国内外の動物愛護団体等の活動に関する情報が提供された。動愛法の改訂に関連した動物愛護団体の動向等の情報は無いが、ペット販売における月齢について与野党間で議論されていることの情報が提供された。

評議員会の概要

第 36 回関西実験動物研究会評議員会

日時：平成 30 年 3 月 2 日（金）12:00～13:20

場所：京都大学 楽友会館 2 階 会議・講演室

出席：42 名

浅野雅秀、磯野協一、外野善弘、海野 隆、岡田利也、岡本宗裕、沖本一夫、春日久男、金子武人、喜多正和、清成 寛、久保 薫、庫本高志、桑村 充、近藤 玄、近藤 靖、佐加良英治、佐藤 浩、塩見雅志、塩谷恭子、清水何一、鈴木 昇、鈴木 稔、芹川忠夫、高木貞明、高島俊行、竹之下 誠、田島 優、坪田裕司、中井伸子、中村紳一朗、成瀬智恵、橋本正晴、平川公昭、平沢 勉、星 信彦、真下知土、増岡通夫、松田潤一郎、宮口純一、宮脇宏彰、森島英喜、山添裕之、山中 久、山本 博、山本好男、横井伯英

議事および審議：

1. 平成 29 年度事業報告

・平成 29 年度の事業報告が近藤会長より報告され、承認された。

2. 平成 29 年度決算報告

・平成 29 年度収支決算書に基づき庫本（庶務・会計）幹事により説明され、承認された。

・繰越決算書について高木監事と橋本監事により監査され、適正であったことが橋本監事より報告され、承認された。

3. 平成 30 年度 事業計画（案）

・近藤新会長より提案され、承認された。

4. 平成 30 年度予算（案）

・庫本（庶務・会計）幹事より提案され、承認された。

5. その他

・近藤会長より、今後の会員への情報・資料提供について出来る限りメールリストやホームページを活用し、郵送による配布を極力減らすとの方針が示され、了承された。これに関連して芹川幹事より、維持会費への情報・資料提供方法についての質問があり、近藤会長より、維持会員については従来どおりの方法を執るとの回答があった。

・塩谷評議員より、平成 32 年日本実験動物学会の開催にあたっての協力要請あった。

・塩見評議員より、平成 30 年 7 月 20 日に行われる日本ウサギバイオサイエンス研究会のアナウンスがあった。

総会の概要

第 35 回関西実験動物研究会総会

日時：平成 30 年 3 月 2 日（金）13:30～14:10

場所：京都大学 楽友会館 2 階 会議・講演室

久保幹事の司会により、総会が始まった。中井会員の推薦により塩谷会員が議長に指名され、承認された。

議事および審議：

以下のとおり、塩谷議長により議事の審議が進められた。

1. 平成 29 年度事業報告

- ・平成 29 年度の事業報告が近藤会長より報告され、承認された。

2. 平成 29 年度決算報告

- ・平成 29 年度収支決算書に基づき庫本幹事により説明され、承認された。
- ・繰越決算書について高木監事と橋本監事により監査され、適正であったことが橋本監事より報告され、承認された。

3. 平成 30 年度事業計画（案）

- ・近藤会長より提案され、承認された。

4. 平成 30 年度予算（案）

- ・庫本幹事より提案され、承認された。

近藤会長より、発送費を削減し、経費削減を図ることが説明された。

喜多理事より、近年、会報販売の収入がないことから、項目を削除してはどうかとの提案があり、承認された。

5. その他

・阿部会員より、発表抄録を事前に届けて欲しいとの要望があった。近藤会長より、ホームページあるいはメーリングリストを用いて、早めに発信するように努力すると回答された。

・宮脇名誉会員より、本会はアカデミア以外を含めた学際的領域でもあるので、維持会員の意見を考慮するようにとの要望があった。近藤会長より、要望に応えるよう検討することが回答された。また、現在の幹事の大半は大学関係者なので、それ以外の幹事への登用も検討してもらいたいとの要望があった。近藤会長より、次期の役員選出の際には、考慮することが回答された。

関西実験動物研究会 維持会員名簿（平成 30 年度）

（あいうえお順）

株式会社アイセイ
EPS 益新株式会社
株式会社イナリサーチ
株式会社イブバイオサイエンス
株式会社エーテック
小原医科産業株式会社
株式会社オリエンタルバイオサービス
オリエンタル酵母工業株式会社
北山ラベス株式会社
株式会社ケー・エー・シー
三協ラボサービス株式会社
清水実験材料株式会社
白井松器械株式会社
株式会社新日本科学
株式会社精研
セオービット株式会社
大日本住友製薬株式会社
テクノプラスト・ジャパン株式会社
株式会社特殊免疫研究所
株式会社夏目製作所
日精バイリス株式会社
株式会社日本医科学動物資材研究所
日本エスエルシー株式会社
日本クレア株式会社
日本新薬株式会社
日本チャールス・リバー株式会社
ハムリー株式会社
株式会社ビオスタ
株式会社ビッグバン
丸石製薬株式会社株式会社
三浦工業株式会社
株式会社美濃ラボ
株式会社レナテック
有限会社浜口動物

関西実験動物研究会 評議員名簿(平成29～31年度)

氏 名	所 属
浅野 雅秀	京都大学大学院医学研究科 附属動物実験施設
阿部 敏男	前 株式会社武田ラビックス光事業所
伊川 正人	大阪大学微生物病研究所 附属感染動物実験施設
池田 克己	武庫川女子大学 薬学部
磯野 協一	和歌山県立医科大学 動物実験施設
今井 良悦	武田薬品工業株式会社 湘南研究所
郊野 善弘	大阪大学医学部 附属動物実験施設
海野 隆	医薬品非臨床安全性コンサルタント
大野 民生	名古屋大学大学院医学系研究科 附属医学教育研究支援センター
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	株式会社新日本科学 大阪病理センター
春日 久男	株式会社武田ラビックス
加藤 啓子	京都産業大学総合生命科学部 動物生命医科学科
金子 武人	京都大学大学院医学研究科 附属動物実験施設
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
清成 寛	(国研)理化学研究所ライフサイエンス技術基盤研究センター 生体モデル開発ユニット
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	大日本住友製薬株式会社
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	株式会社新日本科学 安全性研究所病理研究部
近藤 玄	京都大学ウイルス・再生医科学研究所 統合生体プロセス分野
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
近藤 靖	田辺三菱製薬株式会社
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
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	(国研)国立循環器病研究センター 研究所 動物実験管理室
清水 何一	清水実験材料株式会社
鈴木 昇	三重大学先端科学研究支援センター 動物機能ゲノミクス部門
鈴木 稔	シオノギテクノアドバンスリサーチ株式会社 モデル動物生産部門
芹川 忠夫	京都疾患モデル研究所
高木 貞明	日本エスエルシー株式会社
高島 俊行	ハムリー株式会社国際事業部 大阪出張所
竹田 潤二	大阪大学大学院医学系研究科
竹之下 誠	株式会社イブバイオサイエンス
田島 優	大阪大学大学院医学系研究科 附属動物実験施設
千葉 薫	株式会社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 生理学
中井 伸子	
中村 紳一郎	滋賀医科大学 動物生命科学研究センター
成瀬 智恵	京都大学大学院医学研究科 附属動物実験施設
橋本 正晴	株式会社ケー・エー・シー
平川 公昭	株式会社新日本科学 大阪病理センター
星 信彦	神戸大学大学院農学研究科 応用動物学講座
真下 知士	大阪大学大学院医学系研究科 附属動物実験施設
増岡 通夫	株式会社トランスジェニック
松田 潤一郎	(国研)医薬基盤・健康・栄養研究所 開発振興部/創薬デザイン研究センター
宮口 純一	住化テクノサービス株式会社 応用動物センター研究支援部
宮下 信泉	香川大学総合生命科学研究センター 動物実験部門
宮脇 宏彰	株式会社ケー・エー・シー
森島 英喜	武田薬品工業株式会社 湘南研究所
山添 裕之	住友化学株式会社 生物環境科学研究所
山田 宜永	新潟大学農学部農業生産科学科 動物遺伝学
山中 久	株式会社イナリサーチ
山本 博	富山大学医学部 ウイルス学教室
山本 好男	三重大学地域拠点サテライト 伊賀サテライト伊賀研究拠点
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29～31年度、平成29年3月現在)

	氏 名	所 属
会 長	近藤 玄	京都大学ウイルス・再生医科学研究所 統合生体プロセス分野
庶 務 ・ 会 計	庫本 高志	京都大学大学院医学研究科 附属動物実験施設
	久保 薫	奈良県立医科大学先端医学研究機構 動物実験施設
	桑村 充	大阪府立大学大学院生命環境科学研究科 獣医病理学
	真下 知士	大阪大学大学院医学系研究科 附属動物実験施設
集 会	浅野 雅秀	京都大学大学院医学研究科 附属動物実験施設
	伊川 正人	大阪大学微生物病研究所 附属感染動物実験施設
	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
	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
	佐加良 英治	兵庫医科大学 動物実験施設
	塩見 雅志	神戸大学大学院医学研究科 附属動物実験施設
	塩谷 恭子	(国研)国立循環器病研究センター研究所 動物実験管理室
	芹川忠夫	京都疾患モデル研究所
	田島 優	大阪大学大学院医学系研究科 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 生理学
	山添 裕之	住友化学株式会社 生物環境科学研究所
	横井 伯英	神戸大学大学院医学研究科 分子代謝医学
編集(委員長)	山本 好男	三重大学 地域拠点サテライト伊賀サテライト 伊賀研究拠点
	中井 伸子	
	中村 紳一朗	滋賀医科大学 動物生命科学研究センター
監 事	高木 博隆	日本エスエルシー株式会社
	橋本 正晴	株式会社ケー・エー・シー

平成29年度 収支決算書

費目	金額(円)	平成29年度予算	
		金額(円)	対比(円)
繰越金	2,029,866	2,029,866	0
収入の部	会費収入	1,685,000	△ 55,000
	普通会员 (口)	309,000 (103)	△ 51,000
	普通会员前受金 (口)	6,000 (2)	6,000
	評議員会員 (口)	280,000 (56)	△ 20,000
	評議員会員前受金 (口)	10,000 (2)	10,000
	維持会員 (団体)	1,080,000 (36)	0
	維持会員前受金 (団体)	0 (0)	0
	当日参加 (口)	75,000 (37.5)	△ 25,000
	会報代金	0	0
	預金利息	1	△ 1
	収入計	1,760,001	△ 80,001
	収入総計	3,789,867	△ 80,001
支出の部	事務局経費	496,217	△ 63,785
	人件費	350,000	0
	アルバイト費	12,000	12,000
	通信費	35,636	△ 44,364
	事務費	46,417	△ 3,585
	印刷費	52,164	△ 27,836
	機関誌発行経費	567,864	△ 32,136
	編集費	0	△ 30,000
	印刷費(PDF化を含む)	567,864	△ 2,136
	集会経費	779,336	79,336
	会場費	48,822	△ 31,178
	講演者招待費	535,120	135,120
	幹事会・評議員会	166,394	△ 34,606
	アルバイト費	30,000	10,000
	予備費	0	△ 50,000
	支出計	1,843,417	△ 66,585
	繰越剰余金	1,946,450	△ 13,416
	支出総計	3,789,867	△ 80,001

<参考>

年度内収支(収入-支出)=(1,760,001-1,843,417)=-83,416円

平成30年度 関西実験動物研究会予算(案)

<評議員会資料>

(普通会費: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30年度予算(案)	平成29年度決算	平成29年度予算
繰越金	1,946,450	2,029,866	2,029,866
収入の部			
会費収入	1,773,000	1,685,000	1,740,000
普通会员 (口)	363,000 (121)	309,000 (103)	360,000 (120)
普通会员前受金 (口)	0 (0)	6,000 (2)	0 (0)
評議員会員 (口)	300,000 (60)	280,000 (56)	300,000 (60)
評議員会員前受金 (口)	0 (0)	10,000 (2)	0 (0)
維持会員 (団体)	1,110,000 (37)	1,080,000 (36)	1,080,000 (36)
維持会員前受金 (団体)	0 (0)	0 (0)	0 (0)
当日参加 (口)	100,000	75,000 (37.5)	100,000
会報代金	0	0	0
預金利息	0	1	2
収入計	1,873,000	1,760,001	1,840,002
収入総計	3,819,450	3,789,867	3,869,868
支出の部			
事務局経費	520,000	496,217	560,002
人件費	350,000	350,000	350,000
アルバイト費	10,000	12,000	0
通信費	40,000	35,636	80,000
事務費	50,000	46,417	50,002
印刷費	70,000	52,164	80,000
機関誌発行経費	600,000	567,864	600,000
編集費	30,000	0	30,000
印刷費(PDF化を含む)	570,000	567,864	570,000
集会経費	740,000	779,336	700,000
会場費	80,000	48,822	80,000
講演者招待費	450,000	535,120	400,000
幹事会・評議員会	200,000	165,394	200,000
アルバイト費	10,000	30,000	20,000
予備費	50,000	0	50,000
支出計	1,910,000	1,843,417	1,910,002
繰越剰余金	1,909,450	1,946,450	1,959,866
支出総計	3,819,450	3,789,867	3,869,868

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 会員相互の情報交換・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. 所在地

- (21) 本会の所在地は京都市左京区聖護院川原町 53、京都大学ウイルス・再生医科学研究所 統合生体プロセス分野内とする。

VII. 会則改正

- (22) 本会則の改正は評議員の議決を経て総会の承認を受ける。

VIII. 附則

- (23) 本会則は昭和 59 年 3 月 16 日より施行する。
- (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。
- (28) 本会則は平成 26 年 3 月 7 日より施行し、平成 26 年 4 月 1 日より適用する。
- (29) 本会則は平成 29 年 3 月 3 日より施行し、平成 29 年 4 月 1 日より適用する。

平成30年12月15日 印 刷
平成30年12月15日 発 行

編集兼発行者 近 藤 玄
発 行 所 関西実験動物研究会
〒606-8507 京都市左京区聖護院川原町53
京都大学ウィルス・再生医科学研究所 統合生体プロセス分野内
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40号
Kansai Journal of Laboratory Animals
平成30年12月

第135回研究会：動物の心を探る

- 中村 哲之：自分の心、分かりますか？－動物におけるメタ認知研究－ 1
牛谷 智一：動物の視知覚を探る 25
清川 泰志：動物の心に配慮した飼育法：ラットの場合 26
竹内 秀明：メダカの個体認知を介した配偶者選択とその分子神経基盤 28

第136回研究会

＜特別発言＞

- LEE, Kook Hyun (李 國賢)：Ten yaers' experiences of IACUC in SNUH 29

＜トピックス＞

- 八神 健一：実験動物飼養保管基準解説書の概要 30

＜特別講演＞

- 喜多 正和：感染症研究の過去、現在、未来 31
竹田 潤二：ゲノム編集技術の進展をキャッチアップ？ 36
＜一般講演＞ 会員の発表 15題 39

第137回研究会：主要なバイオリソースであるメダカとラットの遺伝学

- 庫本 高志：ラットの遺伝学 57
成瀬 清：メダカを用いた順遺伝学及び逆遺伝学的解析－メダカ体色突然変異体の原因遺伝子同定を例として－ 62
＜トピックス＞
本多 新：絶滅危惧種の特徴をiPS細胞と発生工学で解き明かす 77

第138回研究会：実験動物学的見地から腸内細菌叢を考える

- 久保 薫：疾患モデル動物を用いたシンバイオティクスの試み 83
平山 和宏：腸内細菌叢研究のツールとしての無菌動物とノトパイオート 86
森田 英利：腸内細菌叢の網羅的な解析と、その考え方に基づく最近の話題 91

〈関西実験動物研究会だより〉 93

- 幹事会、評議員会、総会の議事概要 94 維持会員名簿 99
評議員名簿 100 会長、幹事、監事名簿 101
収支・予算 102 会則 104