

関西実験動物研究会会報

Kansai Journal of Laboratory Animals

令和5年11月 41号

関西実験動物研究会

Kansai Laboratory Animal Research Association

目 次

<第 145 回研究会（令和 3 年 3 月 5 日）オンライン開催>

<維持会員ニュース>

－ Web システム事業について－

清水 何一（清水実験材料株式会社）

<テーマ：発生工学技術の新しい展開>

1. 新しい遺伝子操作技術の開発と応用～技術開発研究の面白さと難しさ～

森岡 裕香（神戸大学医学研究科附属動物実験施設）…………… 1

2. 変異動物を作る

中尾 和貴（大阪大学医学系研究科医学部附属動物実験施設・教授）…………… 4

<トピックス>

Unmet Medical Needs を意識したモデル動物のキャラクターゼーション

太田 毅（京都大学農学研究科）…………… 8

<第 146 回研究会・日本実験動物技術者協会関西支部合同大会

（令和 3 年 9 月 10 日）オンライン開催>

<維持会員ニュース>

（株）OSG コーポレーション

<テーマ：パンデミックを知り、備える>

1. ウイルスによる宿主への感染戦略

岡本 徹（大阪大学微生物病研究所 高等共創研究院）……………13

2. 現代と古代のウイルスの多様性を探る

堀江 真行（大阪府立大学・獣医微生物学）……………14

3. 新型コロナパンデミックに対する動物実験施設の対応と本施設での学術研究

磯野 協一（和歌山県立医科大学動物実験施設）……………22

<第 147 回研究会（令和 3 年 12 月 10 日）オンライン開催>

<会員の発表>

1. マウス胎子における精巣から中腎内へのAMHの移行経路の検討

加藤 葉（神戸大院・農・形態機能）……………27

2. 女性ホルモンによる糖尿病膵島保護作用の解明

重中 咲希（京都大院・農・動物遺伝育種学）……………29

3. 帯電微粒子水の UV ケア効果の検討

近藤 友宏（大阪府立大学実験動物学教室）……………30

4. QTL からの効率的癌型 K-Ras 肺発癌 modifier 遺伝子候補の選択と解析

○齋藤浩充（三重大学 地域イノベーション推進機構）……………31

<トピックス>

マウス卵胞再構築系の開発と今後の展望

林 克彦（大阪大学大学院医学系研究科生殖遺伝学）……………32

<特別講演>

1. マウス生体内におけるエネルギー動態の可視化
山本 正道 (国立循環器病研究センター 研究所 研究推進支援部) ……33
2. ゲノム編集による遺伝子改変有袋類の誕生
清成 寛 (理化学研究所 生命機能科学研究センター 生体モデル開発チーム) ……38

<第148回研究会(令和3年3月11日)オンライン開催>

<維持会員ニュース>

- 動物用皮内投与デバイスの開発とDNAワクチンモデルへの応用
山下邦彦 (株式会社ダイセル / 大阪大学)

<トピックス>

- がん免疫治療をモデルとした内在性タンパク質ノックダウン法の開発
成瀬 智恵 (京都大学大学院医学研究科附属動物実験施設) ……39

<テーマ: 関西実験動物研究会の女性活躍(1)>

1. はじめとおわり
塩谷 恭子 (国立研究開発法人 国立循環器病研究センター) ……46
2. 関西実験動物研究会とともに歩んで
中井 伸子 ……50

<第149回研究会・日本実験動物技術者協会関西支部合同大会

(令和4年9月9日) オンライン開催>

<維持会員ニュース>

- 新東洋製作所の取り組み: 実験動物~産業動物まで
中山 武彦 (有限会社 新東洋製作所)

<テーマ: 動物のコミュニケーション>

1. 非ヒト霊長類の表情解析と疼痛評価
宮部 貴子 (京都大学ヒト行動進化研究センター) ……57
2. 動物におけるコミュニケーション能力の基盤と表象操作の進化
黒島妃香 (京都大学大学院文学研究科) ……70

<第150回研究会(令和4年12月16日)オンライン開催>

<会員の発表-1>

1. C57BL/6マウス亜系統間における未分化性腺内のSry発現の差異に関する定量組織学的解析
成田 大翔 (神戸大院・農・形態機能) ……81
2. C57BL/6NCrSlcマウスの未分化性腺におけるSry上流因子の発現に関する定量組織学的検討
奥西 宣祐 (神戸大院・農・形態機能) ……82
3. ジアミド系農薬がマウスの行動および神経活動に及ぼす影響評価
木村 真子 (神戸大院・農・形態機能) ……83
4. スナネズミにおける3種混合注射麻酔薬による外科的麻酔深度の導入とアチパメゾールによる早期覚醒の試み
水野 信哉 (岡山理科大学・理・動物学科) ……85

<会員の発表-2>

5. 肥満糖尿病モデル ZFDMラットにおける糖尿病発症に対する女性ホルモンの効果に関する検討
重中 咲希 (京都大院・農・動物遺伝育種学)87
6. 造血幹細胞の骨髄へのホーミングに重要な働きをするタンパク質とその糖鎖構造についての研究
PAN XUCHI (京都大院・実験動物学)89
7. ガラクトース転移酵素欠損マウスは高免疫原性腫瘍の増殖を抑制する
魏 恒 (京都大院・附属動物実験施設)91
8. QTL による癌型 K-Ras 肺発癌 modifier 遺伝子の解析
齋藤 浩充 (三重大・先端科学研究支援センター・動物機能ゲノミクス部門)
.....92

<特別講演-1>

- マウス胚発生と子宮内の力学的な環境
松尾 勲 (大阪母子医療センター・病因病態部門)93

<特別講演-2>

- 実験動物におけるアミロイドーシスと伝播
渡邊 謙一 (帯広畜産大・グローバルアグロメディシン研究センター)96

<第 145 回研究会（令和 3 年 3 月 5 日）オンライン開催>

<テーマ：発生工学技術の新しい展開>

1. 新しい遺伝子操作技術の開発と応用～技術開発研究の面白さと難しさ～
森岡 裕香（神戸大学医学研究科附属動物実験施設）
2. 変異動物を作る
中尾 和貴（大阪大学医学系研究科医学部附属動物実験施設・教授）

<トピックス>

Unmet Medical Needs を意識したモデル動物のキャラクターゼーション
太田 毅（京都大学農学研究科）

新しい遺伝子操作技術の開発と応用

～技術開発研究の面白さと難しさ～

森岡 裕香

(神戸大学大学院医学研究科附属動物実験施設)

2019年5月1日に神戸大学大学院医学研究科附属動物実験施設に着任し、新たに関西実験動物研究会に入会させていただきました。新型コロナウイルス感染症拡大の影響により1年遅れとなりましたが、ご挨拶を兼ねてこれまでの研究についてご紹介させていただきます。

科学研究の成果が新たな技術開発の着想を生み、画期的な新技術の台頭は科学の発展に大きなブレイクスルーをもたらします。このように、科学と技術は互いに切り離せない関係にあり、相乗的な影響を与え合いながら進歩を続けています。

私は、大学時代に遺伝子工学技術に触れ、その魅力に心を奪われました。当時の研究対象はアデノウイルスベクターで、遺伝子操作によりウイルスを様々に変化させ、目的とする性質を付与する研究に没頭しましたが、徐々に、遺伝子工学技術を動物個体作製にまで繋げる発生工学技術へと、興味の対象が変遷していきました。

発生工学技術は、生命科学の領域において最も成熟した技術の1つであると言えます。1960～1970年代に齧歯類の体外受精・胚移植・胚凍結の技術が報告されて以降、様々な基礎研究の成果を取り入れながら現在も改良が続けられていますし、今や不可欠な研究ツールとなった、遺伝子操作動物の作製を可能にしたのも発生工学技術です。

実際に私がこれまでに携わった代表的な技術開発研究は、以下の通りです。

【1】アデノウイルス (Ad) ベクターの改変

Adが標的細胞に感染する際には、第一ステップとして、Adのファイバー先端がCARと呼ばれる受容体に結合して細胞に接近し、続いて、Adのペントンベースに存在するRGDモチーフが、細胞表面のインテグリンと相互作用することで細胞内に取り込まれます。

Adベクターは極めて遺伝子導入効率の高いベクターとして知られていますが、メラノーマなど一部の細胞では、CARの発現が乏しいことが原因で感染抵抗性を示します。一方で、インテグリンは豊富に発現していることに着目し、ファイバーの先端部分にRGD配列を導入した改変型Adベクターを構築したところ、感染の第一ステップの標的がCARからインテグリンに変更され、メラノーマ細胞に対しても効率の良い遺伝子導入が可能になりました。

Ad ベクターは現在までに、ファイバー以外にも種々の改変が試みられており、特定の細胞のみをターゲットにした Ad ベクターや、血中滞留性を向上させた Ad ベクターなどが広く応用されています。

【2】レンチウイルス (LV) ベクターを利用した個体レベルでの遺伝子操作

a) *in vivo* ジーントラップ技術の開発 (ランダムな挿入変異)

ジーントラップマウスは、はじめにトラップベクターを ES 細胞に導入して変異細胞を樹立し、そこからキメラマウスを経て作製するのが一般的でしたが、時間とコストがかかる欠点を有していました。そこで、「透明体を除去した 2 細胞期胚に LV ベクターを感染させるとトランスジェニックマウスを作製できる」という技術に着目し、トラップカセットを搭載した LV ベクターを 2 細胞期胚に感染させることで、ES 細胞を介さず、短期間かつ低コストでジーントラップマウスを作製する方法を開発しました。遺伝子がトラップされると EGFP が発現するようトラップベクターの設計に工夫を施すことで、蛍光の有無でジーントラップマウスを選別することも可能になりました。

b) LV ベクターを利用した相同組換え技術の開発

相同組換え用ベクターの細胞内への導入にはエレクトロポレーション (EP) 法が汎用されますが、LV ベクター感染でも相同組換えが可能かを検証しました。具体的には、LV ベクターに相同組換え用のアームを搭載し、さらに、核内での相同組換え率上昇を狙ってゲノムへの組込み活性をなくす変異を導入したうえで ES 細胞に感染させたところ、EP 法の 1/10 以下の効率ではあるものの、相同組換え細胞を得ることに成功しました。

c) *in vivo* 相同組換え技術の開発 (狙った場所への変異挿入)

b) で利用した相同組換え用 LV ベクターを 2 細胞期胚に感染させることで、ES 細胞を介さない相同組換えマウスの作製を試みましたが、効率の低さから実現には至りませんでした。

d) 胎盤特異的な遺伝子操作技術の開発

マウス受精卵の発生が進んで胚盤胞期に達すると、将来胎児に分化する内部細胞塊と、胎盤に分化する栄養外胚葉層が明確に区分されます。この特徴を利用することで、胎盤特異的な遺伝子操作技術の開発に成功しました。具体的には、透明体を除去した 2 細胞期胚に LV ベクターを感染させた場合、胎児・胎盤の両方が遺伝子操作されますが、感染時期を胚盤胞期胚に変更すると外側の栄養外胚葉層のみに LV ベクターが導入されるため、結果として、胎児に遺伝子が導入されることなく胎盤のみが遺伝子操作されます。

【3】 *piggybac* トランスポゾンを利用したゲノムに傷を残さない遺伝子操作技術の開発

ES細胞を介して点変異マウスを作製する際、変異が導入された細胞を選択するために搭載していた薬剤耐性遺伝子は、最終的に Cre/loxP 部位特異的組換えを利用して抜き取られるのが一般的ですが、この方法では、目的の変異以外に 34 塩基からなる loxP 配列が 1 つ残ってしまいます。そこで、「ゲノム中を転移する際に痕跡を全く残さない」という特殊な性質を有する *piggybac* トランスポゾンを利用し、余分な配列を一切残すことなく目的の変異のみを導入する技術を開発しました。この技術により作製した動物は、目的変異の影響のみを正確に反映しており、かつ、外来遺伝子を含まないため遺伝子組換え生物として取り扱う必要がないという利点を有しています。

これまでの研究において、狙い通りの技術の確立に成功し、それを利用して新たな知見を得た際には、言葉にならない達成感を得てきました。一方で、革命的な新技術の登場により、長年かけてようやく開発した技術の価値が、一瞬にして色褪せてしまうようなケースも少なくありません。実際、上記【2】c) や【3】の試みは、Crispr/Cas システムの登場によりいとも簡単な技術となり、圧倒的なスピード化、低コスト化が実現されました。

今後も続々と報告されるであろう新たな技術を積極的に取り入れながら、次の一步に繋がる独自の技術開発を目指して研究を進めていきたいと考えています。

変異動物を作る

中尾 和貴

(大阪大学大学院医学系研究科 附属動物実験施設・教授)

平成の始まり、cell 誌の表紙を sperm vector 法の報告が飾りました。これは、精子が受精時に周りの DNA と一緒に卵子に侵入しその結果、高効率でトランスジェニックが作製できると言う、極めて魅力的な変異マウス作製法でした。おそらく、世界中の研究室で追試が行われたと思います。しかし、残念ながら追試ができず、うまくいかないことが確認されました。それからしばらくして、ES 細胞から標的遺伝子組換えによるノックアウトマウスの出現により、これまで変異マウスの代表であったトランスジェニックマウスからノックアウトマウスへと大きく代わった、そんな時期に私は、実中研の勝木研に所属しマウスを使った、変異動物の作製に関わることになりました。目的の遺伝子の破壊を可能にしたノックアウトマウスは魅力的ですがその作製法は、これまでのトランスジェニックとは大きく異なり、もちろん、これまでのトランスジェニックマウスの技術を基本としますが、キメラを作製するための ES 細胞を胚盤胞にインジェクションするのは、なかなか難しく、勝木先生の希望した数時間で 200 個以上の胚盤胞に安定してインジェクションできるようになるのに約 1 年かかりました。このノックアウトマウス作製が安定してできるようになる時を前後して、当時の川崎野川の実験動物中央研究所から、九州大学、その後も東大医科研と移動しますが、変異マウスの作製は、変わらず続けていました。そんな中、勝木先生からの指示があり、このノックアウトマウスのより効果的な作製システムを構築することになりました。当時私は、これまでの緩慢凍結保存法でなく、新たな凍結保存法を開発して、それと組み合わせることで、新しい変異動物作製を含む、マウスの供給システムを構築しようと考えていました。そのため、凍結保存法の開発です。Roll & Fathy らから '85 年にガラス化凍結保存法の報告があり、すぐにこのガラス化凍結保存法を取り入れようと考えました。ガラス化凍結保存法とは、すでに名前から矛盾がありますが、結晶構造を取らずに固化すなわちガラス化させる方法でその実現には超急速に冷却する必要がある、結果として、短時間で作業が終了します。この短時間も魅力ですが、それ以外にも従来法と比較して多くの利点をもつ方法です。この方法を取り入れて、全く新しいガラス化凍結保存法を開発し、新たな変異マウス作製を含めた生産法を構築しました (図 1)。この方法を使うことで、ほぼ一人で作製していた変異マウスの円滑な作製が実現しました。

勝木先生の元で約 10 年、変異マウス作製に従事してきましたが、その後、神戸の理研に移動になり、相澤先生の元で仕事をすることになりました。その相澤先生からは、世界でも

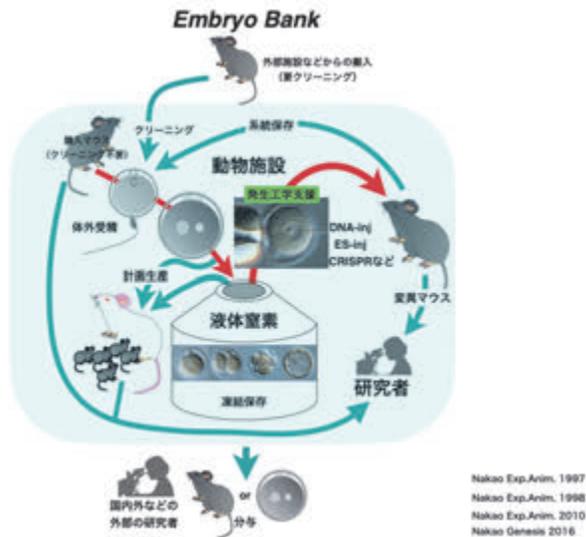


図 1. 凍結保存技術を利用した変異マウス作製・供給システム



図 2. ケージ供給システム

トップクラスの動物施設を、そのハードとソフトを含めて運営して欲しいとのリクエストがあり、まずハードとして、ケージの洗浄から各部屋に必要なケージを配るまでをある程度自動で行う、当時としては、極めて大掛かりなシステムを作り上げました（図2）。ソフトの方としては、勝木研で完成した凍結保存を中心としたシステム（図1）の導入を考えていたことに加えて、より大規模な変異マウスの作製システムを作ってみようと考えました。そのためには、第一にマウスの飼育ですが、マウスの飼育については私見ですが、日々の見回り

やケージの交換や洗浄などの一般的な作業に加えて、体外受精、凍結保存などの生殖工学全般を含むと考えていました。そのために、当時一緒に仕事をするようになった、たくさんの人たちに生殖工学を教えて、その中からマニピュレーションなどの発生工学を教えて、生殖・発生工学のプロフェッショナル集団を育てました。もちろん、これらの教育は、私一人では不可能です。現在京都大学ウイルス再生研にいる宮地さんが、神戸理研の立ち上げの頃から参加し、飼育管理や受精卵移植などを熱心に教え育ててくれた結果です。また、ES細胞からの変異マウスの作製は、相澤研から現在のCDB生体開発モデルユニットのユニットリーダーの清成先生が参加して、面倒をみてくれました。彼らは、私の無茶なシステムやそのやり方を理解し協力して、見事に実現してくれました。彼らを筆頭にその他たくさんの人達の協力で神戸理研での変異マウス作製も軌道に乗り約10年が経つ頃、今度は、東京大学に移動することになりました。東京大学でもこれまでと同じになりますが、動物施設の技官達の協力で生殖・発生工学システムを立ち上げました。そうこうしているうちに、世の中には、新しい変異動物作製法として、CRISPR/Casシステムを代表としたゲノム編集法が出現します。この方法は、まさに革命で、これまでとは、全く違った極めて強力な変異動物作製法です。これの出現で私がこれまで、変異マウスを作製するために抱き続けていたマウスの生殖・発生工学への興味が急速に萎むのを実感しました。東大での新しいボスの饗場先生も同じ考えなのか、今度は、霊長類での変異動物の作製をと言うことになり、変異コモモンマーモセットの作製に挑戦することになりました。一般的な変異マーモセットの作製は、ホルモン処理をして、卵胞から排卵前の卵胞卵を採取し体外成熟—体外受精で作製した受精卵にCRISPR/Cas9システムをインジェクションします。その後、数日間培養して、レシピエント雌の子宮に移植します。もちろんこの方法で十分なのでしょうが、この方法ではかなりの数のマーモセットが必要になります。当時の饗場研には、数十頭しかいません。また、前述のやり方では、かなりの長期間マーモセットの卵を体外培養する必要があります。目的は、マーモセットの生殖工学の確立ではなく変異マーモセットの作製です。したがって、よりシンプルな方法を開発として自家移植法を開発することにしました(図3)。この自家移植法は、実験動物では、一般的ではなくあまり使われていません。また、確かな理由は判りませんが、一般的にはマーモセットは子宮内移植であり、卵管内移植はなぜか報告が見つかりません。そこで、まず卵管内移植法を開発し、続いて、排卵時期を特定して確実に採卵できる条件及び方法を開発することにしました。ここでも、一緒に仕事をしてくれた技官の人達がかなり力になってくれました。いや、ほとんどの技術を彼らが開発してくれました。マーモは、妊娠期間が約5ヶ月です。結果が出るのには、長い期間を要しますが、何度か繰り返し自家移植法を施してやっと、変異マーモを得ることに成功しました。この中の一例ですが、一頭の



図 3.

雌マーモから3個の受精卵を採卵して、その3個にCRISPR/Casシステム注入一移植後、分娩して無事に3頭の変異マーモを作製することに成功しました。現在この方法を駆使して、変異マーモを作製しています。

このように私は、平成の約30年間、あちこち移動しながらですが、一貫して変異マウスを作製してきました。また、最近では、CRISPRの出現で、新たな変異マーモセットの作製法を開発することができました。私にとってこの、変異動物を作ると言うことは、たくさんの人たちの協力の結果実現したことであり、多くの人たちの協力に感謝しています。現在は、令和元年に大阪大学に移動してきました。これからも、今までと同様に多くの人達の協力で変異動物の作製を続けていくつもりです。

Unmet Medical Needs を意識したモデル動物のキャラクターゼーション

太田 毅

(京都大学大学院農学研究科)

はじめに

ヒトを中心とした生命科学研究の進展に実験動物が果たしてきた役割は非常に大きい。私は糖尿病、肥満症などの代謝性疾患領域の創薬研究を通じて、実験動物のヒト臨床病態への貢献を経験してきた1人である。糖尿病の創薬研究において、そのモデル動物の使用は必須であり、インスリン分泌不全治療薬の薬効評価には Goto-Kakizaki (GK) ラット、インスリン抵抗性改善薬の薬効評価には KK-Ay マウスや db/db マウスなどの糖尿病モデル動物を用いてきた。各種糖尿病モデル動物を用いた血糖降下薬の創薬研究が継続された結果、古くはビグアナイド薬や Sulfonyl Urea (SU) 薬、最近では Dipeptidyl Peptidase (DPP) -4 阻害薬、Sodium Glucose Co-Transporter (SGLT) -2 阻害薬が上市され、糖尿病患者さんの血糖値を安全に、かつ長期的にコントロールできる時代が訪れている。

一方で、腎症、網膜症、神経障害に代表される糖尿病性合併症治療薬の開発は難航しており、その病態解析と共に、より適切な病態モデルの開発が重要な課題である。糖尿病性合併症の動物モデルを用いた研究では、streptozotocin (STZ) 誘発糖尿病モデルの使用が一般的ではあるが、例えば STZ 自身の腎毒性により、糖尿病性腎症の病態解析や薬効評価に STZ モデルを使用することには課題があると考えられる。また、各標的臓器の病態像を詳細に観察することでヒトへの外挿性という観点からも課題が残ることは明らかである。

現在我々は、創薬研究の効率化あるいはヒトへの外挿性を意識しながら、非肥満2型糖尿病モデル Spontaneously Diabetic Torii (SDT) ラットと肥満2型糖尿病モデル SDT fatty ラットの2種の糖尿病動物を用いて、糖尿病性合併症モデル動物としての最適化に関する研究を進めている。本報告では、SDT ラットの眼病変、あるいは SDT fatty ラットの腎臓病変に焦点をあて、モデル動物の活用法を改めて考えてみたい。

SDT ラット

病態概要

SDT ラットは鳥居薬品（現日本クレア（株））の篠原雅巳博士により開発された非肥満2型糖尿病モデル動物であり（文献1）、1997年に確立され、2005年に日本クレア社から販売が開始されている。SDT ラットは、Sprague-Dawley (SD) ラットの多飲、多食、多尿、尿糖を呈する個体の発見から系統育成され、遺伝的には耐糖能低下に關与する7つの量的形質

遺伝子座がラットゲノム上にマップされており、多様な因子を背景とする糖尿病モデル動物である。8週齢という若週齢において、睪島の組織学的異常（出血、萎縮など）が観察され、耐糖能異常（IGT: impaired glucose tolerance）を呈し、15週齢前後より糖尿病を発症する。糖尿病発症には雌雄差があり、雄の発症率は100%であるのに対し、雌でその発症率は30%程度であり、IGTのまま経過する個体もある。

網膜症病変

SDT ラットは持続的高血糖を背景に糖尿病性細小血管合併症を発症し、特に網膜に特徴的な病変を発現する。60～70週齢を超える高週齢動物の眼において、網膜の肥厚、新生血管、牽引性網膜剥離などヒトの糖尿病性網膜症と類似した眼所見を呈する（図1）。STZモデルでは、網膜は菲薄化し、新生血管や牽引性網膜剥離はみられず、ヒトへの外挿性の観点からSDTラットの有用性が示唆される。一方で、SDTラットに特徴的な網膜病変は1年以上飼育した高週齢動物でみられる変化であり、研究効率という観点からは課題が残されている。

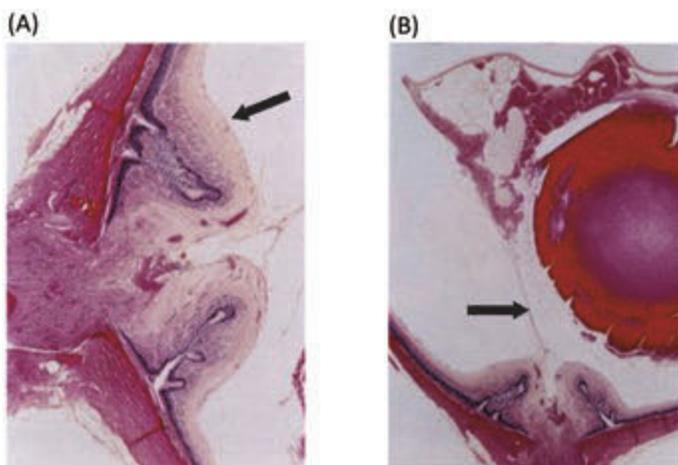


図1 雄性SDTラットの網膜病変（70週齢）
(A) 網膜の肥厚、(B) 牽引性網膜剥離
文献1より改変

薬効評価

糖尿病性合併症は多くの要因が複雑に関与しているが、我々はその要因の1つであるPKC β 活性化に焦点を当て、新規PKC β 阻害薬（JTP-010）を開発し、SDTラットの眼病変に対する薬効評価を試みた（文献2）。本化合物の網膜局所でのPKC阻害作用を確認した上で、20週齢から68週齢までの48週間SDTラットに経口投与し、JTT-010の眼病変改善作用を検討した。

結果として、投与期間中での網膜電位頂点潜時遅延に対する改善作用を認めたものの、最終的な網膜の病理組織学的解析では、網膜肥厚や網膜血管透過性亢進などに対する明らかな

作用は認められなかった（図2）。当時、PKC β 阻害薬の糖尿病性合併症に対する創薬研究が世界中で行われていたが、主に薬効不十分との理由で、全ての開発化合物が開発中止に至っており、JTT-010 のSDT ラットでの薬効評価結果は妥当であったと言える。しかしながら、実験の計画立案から最終の解析結果取得まで1年半以上の期間を要しており、結果がネガティブである場合は特に「研究の効率化」は意識せざるを得ない要因である。本薬効評価の経過および結果は、たとえヒトへの外挿性が優れる動物モデルであっても、その病態の早期化が必須の課題であることを強く印象づけるものであった。

その後、次項で述べる SDT fatty ラットを開発するに至り、本ラットでの網膜肥厚、網膜血管透過性亢進は16週齢で確認され、糖尿病性網膜症や糖尿病黄斑浮腫モデルとしての有用性が期待されている（図3）（文献3）。

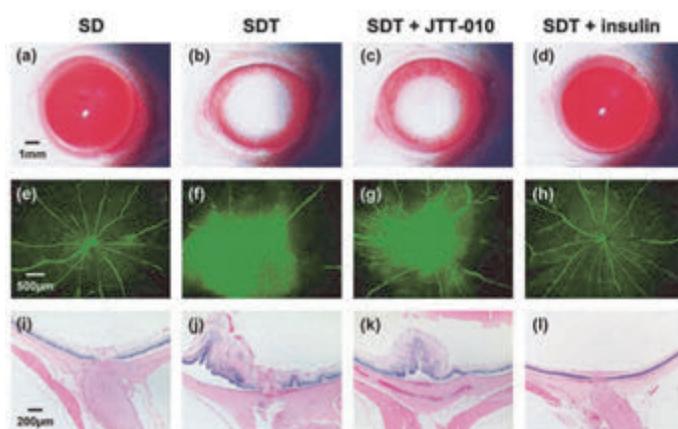


図2 PKC β 阻害薬 JTT-010 の雄性 SDT ラット眼病変に対する作用
 (a)-(d) 白内障の肉眼的観察、(e)-(h) 蛍光眼底造影検査
 (i)-(l) 網膜病変の組織学的観察
 文献2より改変

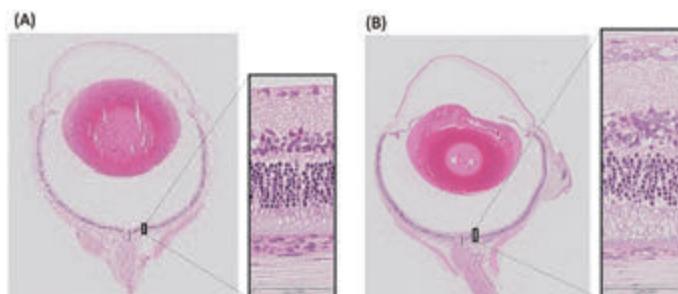


図3 雄性 SDT fatty ラットの網膜肥厚（16週齢）
 (A) SDT ラット、(B) SDT fatty ラット
 文献3より改変

SDT fatty ラット

病態概要

SDT fatty ラットはSDT ラットに fatty 遺伝子を導入することにより、過食を背景に早期から糖尿病を発症する肥満 2 型糖尿病モデルである（文献 4）。篠原雅巳博士や鳥居薬品（現日本たばこ産業）の益山拓博士により 2004 年に確立され、2012 年に日本クレア社から販売が開始されている。離乳直後の 5 週齢より糖尿病を発症し、雌雄共にその発症率は 100% である。糖尿病の早期発症と共に、糖尿病性合併症の発症も早期化している。

腎臓病変

腎臓尿細管病変が 10 週齢前後よりみられ、糸球体硬化病変は 20 週齢前後、24 週齢以降に尿細管間質病変、40 週齢以降には糸球体結節様病変がみられる（図 4）。糸球体結節様病変がみられることが本モデルの特徴の 1 つであり、ヒトでは Kimmelstiel-Wilson 病変として、糖尿病性腎症特異的な病変として知られている。

また、慢性腎臓病（CKD: chronic kidney disease）の重要な指標である糸球体濾過量（GFR: glomerular filtration rate）の推移は、SDT fatty ラットにおいて 24 週齢前後まで増加、つまり糸球体過剰濾過を示し、その後は緩やかに低下する。CKD の病態は、GFR を指標にステージ I ~ V に分類され、特にステージ III 以降の GFR が低下していく病態を反映するモデルの確立が重要である。現在我々は、その腎症後期モデルの確立へ向け、SDT fatty ラットを用いた最適化に関する研究を行っている。その結果、片腎摘出した SDT fatty ラットに食塩水を負荷したモデルで早期から GFR が低下することを見出し、薬効評価を検討中である。

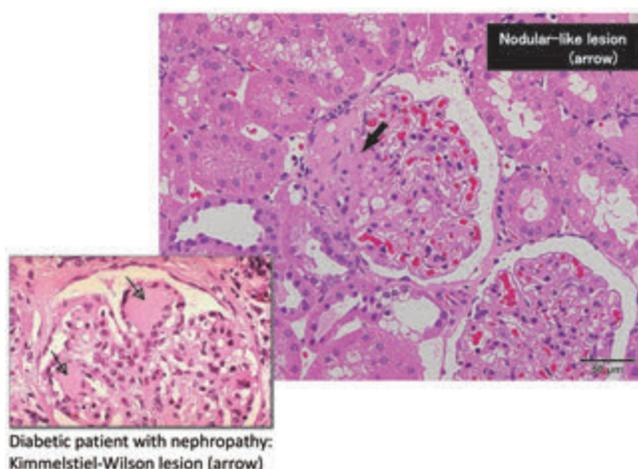


図 4 雄性 SDT fatty ラットの糸球体結節様病変（40 週齢）

終わりに

繰り返しになるが、人類の生命科学の発展に実験動物の果たしてきた役割は大きく、今後もその人類への貢献は永続的であると考え。多くのモデル動物が開発され、販売される現状において、我々は目的に応じてモデル動物を容易に使用することができる。一方でヒトへの外挿性の問題や研究効率の観点などから、その使用に困難さを感じることも多々ある。実験動物の潜在能力を十分に引き出すことができる様、特にモデル動物であれば、Unmet Medical Needs を意識した最適化を目指し、引き続き実験動物の価値向上に努めていきたいと考えている。

文献

1. Shinohara M, Masuyama T, Shoda T, Takahashi T, Katsuda Y, Komeda K, Kuroki M, Kakehashi A, Kanazawa Y. A new spontaneously diabetic non-obese Torii rat strain with severe ocular complications. *Int J Exp Diabetes Res.* 2000;1 (2) :89-100.
2. Sasase T, Morinaga H, Abe T, Miyajima K, Ohta T, Shinohara M, Matsushita M, Kakehashi A. Protein kinase C beta inhibitor prevents diabetic peripheral neuropathy, but not histopathological abnormalities of retina in Spontaneously Diabetic Torii rat. *Diabetes Obes Metab.* 2009;11 (11) :1084-1087.
3. Motohashi Y, Kemmochi Y, Maekawa T, Tadaki H, Sasase T, Tanaka Y, Kakehashi A, Yamada T, Ohta T. Diabetic macular edema-like ocular lesions in male spontaneously diabetic torii fatty rats. *Physiol Res.* 2018;67 (3) :423-432.
4. Matsui K, Ohta T, Oda T, Sasase T, Ueda N, Miyajima K, Masuyama T, Shinohara M, Matsushita M. Diabetes-associated complications in Spontaneously Diabetic Torii fatty rats. *Exp Anim.* 2008;57 (2) :111-121.

糖尿病モデル動物概要

・ KK-Ay マウス

https://www.clea-japan.com/products/diabetes/item_a0110

・ db/db マウス

https://www.clea-japan.com/products/diabetes/item_a0120

・ GK ラット

https://www.clea-japan.com/products/diabetes/item_a0130

・ SDT ラット

https://www.clea-japan.com/products/diabetes/item_a0140

・ SDT fatty ラット

https://www.clea-japan.com/products/diabetes/item_a0150

<第 146 回研究会・日本実験動物技術者協会関西支部合同大会

(令和 3 年 9 月 10 日) オンライン開催>

<テーマ：パンデミックを知り、備える>

1. ウイルスによる宿主への感染戦略
岡本 徹 (大阪大学微生物病研究所 高等共創研究院)
2. 現代と古代のウイルスの多様性を探る
堀江 真行 (大阪府立大学・獣医微生物学)
3. 新型コロナパンデミックに対する動物実験施設の対応と本施設での
学術研究
磯野 協一 (和歌山県立医科大学動物実験施設)

ウイルスによる宿主への感染戦略

岡本 徹

(大阪大学微生物病研究所 高等共創研究院)

現在の新型コロナウイルス (SARS-CoV-2) によるパンデミックは言うまでもなく、これまでも SARS コロナウイルス、MERS コロナウイルス、インフルエンザ、ジカウイルスなどさまざまなウイルスが話題となりました。また、ヒト免疫不全ウイルス、B 型肝炎ウイルス、C 型肝炎ウイルスは、ヒトに持続的に感染し免疫不全症や肝疾患を引き起こします。このように新型コロナウイルスだけではなく、ヒトに重篤な疾患を引き起こすウイルス感染症は多く存在します。これらのウイルスに対し、感染防御、重症化の抑制につながるワクチン開発が重要であることは言うまでもなく、同時に生体内から速やかにウイルスを排除することのできる抗ウイルス薬の開発も大切な検討課題だと考えています。

私は C 型肝炎ウイルス (HCV) をはじめとするフラビウイルス科ウイルスの基礎研究と抗ウイルス薬に関する研究を進めています。特に HCV のウイルス粒子を形成するコア蛋白質は翻訳後に宿主のシグナルペプチダーゼによって切断を受けたのちに、シグナルペプチドペプチダーゼ (SPP) によって膜貫通領域が切断されて成熟コア蛋白質になることが知られています。SPP は、小胞体に局在する 9 回膜貫通型のプロテアーゼで活性中心がアルツハイマー病の原因遺伝子として知られている Presenilin-1 と高い相同性を持っています。まず、私たちは SPP がコア蛋白質を切断する意義について研究を進め、SPP はコア蛋白質の発現と機能に必須であることを明らかにしました。特に SPP を欠損させた細胞ではウイルスがまったく産生されないことが分かり、SPP が HCV の増殖を制御できる因子となりことが考えられました。そこで、SPP が Presenilin-1 と高い相同性を持つことから、Presenilin-1 が構成している γ -Secretase 複合体の阻害剤の中から SPP 阻害活性を有する化合物を探索し、いくつかの化合物を得ることに成功しその解析を進めています。

また、SARS-CoV-2 の治療薬の開発も行ってきました。京都府立医科大学の星野温先生、大阪大学蛋白質研究所の高木淳一先生と共同で可溶性 ACE2 変異体を使った蛋白質製剤を開発しました。得られた可溶性 ACE2 は野生型の ACE2 と比べて SARS-CoV-2 の Spike に対する親和性が 100 倍近く亢進しており効率良くウイルス感染を中和することができました。また、中和抗体と比較してエスケープ変異が出ないことも優位点の 1 つと考えられます。

今回の発表ではこれまでに取り組んできた私たちのウイルスの感染戦略を解き明かす基礎研究から抗ウイルス薬の開発を進めてきた研究内容をご紹介させていただき、安全で効果的な治療薬開発に関して議論できればと思っております。

現代と古代のウイルスの多様性を探る

堀江 真行

(大阪府立大学大学院生命環境科学研究科 獣医学専攻 獣医微生物学教室)

1. 現代のウイルスの多様性を探る

1-1. 研究の背景

ウイルスの多様性は十分に理解されていない。これには大きく2つの理由が考えられる。まず、病気を起こすウイルスへの偏重である。ウイルスは動物や植物に病気を起こす病原体としてその存在が認識された。その後、病気と無関係のウイルスも見ついているものの、ヒトやヒトと関連のある生物における病原体としてウイルス探索が盛んに行われた。次に、技術的な限界である。過去のウイルス探索にはウイルス分離やコンセンサス PCR が使われていた。ウイルスの増殖には宿主細胞を必要とするため、ウイルス分離には各ウイルスに感受性のある細胞や動物などの材料が必要である。さらに、分離自体が困難なウイルスも多数存在する。コンセンサス PCR は混合塩基を用いたプライマーを使用することにより、比較的広範囲のウイルスを検出することができる。しかし、その検出能力は依然としてプライマーの配列に依存するため、既知のウイルスと遺伝的に近縁なウイルスしか検出することができない。

これらの欠点を克服した手法がディープシーケンス (別名: 次世代シーケンス) である。ディープシーケンスは、存在する核酸を網羅的に検出する技術である。検体にウイルスが含まれている場合、ウイルスの核酸も網羅的に検出することができる。そのため、種々の検体から広範なウイルスを検出することが可能であり、実際にディープシーケンスによって大量の新規ウイルスが同定されている。

一方、ディープシーケンス技術にも「コスト」という最大の欠点がある。サンプリング、前処理、核酸精製、ライブラリ作成、シーケンスまで、かなりの時間・労力を要する。さらに、ライブラリ作成やシーケンス試薬・機器には莫大な金銭的成本がかかる。そのため、ウイルス探索のためにディープシーケンスをひたすらやり続けるということは現実的ではない。

我々はこれらの欠点を解消するため、データベース上のシーケンスデータに着目した。例えばNCBIのSRAデータベースには、ウイルス探索以外の目的で取得された大量のシーケンスデータが存在する。これらの配列は多様な生物の様々な臓器から得られたデータであるため、潜在的にウイルス由来の配列を含んでいる可能性がある。我々は新規ウイルスの探索を目的として、NCBIのSRAデータベースから鳥類と哺乳類動物に由来する合計

40,000 以上の RNA-seq データからウイルス由来の配列の検出を試みた。

1-2. 大規模ウイルス探索による新規ウイルスの発見

スーパーコンピューターを使った大規模解析の結果、上記のデータから 900 以上のウイルス様配列を検出した。検出したウイルス様配列の中には、新規ウイルスも多く含まれており、新規のデルタウイルス、ヘパトウイルス、ヘペウイルスなどを同定した。これらのことから、データの再利用によるウイルス探索の有用性を示すことができた。我々はさらに発見した新規ウイルスのうち、デルタウイルスに着目してさらなる解析を行った。

1-3. 新規デルタウイルスの発見と異種間伝播

デルタウイルス（デルタウイルス属のウイルスの総称）は 1,700 塩基程度の環状マイナス鎖 RNA をゲノムとして持つウイルスであり、古くからヒトの病原体である D 型肝炎ウイルス（Hepatitis D virus: HDV）が知られている。HDV は自身のみでは感染性のウイルス粒子を形成できない「サテライトウイルス」であり、「ヘルパーウイルス」である B 型肝炎ウイルス（Hepatitis B virus: HBV）のエンベロープタンパク質を利用することによって感染性の粒子を形成する。

HDV は 1977 年にヒトより発見されたものの、2017 年までその他のデルタウイルスは見つかっていなかった。そのため HDV の進化は謎に包まれており、HDV はヒトの転写産物に由来するという説も挙げられていたほどである。しかし 2018 年以降、様々な動物より、多様なデルタウイルスが発見された。これによって HDV は多様なデルタウイルスと共通祖先を共有しており、ヒトの転写産物に由来するのではなく、ウイルスとして進化してきたことが明らかとなった。しかし、発見されたデルタウイルスは HDV とは遺伝的に遠縁であるため、系統樹上の大きなギャップが存在しており、依然として HDV の進化については詳細がわかっていなかった。またデルタウイルスが単純な共分岐（ウイルスと宿主が長期共存することによって、ウイルスが宿主の分岐に従って進化する様）によって進化してきたのか、それとも過去に種間伝播が起こったのかは明らかとなっていない。さらには、サテライト/ヘルパーウイルスの関係の進化も依然として謎に包まれていた。

我々は上記の問題を解明するため、上記の大規模データベース解析によって発見したウッドチャック (*Marmota monax*)、オジロシカ (*Odocoileus virginianus*)、キンカチョウ (*Taeniopygia guttata*) 由来の新規デルタウイルス（それぞれ宿主生物の種名にちなんで mmDeV, ovDeV, tgDeV と名付けた）の詳細な解析を行った。これらのデルタウイルスについてはゲノム全長を決定することができた。各々のウイルスの DA_g タンパク質のアミノ

酸配列は、既知のデルタウイルスの DAg タンパク質と 60-66.7% の配列一致率を示した。

我々はさらに、NCBI SRA データベースの RNA-seq データ解析および様々な動物（ウツドチャックおよび種々の鳥検体）検体由来の RT-PCR およびシーケンス解析によって、類似のデルタウイルスの検出を試みた。その結果、多様なスズメ目の鳥から tgDeV 様の配列を検出し、それらのうちキバラガラ (*Pardaliparus venustulus*) およびジュウシマツ (*Lonchura striata*) のデルタウイルスについて全ゲノム配列を決定することができた。驚くことに、キンカチョウを含めこれらの宿主生物は分類上の異なる科に属するにも関わらず、それぞれの生物に感染しているデルタウイルスの塩基配列は 98% 以上一致していた。デルタウイルスは RNA ウイルスであり、HDV を用いた研究ではその進化速度は 10-3 置換 / 部位 / 年程度であると推定されている。一方、キンカチョウ、キバラガラ、ジュウシマツの分岐年代は約 4,400 万年前と推定されており、単純な共分岐ではこの非常に高いウイルス塩基配列の一致率を説明することができない。これらのことから、これらの鳥あるいはその祖先において、比較的近年にデルタウイルスの異種間伝播が起こっていたことが強く示唆された。

さらに、発見した 3 種のデルタウイルスおよび既知のデルタウイルスの配列を用いて、分子系統樹解析を行った。その結果、デルタウイルスの系統樹全体のトポロジーは、宿主の系統樹を反映していなかった。つまり、脊椎動物のデルタウイルスの進化を俯瞰した際にも、単純な共分岐のみではデルタウイルスの進化を説明することはできないことを示しており、デルタウイルスの進化において異種間伝播が起こっていたことを強く示唆する。さらに、ヒトの HDV は我々が発見した ovDeV および mmDeV に比較的近縁であり、HDV が哺乳動物のデルタウイルスから分岐した可能性が考えられた。

一旦、ここまでの成果をまとめる。我々は公共データを再利用することによって、これまでのデルタウイルスの系統樹の大きなギャップを埋めるような新規デルタウイルスを発見した。さらに詳細な分子進化学的な解析により、異種間伝播がデルタウイルスの進化の原動力であることが示唆された。さらに分子系統樹解析によって、HDV は哺乳動物のデルタウイルスに由来することが示唆された。

1-4. デルタウイルスとヘルパーウイルスの進化

次に、デルタウイルスのサテライト / ヘルパーウイルスの関係に関する解析を行った。はじめに、発見したデルタウイルスのヘルパーウイルスを探索するために、NCBI SRA の RNA-seq データの解析を行った。しかし、残念なことに共感染しているエンベロープウイルスは見つからなかった。そのため、DAg 遺伝子のアイソフォームの発現に焦点を当てて解析を行った。デルタウイルスのゲノムに存在する ORF は DAg 遺伝子の ORF のみである。

HDV は宿主の A-to-I RNA 編集機構を利用して、DAg 遺伝子のストップコドン UAG を UIG (UGG として扱われる)へと編集することによって、2種類の DAg アイソフォーム (通常のストップコドンで翻訳が終止する small DAg (SDAg) および RNA 編集によって発現する、SDAg より 19 アミノ酸長い large DAg (LDAg)) を発現する。この LDAg には CXXQ モチーフからなるファネンシル化部位が含まれており、このファネンシル化がヘルパーウイルスである HBV のエンベロープタンパク質との相互作用に必須であることがわかっている。そのため、はじめに新規デルタウイルスにおける RNA 編集に解析を行った。

データベース上の RNA-seq データを解析したところ、mmDeV および tgDeV については RNA 編集の証拠は得られなかった。一方、ovDeV では DAg 遺伝子のストップコドンにおける RNA 編集を示唆するデータが得られた。ovDeV DAg 遺伝子のストップコドンは UAG である。SRA データベースに存在するオジロシカ由来 RNA-seq データのうち、この領域にマップされるリードは 1160 リード存在する。そのうち 5 リードにおいてストップコドンが UGG であった。これは HDV と同様の A-to-I RNA 編集であることが示唆された。しかし、ovDeV の DAg 遺伝子では、たとえストップコドンにおいて RNA 編集が起こったとしても、2 アミノ酸が延長されるのみであり、ファネンシル化モチーフである CXXQ 配列は存在しない。そのため、ovDeV では RNA 編集自体は起こり得るものの、HBV のエンベロープタンパク質と相互作用するような DAg アイソフォームを発現することはできないと考えられた。

我々はさらに、mmDeV と tgDeV についてウイルスの人工合成系を確立 (詳細は省略する) し、各々のウイルスの DAg 発現をウエスタンブロット法によって解析した。その結果、どちらのウイルス感染細胞においても 1 本の DAg バンドのみが観察された。これは、mmDeV と tgDeV は DAg アイソフォームを発現しないことを示唆しており、RNA 編集に関する解析の結果と一致する。さらにウイルスの人工合成系を用いて、mmDeV と tgDeV が HBV のエンベロープタンパク質を利用できるかどうか検討した。その結果、陽性対照として用いた HDV では HBV エンベロープの供給によって感染性のウイルス粒子が細胞外へと放出されるのに対し、mmDeV と tgDeV ではウイルス粒子の形成は観察されなかった。これらのことから mmDeV および tgDeV は HBV エンベロープを利用できないということが示唆され、何らかの他のヘルパーウイルスが存在すると考えられた。

これらの結果からデルタウイルスのサテライト / ヘルパーウイルスの進化に関する以下のようなシナリオが考えられる (図 1)。ovDeV については RNA 編集を示唆する結果が得られていることから、RNA 編集を利用するという形質は ovDeV と HDV の分岐以前に獲得されたことが示唆された。さらに、ovDeV では HBV エンベロープと相互作用するような

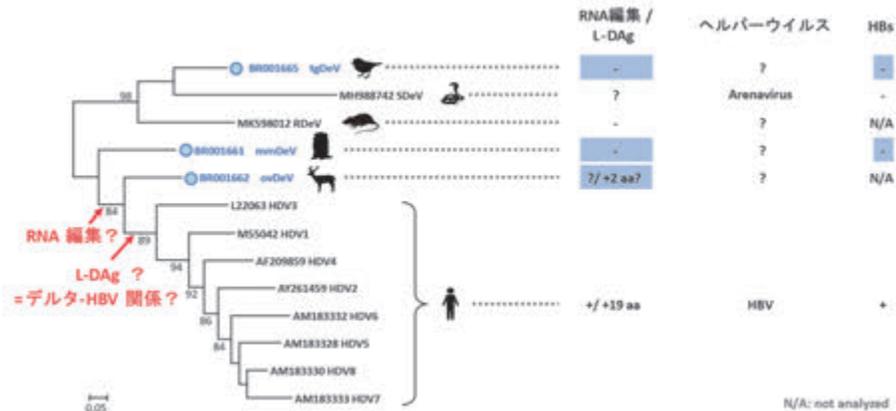


図1. デルタウイルスの分子系統樹と本研究において得られた知見. デルタウイルスの分子系統樹と各ウイルスの形質を右に示す。青色で示されたウイルスが本研究において検出されたデルタウイルスである。本研究において明らかとなった形質を青色でハイライトしている。スケールバーは部位ごとの置換数を表す。

LDAgを発現しないことから、デルタウイルスとHBVのサテライト/ヘルパーウイルスの関係は ovDeV と HDV 系統の分岐以降に成立したと考えられる。

このように本研究では、大規模なデータベース解析を行うことによって新規のウイルスを同定し、さらに詳細な解析を行うことによって、これまでの大きな謎であったウイルスの進化の一部を解明する知見が得られた。また本研究では、データの再利用、さらにはデータ解析とウイルス学的実験というドライとウェットの融合という観点から、今後のウイルス研究における1つのモデルケースとなるであろう。

2. 古代のウイルスの多様性を探る

2-1. 研究の背景

ウイルスは生物と異なり物理的な体化石を残さないため、古代のウイルスについては謎が多い。しかし私たちの生物のゲノムには、ウイルス由来の遺伝子配列が多数存在する。これは生物の進化の過程において、ウイルス由来の遺伝子配列が宿主ゲノムに組み込まれることによって生じたと考えられている。このようなウイルス由来の配列を内在性ウイルス様配列とよぶ。EVEの多くは数百万年以上前に生物ゲノムへと組み込まれており、太古のウイルスの「分子化石」として、太古のウイルスを研究するための貴重な材料となる。

EVEから太古のウイルスについてどのようなことがわかるのか？例えば図2に示すような系統関係にある生物がオーソログなEVEを持っている場合、その共通祖先においてウイルスの内在化が起こったことが考えられる。つまりその共通祖先生物はそのEVEの起源

となったウイルスに感染していた、すなわちそのウイルスの宿主であったと考えられる。さらに生物の分岐年代は化石やゲノムのデータなどから推定されており、内在化が起こった年代も推定できる。また EVE の遺伝子配列から、過去に感染したウイルスの遺伝子配列を再構築することができる。すなわち EVE から、太古のウイルスの宿主、年代、遺伝子配列（系統）を知ることができる。

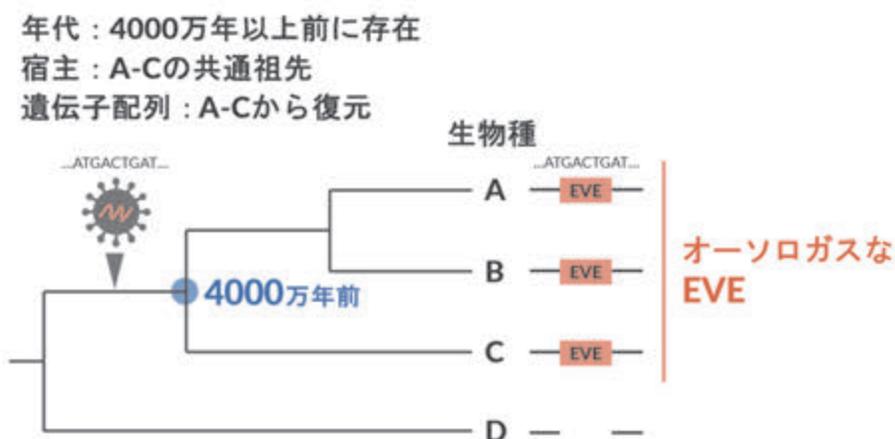


図2. EVE からわかる古代のウイルス. 図の系統関係にある生物種 A-D において、オーソログスな EVE が生物種 A-C に存在すると仮定する。その場合、この EVE は A-C の共通祖先においてウイルスの内在化が起こった、つまりこの EVE の起源となるウイルスが A-C の共通祖先に感染していたことがわかる（宿主）。また生物の分岐年代は体化石や比較ゲノム解析から推定されており、A-C の分岐年代が 4000 万年前であった場合、この EVE の起源となるウイルスは 4000 万年以上前に存在していたと考えられる（年代）。また、現代の EVE 配列より祖先配列の推定が可能であり、分子系統解析を行うことができる（系統）。このように、EVE の解析によって太古のウイルスの宿主、存在年代、遺伝子配列がわかる。

私たちは 2010 年に RNA ウイルスであるボルナウイルスに由来する EVE が、様々な哺乳動物のゲノム存在することを報告し、内在性ボルナウイルス (EBL) 配列と名付けた。さらに我々と他の研究グループの網羅的探索により、ほ乳動物だけでなく多様な脊椎動物ゲノムに EBL 配列が存在することを報告した。比較的 EVE が豊富なレトロウイルスとは異なり、太古の RNA ウイルス感染については謎に包まれている。そこで我々は EBL 配列を網羅的に検出し解析することによって、古代のボルナウイルスの感染の歴史について解析を試みた。

2-2. 1 億年にわたるボルナウイルス感染の歴史の解明

929 の真核生物ゲノムの配列より網羅的に EBL 配列を同定し、同定した EBL 配列について遺伝子オーソロジー解析を行い、各々の古代のボルナウイルスが感染していた年代と宿主

に関する知見を得た。結果を図3に記す。まず、本研究によって最古のボルナウイルス感染が少なくとも9,600万年前に北方真獣類の共通祖先動物において起こっていたことが示された。これは最古のRNA ウイルス感染を示す証拠であり、古ウイルス学 (paleovirology) における貴重な知見が得られた。

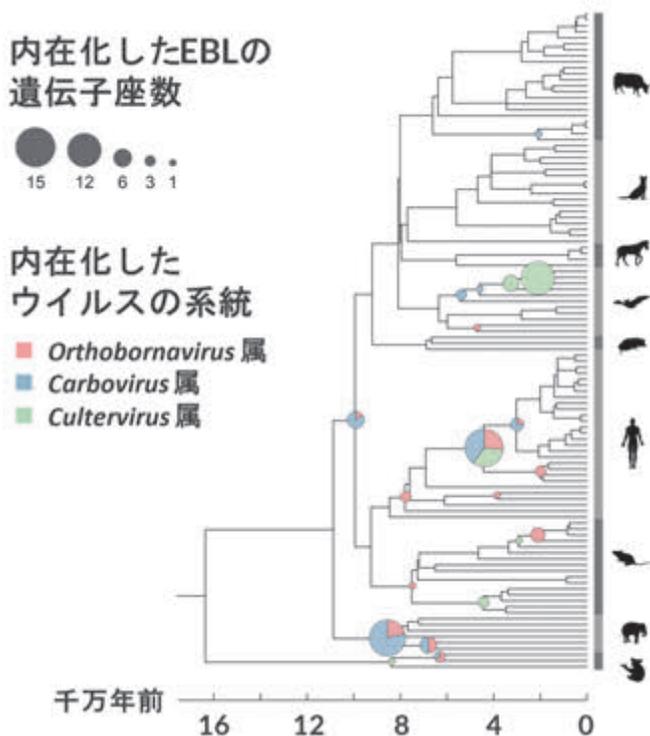


図3. 哺乳動物の進化におけるボルナウイルス感染の歴史。哺乳動物の系統樹とボルナウイルスの内在化を示す。哺乳動物の系統樹では、各系統における代表的な生物のシルエットを系統樹の右に示す。系統図中の円がボルナウイルスの内在化を示している。円の大きさは内在化の回数（内在化した EBL 配列の遺伝子座数）を、色は内在化したウイルスの系統を示している。

また古代のボルナウイルスの宿主は、既知の現代のボルナウイルスに比べてはるかに広いことがわかった。例えばカルボウイルス属およびカルターウイルス属のウイルスはそれぞれヘビと魚からしか同定されていないが、過去には様々な哺乳動物において感染が起こっていたことが示された。これは現代の哺乳動物においても未発見のカルボウイルスやカルターウイルスが存在することを示唆しており、現代のウイルス研究のみからは得られない貴重な知見が得られた。

次に、得られた古代のボルナウイルスおよび現代のボルナウイルスの配列を用いて分子系統樹解析を行った。この結果、古代のボルナウイルスは現代のボルナウイルスの分類と同様

に大きく3系統に分かれることが示唆された。一方で3つの各系統内において、古代のボルナウイルスのほぼ全てが、現代のウイルスとは異なるクレードに属しており、過去には極めて多様なボルナウイルスが存在したことが示唆された。

さらに、分子系統樹解析と年代推定のデータを統合することによって、ウイルスの長期的な進化に関する知見も得られた。過去の報告において、ボルナウイルスは宿主生物との共分岐によって進化してきたことが提唱されている。しかし、古代のボルナウイルスの系統樹は、宿主生物の系統を反映しておらず、むしろ存在年代ごとにクラスターを形成していた。そのため、時代によって異なる系統のウイルスが脊椎動物へと感染していたことが示唆された。

一方、一部のボルナウイルスでは宿主生物と長期共存関係にあったことが示唆された。例えば新生代において、古代のカルボウイルスと霊長類動物が長期的な共存関係にあることが示唆された。興味深いことに、この霊長類と長期的な共存関係にあったと考えられたカルボウイルスのクレードには、コウモリ由来の古代ボルナウイルスも属していることが明らかとなった。これらのことから、霊長類において長期的に共存していたウイルスがコウモリへと伝播した可能性が考えられた。

本研究では、約1億年にわたる脊椎動物における古代のボルナウイルスの存在年代、宿主、系統を体系的に明らかにした。本研究はRNAウイルスの長期的な感染の歴史を追究したはじめての研究であり、古ウイルス学的に極めて貴重な知見が得られた。また今後の古ウイルス学研究のモデルとなり得るであろう。さらに、過去の宿主生物について、現代のウイルスの研究のみからは得られない、ウイルス学や感染症学に関連する重要な知見も得られた。一方で、これらはあくまでも過去のウイルス感染の「スナップショット」であることに留意する必要がある。すなわち、生物の体化石と同様に、過去の姿すべてを反映しているだけでなく、そのごく一部だけが残っているということである。そのため実際の進化の詳細については未だ謎が多い部分もあるが、今後生物のゲノム配列の解明や、さらなる現代のウイルスの探索によって明らかになっていくことも多いであろう。

参考文献

1. Kawasaki J, Kojima S, Tomonaga K, Horie M. Hidden Viral Sequences in Public Sequencing Data and Warning for Future Emerging Diseases. *mBio*. 2021. 31:12 (4) :e0163821. doi: 10.1128/mBio.01638-21.
2. Iwamoto M, Shibata Y, Kawasaki J, Kojima S, Li YT, Iwami S, Muramatsu M, Wu HL, Wada K, Tomonaga K, Watashi K, Horie M. Identification of novel avian and mammalian deltaviruses provides new insights into deltavirus evolution. *Virus Evol*. 2021. 12:7 (1) :veab003. doi: 10.1093/ve/veab003.
3. Kawasaki J, Kojima S, Mukai Y, Tomonaga K, Horie M. 100-My history of bornavirus infections hidden in vertebrate genomes. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2021. 18:118 (20) :e2026235118. doi: 10.1073/pnas.2026235118.

新型コロナパンデミックに対する動物実験施設の対応と本施設での学術研究

磯野協一

和歌山県立医科大学動物実験施設

【新型コロナウイルスへの対応】

新元号「令和」が始まった2019年を忘れようとしていた頃、中国湖北省武漢市で原因不明の肺炎患者が多数確認された。未曾有の大惨事・新型コロナパンデミックの始まりである。新型コロナウイルスは瞬く間に全世界に広がり、人のあらゆる活動が制限された。感染拡大が甚大な諸外国の一部動物実験施設においては、動物福祉の観点から実験動物のトリアージを余儀なくされた。国内の動物実験施設は、比較的感染拡大が緩やかであったため「動物の命」と「人の命/感染阻止」を両立させる対策を講じる時間が与えられた。対策の内容は各施設の状況・環境に依るところが大きいが、一施設の例として当学動物実験施設の対応・対策を簡単に紹介する。

(1) 当施設における初動対応（下表）

2020年1月初旬の国内初の感染者発表から約1.5ヶ月間は状況を注視しながらの対応であった。事実、2月初旬のダイヤモンドプリンセス号の報道では、まだ他人事、危機として真剣に向き合っていなかったように思える。しかし2月中旬からの感染経路不明者の増加によって、『今そこにある危機』と思い知った。緊急に感染および感染予防に向けたマニュアルを作成したが、事態は深刻の一途を辿り、全国緊急事態宣言の発出に至った。それを受けてマニュアルをより厳しく改訂した。その後も事態は日々刻々と深刻化していたが、結果として後手に回らず対応することができ、現在に至るまで重大な混乱を招くことはなかった。

年月	新型コロナ禍の国内状況	当施設の対応
2020年1月初旬	国内初の感染者（渡航歴あり）の発表	マスク発注（在庫含め半年分）
2020年2月初旬	店頭からマスクが消える	マスク使用節約を要請
2020年2月末	国内小中学校が一斉臨時休校	新型コロナ対応マニュアルを学内配信
2020年4月中旬	全国に緊急事態宣言発出	新型コロナ対応マニュアルの改訂

(2) 当施設における感染対策

個々の生活がある中で感染を完全に防ぐことは難しい。施設で働く者が感染したとし

ても、施設内での感染を広げないことが、人の命・動物の命を護るための最善策であると考へた。飼育員は作業衣、マスク、手袋を常に着用して作業するため、ヒトからヒトへの感染が起これるとすれば昼食時である。本施設では、飼育作業員を複数にグループ分けし、時間差昼食を取り入れ、さらに食事時の飛沫感染対策として仕切り板を設置した。食前食後での休憩室のエタノール消毒も徹底した。感染が起これた場合の濃厚接触者の判断は専門機関に委ねるが、おそらく異なるグループを跨ぐことはないと考へる。しかしあらゆる状況に対応するために、感染対応により出勤できなくなったグループの数に応じた飼育作業（ケージ交換、給水・給餌、洗浄、清掃、動物点検など）の見直し案も用意した。飼育作業見直しに対応した動物実験の制限もこれに附帯させた（新規交配不可、個体数削減努力、実験計画書の審査中断など）。当然、事務職員側で感染が起これた場合の対応もマニュアルに含めた。

（3）雑感と謝意

これまで10人近くの当施設従業員から発熱報告を受けた。ほとんどは治療副作用や保育所での幼児発熱、あるいは県内感染者数のほぼゼロ状況から判断して、心情的に慌てること無く、PCR検査結果を待つことができた。しかし1件だけ、全国レベルで感染者数が増大していた第4波のピークに差し掛かる時期での発熱報告、あまつさえ同居家族の同時発熱との情報も合わさって、これには覚悟した。その夕刻に陰性であるとの連絡があった時は、もちろん安堵で一杯となったが、すぐに「もはや感染は避けられないもの」と言い聞かせた。幸いにして、これまで施設従業員は誰1人として新型コロナに感染していない。今現在（2021年10月上旬）、国内のコロナ感染はあたかも収束に向かっているように見える。コロナワクチン接種（2回）が6割に到達したことが理由の1つであるのは間違いない。しかし専門家は必ず次の波が来ると警鐘を鳴らしている。実際にどうなるかはわからないが、およそ2年にわたる大惨事から解き放たれることを節に願っている。

最後に、日々の生活においても感染対策を徹底してきた施設従業員、並びに国内感染が起これていない時点で過去の経験からマスク不足を予測した事務スタッフに感謝する次第である。

【学術研究：ポリコム群によるエピジェネティクス】

ポリコム群の歴史はショウジョウバエから始まった。ポリコム群は体の前後軸に沿ったホメオティック遺伝子の発現を制御し、体節のアイデンティティを決定する。ポリコム群の機能は哺乳動物でも高度に保存されており、近年のゲノムワイド解析からポリコム群はほとんどの分化関連遺伝子や細胞周期関連遺伝子を制御下におき、様々な組織

の幹細胞や未分化細胞の分化能や自己複製能に貢献していることが明らかとなっている。ポリコム群は複合体を形成して機能するが、2つの複合体 PRC1 (コア成分 PCGF2/4, RING1A/B, CBX2/4, PHC1/2) と PRC2 (コア成分 EED, SUZ1, EZH1/2) が古くから知られている。PRC1 および PRC2 はそれぞれ異なるヒストン修飾活性を有する転写抑制複合体である。ポリコム群の生化学的理解の深まりとは対比的に、その抑制メカニズムには議論の余地を残していた。

我々はポリコム群による遺伝子抑制メカニズムを解明するために PRC1 成分の PHC2 を中心に研究を展開してきた。マウス PHC2 の遺伝子クローニングと発現解析から始まり (1)、ノックアウトマウス作製よって PHC2 はポリコム群として機能していることを証明し (2)、さらには抑制メカニズムを改訂した (3)。PHC2 の C 末に位置する SAM (sterile-alpha-motif) ドメインは自己重合 (head-to-tail 結合) することができる。この重合機能によってクロマチン結合した PRC1 を会合させ、結果としてクロマチンが凝集して抑制的になるという遺伝子抑制モデルを報告した (図 1) (3)。

多能性および自己複製能は幹細胞の特性である。この特性はポリコム群の状況依存的な遺伝子抑制機能によって支えられている。したがって、ポリコム群機能はシグナルやストレスなどの環境変化に応じてオンオフを切り換える必要がある。最近我々は、ポリコム群を制御する上流機構を解明する一環として、PHC2 リン酸化に注目した。一連の解析から、PHC2 は DNA 損傷誘導的に DNA 損傷応答キナーゼ ATM によって直接的にリン酸化され、DNA 修復に貢献することを発見した (図 2)。当該リン酸化残基に対する点変異型マウスを利用した解析により、PHC2 リン酸化はがん発症リスクに関わること、ポリコム群遺伝子抑制とは独立していることが示唆された。したがって、ポリコム群機能の二面性 (遺伝子抑制と DNA 修復) は、幹細胞の多能性、自己複製能、そしてゲノム完全性、すなわち幹細胞ホメオスタシスに寄与していることが示された (図 2)。近年、ポリコム群の遺伝子抑制機能はがん治療の標的として大きな高まりを見せているが、PHC2 リン酸化もまたその候補であると期待する。これまでも、これからもポリコム群機能の分子基盤は魅力的な研究分野である。

1. Yamaki M, Isono K, Takada Y, Abe K, Akasaka T, Tanzawa H, Koseki H. (2002) The mouse *Edr2* (*Mph2*) gene has two forms of mRNA encoding 90- and 36-kDa polypeptides. *Gene*, 288, 103-110.
2. Isono K, Fujimura Y, Shinga J, Yamaki M, O-Wang J, Takihara Y, Murahashi Y, Takada Y, Mizutani-Koseki Y, Koseki H. (2005) Mammalian polyhomeotic homologues *Phc2* and *Phc1* act in synergy to mediate polycomb repression of *Hox* genes. *Mol. Cell. Biol.* 25, 6694-6706.

3. Isono K, Endo TA, Ku M, Yamada D, Suzuki R, Sharif J, Ishikura T, Toyoda T, Bernstein BE, Koseki H. (2013) SAM domain polymerization links subnuclear clustering of PRC1 to gene silencing. *Dev Cell* 26, 565-577.

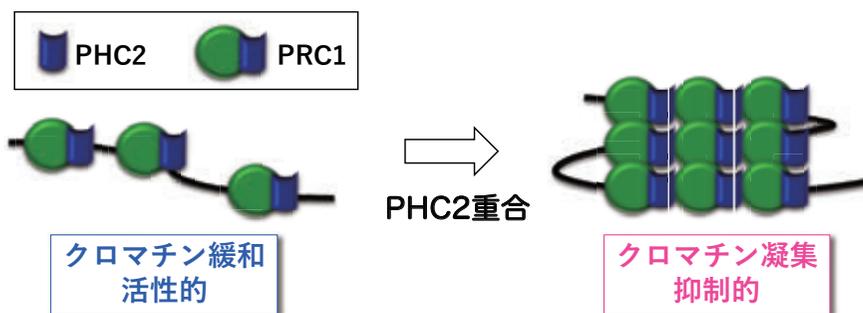


図1 PHC2自己重合を介した遺伝子抑制モデル

ポリコーム群による遺伝子サイレンシングにはPHC2重合を介したPRC1複合体の会合、それに伴うクロマチン凝集が重要である

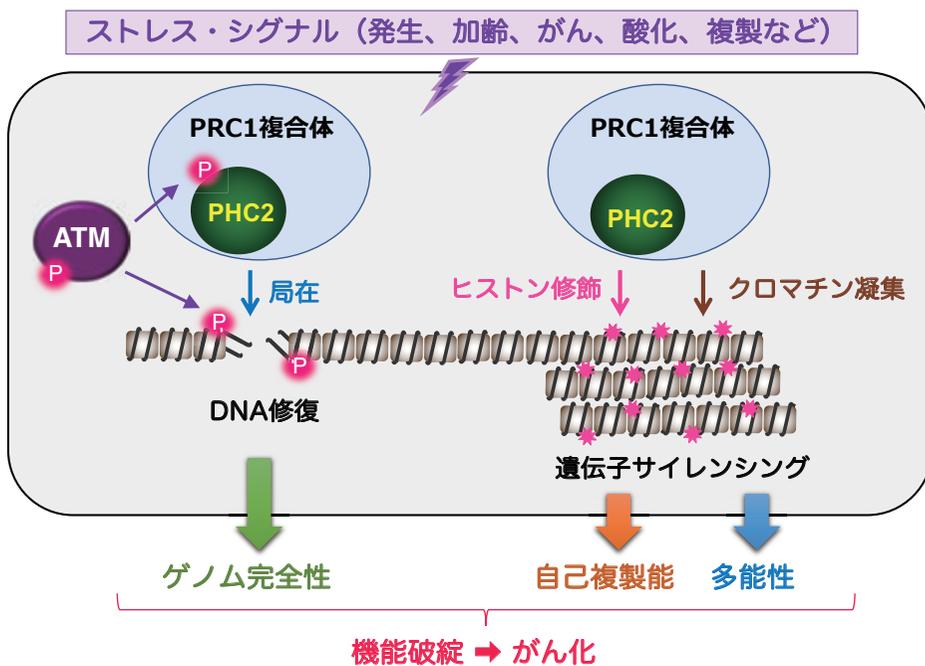


図2 ポリコーム群による幹細胞ホメオスタシスの制御モデル

<第 147 回研究会（令和 3 年 12 月 10 日）オンライン開催>

<会員の発表>

1. マウス胎子における精巣から中腎内への AMH の移行経路の検討
加藤 栞（神戸大院・農・形態機能）
2. 女性ホルモンによる糖尿病膵島保護作用の解明
重中 咲希（京都大院・農・動物遺伝育種学）
3. 帯電微粒子水の UV ケア効果の検討
近藤 友宏（大阪府立大学実験動物学教室）
4. QTL からの効率的癌型 K-Ras 肺発癌 modifier 遺伝子候補の選択と解析
○齋藤浩充（三重大学 地域イノベーション推進機構）

<トピックス>

- マウス卵胞再構築系の開発と今後の展望
林 克彦（大阪大学大学院医学系研究科生殖遺伝学）

<特別講演>

1. マウス生体内におけるエネルギー動態の可視化
山本 正道（国立循環器病研究センター 研究所 研究推進支援部）
2. ゲノム編集による遺伝子改変有袋類の誕生
清成 寛(理化学研究所 生命機能科学研究センター 生体モデル開発チーム)

マウス胎子における精巣から中腎内への AMH の移行経路の検討

○加藤 栞、横山俊史、奥西宣祐、成田大翔、桐月優輔、藤川大誠、万谷洋平、星 信彦
(神戸大院・農・形態機能)

発生中の哺乳類では、雌性生殖道の前基であるミュラー管 (MD) と雄性生殖道の前基であるウォルフ管 (WD) の両者が形成される。その後、雄では、精巣から分泌される抗ミュラー管ホルモン (AMH) の影響で MD は退行し、テストステロンの影響で WD は精巣上体、精管、精嚢腺へと分化する。一般にホルモンは血液を介して作用するが、胎子性腺内のテストステロンは精巣網 (RC) および中腎細管 (MT) を介して中腎内へ移行することが器官培養系で解明されており、このテストステロンが同側の WD を維持・発達させると考えられている [Tong *et al.*, 1996]。また我々は以前、AMH についても全身循環を介さず、精巣から中腎内へ移行し同側の MD の退行を惹起することを明らかとし、その際に AMH が主に精巣頭側部から中腎内に浸潤することを示唆する所見を示した [Yamamoto *et al.*, 2018]。これより、精巣頭側部から中腎内へ移行した AMH が MD 頭部の退行を惹起することが推測されたが、MD 中央部以降に AMH が到達する経路は不明であるため、器官培養法を用いて検討した。

【方法】

胎齢 12.5 日付近のマウス性腺中腎複合体を摘出し、AMH の移行経路の候補領域を切断後、72 時間培養した。横断方向のパラフィン切片上で、MT と WD の接続部付近 (MD 頭部) および最尾側の中腎細管付近 (MD 中央部) の MD 管径を計測して、その退行程度を評価した。また、胎齢 12.5-15.5 日の精巣頭部または尾部に AMH を注入後、切片上で AMH の拡散程度を検討した。

【結果と考察】

精巣頭部側での AMH の移行を阻害して培養すると、MD 頭部管径は培養のみ行った実験対照より有意に増加した一方、MD 中央部管径は実験対照と同程度であった。精巣尾部側での AMH の移行を阻害して培養すると、MD 頭部管径は実験対照と同程度であり、MD 中央部管径は実験対照よりわずかに増加する傾向を示したものの、有意な差は認められなかった。RC および MT を介する経路を阻害して培養すると、MD 頭部管径は増加する傾向を示した一方、MD 中央部管径は実験対照と同程度であった。また、AMH を精巣に注入すると、胎齢 12.5、13.5 日では、精巣に加えて注入部付近の精巣・中腎境界部および MD 近傍の間充

織に AMH が検出されたが、胎齢 15.5 日では精巢・中腎境界部の間充織は陰性であった。

以上より、MD 退行初期において AMH が精巢頭部側から中腎内へ移行することが明らかとなり、精巢尾部側からも AMH が中腎内へ浸潤的に移行することが示唆された。また、初期の MD 退行には、RC および MT を介して中腎内へ移行する AMH よりも、間充織を浸潤する様式で中腎内へ移行する AMH の方が重要である可能性が示された。

女性ホルモンによる糖尿病膵島保護作用の解明

○重中 咲希、足立 直紀、廣小路 知貴、谷口 幸雄、横井 伯英

(京都大院・農・動物遺伝育種学)

【背景】 2型糖尿病は、膵β細胞からのインスリン分泌不全を基盤として末梢臓器におけるインスリン抵抗性が加わることにより発症する生活習慣病の1つである。2型糖尿病の罹患率が女性よりも男性で高いことや、閉経後の女性が閉経前に比べて発症リスクが高まることから、2型糖尿病の発症には性差が存在し、女性ホルモンが大きく関与していることが知られる。特に女性ホルモンの1つである17βエストラジオールは膵島への脂質の蓄積を防いだり、膵β細胞のアポトーシスを防ぐことが報告されているが、その詳細なメカニズムは未だに明らかでない。

肥満2型糖尿病モデル Zucker fatty diabetes mellitus (ZFDM) ラット系統において、レプチン受容体遺伝子 (*Lepr*) のミスセンス変異 (*fatty*, *fa*) をホモ型で有するオスは肥満を呈し10週齢から20週齢までに全例が糖尿病を発症し、膵β細胞からのインスリン分泌障害と膵島構造の崩壊が観察される。一方で *fa/fa* ホモ型のメスは肥満を呈するもののインスリン分泌と膵島構造が保持され、糖尿病を生涯発症しない。

【目的】 今回、ZFDM ラットのオスに対して17βエストラジオール (E2) の投与実験を行い、女性ホルモンによる糖尿病発症抑制効果について報告する。

【方法】 6週齢のZFDM ラット (*fa/fa* ホモ型) のオスを2群に分け、実験群には首の後ろの皮下にE2を60日間で0.72 mg徐放するペレットを留置し、対照群にはプラセボのペレットを留置した。留置した日から週に1回体重と血糖値の測定を行い糖尿病の発症について観察した。また、同時にZFDM ラットのメス (*fa/fa* ホモ型) についても9週齢以降、週に1回体重と血糖値を測定した。非絶食下(随時血糖)において血糖値300 mg/dL以上を2週連続で確認したものを糖尿病発症と診断した。

【結果と考察】 対照群は7～10週齢で全個体が血糖値300 mg/dLを超え、糖尿病を発症した。一方、E2投与群はペレットの徐放期間が終了する15週齢まで全個体が血糖値200 mg/dL以下で推移し糖尿病の発症が認められなかったが、その後糖尿病を発症する個体が現れた。対照群の体重は、糖尿病発症前から発症初期にあたる10週齢ごろまで著しく増加し、次第に増加が緩やかになるのに対し、E2投与群の体重は比較的緩やかに増加し続け14週齢で対照群と同等になった。メスは、肥満を呈するものの糖尿病の発症が認められなかった。

【結語】 女性ホルモンの投与によりZFDM ラットのオスの糖尿病の発症が抑制されることが示された。ZFDM ラットは糖尿病性膵島障害における性差のメカニズムを解明する上で有用なモデルであり、新たな2型糖尿病治療法の開発に寄与することが期待される。

帯電微粒子水の UV ケア効果の検討

○近藤 友宏、長井 寛明、岡田 利也

(大阪府立大学実験動物学教室)

帯電微粒子水は様々な物質に作用しやすい OH ラジカルを含み、また水の中に含まれているため寿命が長く、その分効果は広範囲におよび、ウイルスおよび細菌の抑制、残留農薬の減少、カビ・アレル物質の抑制、美肌や美髪作用、野菜の鮮度保持などの効果が確認されている。我々はこのうち美肌効果に着目し、紫外線暴露後の帯電微粒子水噴霧に UV ケア効果が認められるという仮説をたて、マウスを用いた検討を行った。

【材料と方法】

7 週齢の雌性メラニン保有ヘアレスマウス (Hos:HRM-2) を導入後、1 週間の馴化期間を設けた。群分けは、240mJ/cm² の強度で紫外線を照射した直後から帯電微粒子水のミスト(以下ミスト)を 24 時間噴霧する群、8 時間噴霧する群、噴霧しない群に分け、紫外線を照射せずにミストの噴霧のみを行う群も設定した。経表皮水分蒸散量 (TEWL) を測定するとともに、8 時間後、1 日後、5 日後の採材時には皮膚の厚さをデジタルノギスで測定した。採取した皮膚を用い、H.E 染色を施すとともに、炎症性反応に関与する遺伝子発現量解析を実施した。

【結果と考察】

肉眼的観察では、紫外線照射ミスト無し群では 1 日後から皮膚の張りが確認されたのに対して、紫外線照射ミスト有り群では噴霧時間に関わらず皮膚の張りは 1 日後では認められず、2 日後以降に観察された。TEWL の測定では、紫外線照射ミストなし群では紫外線照射 24 時間ミスト噴霧群と比較し終始高値を示しており、ミスト噴霧による皮膚バリア機能の改善が示唆された。皮膚の厚さは、紫外線照射 5 日後で、紫外線照射による皮膚の肥厚が確認され、またミスト噴霧時間に比例して、肥厚の緩和が認められた。組織観察の結果、紫外線照射による核濃縮像、細胞質の酸好性の増強、血球漏出像がミスト噴霧により軽減されていた。また有意差は認められなかったものの、照射後 24 時間での遺伝子発現量解析において、紫外線照射による IL-1b、COX-2 発現量の上昇が、ミスト噴霧により抑制されている傾向が確認された。

以上の結果より、ミスト噴霧は紫外線暴露による変化のいくつかを抑制することが明らかとなり、帯電微粒子水は紫外線暴露後の UV ケア効果を有することが示唆された。

QTL からの効率的癌型 K-Ras 肺発癌 modifier 遺伝子候補の選択と解析

○齋藤浩充、鈴木昇

(三重大学 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部門)

(背景) *K-Ras* 変異は肺癌全体の 30% を占めるにもかかわらず *K-Ras* に対する臨床上利用可能な分子標的薬は無く、治療につながる新たな標的遺伝子の探索が重要な課題である。我々は、*K-Ras* 遺伝子変異から腫瘍が出現するまでの発症過程 (変異後過程) に焦点をあてるため、Cre 組み換え酵素発現により、任意の時期、細胞で癌型 *K-Ras* 遺伝子を発現可能な *Ryr2^{m1Nobs}* マウスを作製した。Cre 発現アデノウイルスを用いた肺気管支上皮細胞特異的な癌型 *K-ras* 遺伝子発現によりヒトの肺胞上皮 2 型様腺がんを発症するモデルマウスを作製した。このマウスにそれぞれ C57BL6 (B6) 系統と、A/J 系統の遺伝子背景を導入し、肺発癌高感受性系統 B6-*Ryr2^{m1Nobs}* 及び低感受性系統 A/J-*Ryr2^{m1Nobs}* を樹立した。

(目的) 約 10cM 間隔で、polymorphism マーカーを設定し、F2 マウス 96 匹による QTL 解析 (単点解析) を行った。これまでの探索で、第 3、7、8、9 番染色体において A/J 系統由来の遺伝子座が B6 系統由来の遺伝子座に対して有意に発癌を促進する遺伝子座、第 6、11、13、19 番染色体において、有意に発癌を抑制する遺伝子座を見出した。複数存在する QTL 遺伝子の同定を、交配で行うためには、膨大な交配と時間が必要であり、3R の観点からも、より効率のよい検討方法が必要と考えられる。そこで、得られた QTL について、データベースと *in vitro* 実験による候補遺伝子の絞り込みを試みた。

(結果と考察) 各 QTL 近傍で、系統間で配列に差異があり、かつ発癌関連の遺伝子 81 遺伝子を選び、2 系統の正常肺での mRNA 発現量の比較を行った。系統間で発現に差異のある 51 遺伝子を最終候補遺伝子とした。B6-*Ryr2^{m1Nobs}* 肺腫瘍から細胞株を樹立し、細胞株において発現している 34 遺伝子について siRNA による発現抑制実験によって細胞増殖への影響を検討した。その結果、19 遺伝子で有意に増殖が抑制され、1 遺伝子で増殖が促進された。今後、この 20 遺伝子について、CAS9 による遺伝子編集を応用し、*in vivo* で検討する予定である。

マウス卵胞再構築系の開発と今後の展望

林 克彦

(大阪大学医学系研究科 生殖遺伝学教室)

生殖細胞系列は次世代の個体をつくる唯一の細胞系列である。種特有の遺伝物質はその細胞系列の中で多様性を獲得しながらも、次世代の個体発生に十分な能力を獲得する。すなわち生殖細胞系列は種の維持および進化の源であり、その発生・分化には減数分裂、エピゲノムリプログラミング、性分化など様々な特殊な過程が含まれる。またこれらの過程における異常は不妊や次世代の個体の発生・発育異常などの原因となるため、生殖細胞系列の発生・分化過程を正しく理解することは生物学的・医学的に重要である。しかしながら生殖細胞系列の分化は胚発生の早い時期（まだ数百細胞からなる胚の段階）に始まり、多くの過程が一過性に進行することから、十分に解析されているとは言い難い。

生殖細胞系列の発生・分化過程を体外培養で再構築できれば、そのメカニズムにアプローチできる。特に多能性幹細胞を起点とした再構築系は生殖細胞系列の発生・分化過程の解明のみならず、得られる配偶子から目的の遺伝子変異等をもった個体を作製することもできる。またこのような多能性幹細胞を用いた再構築系は実験動物の代替としても機能するだろう。我々はこれまでにマウスの ES 細胞および iPS 細胞から機能的な卵子を分化誘導する体外培養法を開発した。この培養系における卵母細胞系列の形態的变化や遺伝子発現変動は体内でのそれらをほぼ踏襲しており、実際に得られた卵子の一部は受精により個体にまで発生する。また最近では、生殖細胞系列の性分化や配偶子形成を支持する生殖巣（精巣や卵巣の原基）の体細胞の再構築にも成功している。

これらの一連の再構築系の開発により、生殖細胞や生殖巣の分化過程を培養レベルで解析することが可能になってきた。本講演では、これらの研究の紹介とそれらを通じて見えてきた課題や生殖細胞の分化メカニズムの新しい知見について紹介したい。

マウス生体内におけるエネルギー動態の可視化

山本 正道

(国立循環器病研究センター 研究所 研究推進支援部)

はじめに

アデノシン三リン酸 (ATP) は細菌から真核生物まで地球上の全生物共通の構造を持ったエネルギー源である。1929年に発見されてから、その構造・生合成系・機能は詳細に解析されてきた。例えば、1941年には筋肉の収縮運動、1954年には分子のリン酸化、1957年にはイオンポンプ、2000年にはクロマチン構造を ATP 量が制御していると報告されてきた。最近では、2017年に新たな機能として生体内でタンパク凝集などを抑制するハイドロトロープとしての機能が報告された。これらの機能は生体の恒常性を司っているため、筆者は ATP 量の変化が恒常性の変化を示しているという仮説をたてて生体内の ATP 動態を正確かつ経時的に計測できるシステム開発を行ってきた。本稿では、本システムとその応用例を紹介する。

ATP 量の可視化

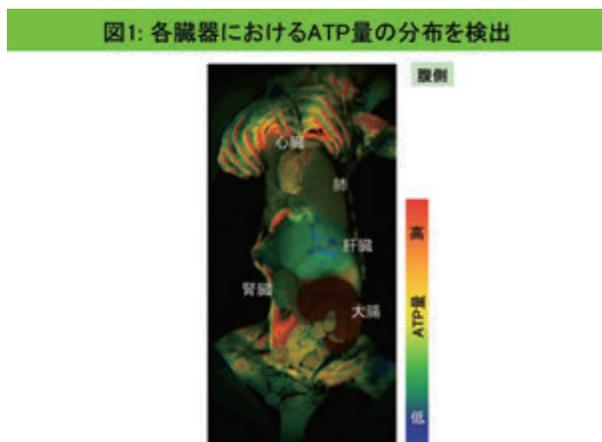
生体内の ATP 量を検出する方法として、紫外可視吸収法、磁気共鳴法などが開発されているが、いずれも ATP 濃度を 1 細胞レベルで高解像度に定量する事はできない。例えば、ルシフェラーゼ法という生化学的方法がある。この方法は細胞をすり潰して、細胞内に存在していた ATP がルシフェリンとルシフェラーゼの反応に使用されることにより発光する原理を使用している。しかしながら、この方法は細胞毎や経時の変化が不明であると言う欠点を有している。一方で、2012年頃から報告され始めた質量分析を 2次元展開した MASS イメージング法は、数百細胞単位であるがおおよその位置情報を得ることができる画期的な方法である。ただし、こちらの方法も経時的な変化が不明であった。近年、光学機器及び蛍光イメージングの技術革新により、様々な組織または臓器深部における生命現象を 1 細胞レベルで解析するため、蛍光生体イメージングは発展してきた。時を同じくして、いくつかの蛍光 ATP センサーが開発されてきた。1つは ATP/ADP 比を 2 波長の蛍光強度比で測定する Perceval¹⁾ が開発された。しかし、pH に対する感受性が高く、結果を解釈するためには pH の変化も解析する必要があった。もう一方は、フェルスター共鳴エネルギー移動 (FRET) を利用して ATP 単独の濃度変化を測定する ATeam²⁾、B-Queen³⁾、EAF-based ATP biosensor⁴⁾ などが開発された。また、ATP の濃度変化に応答して、蛍光強度が変化する単色型の蛍光タンパク質を用いた MaLionB, G, R⁵⁾ も開発された。これらの ATP 蛍光プロー

ブは目的に応じて様々な研究に活用され始めている。

ATP 可視化マウスの開発

筆者が生体内の ATP 動態を調べる方法を探索して行き着いた候補が Perceval と Ateam であった。しかし、Perceval 及び初代の CFP と YFP を用いて構築された Ateam は pH に対しても感受性が高くて、ATP の変化と pH の変化を区別する事が難しく、生体への展開は困難だと考えていた。この困難を克服可能な新規 ATP 感受性センサー Goateam が開発されたので、これを用いて生体内での ATP 量可視化を検討することにした⁶⁾。

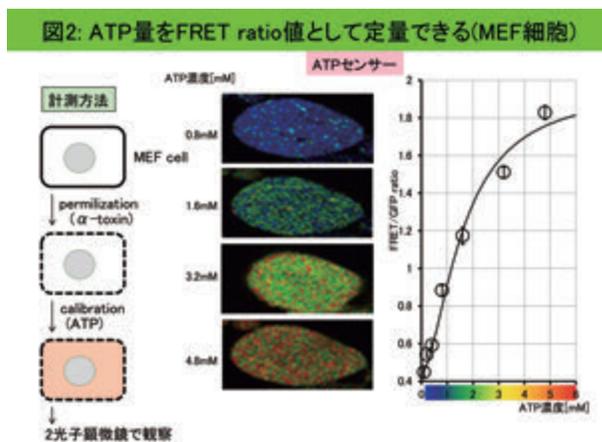
Goateam は、オワンクラゲ由来緑色蛍光タンパク質 (GFP) とサンゴ由来のオレンジ色蛍光タンパク質 (Kusabira Orange, KO) を、細菌の ATP 合成酵素を構成するタンパク質の 1 つである ϵ (イプシロン) サブユニットを介して遺伝子工学的に連結させた人工タンパク質である。ATP が低濃度の時には、 ϵ サブユニット部分は直線状の構造をしており、Goateam 中の GFP と KO の距離は離れる。一方、ATP 濃度が上昇すると ϵ サブユニット部分に ATP が結合することで、閉じた構造へと構造が変化し、Goateam 中で GFP と KO の距離が縮む。この 2 種類の蛍光タンパク質間距離が近くなると FRET 現象が起り、GFP を励起しても KO の吸収光が生じる。この原理を利用して、Goateam の GFP を励起したときに発生する吸収光を解析すれば ATP 濃度を推測することが可能になる。ATP 濃度の評価は、蛍光顕微鏡を使ってこの細胞の FRET 画像 (GFP 励起・KO 吸収光) と GFP 画像 (GFP 励起・GFP 吸収光) を取得し、FRET/GFP 比 (FRET ratio 値) を計算することにより実施する。FRET シグナルが高いほど ATP 濃度が高いことになる。この Goateam を細胞質内で発現するマウス個体 (以下 ATP 可視化マウス) の作成に成功したので、これを用いて全身の ATP 動態を調べる事にした (図 1)。



FRET/GFP 比 (FRET ratio 値) と ATP 量の関係

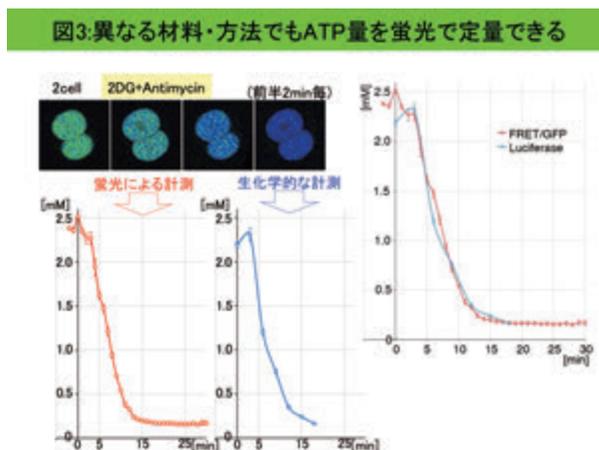
ATP 可視化マウスに利用した Goateam が発する吸収光の FRET/GFP 比は、原理的に値が小さくなると ATP 量が低下し、大きくなると ATP 量が増加していることを表している。これまで報告されてきた FRET 型蛍光タンパクプローブで、例えば AMPKAR は FRET ratio 値が 1.2 から 1.6 程度に変化するため、変化量は $1.6/1.2 = 1.33$ 倍程度であった⁷⁾。一方、今回使用した Goateam は FRET ratio 値が 0.4 から 2.0 程度に変化するため、変化量は $2.0/0.4 = 5$ 倍と既存の FRET 型蛍光タンパクプローブとしては最大の FRET ratio 変化値であった。この大きな FRET ratio 変化値を利用すれば FRET ratio 値から ATP 量を定量的に計測することが可能ではないかと考えたので、これを検討することにした。

ATP 可視化マウスの胎児からマウス線維芽細胞を樹立し、この細胞を黄色ブドウ球菌由来の α 毒素で処理することで細胞膜に ATP が通過できるだけの穴を開けた。その後、培養液に様々な濃度の MgATP を添加した時 (つまり、細胞内の ATP 量を変化させた時) の FRET ratio 値を同一細胞で計測した。この時得られた FRET ratio 値と添加した ATP 量の関係を検討したところ、ATP 量が 0.1 から 6.4mM の間で FRET ratio 値がシグモイドカーブを描く検量線を得られることが明らかとなった (図 2)⁸⁾。つまり、マウス線維芽細胞で



は FRET ratio 値から ATP 量を推定できる事が示された。この得られた結果を他細胞へ拡張するため、他の細胞・他の方法でも同様の検量線を得ることができると検討した。材料としてはマウス受精卵を利用することにした。ATP 合成阻害剤である 2-deoxy-D-Glucose と Antimycin A を添加すると受精卵の ATP 量が経時的に減少すると予想された。そこで、ATP 可視化マウスから受精卵を得た後に 2-deoxy-D-Glucose と Antimycin A を培養液に添加したところ、約 18 分間で FRET ratio 値が底打ちした。この阻害剤添加過程を利用して、0分から18分まで3分ごとに受精卵を回収・粉碎することで細胞内 ATP 量を生化学的計測

した。一方で、マウス線維芽細胞で得られた検量線を用いて FRET ratio 値から阻害剤添加過程での受精卵内の ATP 量を推定した。この2つの結果を比較検討したところ、両方で描いたグラフが一致したことから、マウス線維芽細胞を用いて作成した FRET ratio 値から ATP 量へ変換する検量線は他の細胞へも適応可能であると示唆された (図3)⁸⁾。これより、FRET ratio 値から定量的に ATP 量を計測できるという考えに至った。



生体内の ATP 動態計測法の応用

現在、マウス生体内の ATP 動態計測技術を利用して、特に対象臓器は心臓・腎臓・脳神経・肝臓・骨格筋を中心に、生理・疾患発症と進行・薬理・疲労・老化などの現象に対して ATP 動態計測を行っている。変動をミリ秒レベルで、細胞から臓器レベルの解像度で調べることによって新たな現象を捉えることに成功している。

例えば心臓では、ATP 可視化マウスを麻酔しながら、生理的条件下で開胸・開腹して蛍光実体顕微鏡で直接心臓を観察した。その結果、収縮弛緩と共に増減する FRET ratio 値を捉えることに成功した。検量線を用いて FRET ratio 値を ATP 量換算したところ、平均値 1.21mM を中心に約 0.04mM の増減を繰り返している事が示された。

また、腎臓では腎動脈の虚血再灌流を行うことで急性腎傷害から慢性腎不全へ移行する疾患モデルを作製する方法を用いて近位尿細管と遠位尿細管での虚血再灌流時の ATP 動態を計測した。その結果、慢性腎不全へ進行する率（繊維化が進む率）と再灌流時の ATP 回復速度が逆相関した。同様に、慢性腎不全へ進行する率と再灌流 1 時間後の ATP 量回復率も逆相関する事を見出した⁹⁾。

今後の展開

マウス生体内で ATP 動態を計測する技術はできてきたが、現状では麻酔で固定されてい

る時の計測となるため、真の意味での代謝を計測している事とは異なっている可能性がある。そこで、ファイバー顕微鏡を開発・利用し、自由に動き回るマウス生体内各臓器・細胞のATP動態を計測できるシステムを構築している。また、エネルギー代謝通貨としてATP以外ではNADが存在する。このNADの動態も生体内で可視化できる技術を開発している。更に、ATPのような代謝の基盤形成に関わる因子はマウスだけでなく、ヒトなどの高次機能動物でも同様の動態を示す可能性がある。これを明らかにし、ヒトなどの大動物への応用を進めるため、蛍光タンパクセンサーを用いたエネルギー代謝動態可視化だけでなく、MRIなどの臨床に使用されている非侵襲装置を用いたエネルギー代謝計測法を構築していきたいと考えて、準備を進めている。

謝辞

今回、このような発表の機会をくださいました大阪大学微生物病研究所の伊川正人博士、国立循環器病研究センターの塩谷恭子博士にこの場を借りて深く感謝いたします。

文献

- 1) Berg J, Hung YP, Yellen GA: Genetically Encoded Fluorescent Reporter of ATP:ADP ratio. *Nat. Methods*, 2009, 6:161-166
- 2) Imamura H, Nhat KP, Togawa H, et al: Visualization of ATP levels inside single living cells with fluorescence resonance energy transfer-based genetically encoded indicators. *Proc.Natl.Acad.Sci. USA*. 2009, 106:15651-6
- 3) Yaginuma H, Kawai S, Tabata KV, et al: Diversity in ATP concentrations in a single bacterial cell population revealed by quantitative single-cell imaging. *SciRep*, 2014, 4:6522.
- 4) Saito K, Chang YF, Horikawa K, et al: Luminescent proteins for high-speed single-cell and whole-body imaging. *Nat.Commun*, 2012. 3:1262
- 5) Arai S, Rokus K, Harada K, et al: RGB - color intensimetric indicators visualize spatiotemporal dynamics of ATP in single cells. *AngewChem.Int.Ed*. 2018, 57:10873-10878
- 6) Nakano M, Imamura H, Nagai T, Noji H: Ca²⁺ regulation of mitochondrial ATP synthesis visualized at the single cell level. *ACS ChemBiol*, 2011, 7: 709-15
- 7) Konagaya Y, Terai K, Hirao Y, et al: A Highly Sensitive FRET Biosensor for AMPK Exhibits Heterogeneous AMPK Responses among Cells and Organs. *Cell Rep*. 2017, 21: 2628-2638
- 8) Koitabashi N, Ogasawara R, Yasui R, et al: Visualizing ATP Dynamics in Live Mice, *bioRxiv* 2020.
- 9) Yamamoto S, Yamamoto M, Nakamura J, et al: Spatiotemporal ATP Dynamics during AKI Predict Renal Prognosis. *J Am Soc Nephrol*, 2020, 12: 2855-2869

ゲノム編集による遺伝子改変有袋類の誕生

清成 寛

(理化学研究所 生命機能科学研究センター 生体モデル開発チーム)

これまで、哺乳類を用いた遺伝・発生的研究はマウスを中心とした限られた生物に依存してきた。これは、実験動物としての飼育環境や扱いやすさに加えて遺伝子改変動物作製の可否によるものも大きいと考える。

有袋類であるハイロジネズミオポッサム（以下、オポッサム）は、アメリカ大陸に生息し、系統的には有袋類の祖先的なグループであると考えられている。体長は約 15cm、体重は 100g 前後、1 度に 10 匹程度の産仔が得られ、マウスやラットと似た飼育環境での繁殖、維持が可能であることから、有袋類では数少ない確立されたモデル動物の 1 つである。有袋類の中で最初に全ゲノムが解読され、また、他の哺乳類にはない様々なユニークな特徴を有することから、有袋類の基礎研究に多く利用されている。しかしながら、オポッサムを含む有袋類は、これまで遺伝子改変動物を作製するために必要な技術が確立されていなかったため、個体レベルで遺伝子機能を解析することが困難であった。

近年、CRISPR/Cas9 システムによるゲノム編集技術の登場により、さまざまな動物種において遺伝子改変動物の作製が可能となった。今回、我々は、CRISPR/Cas9 システムを用いた遺伝子改変オポッサムの作製に必要な一連の生殖・発生工学技術の開発に着手し、有袋類では初となる遺伝子改変オポッサムの作製に成功した。本成果により、有袋類のユニークな特徴をコントロールする遺伝子の探索や、それらが実際に生体内でどのように機能しているのかを明らかにする遺伝子機能解析への道を拓くことができた。また、これまでマウスなどの有胎盤類で知られた知見と、今後有袋類で新たに得られる知見を比較することで、哺乳類の進化や多様性のメカニズムの解明にも大きく貢献すると期待できる。

<第 148 回研究会（令和 3 年 3 月 11 日）オンライン開催>

<維持会員ニュース>

動物用皮内投与デバイスの開発と DNA ワクチンモデルへの応用

山下邦彦（株式会社ダイセル / 大阪大学）

<トピックス>

がん免疫治療をモデルとした内在性タンパク質ノックダウン法の開発

成瀬 智恵（京都大学大学院医学研究科附属動物実験施設）

<テーマ：関西実験動物研究会の女性活躍（1）>

1. はじめとおわり

塩谷 恭子（国立研究開発法人 国立循環器病研究センター）

2. 関西実験動物研究会とともに歩んで

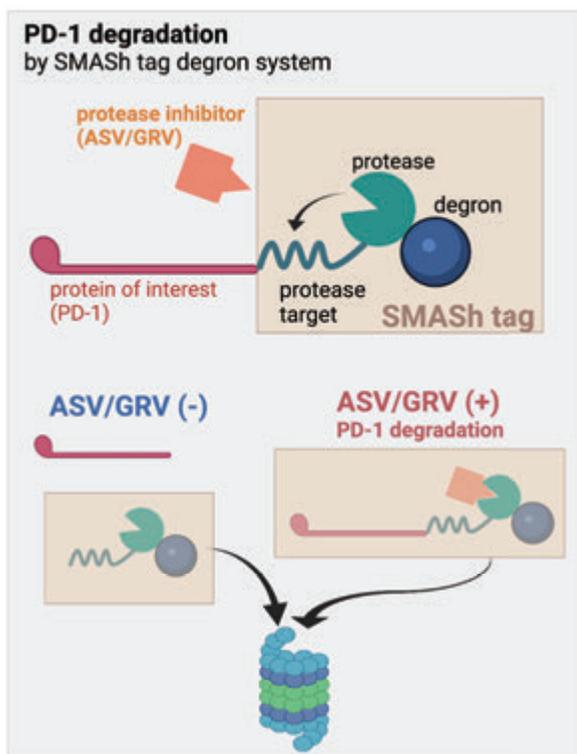
中井 伸子

がん免疫治療をモデルとした内在性タンパク質ノックダウン法の開発

京都大学大学院医学研究科附属動物実験施設

成瀬 智恵

【背景】細胞には不要になったタンパク質を破壊したり、発現量を調節したりするためのユビキチンプロテアソーム系タンパク質分解機構が存在する。近年、この分解機構が認識するタンパク質分解配列（デグロンタグ）と小分子化合物を組み合わせて、標的タンパク質を薬剤依存的に分解できる方法であるプロテインノックダウン法が開発され、PROTAC などとして臨床応用されている。しかしながら、目的とする内在性タンパク質に結合する小分子化合物の探索は容易ではない。培養細胞レベルでは、遺

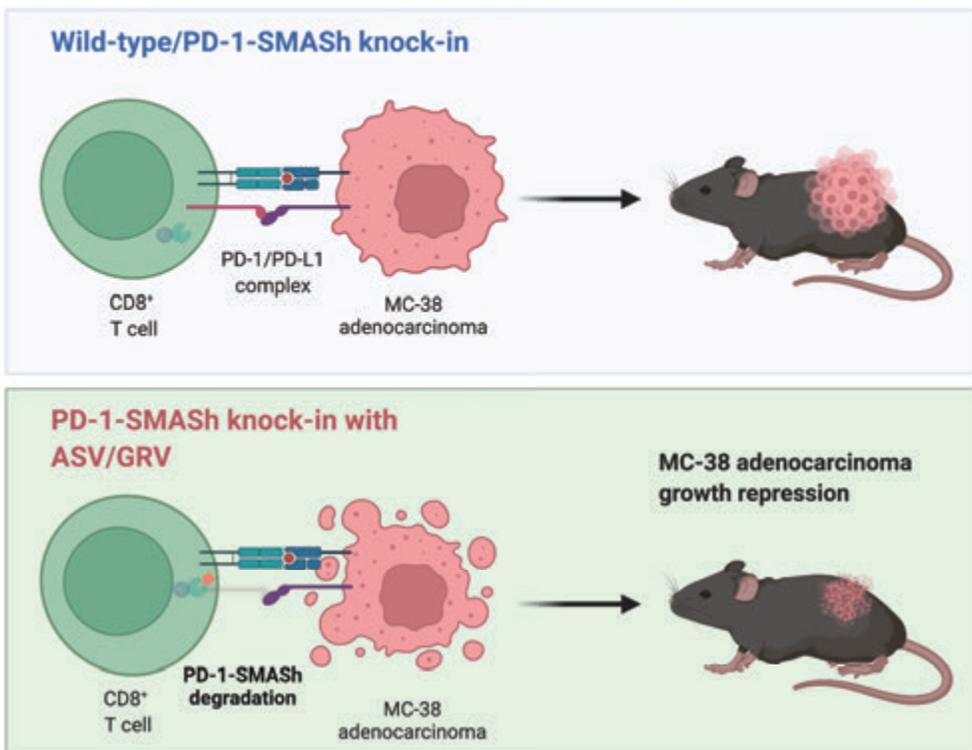


伝子改変によって内在性遺伝子にデグロンタグを組み込むことで目的タンパク質の分解が達成されているが、マウス生体内への応用は未だ報告されていない。そこで、本研究では、SMASH デグロンタグを用いて、マウスで PD-1 を薬剤投与時にのみ分解できるシステムの確立を試みた。PD-1 など免疫抑制分子の活性を阻害することで、がんに対する免疫の活性を高めるがん免疫療法は、高い治療効果が認められるが、自己免疫疾患を発症するケースがある。本方法によって、PD-1 抑制時間を最短にすることで、がん細胞増殖の抑制および自己免疫疾患の抑制を試みた。

【方法】 Jurkat ヒト T リンパ芽球性白血病細胞株、PD-1-mCherry-デグロンタグノッ

クイン (KI) マウスの CD3 陽性脾臓細胞, MC-38 マウス大腸腺癌細胞株を KI マウスに移植した微小環境を用いて, 小分子化合物が PD-1-SMASH デグロンタグ融合タンパク質に及ぼす変化を調べた。また, KI マウスに移植した MC-38 細胞の増殖を調べて, マウス生体内におけるデグロンタグの機能を評価した。さらに, KI マウスの詳細な組織学的解析を行った。

【結果と考察】 Jurkat 細胞およびマウス CD3 陽性脾臓細胞に発現した PD-1-デグロンタグ融合タンパク質は, 薬剤の投与により減少した。MC-38 大腸腺癌細胞を移植した KI マウスに薬剤を投与したところ, MC-38 細胞の増殖は野生型および無処置の KI マウスに比べて抑制された。致死量放射線を照射した野生型 C57BL/6J マウスに KI 造血幹細胞を移植したのちに MC-38 細胞を移植した実験でも MC-38 細胞の増殖が抑制されたことから, これらの効果は血液細胞の PD-1 が減少しているためと考えられた。



KI マウスは1年齢まで全てが生存したが, 詳細な組織学的解析により軽度の自己免疫疾患が認められた。これは無処置 KI マウスにおいても PD-1 の減少があったためと考えられた。SMASH デグロンシステムをさらに改良し, 生体内で利用することで, 様々

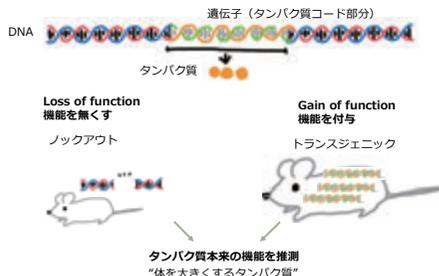
な生物学的研究のみならず、病気の治療にもつなげられるよう今後の研究を進めたい。

(謝辞)PD-1-mCherry-SMASH ノックインマウスの作製に使用した C57BL/6 背景 ES 細胞は筑波大学・杉山文博先生にご提供いただきました。組織学的解析は岐阜大学・宮崎龍彦先生，遺伝子改変マウスの作製は京都大学・杉原一司博士にお願いしました。京都大学・浅野雅秀先生の全面的なご協力で本研究を行いました。また，京都大学医学研究科附属動物実験施設の皆様にご協力いただきました。ここにお礼を申し上げます。

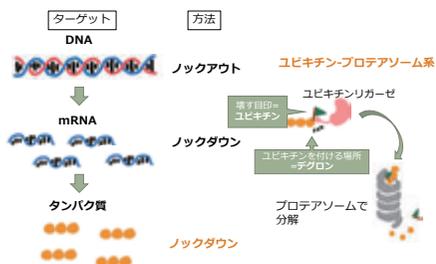
**がん免疫治療をモデルとした
内在性タンパク質ノックダウン法の開発**

京都大学大学院医学研究科 附属動物実験施設
成瀬 智恵

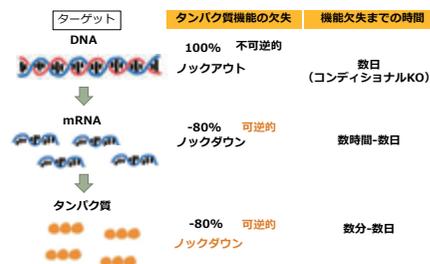
生体でタンパク質の機能を調べる



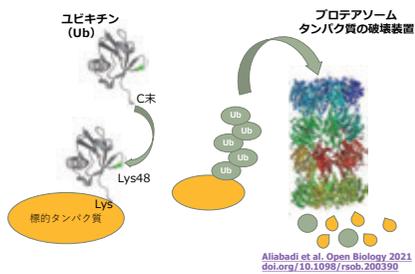
Loss of functionの方法



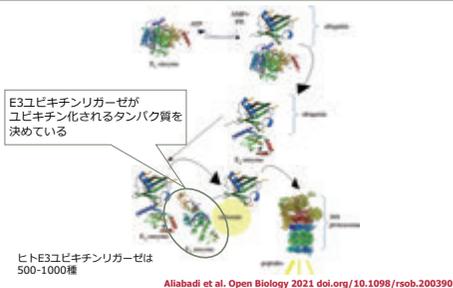
Loss of functionの方法



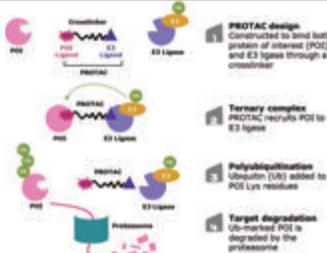
**ユビキチン-プロテアソームを用いた
タンパク質ノックダウン**



**ユビキチン-プロテアソームを用いた
タンパク質ノックダウン**



小分子化合物を用いたタンパク質ノックダウン



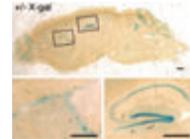
シグマアルドリッチ社 標的タンパク質分解のためのPartial PROTACより

生体におけるプロテインノックダウン
 -研究者の興味に合わせた標的のノックダウン-

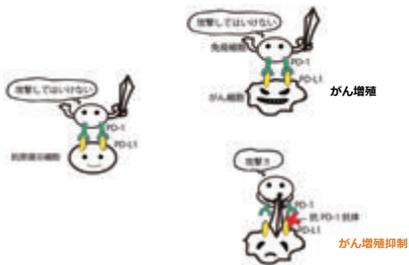
発生段階のタンパク質機能解析



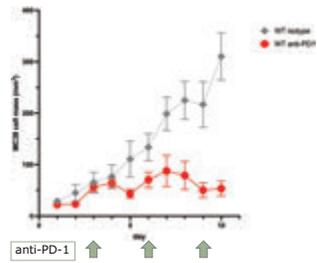
高次脳機能解析



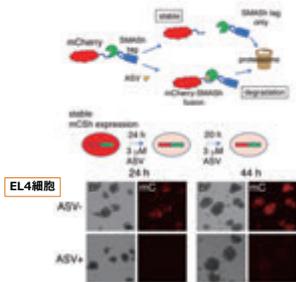
マウス生体内PD-1をノックダウンすることでがんの増殖を抑制



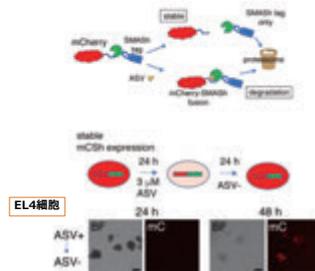
マウス生体内PD-1をノックダウンすることで
 MC-38がん細胞株の増殖を抑制



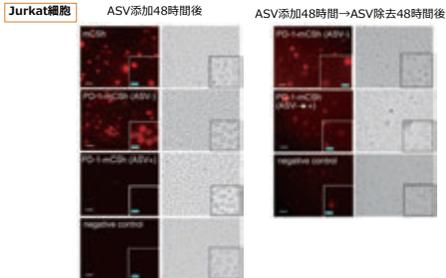
マウスT細胞由来細胞株での機能確認



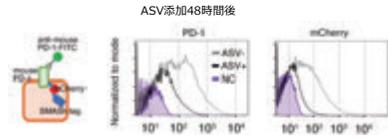
マウスT細胞由来細胞株での機能確認



ヒトT細胞由来細胞株での機能確認

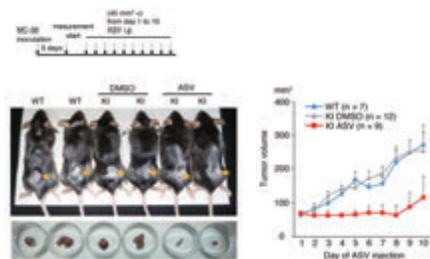


ヒトT細胞由来細胞株での機能確認

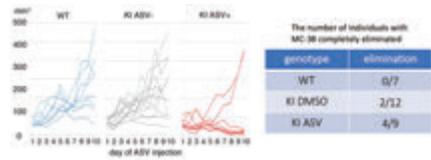


- デグロンタグと融合したPD-1は細胞表面で検出された
- Asunaprevirを加えると減少した

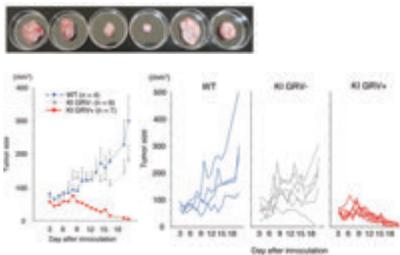
デグロンタグ融合PD-1を全身で発現するマウスではMC-38細胞の増殖が抑制された



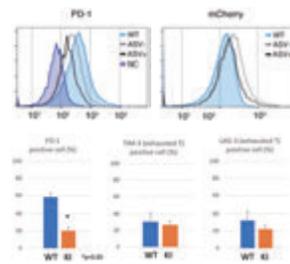
デグロンタグ融合PD-1を全身で発現するマウスではMC-38細胞の増殖が抑制された



デグロンタグ融合PD-1骨髄細胞を移植した野生型マウスでMC-38細胞の増殖が抑制された



がん微小環境におけるPD-1の発現が抑制された



はじめとおわり（まだ終わらない！！終われない！！）

塩谷 恭子

（国立研究開発法人 国立循環器病研究センター
研究推進支援部 動物実験管理室 人工臓器部）

先ず、研究者ではないため研究成果をお伝えすることもできず、いただいた貴重なお時間を如何に活用させていただくか？近藤会長から今回のお話をいただいてからの大きな課題でした。

考えた末、この仕事を通して伝えたいことをお話させていただくこととしました。

はじめ： これはこの社会へのデビューのきっかけをいただいたのが関西実験動物研究会でした。まだ、お名前も覚えられていない先生方の前で極度に緊張して、当時の国循の現状をお伝えしたのが、2006年。それから今日まで皆様に育てていただきました。きちんと育ちましたか？いつか皆様に感想を伺いたいと思います。

着任早々、飲み込まれたのは動愛法改正という大波でした。この波の影響で、職場では仙人のような前任者と鬼のような塩谷が比較されることとなりました。すべての根源がこの法律にあると思いつつも学生時代以上に猛勉強した記憶があります。今思えば、現在、学会で関わらせていただいている仕事についてもこの因縁が感じられます。

事件： この間に心に残っている事件をお示しします。悔しかったこと。びっくりしたこと。良かったこと。悪かったこと。色々あった日々でした。

事件1：キーワード 2018

忘れたころにやってきた地震です。阪神淡路大震災の時は開業獣医師で実験動物の世界とは全く無縁でした。東日本大震災の時は旧国循の7階の管理室で船酔いにも似た経験をしました。施設は壁のタイルに亀裂が入り数枚のタイルが落ちました。それから、大変なご経験をされた先生方のお話を伺い、十分に準備をしてきました。耐震固定、落下防止や飼料など消耗品の備蓄・飲料水の確保・懐中電灯の常時携帯や、カセットコンロの準備などです。しかしながら、災いは忘れたころに来るものでした。確かに大阪は地震が少ないとの安心と油断がありました。施設での大きな地震が初めてで、逃げるのか？どこに逃げるのか？このまま7階にいることが良いのか判断もできませんでした。研究者の施設の入室を禁止したとこ

ろで、委託業者さんであるエーテックさんの帰宅指示が出ました。あの日、何時間もかけて帰宅することが良いのか、施設に留まることが良かったのか今もわかりません。その後、対策本部が立ち上がり、30分ごとに報告が行われました。1階と7階を階段で往復しましたが、通常であれば絶対に無理な距離なのになぜか1時間に2回の往復も苦になりませんでした。アドレナリンが全開でした。そのころ、隣の病院では屋上の貯水タンクが転倒し、そこから流出した水で階下の病室が水浸しになるという大惨事になり、患者様の病室の移動や緊急退院、転院などが行われていました。動物施設の点検では遺伝子組換え動物の施設は全く被害がありませんでした。本館でもSPFエリアは異常が認められませんでした。そして、管理室から一番遠いコンベのラット室で事件は起こりました。そのラット室は低酸素負荷の実験を行っている実験飼育室でしたが、通常はラックのタイヤのロックは外して作業をしていました。ところが真ん中の1台が転倒していました。引き戸の扉が下から2段目だけ外れて斜めになったラックからケージが落ちていました。幸いにもケージから室内に逃走したラットは1ケージ3匹だけでした。それでも自分の使命を全うできなかったラットには申し訳なかったと思います。そしてその1台のラックこそタイヤがロックされていたのです。気のゆるみでしかありません。大丈夫という根拠のない安心からリスク管理を蔑ろにしていました。この事件が自分が施設管理をしてきたうで、一番大きな後悔とともに思い出されます。2018年6月18日のことです。

事件2：キーワード チュービー・JEBI

今世紀最強の台風がまさか大阪直撃でした。関西国際空港に海水が浸水し水没し、タンカーが連絡橋に激突したあの台風です。最大瞬間風速が47メートル、関空付近では58メートルにもなりました。

この台風は屋上の空調機の配管のステンレスの板を紙飛行機のように飛ばし、断熱材を雲のように空に舞わせて、駐車場は一面菜の花畑の彩、ところどころ台風一過の陽光をキラキラ跳ね返すステンレスがあり不思議な光景でした。移転を9か月後に控えた施設の判断はこれから来る冬の季節をブルーシート1枚で乗り切るといった画期的なものでした。この状況で乗り切ることができるという判断をなぜあの時できたのか？管理室はヒヤヒヤしていました。ただ、無駄なお金は使えないという施設の判断を覆すことはできず冬に突入し、結果的にはなんとなく維持できるものですね。という状況でした。移転に伴う動物の準備が始まったことも乗り切れた大きな要因と思います。

2018年9月4日のことです。

激動の2018年です。

事件3：キーワード 2020

関西実験動物研究会のみなさまの全面のご協力の元、大阪国際会議場での開催を準備していた2020年大阪大会で花火は新型コロナウイルスにより打ち上げられませんでした。地味ですが線香花火ぐらいの思い出を残せたのではと思います。これも関西実験動物研究会のみなさまのおかげです。本当にありがとうございました。パンデミックはこんな近くで起こるのですね。

時のながれ： この仕事を通して社会の変化を感じます。たぶん、女性は家を守るべき世代のおわりに生を受けた年代です。なので、家のこともしないで仕事するなんて、子供がかわいそう、なんで男の子じゃないの？と言われた生活が長く続かなかったのも自分で納得がいきます。娘の世代は何の抵抗もなく共働きで、むしろ、女性も男性もないよ、したいことを探せる大人になって、したいことができるように努力してほしいと、自由・自立・自己責任の教育方針で育った娘たちはことのほか強い人間に育ち、孫も保育園が当たり前のように遅く育っているようです。今の社会は共働きが普通で、政治の面でも共働き前提で進められています。一見すると昔に比べて恵まれた生活をしているように映ります。世の中には生活していく上での保証や権利も充実してきています。これらを生かして、もっと女性が活躍できる動物管理の仕事を選択して欲しいと思います。そういう社会にきつとなるはずです。そして、奇跡の出会いを重ねて性別に関係なく輝ける人であってください。私たちも当たり前というルールに縛られてきた世代ですが、明るい未来に奇跡を求めたいと思います。

ただ、女性が当たり前と言われるものを全て手にすることは、想像を絶する努力が必要です。当たり前を当たり前と取らないやさしさと、ともに進むために手を差し伸べるやさしさが必要です。ダイバーシティが当たり前になり、認め合うことで明るい明日を迎えることができると思います。矛盾しているのですが、当たり前を当たり前を受け取らずに、当たり前に甘えずにともに思いやり、暖かく進んでいくことが重要と思うのです。

小学生の時、なんで男の子だから、女の子だからと言われるのかと疑問を持ったこまっしゃくれ女の子はいい感じに年を重ねてきました。

おわり？： この発表の機会をいただいたこと俗にいう退官講演？なのでしょうか？この機会を与えてくださったみなさまに深く感謝いたします。実験動物という世界で過ごしてこられたのも皆様のおかげです。本当にありがとうございました。

これから： 4月からのこと最後にお伝えします。4月からこの世界に入ることになった原点に戻ります。動物管理室の仕事のサポートも続けますが、動物管理の仕事の前にいた研究室に籍を置いて研究者と実験動物のサポートをしていきたいと思います。気が付いたら、趣味の無い生き方をしていました。この仕事が好きで趣味であったようにも思います。一人で家にも何をして良いのかわからなくて、このままではすぐに危ない前期高齢者状態になりそうです。回避するためにも仕事は続けていこうと思います。少なくとも趣味を見つけるまでは。。。。。。 また、お目にかかりましょう！！

関西実験動物研究会とともに歩んで

中井伸子

【要旨】関西実験動物研究会は故山田淳三京都大学名誉教授を初代会長として、1984年に「関西地区において実験動物学ならびに関係諸科学の発展を図ること」を目的として発足した。

私は1979年に大学を卒業、京都の製薬企業に入社して実験動物の検疫と施設の管理業務に携わるようになったが、当時は現在と異なり、獣医学科を卒業しても実験動物学の知識は皆無であり、マウスやラットは怖くて触ることすらできなかった。上司に連れられ前身の関西実験動物集談会(1980年～)時代より参加していたので、関西実験動物研究会が発足した第1回からの数少ない会員の一人である。当時は講演を聴講してもあまり理解できず、一から学ぶ必要があったが、実験動物や施設の管理業務に携わりながら、年に4回、時流に乗ったテーマで開催された研究会は私にとっては最も重要で身近な情報源となった。その中で何度か発表の機会を頂き、関西実験動物研究会とともに私の歴史が形成された。研究会のテーマあるいは自身が発表したテーマ内容を眺めると時流がよくわかり、まさに関西実験動物研究会とともに歩んできたことがわかる。そして動物実験および動物実験を取り巻く環境に影響する要因が見え、その中で次々と新しい課題が現れる様子がわかる。歌は世につれ世は歌につれという諺があるが、本日は、関西実験動物研究会で取り上げたあるいは発表したテーマを振り返りながら、世の中の動きとの関連を考察するとともに、今後の実験動物や動物実験を取り巻く環境についても考えてみたい。

関西実験動物研究会との歩み

1984	1985	1986	1987	1988	1989	1990	1991	1992	1993	1994
山田会長 発足									② 10周年 宮高会長	
1995	1996	1997	1998	1999	2000	2001	2002	2003	20周年	
芹川会長			③	④				⑤		
2005	2006	2007	2008	2009	2010	2011	2012	2013		
⑥ 芹川会長			100回			30周年				
2014	2015	2016	2017	2018	2019	2020	2021	2022	2023	
⑦ 喜多会長			近藤会長			40周年				

研究会における足跡

- ① マウス泌尿器症候群(MUS)の発生について
- ② 腫瘍細胞株の汚染状況
- ③ 腫瘍細胞の微生物汚染に関する検討
- ④ 実験動物施設における二酸化塩素系滅菌剤Exsporによる滅菌効果の検討
- ⑤ 被験物質の投与と採血に関するガイドライン
- ⑥ モルモットにおける壊血病の再来
- ⑦ 動物実験における人道的エンドポイントは進化したか

1980年代:感染症コントロールとGLP至上主義の時代

関西実験動物研究会は大学等の研究者のほか製薬企業のメンバーも多い。そのため取り上げられるテーマは製薬業界の状況が反映されることが多かった。

1980年代はバイオメディカル分野の研究は動物実験への依存度が非常に高かったにもかかわらず、実験動物の感染症により動物実験が実施できなくなる事故も相次いだ。そのため製薬企業を中心に最新鋭の大規模なバリアを備えた動物実験施設の建設が相次ぎ、感染症をはじめ動物実験結果に影響する各種要因をコントロールする体制を整えて競争力の強化がはかられた。しかし、実験動物の感染症コントロールが最重要課題であったため、人海戦術によるホルマリン燻蒸や飼育室への入室のための過剰なシャワー浴、手洗い、着替えなど労働安全衛生の観点では必ずしも適切であったとは言えず、更に高価な滅菌装置の導入など実験動物施設の維持管理のためのコストは莫大であった。

一方、GLP(Good Laboratory Practice)に関しては、1979年に米国で開始後1981年に経済協力開発機構(OECD)においてGLP原則が定められ、日本では1983年に医薬品の製造販売承認申請に対して求める基準としてGLPの適用が開始された。当時はGLPへの対応が手探りであった事もあり、感染症コントロールとともにGLPは最も関心が高いテーマであった。

1980年代の主な出来事	研究会テーマ(第1回～24回)
<ul style="list-style-type: none"> ✓ 1981年OECD GLP基準制定 	1984年 シンポジウム:東北鼠疫モデルマウス(SAM)について Bacterial Translocation in immune-deficient hosts Current trend for degoration of animal experiment 会員の発表 13題
<ul style="list-style-type: none"> ✓ 1983年 医薬品GLP開始 	1985年 GLPの査察を行って 堀内 茂友(国立衛生試験所) 1. マウスのアラム中に組み込まれたセト遺伝子の発現 と、新しい遺伝子標識 RFLP - ヒトアミラーゼ遺伝子を中心に- 会員の発表 13題
<ul style="list-style-type: none"> ✓ 1984年GLP査察開始 	シンポジウム:実験動物における人畜共通寄生虫症 癌原性試験の現状と問題点 哺乳動物卵及び胚取扱いに関する最近の進歩 会員の発表 11題
<ul style="list-style-type: none"> ✓ 大学等における動物実験についての通知(文部省、1987) 	1986年 1. ハルビン医科大学における実験動物事情 2. 宇宙実験動物の現況 移植免疫、癌免疫の制御へのアプローチ 1. 実験動物における腎臓の毒性病理 2. 欧米におけるGLPの実施状況について 会員の発表 14題
<ul style="list-style-type: none"> ✓ 国動協、公私動協本格活動開始 	1987年 1. 自然免疫でんかんラットの作出とその応用 2. 癌原性試験における統計解析 1. 東大獣医学科における実験動物学教育・研究の現状と展望 2. 北海道大学獣医学部実験動物学講座における教育と研究の行果 1988年 英国における実験動物技術者の現況と動物実験 1. 大阪府立大学農学部における実験動物学教育の現状と実験動物学講座 と実験動物ケアと全国共同利用施設動物実験研究教育訓練センター構想 会員の発表 11題
	1988年 1. 毒性試験における統計解析 2. 癌原性試験における統計解析 1. 霊長類におけるATL及びAIDS-関連ウイルス 2. 日本ゾルの集団構造の遺伝学的解析 1989年 1. 細菌移植研究における動物実験について 2. スクロイド培養機構と実験動物 会員の発表 6題

1990年代：感染症コントロール、Zoonosis、動物福祉

1990年代はエボラ出血熱、サルのBウイルス、腎症候性出血熱など、Zoonosis問題が相次いで発生した。実験動物においてもこれらの感染症への対応が求められ、関西実験動物研究会においてもこれらに関連した話題が多数取り上げられた。

1990年代の主な出来事

- ✓ 実験動物におけるzoonosis問題（エボラ出血熱、Bウイルス、HFRS）
- ✓ 1990年 ICH創設（国際的なハーモナイゼーション）
- ✓ 製薬企業では動物実験に関する指針、委員会設置、動物実験委員会設置、事前審査制度開始
- ✓ 1997年GLP省令
- ✓ 1998年 実験動物専門医制度の開始

研究会テーマ（第25～64回）	
1990年	1. エボラ出血熱の病原性 <ol style="list-style-type: none"> 1. エボラ出血熱の病原性 2. 免疫反応とウイルス(SDAM)の相互作用 3. プラットに自発発生した腎症候性出血熱(Renal oedematosyndrome)の病原性 4. 自己免疫疾患モデルマウスMRLに関する遺伝、育種学的研究 1. 輸入カニクイザルにおけるエボラウイルス感染 <ol style="list-style-type: none"> 1. 遺伝性の形態形成異常を示すニホンウラジーニル(ET)及び喉頭(TT)系統について 2. 感染したマウスの感染と発症 会員の発表 13題
1991年	<ol style="list-style-type: none"> 1. ニュータムマウスを用いた腫瘍分化の解析 2. 造血球の腫瘍形成とアポトーシス 3. ニホンウラジーニルマウスの免疫学的諸事象 4. ニホンウラジーニルマウスの免疫学的特性と室内人工繁殖の試み 1. 23種細菌感染動物 <ol style="list-style-type: none"> 1. 私の研究と実験動物 会員の発表 14題
1992年	<ol style="list-style-type: none"> 1. 発生毒性試験における in vitro 試験法とその意義について 2. イヌネ子嚢胚早期による腫瘍発生について 1. 毒性試験における臨床検査正常値 - 製薬協アンケート調査から - <ol style="list-style-type: none"> 1. GOP と臨床倫理 2. 毒性試験における国際的ハーモナイゼーション - ICH のめざす効果 会員の発表 19題

1993年	プラットにおける生化学的遺伝子産物の解析から染色体地図の作成まで 腎症候性出血熱(HFRS)の汚染対策 実験動物の臨床検査 <ol style="list-style-type: none"> 1. 毒性試験における臨床検査の意義 2. 実験動物臨床検査の問題点 3. 毒性試験臨床検査の国際ハーモナイゼーション 会員の発表 14題
1994年	疾患モデル動物の病態に及ぼす飼料の影響 感染症 免疫毒性 会員の発表 12題
1995年	<ol style="list-style-type: none"> 1. アガロースマイクロカプセル化ウラジーニルマウス同種移植への適用 2. 肺高血圧症に対する実験治療 免疫学と実験動物における免疫学 医療の発展における実験用マウスの貢献 ICH-3に向けて医薬品の安全性試験をめぐる最新の話題 会員の発表 11題 < 特別講演> プリオン病の動物実験 適切な実験動物の飼育管理と動物実験の管理
1996年	ハンタウイルス感染症と動物実験：腎症候性出血熱をめぐる最近の話題 代替法をめぐる最近の話題 会員の発表 15題
1997年	がん原生試験を指向する - その理論と実際 HIVリポソーム法による生体への遺伝子導入法とその応用 臨床から動物実験まで臨床へ 会員の発表 20題
1998年	マウスの新たな利用法を求めて(株)ラビオン研究所 実験動物を用いた新細菌感染症の研究と伝染病予防法の改正 受精機構の新たな研究展開と内分泌攪乱物質の生殖系への影響 会員の発表 13題
1999年	1. 臨床試験実施に関する非臨床試験データの意義 2. ICH Common Technical Document (CTD) Guideline on Registration of New Medical 実験動物、育種繁殖領域からの新たな展開 生殖発生毒性試験を考える 疾患モデルヒトとマウスの種差を越えて 会員の発表 17題

動物実験現場では、抗腫瘍薬の開発のためにヒトあるいは動物由来の腫瘍細胞をマウスなどに移植する実験が増加し、動物に移植された腫瘍細胞由来のヒトおよび動物の感染症の発生が問題となった。そこで、我々は実験に使用する腫瘍細胞由来の感染症をコントロールするため、腫瘍細胞の汚染状況を調査し、その結果を関西実験動物研究会においても報告した。

腫瘍細胞株の汚染状況 第40回研究会(1993年)

腫瘍細胞の微生物汚染に関する検討 第60回研究会(1998年)

実験動物の感染症コントロールするためには移植用腫瘍細胞株の検査も必要
 担癌マウスのMHV感染事故を経験して以後腫瘍細胞株の汚染検査を開始 MAP試験 1993年頃～

1990年頃までに、日本・米国・ヨーロッパでは、新薬の政府による評価・承認のための法制度が整備され、地域ごとに新薬の品質、有効性及び安全性に関するデータの報告・評価の体制が整った。しかし、承認申請の詳細な技術的要件は地域により異なり、製薬企業の国際化に伴い、各地域の規制要件を満たすため、時間とコストのかかる重複した試験を数多く行う必要があった。

そこで、必要な患者に安全で有効な新薬をより早く提供するため、各地域の医薬品承認審査の基準の合理化・標準化が必要となり、1990年4月、日本・米国・ヨーロッパの各医薬品規制当局と業界団体の6者によりICHが発足した。

ICHの目的は、新薬を時宜に即し、継続的に患者が利用できるようにすること、ヒトにおける不必要な臨床試験の重複を避けること、及び安全性及び有効性が損なわれることなく動物試験が軽減されることなどに資する技術的要件の国際的なハーモナイゼーションであった。

このような背景で医薬品開発におけるガイドライン等にも動物実験で3Rの原則が盛り込まれその重要性が広く認識されるとともに動物実験計画書の事前審査も急速に定着した。

ICHにおける3Rsの促進へのとくみ

- 1990年以前；各国のguidelineはまちまち
- 海外ではすでに臨床試験中もしくは市販されている医薬品であっても、わが国固有の基準に従って非臨床試験をやりなおすことが多かった
- ICH：重複試験を避ける、不必要な苦痛を避ける、in vitro試験の採用など各国のguidelineが調整され不必要な重複試験をなくす努力が続けられている
- 動物実験の分野では3Rsが促進

2000年～ 動物福祉、レギュラトリーサイエンス

2000年代になり、動物実験の適正化への関心が更に高まり、2006年の動物愛護管理法の改正で3Rsが条文の中に盛り込まれるなど動物実験の適正化が法的にもサポートされた。動物実験計画を作成する中で、特にRefinementの観点では国際的なガイドラインを参照する機会も多く、投与と採血のガイドラインあるいは動物実験における人道的エンドポイントについて関西実験動物研究会において紹介した。

実験施設の管理では、世間における相次ぐ事故やトラブルにより化学物質管理や労働安全衛生面での管理が強化され、エチレンオキシドガスやホルムアルデヒドが特化則第二類に指定されたことやケタミンの麻薬指定されたことなど動物実験施設においても対応が必要となった。

2000年代の主な出来事	
<ul style="list-style-type: none"> ✓ 2000年 動物の愛護及び管理に関する法律改正 ✓ 2001年 エチレンオキシドガスが特化剤第二類指定 ✓ 2002年 組織sDNA実験指針 ✓ 2004年 カルタヘナ法施行 ✓ 2006年 動物の愛護及び管理に関する法律 改正 <ul style="list-style-type: none"> - 3種の動物実験等の実施に関する基本指針 - 動物実験の適正な実施に向けたガイドライン ✓ 2006年 ISO10993-2: Animal Welfare Requirement in Biological Evaluation on Medical Devices ✓ 国産の第三者認証/検証の開始 日動協、HS財団、国動協、公私動協 ✓ 2007年 ケタミンの麻薬指定 ✓ 2008年 ホルムアルデヒドが特化剤第二類指定 特化剤：特定化学物質の飼育下取扱い 	<p>西ナイルウイルスの最新情報 細菌感染症の病原因子と分子疫学 腎疾患モデルと投与採血の指針</p> <p>2003年</p> <p>2004年</p> <p>2005年</p> <p>2006年</p> <p>2007年</p> <p>2008年</p> <p>2009年</p>
<p>研究会テーマ(第65～104回)</p> <p>2000年</p> <p>2001年</p> <p>2002年</p>	<p>東洋動物の国際化を促して 医薬品開発の前臨床試験における新しい動向と国際戦略を考える 高次神経機能と動物実験(より解剖する部)</p> <p>2001年</p> <p>動物を用いた発がん研究の最新動向 生種・発生研究の最新動向</p> <p>2002年</p> <p>動物実験の科学的・倫理的な実施とその成果 動物を評価して考える</p>

**被験物質の投与と採血に関するガイドライン
第79回研究会(2003年9月)**

A Good Practice Guide to the Administration of Substances and Removal of Blood, Including Routes and Volumes
EFPIA (The European Federation of Pharmaceutical Industries Associations) and EDVAM (The European Center for the Validation of Alternative Methods), 1 April 2003 21: 19-23, 2001.

- ◆ ガイドラインが作成された目的の一つである、使いやすさを考え翻訳して紹介するとともに普及につとめた http://www.kiss.mech.tohoku.ac.jp/committee/79ku_79ku1.html
- ◆ ガイドラインの目的
 - 安全な投与の確保において試験計画を立てる際の第一として「ワークを思いやすくすると同時に、実験動物の負担にも配慮を要する」
 - 動物実験の質を向上させるため、科学的で標準化された、試験、評価、検証を共有する

European Union Directive 86/609/EEC(1986)の規定により、苦痛を軽減し得るため、実験法を改善する義務がある
* 動物実験の改善、削減に関する技術的取組を行うことが奨励される

研究報告書発行番号: 04-25(2004)
[http://www.kiss.mech.tohoku.ac.jp/kiss/04_25\(2004\).pdf](http://www.kiss.mech.tohoku.ac.jp/kiss/04_25(2004).pdf)

体制が整えば 中味の充実・実際の対応が重要

- ▶ 投与と採血 G.L.I.EFPIA/ECVAMI
- ▶ 胎子や新生児の麻酔や安楽死
- ▶ 人道的エンドポイント 2000LAR Journal Humane Endpoints 特集
- ▶ 安楽死方法 AVMA
- ▶ 給餌、給水制限
- ▶ 環境エンリッチメント (物理的)
- ▶ 非医薬品グレードの化合物使用不可
- ▶ ペントバルビタールの単独麻酔不可
- ▶ 再現性の問題: APFIVEガイドライン
- ▶ 痛みの兆候: Grimace Scale
- ▶ 環境エンリッチメント (動物心理学)

2006 翻訳出版

動物実験施設の環境が整い、感染症や不適切な飼育によるトラブルが大幅に減少した中、忘れていたモルモットの壊血病を経験した。飼料製造業者において品質管理面での複数のミスが重複しビタミンC無添加飼料が供給されたことが原因であった。動物実験用の飼料は品質管理が確実になされているので絶対に大丈夫だという思い込みで、原因説明が遅れたが、思い込みを排除し、原点に立ち戻ることが重要であるという教訓を共有するため本研究会で報告した。

モルモットにおける壊血病の再来第92回研究会(2006年12月)

▶ 経過

- ✓ 2006年夏、モルモットにおいて原因不明の疾病が発生
- ✓ 主な症状: 歩行不全、皮下出血、痛覚過敏、体重減少、摂餌不良
- ✓ 感染症等は検査で否定、当該モルモットの血清中のVCが検出されず
- ✓ アスコルビン酸を投与で回復

▶ 飼料の分析

- 生産業者保管の飼料を業者の分析センターで分析⇒異常なし
- 飼料の輸送行程問題なし
- 飼料のロットを変更⇒動物は異常なし

2010年～ 動物福祉、情報発信 そして未来に向けて

2010年代以降も国内外で動物実験における動物福祉については法令や各種ガイドラインなどが改定され進化が続いている。

2010年以降の主な出来事																			
<ul style="list-style-type: none"> ✓ 2010年 OIE Laboratory Animal Welfare Code ✓ 2010年 DEU 実験動物保護指令 ✓ 2011年 Guide for the Care and Use of Laboratory Animals 8th ✓ 2012年 CIOMS-ICLASの動物実験に関する国際原則 ✓ 2013年 動物の愛護及び管理に関する法律改正 ✓ 2017年 毒物薬物の判定基準の改定について（通知）薬生薬審発 0613第1号 ✓ 2018年 医薬部外品・化粧品等の安全性評価のための権限の皮膚感作性試験代償法を組合せた評価体系に関するガイダンスについて薬生薬審発0111第1号 ✓ 2018年 OIE Animal Welfare Code ✓ 2019年 動物の愛護及び管理に関する法律改正 	<table border="1"> <thead> <tr> <th>研究会テーマ(第105～145回)</th> <th>2013年</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td>2010年</td> <td>アカハイモリとゼブラフィッシュを用いて生命原理を解き明かす 遺伝子改変技術を用いた糖尿病および動脈硬化研究 生体イメージングの最前線—免疫学の新たな世界 関西実験動物研究会の歴史と未来：動物実験の今後を考える</td> </tr> <tr> <td>2011年</td> <td>難治性疾患の克服に向けて 免疫研究の新たな展開 循環器研究の新たな展開 会員の発表 14題</td> </tr> <tr> <td>2012年</td> <td>関西実験動物研究会へようこそ エビジェネティクス研究の最前線 哺乳動物における生体工学技術の新たな展開 会員の発表 10題</td> </tr> <tr> <td>2013年</td> <td>マウスとサルを用いて脳の高次機能を探る冊子 神経科学の新たな展開 神経回路ダイナミクスへの挑戦 動物実験に関する効果的な教育訓練について考える 会員の発表 11題</td> </tr> <tr> <td>2014年</td> <td>実験動物学のこれから—マウスとラットを例に— インフルエンザウイルスの最新情報 動物の心を探る 会員の発表 15題</td> </tr> <tr> <td>2015年</td> <td>主要なバイオリソースであるメダカとラットの遺伝学 実験動物学的見地から腸内細菌叢を考える 実験動物を用いたトランスレージョンナルサーヂ 会員の発表 12題</td> </tr> <tr> <td>2016年</td> <td>がん免疫療法における免疫抑制分子PD-1の基礎と臨床 動物モデルを用いたニッチ疾患研究の新たな展開 ヒトと実験動物の関係をイメージする 動物の愛護及び管理に関する法律の制定と改正の経緯 会員の発表 7題</td> </tr> <tr> <td>2017年</td> <td>2020年 コロナで休止 2021/3 発生工学技術の新しい展開</td> </tr> </tbody> </table>	研究会テーマ(第105～145回)	2013年	2010年	アカハイモリとゼブラフィッシュを用いて生命原理を解き明かす 遺伝子改変技術を用いた糖尿病および動脈硬化研究 生体イメージングの最前線—免疫学の新たな世界 関西実験動物研究会の歴史と未来：動物実験の今後を考える	2011年	難治性疾患の克服に向けて 免疫研究の新たな展開 循環器研究の新たな展開 会員の発表 14題	2012年	関西実験動物研究会へようこそ エビジェネティクス研究の最前線 哺乳動物における生体工学技術の新たな展開 会員の発表 10題	2013年	マウスとサルを用いて脳の高次機能を探る冊子 神経科学の新たな展開 神経回路ダイナミクスへの挑戦 動物実験に関する効果的な教育訓練について考える 会員の発表 11題	2014年	実験動物学のこれから—マウスとラットを例に— インフルエンザウイルスの最新情報 動物の心を探る 会員の発表 15題	2015年	主要なバイオリソースであるメダカとラットの遺伝学 実験動物学的見地から腸内細菌叢を考える 実験動物を用いたトランスレージョンナルサーヂ 会員の発表 12題	2016年	がん免疫療法における免疫抑制分子PD-1の基礎と臨床 動物モデルを用いたニッチ疾患研究の新たな展開 ヒトと実験動物の関係をイメージする 動物の愛護及び管理に関する法律の制定と改正の経緯 会員の発表 7題	2017年	2020年 コロナで休止 2021/3 発生工学技術の新しい展開
研究会テーマ(第105～145回)	2013年																		
2010年	アカハイモリとゼブラフィッシュを用いて生命原理を解き明かす 遺伝子改変技術を用いた糖尿病および動脈硬化研究 生体イメージングの最前線—免疫学の新たな世界 関西実験動物研究会の歴史と未来：動物実験の今後を考える																		
2011年	難治性疾患の克服に向けて 免疫研究の新たな展開 循環器研究の新たな展開 会員の発表 14題																		
2012年	関西実験動物研究会へようこそ エビジェネティクス研究の最前線 哺乳動物における生体工学技術の新たな展開 会員の発表 10題																		
2013年	マウスとサルを用いて脳の高次機能を探る冊子 神経科学の新たな展開 神経回路ダイナミクスへの挑戦 動物実験に関する効果的な教育訓練について考える 会員の発表 11題																		
2014年	実験動物学のこれから—マウスとラットを例に— インフルエンザウイルスの最新情報 動物の心を探る 会員の発表 15題																		
2015年	主要なバイオリソースであるメダカとラットの遺伝学 実験動物学的見地から腸内細菌叢を考える 実験動物を用いたトランスレージョンナルサーヂ 会員の発表 12題																		
2016年	がん免疫療法における免疫抑制分子PD-1の基礎と臨床 動物モデルを用いたニッチ疾患研究の新たな展開 ヒトと実験動物の関係をイメージする 動物の愛護及び管理に関する法律の制定と改正の経緯 会員の発表 7題																		
2017年	2020年 コロナで休止 2021/3 発生工学技術の新しい展開																		

実験動物や動物実験を取り巻く環境は世相により変化する。しかし我が国では動物実験に関して実施者側から一般市民への情報発信が極めて少なく、このため一般市民の動物実験への理解が乏しい。そこで、2016年、動物実験の社会的理解を得るための情報発信の在り方に関して、実験動物分野の研究者のみならず、法律や科学哲学・倫理学、動物行動学分野の研究者等とともに幅広い見地から研究を開始した。現在も本研究プロジェクトは継続し、動物実験について広く社会に受け入れられる発信方法について検討している。

動物実験の社会的理解を得るための情報発信	
<p>科研費基盤研究(C)として活動</p> <ul style="list-style-type: none"> ➤ 動物実験の社会的理解を得るための情報発信のあり方についての研究 2016/4 - 2019/3 ➤ 動物実験の社会的理解を得るための情報発信基盤構築に関する研究 2019/4 - 2022/3 <p>研究代表者：笠井憲雪 東北大学名誉教授、 研究分担者：越越綾子 成城大学法学部教授、越本知大 宮崎大学教授、加隈良枝 帝京科学大学准教授 現在は研究協力者を含め29名で活動</p>	<p>①一般市民の動物実験に関する意識調査と解析 一般市民を対象としたアンケート調査 第1回 2017年5月実施(3096人) 第2回 2020年10月</p> <p>②高校生物教育の動物使用学習の適切な支援法の提言と支援組織の構築</p> <p>③動物実験情報発信基盤の構築</p> <p>④動物実験に関する情報発信における倫理に関する研究</p>

関西実験動物研究会発足以来39年間にわたり、時流に乗ったテーマで活動してきた。

今後、未来に向けて重要なことのひとつは、動物実験に関する実験者側からの情報発信である。実験結果を報告するだけでなく、動物実験の意義や状況について、研究者だけでなく動物実験を支えるスタッフからも適切に情報発信して社会の理解を促進することが大切である。それが次世代の育成にもつながる。そのためには、既に積極的な情報発信と次世代教育に力を注いでいる欧米の諸組織と、また国内においては組織の壁を越えた関係機関との連携が必要である。

今後も組織を超えて関係団体とも連携しながら情報発信と次世代の育成に取り組む活動をすることで、関西実験動物研究会の発展にも微力ながら貢献していきたい。

本日の講演内容は、関西実験動物研究会のホームページ

http://www.klara.umin.ne.jp/kansai_HP/index2.html に掲載されている研究会会報および発表当時の資料を中心にまとめた。

<第 149 回研究会・日本実験動物技術者協会関西支部合同大会

(令和 4 年 9 月 9 日) オンライン開催>

<維持会員ニュース>

新東洋製作所の取り組み：実験動物～産業動物まで

中山 武彦（有限会社 新東洋製作所）

<テーマ：動物のコミュニケーション>

1. 非ヒト霊長類の表情解析と疼痛評価

宮部 貴子（京都大学ヒト行動進化研究センター）

2. 動物におけるコミュニケーション能力の基盤と表象操作の進化

黒島妃香（京都大学大学院文学研究科）

非ヒト霊長類の表情解析と疼痛評価

講演に関連し開示すべきCOI関係にある企業等はありません。

京都大学ヒト行動進化研究センター 宮部貴子

13:36:32

1

本日のトピック

- 非ヒト霊長類の表情解析
 - FACSとは
 - ニホンザルFACS
 - CalliFACS
- 非ヒト霊長類の疼痛評価
 - 痛みとは
 - 疼痛評価法
 - ニホンザルにおける例

Dr. Catia Correia
Cairo, PhD

Dr. Vanessa Nadine
Gris, DVM

13:36:32

2

非ヒト霊長類の表情

- 感情をあらわす
 - コミュニケーションツール
- 「笑顔」
- 嬉しい、楽しい、幸せ (感情)
恥ずかしい、悲しい、確信が持てない
 - 挨拶をしている (コミュニケーション)
- 実は・・・
- 恐怖
 - 服従



Play Face
Waller et al 2015

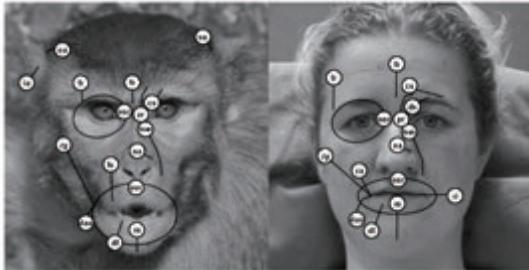


Silent bared teeth (SBT) Grimace

13:36:32

3

FACS: Facial Action Coding System



Method to code facial movement based on facial musculature. (Paul Ekman et al 1978, revised in 2002)

表情筋に基づいて顔の動きをコーディングする方法

Waller et al 2008

EX. AU12: Lip Corner Puller : Zygomaticus major (ZMa)

13:36:32

4



Home ChimpFACS MagFACS GibbonFACS OrangFACS DogFACS CatFACS
EquiFACS CalliFACS AnimalFACS in Research NetFACS

- **ChimpFACS**: Chimpanzees (Vick et al 2007) www.animalfacs.com
- **MaqFACS**: Rhesus macaques (Parr et al 2010), Barbary macaques (Julle-Daniere et al 2015), Japanese macaques (Caeiro et al 2021)
- **GibbonFACS**: Siamangs and gibbons (Waller et al 2012)
- **OrangFACS**: Orangutans (Caeiro et al 2013)
- **DogFACS**: Domestic dogs (Waller et al 2013)
- **CatFACS**: Domestic cats (Caeiro et al 2013)
- **EquiFACS**: Horses (Wathan et al 2014)
- **CalliFACS**: Common marmosets (Caeiro et al 2022)

13:36:32

5

Japanese macaque extension of maqFACS

FACS classifies facial movements based on muscle contraction:



Neutral face



AU18 - Lower lip depressor



AU12 - Lip corner puller

FACS avoids:

- ✗ subjective emotion labels
- ✗ observer biases

FACS allows:

- ✓ objective, systematic and standardized coding
- ✓ quantification of independent facial movements
- ✓ reliability with training and certification
- ✓ cross-species comparison

Caeiro et al 2021 PLOS ONE

13:36:32

6

AU 1+2 Brow Raiser (Frontalis 前頭筋)



13:36:32

7

< MacFACS Manual, Parr et. al., 2010 > AU 1+2 Brow Raiser (Frontalis)

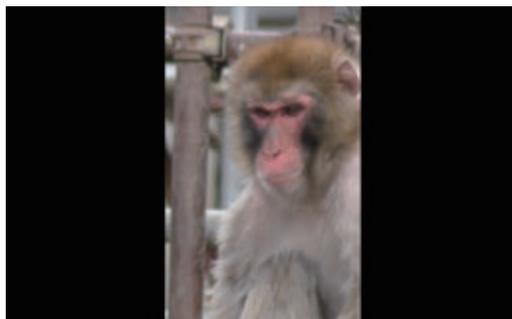
Appearance Changes

1. Raises the brow up, lifting the browline. Depending on the thickness of the brow ridge, movement may be restricted to a minor roll over the browline.
2. Reveals greater surface area in the underbrow region. The underbrow is often lighter in color as it has more light colored hair and skin than the brow.
3. When extreme, the brow profile flattens and widens vertically. This reduces and/or smoothes the sharpness of the vertical nose ridge.
4. Changes curvature of browline. In the neutral state the browline is often v-shaped (a) and with AU1+2, the browline may change to a smooth arch (b).
5. Can create bulging of hair more superior to brow region. This may be due to stronger medial vs. lateral contraction of frontalis, causing thickening of medial forehead area.

13:36:32

8

AU 1+2 Brow Raiser (Frontalis) unilateral



13:36:32

9

AU41 Glabella Lowerer (Procerus 鼻根筋)



13:36:32

10

AU12 Lip Corner Puller
(Zygomatic major 大頬骨筋)



13:36:32

11

AU25+AU27+AU12+AU10+AU1+2

Lip Parted, Mouth Stretch, Lip Corner Puller, Upper Lip Raiser, Brow Raiser



13:36:32

12

CalliFACS: コモンマーモセットのFACS

- ステップ 1：解剖学的知識（解剖）



(Lightoller 1934, Huber 1930, Waller et al 2006)

- ステップ 2：自発的な顔の動き（ビデオ解析）



- ステップ 3：ヒトのFACSと比較検討、顔の動きを分類



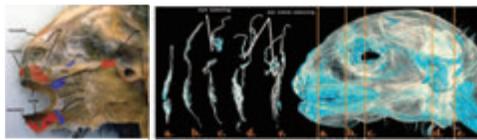
13:36:32

13

ステップ1：解剖学的知識（解剖）

- dMRIを用いた表情筋解析

C Correia¹, K Muta^{2,3}, J Hata^{2,3}, T Miyabe-Nishiwaki¹, Anne Burrows⁴, HJ Okano³
 1: KUPRI 2: Tokyo Metropolitan University 3: The Jikei University 4: Duquesne University



Burrows et al (2019) J. Vis. Exp. (143), e58394, doi:10.3791/58394

13:36:32

14

ステップ2：自発的な顔の動き（ビデオ解析）

ステップ3：ヒトのFACSと比較検討、顔の動きを分類

- 15 Action Units
表情筋に基づく動き
- 8 Action Descriptors
顎や舌などの大きな動き
- 3 Ear Action Descriptors
耳の動き

AU code	AU name	Underlying muscle	Human	Common marmoset
AU1	Inner brow raiser	Frontalis (medial)	✓	✗
AU2	Outer brow raiser	Frontalis (lateral)	✓	✗
AU1+2	Brow raiser	Frontalis ^a	✗	✓
AU4	Brow Lowerer	Frontalis, Depressor supercilii, Corrugator supercilii	✓	✗
AU4E1	Glabella Lowerer	Frontalis	✓	✓
AU5	Lippper Lid raiser	Orbicularis oculi	✓	✗
AU6	Cheek raiser	Orbicularis oculi, pars orbitalis	✓	✓
AU7	Lid tightener	Orbicularis oculi ^b , pars palpebralis	✓	✗
AU43	Eye closure	✓	✓	✓
AU45	Smile	✓	✓	✓



Cairo et al 2022 PLOS ONE

13:36:32

15

AU1+2 Brow Raiser (Frontalis)



13:36:32

16

AU41 Glabella Lowerer (Procerus)



13:36:32

17

AU12 Lip Corner Puller (Zygomatic major)



13:36:32

18

AD301 Tufts Downwards



13:36:32

19

CalliFACS自動化の可能性

- ヒトでの例 Human FACS
 - Face Reader
 - Affective/iMotions
- Animal FACS

Automatic Recognition of Macaque Facial Expressions for Detection of Affective States

Anna Morozov,¹ Lisa A. Parr,^{2,3} Katalin Gothard,⁴ Rony Paz,⁵ and Raviv Prityuk⁶

<https://doi.org/10.1523/JNEURO.0117-21.2021>

- 京都大学研究連携基盤「多階層ネットワーク研究ユニット」
個別ユニット7
「マルチモーダル行動測定による霊長類の自由行動解析と多分野への応用」

13:36:32

20

本日のトピック

- 非ヒト霊長類の表情解析
 - FACSとは
 - ニホンザルFACS
 - CalliFACS
- 非ヒト霊長類の疼痛評価
 - 痛みとは
 - 疼痛評価法
 - ニホンザルにおける例

Dr. Catia Correia
Caeiro, PhD

Dr. Vanessa Nadine
Gris, DVM

13:36:32

21

痛みとは？ 痛みの定義

IASP: International Association for the Study of Pain
国際疼痛学会 (revised in 2020)

An **unpleasant sensory and emotional experience** associated with, or resembling that associated with, actual or potential tissue damage.

痛みは、実質的または潜在的な組織損傷に結びつく、あるいはそれに似た、**不快な感覚・情動体験**である

13:36

痛みとは？ 痛みの定義

注意

- 痛みは常に個人的な経験で、さまざまな程度、生物学的、心理学的、社会的要因に影響される。
- 痛みと侵害受容は異なる現象である。痛みは感覚神経の活動だけでは推測できない。
- 個人（個体）は経験を通して痛みの概念を学ぶ。
- 人が痛みの経験を訴えたら尊重されなければならない。
- 痛みは適応的な役割があるが、機能や社会的心理的幸福に悪影響を与えることもある。
- 言葉で表すのは、痛みを訴えるひとつの行動に過ぎない。意思伝達ができないことで、ヒトやヒト以外の動物が痛みを経験している可能性を否定できない。

13:36

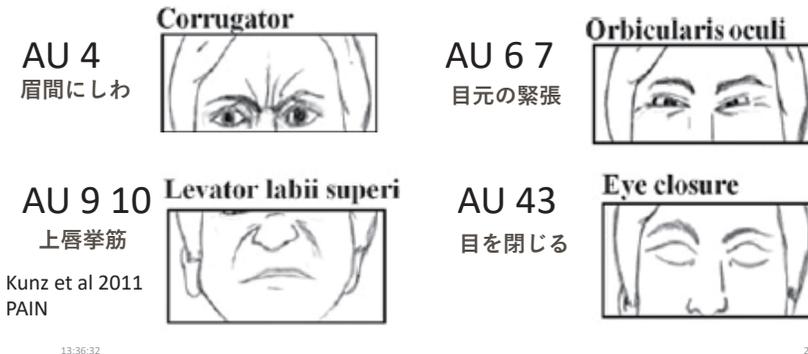
ヒトにおける痛みの評価

- 「痛い！」、「腰が痛いです」、「頭痛があります」などの言葉
- Visual Analogue Scale (V A S) 視覚的アナログスケール
- Numerical Scale
- Face Scale
顔スケール

13:36:32

24

ヒトの痛み表情



13:36:32

25

動物における痛みの評価

- Composite Pain Scale 複合ペインスケール
 - Glasgow composite pain scale for cats and dogs
グラスゴー大学
 - UNESP-Botucatu Multidimensional Composite Pain Scale
for assessing postoperative pain in cats.
ユネスブ ペインスケール
- Post Abdominal Surgery Pain Assessment Scale
(PASPAS) (Horses) 馬の腹部手術後の疼痛評価スケール

Coding of facial expressions of pain in the laboratory mouse

Dale J Langford¹, Andrea L Bailey¹, Mona Lisa Chanda¹, Sarah E Clarke¹, Tanya E Drummond¹, Stephanie Echols², Sarah Glöck¹, Joelle Ingrao¹, Tammy Klassen-Ross², Michael L LaCroix-Fralish¹, Lynn Matsumiya¹, Robert E Sorge¹, Susana G Sotocinal¹, John M Tabaka¹, David Wong², Arn M J M van den Maagdenberg^{3,4}, Michel D Ferrari⁵, Kenneth D Craig² & Jeffrey S Mogil¹

Facial expression is widely used as a measure of pain in infants; whether nonhuman animals display such pain expressions has never been systematically assessed. We developed the mouse grimace scale (MGS), a standardized behavioral coding system with high accuracy and reliability; assays involving noxious stimuli of moderate duration are accompanied by facial expressions of pain. This measure of spontaneously emitted pain may provide insight into the subjective pain experience of mice.

Langford et al *Nature Methods* 7, 447–449 (2010)

13:36:32



Figure 1 | In the MGS, intensity of each feature is coded on a three-point scale. For each of the five features, images of mice exhibiting behavior corresponding to these values are shown.

27

Association of Primate Veterinarians' Guidelines for Assessment of Acute Pain in Nonhuman Primates

- 安全性の問題から、ケージの前での観察が唯一の評価方法であることもある。食べ物を渡すなど限られた交流、ケージ越しのグルーミングなどは有用
- 痛みのある部分の触診は推奨されない
- その種、その個体の典型的な行動を良く知っていること
- 鎮痛薬投与後のポジティブな変化
- 直接観察 または ビデオ観察（録画/リアルタイム）

DOI: 10.1111/jmp.12537

ORIGINAL ARTICLE

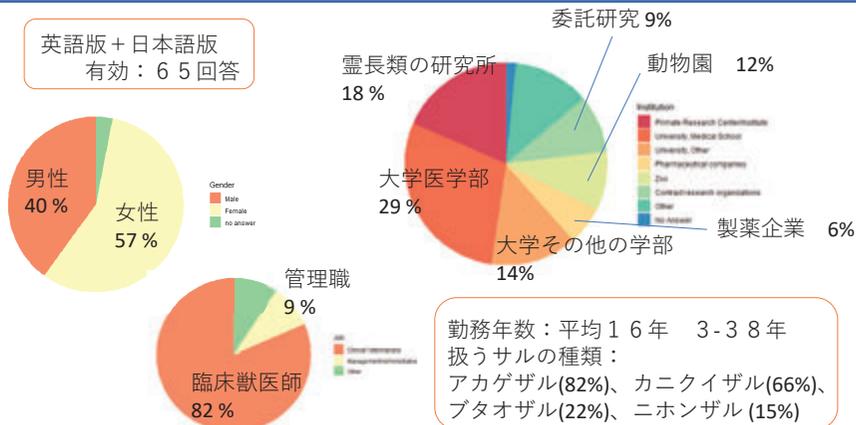
WILEY

Primate veterinarians' knowledge and attitudes regarding pain in macaques

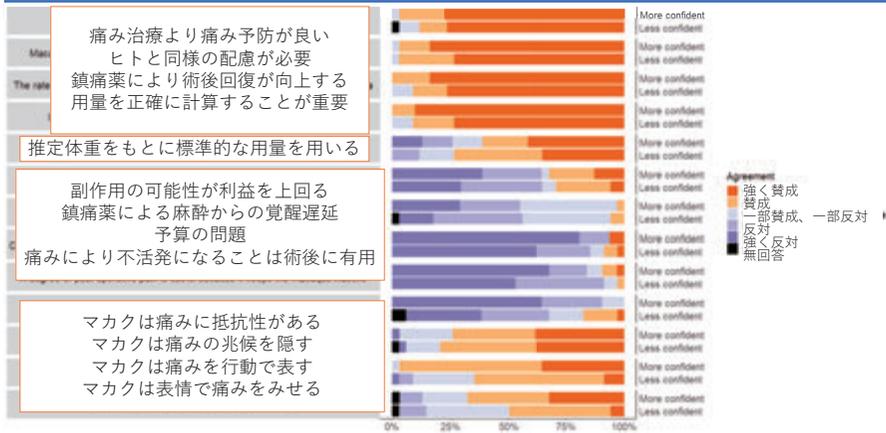
Takako Miyabe-Nishiwaki¹ | Vanessa Nadine Gris¹ |
Kanakano Muta² | Ryohei Nishimura² | Daniel Simon Mills³

<謝辞> Association of Primate Veterinarians、日本野生動物医学会、サル類の疾病と病理のための研究会 Drs. LaVonnie Meunier and Lisa Halliday
日本学術振興会 科研費 JP15K14364

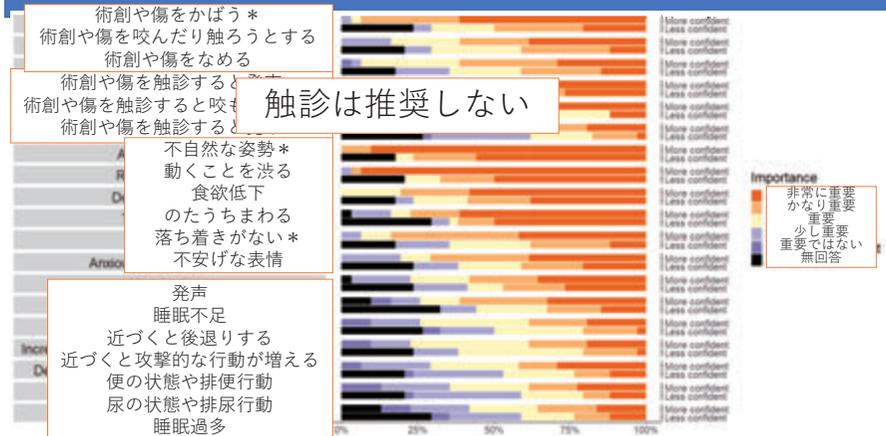
Background Information



痛みに対する姿勢や経験について



痛みの認識: 痛みの兆候



そのほかの痛みの兆候（自由記載）

- 顔面蒼白、顔が灰色、目が落ち窪む（脱水の兆候）
- 被毛粗剛
- 体重減少
- **不自然な姿勢として**：hunched position/slumped posture（背中を丸くして前かがみになった姿勢）、praying position（頭を下げてお尻を挙上）、stretching（伸びている）
- **行動の変化として**：毛づくろいをしない、同居個体に対する攻撃、同居個体から隠れる
- **異常行動として**：head pressing（頭を押し付ける）、歯ぎしり、異常な歩様（跛行というより、前かがみの姿勢による）
- **心理的**：うつ様行動、全体的に落ち込んでいる、気分の変化、他の動物や環境への興味への低下

Research Article

Opportunities for Refinement in Neuroscience: Indicators of Wellness and Post-operative Pain in Laboratory Macaques

Kris A. Descovich^{1,2,3}, Susan E. Richmond^{1,4}, Matthew C. Leach⁵, Hannah M. Buchanan-Smith¹, Paul Flecknell⁶, David A. H. Farningham⁷, Claire Witham^{6,7}, M. Carolyn Gates⁸ and Sarah-Jane Vick¹
¹Psychology, Faculty of Natural Sciences, University of Stirling, Stirling, United Kingdom; ²Environmental and Animal Sciences, Unitec Institute of Technology, Auckland, New Zealand; ³Centre for Animal Welfare and Ethics, University of Queensland, Gatton, Australia; ⁴Humane Slaughter Association, The Old School, Brehouse Hill, Wheathampsted, United Kingdom; ⁵School of Natural and Environmental Science, Newcastle University, Newcastle upon Tyne, United Kingdom; ⁶Comparative Biology Centre, Newcastle University, Newcastle upon Tyne, United Kingdom; ⁷Centre for Macaques, Medical Research Council, Salisbury, United Kingdom; ⁸School of Veterinary Science, Massey University, Palmerston North, New Zealand

13:36:32

34

形態計測の方法を使用

Geometric Morphometric (GMM) Finka et al 2019

scientific reports

OPEN Investigating subtle changes
in facial expression to assess acute
pain in Japanese macaques

Vanessa N. Gris^{1,2}, Nelson Broche Jr.^{1,2}, Akihisa Kaneko^{1,2}, Munehiro Okamoto^{1,2},
Juri Suzuki¹, Daniel S. Mills³ & Takako Miyabe-Nishiwaki^{1,2,4}

2023.2.17追記：論文出ました！

13:36:32

35

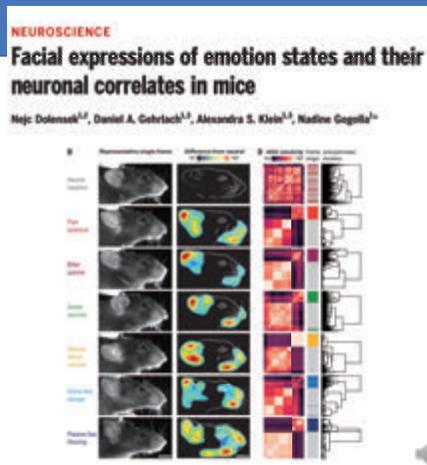
今後の展望

- 画像認識、特徴抽出
- Neural Networks
- DeepLabCut Model Zoo
 - MacaquePose
 - primate_face
- Dolensek et. al., 2020
- Feighelstein et. al., 2022

scientific reports

OPEN Automated recognition of pain
in cats

Wenbin Zhang^{1,2}, Ben Brinkhoff¹, Leanne K. Piner¹, David J. L. Cook¹, David R. Miller¹
Alex Eisenberg¹



今後の展望：痛みだけでなく福祉の評価に

Review Article

Facial Expression: An Under-Utilized Tool for the Assessment of Welfare in Mammals

Kris A. Descovich^{1,2,3}, Jennifer Wathan⁴, Matthew C. Leach⁵, Hannah M. Buchanan-Smith¹, Paul Flecknell⁶, David Farningham⁷ and Sarah-Jane Vick¹

¹Psychology, Faculty of Natural Sciences, University of Stirling, Stirling, United Kingdom; ²Environmental and Animal Sciences, Unitec Institute of Technology, Auckland, New Zealand; ³Centre for Animal Welfare and Ethics, University of Queensland, Gatton, Australia; ⁴School of Psychology, University of Sussex, Brighton, United Kingdom; ⁵School of Agriculture, Food & Rural Development, University of Newcastle, Newcastle, United Kingdom; ⁶Comparative Biology Centre, University of Newcastle, Newcastle, United Kingdom; ⁷Centre for Macaques, Medical Research Council, Salisbury, United Kingdom

13:36:32

37

ご清聴ありがとうございました。

謝辞

- 京都大学ヒト行動進化研究センター
Dr. Catia Correia Caeiro, Dr. Vanessa Gris
岡本宗裕教授、明里宏文教授、兼子明久先生、兼子峰明先生、井上謙一先生
- 東京慈恵会医科大学
岡野ジェイムス洋尚教授
太田裕貴先生
- 実験動物中央研究所
佐々木えりか先生、黒滝陽子先生、井上貴史先生、塚本晃海先生
- 東京都立大学
畑純一先生、牟田佳那子先生
- 広島大学
外丸祐介教授、信清麻子先生
- University of Lincoln
Prof. Daniel Mills
- 鈴木樹理先生
- 東京大学
西村亮平教授、村田幸久先生
- 京都大学情報学研究所
寺前順之介先生、Thomas R Crespoさん
- 京都大学文学研究科
Dr. Duncan Wilson
- Duquesne University
Prof. Anna Burrows
- University of Stirling
Prof. Hannah Buchanan-Smith

13:36:32

38

ご清聴ありがとうございました。

謝辞

- MEXT scholarship #180464
- Leading Graduate Program in Primatology and Wildlife Science, Kyoto University
- 科研費 #JP15K14364
- 京都大学創立125周年記念ファンド「くすのき・125」
- 京都大学研究連携基盤「多階層ネットワーク研究ユニット」



13:36:32

39

動物におけるコミュニケーション能力の基盤と表象操作の進化

黒島 妃香

(京都大学大学院文学研究科心理学専修)

ヒトは言語を用いてコミュニケーションを行うが、言語理解だけでは他者との円滑なコミュニケーションは成り立たない。他者とのコミュニケーションを成立させるためには、たとえば、自身が他者に伝えたい事柄を正確に認識する能力（「メタ認知」）、他者との共通言語の獲得、他者の知識や内的状態を認識する能力（「心の理論」）、社会的な文脈を理解する能力、他者の反応に応じて伝え方や内容を調節する能力などが必要となる。これらすべての能力は、心的表象の操作能力とも関連している。私たちの研究室では、コミュニケーション能力の基盤となる能力として、心的表象操作能力、自己理解、他者理解、自己理解と他者理解の関係に関する研究を、多様な動物種を対象に進めてきた。本講演では、最近の研究成果から、（１）心的表象能力、（２）他者への社会的評価能力、（３）自己経験と他者理解の関連に関する研究成果を紹介する。

1. 心的表象能力

（１）ネコにおける心的表象理解

最近の20年間で、比較認知科学分野におけるイヌやネコなどの伴侶動物を対象とした認知研究は飛躍的に進展してきた。イヌとネコは同じ伴侶動物であり、ヒトにとって身近に生息する動物ではあるものの、ネコはイヌほどの積極的な繁殖制御は行われることなくヒトと環境を共にして生息してきた歴史がある。ネコの認知研究は、実験環境への導入の難しさからイヌの文献数と比較すると少なくはあるが、聴覚刺激や動きを加えた刺激を用いたり、選択行動ではなく視線反応を行動指標として用いたりするなど、研究手法の工夫によって近年増加傾向にある。ネコの認知能力を検討し、イヌや、伴侶動物以外の動物種の認知能力と比較することによって、ヒトと環境を共にすること、伴侶動物として生息することによる認知能力への進化的要因を解明することができる。

では、ネコはどのような心的表象をもちうるのだろうか。Takagi et al. (2019) は、「クロスモーダル期待違反法」を用いてネコが飼い主の声（聴覚刺激）から顔（視覚刺激）を想起するか否かを検討した。実験では、ネコを背後から軽く保定した状態で、モニターの前に座らせ、音声刺激として飼い主か見知らぬ人が当該のネコの名前を呼ぶ声を、モニター背後のスピーカーから再生した（音声フェーズ）（図1）。続いて、モニターに飼い主かあるいは見知らぬ人の顔写真を呈示し、顔写真に対するネコの注視時間を計測した。「期待違反法」では、

期待に反した事象が生じた場合に注視時間が長くなることが想定されている。よってこの手続きでは、飼い主の声が先行したにも関わらず見知らぬ人の顔写真が提示された場合と、見知らぬ人の声で名前を呼ばれたにも関わらず飼い主の顔がモニターに提示された場合（共に「不一致条件」）では、それ以外の場合（「一致条件」）と比較してモニターへの注視時間が長くなることが予測される。



図1. 実験手続き.
音声提示後、顔刺激を提示する。図は音声刺激と顔刺激の組み合わせを示す。Takagi, et al.(2019)からの引用。

実験の結果、一般家庭で飼育されているネコ（以下、家庭ネコ）では飼い主の顔が提示される条件で、不一致条件の方が一致条件よりもモニターを長く注視したが、見知らぬ人の顔が提示される条件では、逆の反応となった（図2）。一方、ネコカフェで飼育されているネコ（以下、カフェネコ）では、両条件共に、不一致条件の方が一致条件よりも有意に長くモニターを注視した。つまり、少なくともカフェネコは、飼い主の音声（聴覚刺激）からその人物の顔（視覚刺激）を想起している可能性が示された。カフェネコはイエネコと比較して、見知らぬ人との接触経験が圧倒的に多いことから、生育環境の違いが見知らぬ人の声から見知らぬ人の顔を予測することの容易さ（困難さ）に影響した可能性が考察されている（Takagi, et al., 2019）。

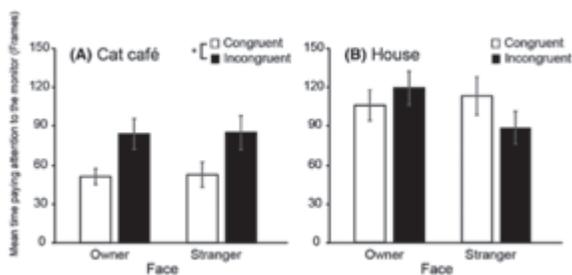


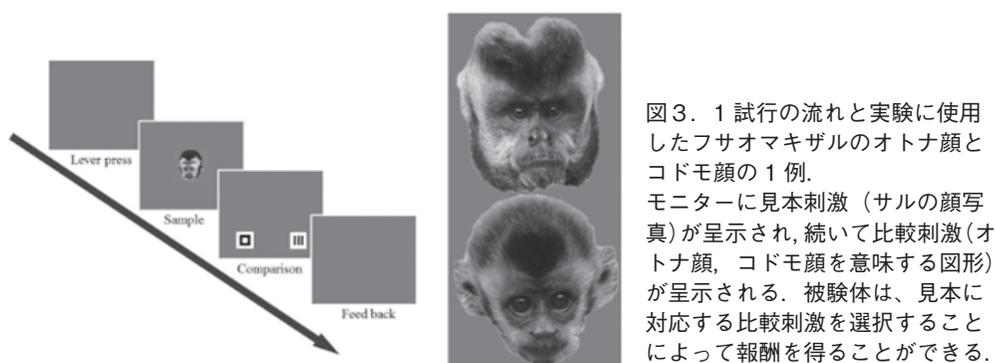
図2. 各条件のモニターへの注視時間 (30 frames/sec.) . (A) はネコカフェのネコ, (B) は一般家庭で飼育されているイエネコ. Takagi, et al. (2019) Fig.3からの引用。

さらに（Takagi et al., 2022）では、ネコが同居するネコや飼い主の名前（呼び名）と顔の連合を形成しているのかを検討した。基本的な手続きは上記の手続きと同様、先行する聴覚刺激として同居するネコ、あるいは飼い主の「呼び名」をスピーカーから呈示し、続けて

その名前に一致するネコ（人）の顔写真（一致条件）か、一致しないネコ（人）の顔写真（不一致条件）をモニターに呈示し、ネコの注視時間を計測した。その結果、家庭ネコは同居ネコに対して一致条件よりも不一致条件で有意に長く注視した。一方、カフェネコではこのような差は見られなかった。また、同居する人に関しても、同居年数が長く、家族の人数が多いイエネコほど不一致条件で長くモニターを注視することがわかった。これらの結果より、ネコは日々の生活の中で、同居ネコや人の呼び名と顔を統合した表象を学習している可能性が示された。ネコが同居個体の鳴き声だけではなく、ヒトの発話や発声にも注意を向け、ヒトの発声が指示する物体の視覚情報と聴覚情報の統合を学習することは、ヒトと動物の共生をより円滑にする機能であると捉えることができるだろう。

（2）フサオマキザルにおける年齢カテゴリー形成

フサオマキザル (*Sapajus apella*) を対象とした心的表象に関する研究では、サルが顔の分類において、年齢カテゴリーを有しているか否かを検討した (Kawaguchi, Kuroshima, & Fujita, 2019)。Lorenz (1943) は、動物種を超えて乳児の顔は、顔全体に対して大きな目と額、小さな口といった特徴を有しており、この特徴を「幼形図式 (Baby schema)」と定義している。本研究では、フサオマキザルが種を超えて年齢群 (成体か幼体) の異なる顔写真を分類することができるかを、象徴見本合わせ課題を用いて調べた。象徴見本合わせ課題とは、見本刺激に対応する比較刺激としてシンボル (図形) を学習させる課題である (図3)。



同種他個体であるフサオマキザルの成体の顔 (オトナ顔) と幼体の顔 (コドモ顔) の弁別訓練を行った後、テストとしてヒトの成人顔と乳児顔、イヌ (ラブラドルレトリバー) の成犬顔と子犬の顔を呈示した結果、同種他個体顔で学習した年齢カテゴリーは他種 (イヌ) には般化しなかった。同種他個体の顔には種特異的な分類情報が存在した可能性があると考え、続く実験では、新たな実験個体に対し、他種であるヒトの成人顔と乳児顔を使った弁別

訓練を行ったが、テスト刺激として提示したイヌ（ラブラドルレトリバー）と同種他個体（フサオマキザル）の顔に対し、年齢カテゴリーに基づいた分類をすることはできなかった。そこで、訓練刺激のバリエーションを増やすべく、同種他個体とヒトの顔刺激を使って年齢カテゴリー弁別訓練を行った後、イヌの顔刺激を呈示してテストを行ったが、やはり年齢カテゴリーに基づいた弁別は見られなかった。さらに類人猿、広鼻猿類、狭鼻猿類、食肉目から複数種を選定し、テストを行ったが、全体として明確な般化は見られなかったものの、類人猿の顔の弁別成績は狭鼻猿類や食肉目の顔に対する弁別成績よりも有意に高かった。これは訓練刺激として使ったヒトの顔刺激との類似性による般化かもしれない。ヒトでは顔から年齢情報を抽出し、年齢カテゴリーを形成することが容易にできるが、フサオマキザルではそのような結果を得ることはできなかった。顔刺激から年齢情報を読み取る能力は、コミュニケーション時に顔に注目し、視線や表情などから他者の感情状態や注意状態を読み取る能力を有するヒト特有の能力なのかもしれない。今後の研究では、動物が乳幼児とオトナを弁別する視覚刺激の特徴が人とどのように異なるかと検討することが必要である。

2. 他者の社会的評価

(1) イヌ・フサオマキザルにおける第三者間のやり取りを基にした他者評価

ヒトはたとえそれが他者との直接的なインタラクションから得た情報でなくとも、第三者間のやり取りを観察したり、噂話を聞いただけで、あの人は信頼できる人であるとか、親切な人であるとか、逆に不誠実な人だとか、意地悪な人だ、などと社会的評価を下す。この評価は集団内外に広まり「評判」となる。ヒト以外の動物も第三者間のやり取りを観察することによって、他者を社会的に評価する能力を持つかを検討した。

Chijiwa, Kuroshima, Hori, Anderson, and Fujita (2015) は、家庭で飼育されているペットのイヌを対象に、飼い主の要請に応じて協力する人物と、要請を拒否して協力しない人物を登場させ、イヌの演技者に対する選好を調べた。図4は条件ごとの実験手続きを示している (Chijiwa, et al. 2015 からの引用)。まず、飼い主が容器の蓋を開けようとする場面をイヌに見せる。飼い主は何度も蓋に手をかけて開けようとするが開けることができない。そこで飼い主は、両脇に座る演技者の片方に容器を差し出し援助を求める。その試行が「**援助者条件**」の場合、演技者は「援助者」として容器を支え、飼い主が蓋を開けるのに協力する。飼い主は蓋を開け、中の物体 (ビニールテープ (イヌにとって特に興味を引く物体ではない)) を取り出し、イヌに見せる。そのあと静かに容器を床に置き、視線を床に向けた。一方「**非援助者条件**」の場合、演技者は「非援助者」として飼い主の要請に対して首を振って拒否する反応を見せ、飼い主は再び自力で容器の蓋を開けようとするが開けることができず、諦め

て床に容器を置いた。その後、両条件共に、両脇の演技者が同時に手のひらに乗せたおやつをイヌに差し出し、イヌがどちらの演技者からおやつを得るかを調べた。「統制条件」では、非援助者の顔をそむける動作がイヌの選択に与える影響を調べるために、飼い主が演技者に協力を要請することなく、単に「非援助者条件」と同じタイミングで顔をそむける動作を行った。

以上の3条件において、イヌの選択行動を比較すると、統制条件と援助者条件では左右の演技者に有意な選好は見られなかったが、非援助者条件では、非援助者を有意に避ける結果となった。以上のことから、イヌは飼い主の要請に対して非協力的に振る舞う人物を避けることと結論づけられた(図5)。

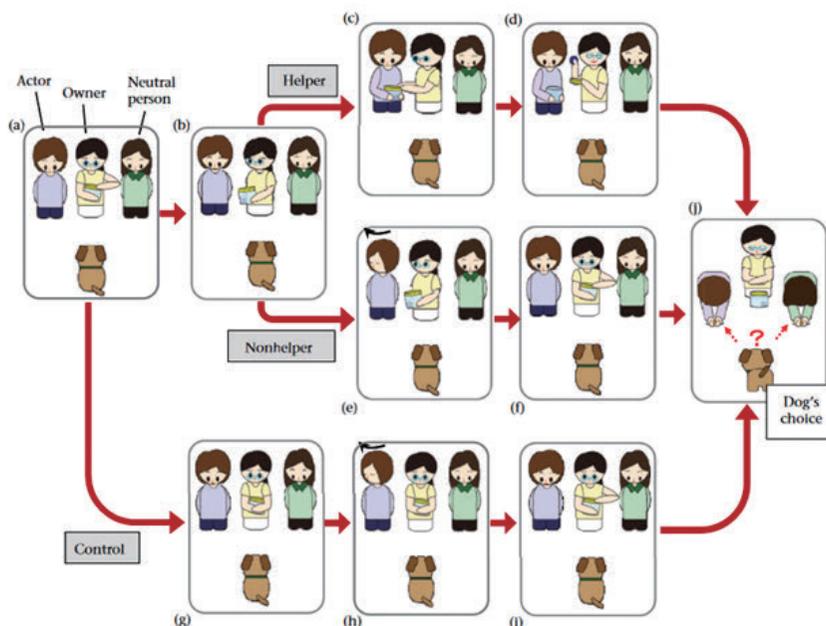


図4. Chijiwa, et al., (2015) による実験条件ごとの手続き図 (Chijiwa, et al. 2015 からの引用) .

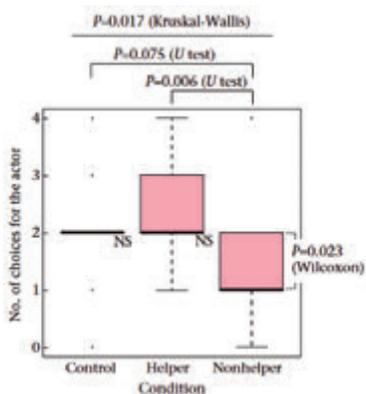


図5. 各条件において演技者を選択した平均回数(1個体につき4試行実施)した結果 (Chijiwa, et al. 2015 からの引用) .

フサオマキザルでも同様の研究が行われており、イヌと同様、非協力な人物を避ける (Anderson, Kuroshima, Takimoto, & Fujita, 2013) ことや、物体を独り占めするような不公平な人物を避ける (Anderson, Takimoto, Kuroshima, & Fujita, 2013) ことが示されている。ヒト以外の動物にも、集団で生息する動物には他者間のやり取りを観察することによって、他者を社会的に評価し自身の行動を調節する能力がみられるようだ。今後、ヒトのような言語をもたない動物種にも、ヒトのように「評判」を形成することが可能なのか、第三者間のやり取りを観察することで得られた社会的評価は自身と他者の行動調節だけに使われるのかなど、更なる課題として興味深い点である。

3. 自己経験と他者理解の関連

他者の行動の意味やその意図を理解するためには、何が手掛かりになるのだろうか。ヒト乳幼児では、自身の行動経験に基づいて他者の行動の見方や行動の結果の予測が変化するという結果が得られている (Kanakogi & Itakura, 2011; Kano, Krupenye, Hirata, Tomonaga, & Call, 2019; Myowa-Yamakoshi, Scola, & Hirata, 2012; Sommerville, Woodward, & Needham, 2005)。そこでフサオマキザルとイヌ対象にして、自身の行動経験が他者の行動の理解に影響を及ぼすかを検討した。

(1) フサオマキザルにおける自身の経験による他者理解への影響

Kuroshima, Kaiser, and Fragaszy (2014) の実験 1 では、まず、被験体であるサルが、すでに結果を知っている動作と初めて見る動作では、当該の行動をする実験者に対する注視時間に差がみられるか否かを調べた。実験者は、サルと対面して座り、通常試行として、報酬 (クランベリー) の入った瓶の蓋を開けて、中から報酬を取り出して、被験体に渡した。被験体はこの試行によって、実験者が瓶の蓋を開けようとする行為の後には報酬を得ることができることを学習することができた。テスト試行では、2種類の動作を被験体に見せた。1つめの動作は通常試行と同じ方法で実験者が瓶の蓋に手をかけ開けようとするが、開けられない動作を 10 秒間見せた (既知動作)。2つめの動作は瓶の側面を両手の人差し指にあてて離す動作を 10 秒間繰り返して見せた (新規動作)。その結果、サルは、実験者が既知動作を行ったときの方が、未知動作を行った時よりも有意に長く実験者と瓶を注視した。このことから、報酬の獲得を予測できる場合の方が、被験体は長く実験者の動作を注視することが示された。

続く実験 2 では、新たな容器を用いて実験を行った (図 6)。



図6. 実験2で用いた装置. 蓋を開けることも、引き出しを引き出すこともできる装置を用いた. (Kuroshima, et al. (2014) からの引用.)

通常試行では、実験者は容器の蓋を開いて中の報酬を被験体に手渡した。テスト試行では、同じ容器に対して2つの新奇な動作を行い、被験体に見せた。1つめの動作は、容器の取っ手に手をかけて引き出そうとする動作（新規動作1）であり、2つ目は容器の蓋を右手の人差し指で押す動作（新規動作2）であり、それぞれを10秒間見せた。テスト試行では、被験体は報酬を得ることはできなかったが、結果を予測することができれば、すなわち報酬を得ることができることを予測することができれば、長く注視することが予測された。その結果、共に新奇な2種類の動作に対する注視時間に有意な差は見られなかった。

実験3では、実験2で実験者が見せた2種類の新規動作のうち、容器の取っ手を引く方の動作を被験体に実際に訓練した。この時点でサルは、自身の行動とその結果として、取っ手を引く行為は報酬獲得につながることを学習できた。しかし、他者の動作の同一の行動が報酬につながることは学習していない。その後、実験2と同じ手続きで通常試行とテスト試行を行った。その結果、経験した動作条件での実験者と装置に対する注視時間は、未経験の動作を観察した時よりも有意に長くなった。つまり、一方の行動を自身の行動として獲得し、その結果を知ることが、他者の動作の結果の予測に影響を及ぼしたことを示している。自身の行動経験により他者の行動の解釈や予測が異なることを示唆する結果と言える。

(2) イヌにおける他者の行動を通じた環境の物理的推論能力

Kuroshima, Nabeoka, Hori, Chijiwa, and Fujita (2017) は、ヒトと暮らすイヌが、ヒトの行動を観察することによって、環境の物理的特性を推論することができるかどうかを検討した。イヌの前に2つの扉を設置した（図7右）。それぞれの扉の向こう側には報酬入りのエサ皿がある。2つの扉を順に実験者が、一方は重そうにゆっくりと、もう片方は軽そうに素早く2回押し上げて見せた後、イヌがどちらの扉を押し上げて報酬と得るかを調べた。その

結果、実験者の扉を押し上げる演技の違いにかかわらず、イヌの扉への選好に偏りは見られなかった。そこで、2つの扉に対して2回ずつ、扉が重い場合と軽い場合があることをイヌに実際に扉を押し上げて報酬を取ることによって経験させた。その後、実験1と同じ手続きで、実験者が2つの扉に対して一方をゆっくりと、もう片方を素早く2回扉を押し上げる動作を見せたあと、イヌがどちらの扉を選択するかを調べた。その結果、有意に多くの被験体が演技者が、素早く2回押し上げた方の扉を選択した（図7左）。この結果は、イヌが自身の経験を通して扉が軽い場合と重い場合があることを知ったことで、ヒトの動作の解釈の仕方が異なり、扉の物理的特性の違いを推論することができた結果であるといえよう。今後の課題として、イヌがヒトの動きからヒトの心的状態を読み取って軽い扉を選択したのか、物体の動きから物理的情報を推測して軽い扉を選択したのかを検討することによって、ヒトの動作から何を推測することができるかを明らかにすることができると考えられる。

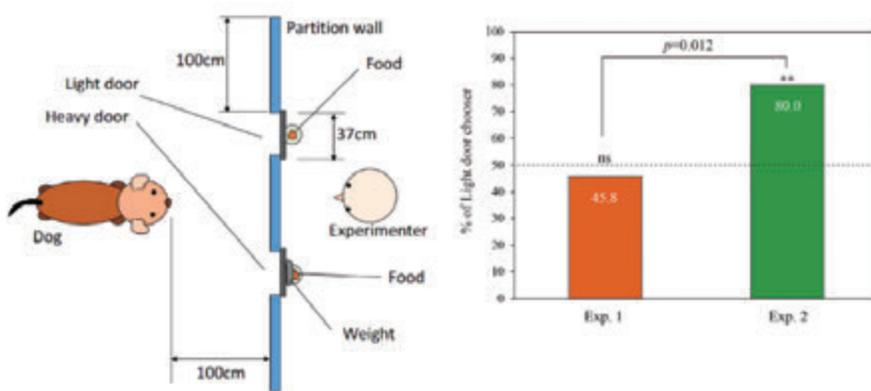


図7左：上空から見た実験装置とイヌの配置図。2つの扉が左右にあり、イヌは扉を押し上げることで、扉の背後の餌皿にある餌を獲得することができる。扉に重りを取り付けることによって扉の重量を変化させることができる。

図7右：イヌがヒト演技者が扉を2回素早く持ち上げる動作と、ゆっくりと1回持ち上げる動作を見た後、軽い扉（素早く2回開けた方）を選択した割合。実験1では事前経験なし、実験2では事前の経験により扉が重い場合と軽い場合があることを知っている状態。図は共に Kuroshima, et al. (2017) からの引用。

以上、フサオマキザルとイヌを対象とした研究から、他者の行動の結果を予測するためには、あるいは他者の行動の観察を通じて環境の物理的特性を推測するためには、自身の経験を通じて得た知識が影響を及ぼすことが示唆された。ヒト乳幼児や類人猿でも同様の結果が示されていることから、動物の他者理解の基盤には自己経験や経験を通じて得た自己理解が関与している可能性が考えられる。

4. コミュニケーションからインタラクションへ

本講演では、他個体とのコミュニケーションを可能にする基礎的能力として、(1) 他個体を心的に表象する能力、(2) 第三者間のやり取りを観察することで他者を社会的に評価する能力、(3) 他個体の行動理解や行動予測における自己経験の影響の3つのトピックに焦点をあて、研究成果を紹介した。これまでの成果から、ネコは特定の訓練なしに、日常生活の中で同居人や同居ネコの呼び名と顔の連合を学習しており、自身に向けられたコミュニケーションカテゴリーシグナルのみならず、他者や他個体に向けられたシグナルにも感受性を持つことを明らかにした。また、イヌやサルも第三者間のやり取りを観察することによって、他者を社会的に評価し、自身の行動を調節することから、これらの能力はヒトの協力的社会やモラル形成の起源となる能力であると考察される。コミュニケーションにおいて、他者の行動からその意図や目的を推測することは重要であるが、サルやイヌもヒトや類人猿と同様に、自身の行動とその結果を経験することによって、他者の行動を理解し、次の行動を予測する能力が備わっていることも示された。これらの結果は、コミュニケーションに必要な基礎的能力がヒト以外の動物にも存在し、ヒトのコミュニケーション能力が、ヒトとヒト以外の動物の共通祖先にまでさかのぼることができることを示唆している。

コミュニケーションの文脈において、比較認知科学研究では、被験体がヒトの、あるいは同種個体のコミュニケーションシグナルに対してどのように反応するかを検討してきた。たとえば、ある表情、視線、音声に対する被験体の反応を分析することによって、被験体が当該の刺激をどのように理解しているのかを考察してきた。その成果として、ヒトと全く同じ様相ではないにしても、多様な動物種が他個体と情報や知識、技術を共有し、共同場面において他者の利益のためにも労力を払うことができることや、情動伝染により他者の心的状態を共有することも示唆されるようになってきた。しかし、これらは発信者からのコミュニケーションシグナルに対して受信者がどのように反応するかを検討した結果であり、ダイナミックなインタラクションは検討されていない。ヒトの日常は、他者や環境との双方向からのインタラクションの連続である。同じコミュニケーションシグナルが発せられたとしても、その読み取りは以前のインタラクションの履歴によっても異なるものになりうる。今後、比較認知科学研究にも特定のコミュニケーションシグナルに対する反応に限るのではなく、互いのインタラクションがどのようにコミュニケーションシグナルの読み取りに影響を及ぼしているのかを検討していく必要があるだろう。

また、動物が第三者間のやり取りを観察することによって、他者を社会的に評価し、行動を調節することが示されたことから、コミュニケーションにおいて他者への信頼性や、社会

的な公平性が行動の読み取りにも影響を及ぼす可能性が考えられる。他個体とのコミュニケーションや協力行動場面では、信頼関係は重要な要因である。ヒト以外の動物が、どのように他個体と信頼関係を構築していくのか、そもそも他個体とのインタラクションで得られる即時的な強化率の高さ（低さ）を超えて、将来的な関係性に関わる「信頼性」をヒト以外の動物も持ち得るのかという点は今後検討していくべき点である。

さらに、比較認知科学では、従来の実験動物の枠を超えて、イヌやネコ、ウマなどの伴侶動物も研究対象として盛んに扱われるようになってきたことから、ヒトとヒト以外の動物の異種間コミュニケーションに関する研究が増大してきた。そこでは主に、伴侶動物たちがヒトの発するコミュニケーション信号をどのように理解し、反応しているかに焦点が当てられてきた。しかし、私たちヒトが彼らのコミュニケーション信号に対してどの程度の感度をもって反応し、正しく反応できているかに関する研究はほぼ行われていない。今後は、ヒトと伴侶動物との相互作用を検討していくことにより、伴侶動物とのより良い関係性の構築に必要な要件や、私たちヒトが改めていくべきことを明確にできるのではないかと考えている。比較認知科学の研究目的の一つには、ヒトの認知能力の進化を知ることが挙げられるが、当該の動物の認知能力を知るとは、現存する動物たちの福祉にも還元していくことができると考えている。

引用文献

- Anderson, J. R., Kuroshima, H., Takimoto, A., & Fujita, K. (2013). Third-party social evaluation of humans by monkeys. *Nat Commun*, 4, 1561. doi:10.1038/ncomms2495
- Anderson, J. R., Takimoto, A., Kuroshima, H., & Fujita, K. (2013). Capuchin monkeys judge third-party reciprocity. *Cognition*, 127(1), 140-146. doi:10.1016/j.cognition.2012.12.007
- Chijiwa, H., Kuroshima, H., Hori, Y., Anderson, J. R., & Fujita, K. (2015). Dogs avoid people who behave negatively to their owner: third-party affective evaluation. *Animal Behaviour*, 106, 123-127. doi:10.1016/j.anbehav.2015.05.018
- Kanakogi, Y., & Itakura, S. (2011). Developmental correspondence between action prediction and motor ability in early infancy. *Nat Commun*, 2, 341. doi:10.1038/ncomms1342
- Kano, F., Krupenye, C., Hirata, S., Tomonaga, M., & Call, J. (2019). Great apes use self-experience to anticipate an agent's action in a false-belief test. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 116(42), 20904-20909. doi:10.1073/pnas.1910095116
- Kawaguchi, Y., Kuroshima, H., & Fujita, K. (2019). Age categorization of conspecific and heterospecific faces in capuchin monkeys (*Sapajus apella*). *J Comp Psychol*, 133(4), 502-511. doi:10.1037/com0000185
- Kuroshima, H., Kaiser, I., & Frigaszy, D. M. (2014). Does own experience affect perception of others' actions in capuchin monkeys (*Cebus apella*)? *Animal Cognition*, 17(6), 1269-1279. doi:10.1007/s10071-014-0760-1
- Kuroshima, H., Nabeoka, Y., Hori, Y., Chijiwa, H., & Fujita, K. (2017). Experience matters: Dogs (*Canis familiaris*) infer physical properties of objects from movement clues. *Behav Processes*, 136, 54-58. doi:10.1016/j.beproc.2017.01.013
- Lorenz, K. (1943). Die angeborenen Formen möglicher Erfahrung. *Zeitschrift für Tierpsychologie*, 5(2), 235-409. doi:https://doi.org/10.1111/j.1439-0310.1943.tb00655.x

- Myowa-Yamakoshi, M., Scola, C., & Hirata, S. (2012). Humans and chimpanzees attend differently to goal-directed actions. *Nat Commun*, 3, 693. doi:10.1038/ncomms1695
- Sommerville, J. A., Woodward, A. L., & Needham, A. (2005). Action experience alters 3-month-old infants' perception of others' actions. *Cognition*, 96(1), B1-11. doi:10.1016/j.cognition.2004.07.004
- Takagi, S., Arahori, M., Chijiwa, H., Saito, A., Kuroshima, H., & Fujita, K. (2019). Cats match voice and face: cross-modal representation of humans in cats (*Felis catus*). *Anim Cogn*, 22(5), 901-906. doi:10.1007/s10071-019-01265-2
- Takagi, S., Saito, A., Arahori, M., Chijiwa, H., Koyasu, H., Nagasawa, M., . . . Kuroshima, H. (2022). Cats learn the names of their friend cats in their daily lives. *Sci Rep*, 12(1), 6155. doi:10.1038/s41598-022-10261-5

<第150回研究会（令和4年12月16日）オンライン開催>

<会員の発表-1>

1. C57BL/6マウス亜系統間における未分化性腺内の Sry発現の差異に関する定量組織学的解析
成田 大翔（神戸大院・農・形態機能）
2. C57BL/6NCrSlcマウスの未分化性腺における Sry上流因子の発現に関する定量組織学的検討
奥西 宣祐（神戸大院・農・形態機能）
3. ジアミド系農薬がマウスの行動および神経活動に及ぼす影響評価
木村 真子（神戸大院・農・形態機能）
4. スナネズミにおける3種混合注射麻酔薬による外科的麻酔深度の導入とアチパメゾールによる早期覚醒の試み
水野 信哉（岡山理科大学・理・動物学科）

<会員の発表-2>

5. 肥満糖尿病モデル ZFDMラットにおける糖尿病発症に対する女性ホルモンの効果に関する検討
重中 咲希（京都大院・農・動物遺伝育種学）
6. 造血幹細胞の骨髄へのホーミングに重要な働きをするタンパク質とその糖鎖構造についての研究
PAN XUCHI（京都大院・実験動物学）
7. ガラクトース転移酵素欠損マウスは高免疫原性腫瘍の増殖を抑制する
魏 恒（京都大院・附属動物実験施設）
8. QTLによる癌型 K-Ras 肺発癌 modifier 遺伝子の解析
齋藤 浩充（三重大・先端科学研究支援センター・動物機能ゲノミクス部門）

<特別講演-1>

マウス胚発生と子宮内の力学的な環境

松尾 勲（大阪母子医療センター・病因病態部門）

<特別講演-2>

実験動物におけるアミロイドーシスと伝播

渡邊 謙一（帯広畜産大・グローバルアグロメディシン研究センター）

C57BL/6マウス亜系統間における未分化性腺内のSry発現の差異に関する 定量組織学的解析

○成田 大翔¹、横山 俊史¹、奥西 宣祐¹、加藤 栞¹、桐月 優輔¹、藤川 大誠¹、
万谷 洋平¹、星 信彦¹

(¹ 神戸大院 農・形態機能)

【背景と目的】

性決定遺伝子 *Sry* は転写因子 *Sox9* を発現上昇させ、胎子の未分化性腺内の支持細胞前駆細胞を精巢特異的なセトリ細胞へと分化誘導する。我々は以前、C57BL/6NCrSlc (B6NCrSlc) マウスにおいて左性腺優位な *Sry* 発現を認め、ICR 系統にはその傾向が認められないことから、B6 系統もしくは B6NCrSlc 亜系統に特有の現象であることを示唆した。加えて、B6 系統の性分化疾患モデルマウスである XY^{POS} マウスにおいて、遺伝的背景の亜系統差により *Sry* 発現時期と性腺表現型が異なる [Umemura *et al.*, 2015] ことから、野生型の B6 亜系統間においても *Sry* 発現に差異のあることが想定された。B6 は B6J 亜系統と B6N 亜系統とに大別されるため、B6J 亜系統の中から B6J と B6JmsSlc、B6N 亜系統の中から B6NCrl を用い、それらにおける *Sry* 発現について定量組織学的に精査した。

【材料と方法】

胎齢 11 日付近 (尾体節数 11 ~ 15) の B6J および B6JmsSlc、B6NCrl の XY マウス胎子から性腺を体壁ごと摘出して使用した。PFA 固定後にパラフィン包埋し、連続横断切片を作製した。抗 *Sry* 抗体による免疫組織染色を行った後に、性腺領域における陽性細胞数を計測した。

【結果と考察】

B6J では *Sry* 陽性細胞数の増加に伴い、わずかに左性腺優位な *Sry* 発現がみられたが、同じ B6J 亜系統である B6JmsSlc では *Sry* 発現の左右差は認められなかった。B6N 亜系統である B6NCrl では、ほとんどの個体で左性腺優位な *Sry* 発現がみられ、総陽性細胞が 100 個を超えた場合の B6NCrSlc と同様であった。さらに、各発生段階において B6NCrl の *Sry* 陽性細胞数が B6J より多いなど、亜系統間で *Sry* 陽性細胞数が異なった。これらの結果から、*Sry* の発現開始時期や発現様式は B6 亜系統間で異なることが考えられた。

B6 系統は性分化研究に多用されているが、その亜系統差は必ずしも考慮されていない。本研究の結果から、その他の性分化関連因子の発現においても亜系統差が存在することが推測され、性分化研究における亜系統間の差異が及ぼす影響を考慮する重要性が考えられた。

C57BL/6NCrSlcマウスの未分化性腺における *Sry* 上流因子の発現に関する 定量組織学的検討

○奥西 宣祐¹、横山 俊史¹、成田 大翔¹、加藤 栞¹、桐月 優輔¹、藤川 大誠¹、
万谷 洋平¹、星 信彦¹

(¹ 神戸大院 農・形態機能)

マウスの未分化性腺は性的両能性を有し、性決定遺伝子 *Sry* が適切に発現した場合に精巣が形成される。その際、性腺内における *Sry* 発現は左右同等と考えられていたが、C57BL/6NCrSlc (B6N) 系統のマウスを用いてその発現の詳細を精査したところ、左右差のあることを我々は明らかにした。また、各性腺内における *Sry* 発現細胞の空間配置は均一でなく、従来知られてきた頭尾側方向および腹背側方向における差異に加えて、内外側方向の差異も認められた。

Sry の発現開始の制御には、上流因子である *Nr5a1*、*Wt1* (+KTS)、*Gata4* 等の関与が報告されているが、未分化性腺内におけるその発現の詳細は明らかにされていない。本研究では、B6N マウス系統における *Sry* 上流因子群の時空間的な発現変化を定量組織学的に精査し、*Sry* の時空間的発現との関連性を検討した。

【材料と方法】

胎齢 10.0 ~ 10.5 日付近 [1-12 ts (tail-somites)] の B6N マウス胎子から性腺を摘出し、横断連続切片を作製した。*Nr5a1*、*Wt1*、*Gata4* を免疫組織化学的に検出し、陽性細胞数を計測した。

【結果と考察】

各因子の発現の左右差を検討すると、*Nr5a1* は胎齢にかかわらず左性腺優位に発現した。*Wt1* の発現は、1-8 ts では特定の傾向を示さなかったが、9 ts 以降は左性腺優位となる個体が増加した。*Gata4* の発現は胎齢にかかわらず特定の傾向を示さなかった。

各因子の発現の内外側差を検討すると、*Nr5a1* は 1-8 ts では内側優位な発現を示したが、9 ts 以降は外側優位となる性腺が増加した。*Wt1* の発現は特定の傾向を示さなかったが、*Gata4* の発現は内側優位な傾向を示した。

これらの結果から、B6N マウスにおける *Sry* の時空間的発現の制御に、*Nr5a1* が重要な役割を果たしている可能性が考えられた。

ジアミド系農薬がマウスの行動および神経活動に及ぼす影響評価

○木村 真子¹、正田 明日香¹、村田 碧¹、原 悠佳子¹、世ノ一 さくら¹、石田 祐也¹、

平野 哲史²、万谷 洋平¹、横山 俊史¹、池中 良徳³、星 信彦¹

(¹神戸大院・農・形態機能、²富山大研究推進機構 分子・構造解析、³北海道大院・獣医・毒性)

ジアミド系農薬は鱗翅目のリアノジン受容体を標的とした新規作用剤で、有用生物への影響が指摘されているネオニコチノイド系農薬の代替として注目されている。しかし、ジアミド系農薬の一種クロラントラニリプロール (CAP) が哺乳類リアノジン受容体に結合し作用することが示唆された。そこで、哺乳類に対する毒性が懸念されるが、関連した研究は少ない。

そこで、本研究では比較対象として既に毒性が認められているネオニコチノイド系農薬の一種クロチアニジン (CLO) を用い、CAP または CLO を急性曝露したマウスの行動解析、脳の神経細胞活性および神経伝達物質の定量解析により、マウスの神経系への影響を検証した。

【材料と方法】

C57BL/6N 雄マウスに、現行の無毒性量の CAP (160 mg/kg) または CLO (50 mg/kg) を単回経口投与した。各化合物の最高血中濃度到達時間に対応させて、9-10 週齢時にオープンフィールド試験、11-12 週齢時に高架式十字迷路試験を行い、自発運動量および不安様行動を評価した。高架式十字迷路試験終了 2 時間後に脳および血液を採取し、免疫組織化学による海馬歯状回の神経細胞活性、LC-MS/MS による血漿中モノアミン系神経伝達物質・コルチコステロン (抗ストレスホルモン) の定量解析を行った。また、各化合物の最高血中濃度到達時間に血液を採取し、血漿中モノアミン系神経伝達物質を定量した。

【結果と考察】

CLO 曝露により自発運動量の低下、不安様行動の増加、異常啼鳴が認められた。CAP 曝露では自発運動量に変化はみられず、不安様行動の増加を引き起こすことが明らかとなった。各対照群と比較して CLO 投与群および CAP 投与群の血中モノアミン系神経伝達物質濃度に有意な差はみられなかった。コルチコステロン値は、CLO 投与群では対照群と比較して高値をとったが、CAP 投与群では差が認められなかった。海馬歯状回における c-fos 陽性細胞は、各対照群と比較して CLO 投与群および CAP 投与群ともに増加した。各対照群と比較して CLO 投与群および CAP 投与群の血中モノアミン系神経伝達物質に差異はみられな

かった。

以上の結果より、マウスにおいて CAP 曝露により神経活動が亢進し不安様行動が惹起されることを初めて示すことができたが、CLO 曝露時よりストレス負荷は小さいことが示唆された。

スナネズミにおける3種混合注射麻酔薬による外科的麻酔深度の導入と アチパメゾールによる早期覚醒の試み

貝賀日向子、○水野信哉

(岡山理科大学・理学部・動物学科)

【はじめに】スナネズミは脳虚血や癲癇などのモデルとして汎用されている。特に虚血モデル作出では全身麻酔が必要となるが、多くのげっ歯動物の全身麻酔誘導にはケタラール・キシラジンなどの混合注射麻酔が利用されてきた。一方、我国ではケタラールが2007年に麻薬に指定され、従来法の代替として、メデトミジン (M)・ミタゾラム (M^{''})・ブトルファノール (B) からなる3種混合麻酔薬 (MM^{''} B) が注目されるようになった。実際、マウスやラット、ハムスターなどではMM^{''} Bによる麻酔導入の用量およびメデトミジン拮抗薬 (アチパメゾール; ATI) による早期覚醒の用量が決定されている [1-3]。しかしながら、スナネズミにおけるMM^{''} B注射麻酔に関する知見は見当たらない。そこで今回、スナネズミの全身麻酔において最適なMM^{''} B麻酔量とATI覚醒量を決定することを目的とし、以下の解析を行った。

【方法】スナネズミの雄6匹をSic社 (浜松) より購入し、通常飼育のもと、下記の実験を行った。まずラットで決定されたMM^{''} B最適量 (M/M^{''} /B=0.15/2/2.5 mg/kg、ラット量 [2]) を基準として、1.5倍 (中間量)、2倍 (マウス量 [1,4]) にまで増量し、皮下注射により全身麻酔の誘導を試みた。Kawaiらの方法 [1] に従い、前肢、後肢、角膜、尾における反射消失の程度を指標として麻酔のスコアを記録した。すなわち、1箇所ごとに反射の残存=0点、不完全喪失=0.5点、完全喪失=1点とし、4箇所でのスコア合計が3.5点以上を外科的麻酔深度と定義した。ついで、麻酔がもっとも安定していたマウス量 (M/M^{''} /B=0.3/4/5 mg/kg, sc) の系を用い、ATI (0.3 or 1.5 mg/kg, ip) による早期麻酔覚醒の可能性を検討した。最後に、M/M^{''} /BとATIの最適用量を組み合わせ、スナネズミに開腹手術を実施し、外科的侵襲下 (シャム手術) でのMM^{''} B 3種混合麻酔薬と麻酔覚醒薬 (ATI) の有用性を検証した。

【結果】(1) ラット量では投与後10分以内に不動化が起これ、この状態を90分以上持続した。一部の個体では25分程度の外科的麻酔深度も得られたが、個体間でのバラツキを認めた。そこで、ラット量を1.5倍にした中間量、2倍にしたマウス量でも同様の検討を実施したところ、特に後者で安定した外科的麻酔深度が得られた。(2) スナネズミにMM^{''} Bのマウス

量を投与して15分後または45分後に0.3 mg/kgまたは1.5 mg/kgの量でATIを腹腔内投与した。その結果、ATI投与後、1.5mg/kg量（Mの5倍量）では3分前後、0.3 mg/kg量（Mと等量）でも5分前後で、すべての動物は歩き出すなど完全に覚醒した。(3) マウス量のMM” Bを皮下に投与したスナネズミでは5分前後でスコア4の深度を導入できた。そこで腹部正中切開により術野に腸管を牽引後、腹腔内に戻して閉腹した（シャム手術）。手術中も麻酔深度は4と安定しており、切開や縫合に際しても痛覚反応は認めず良好な麻酔深度を保持した。閉腹終了の直前にATI(1.5mg/kg)を腹腔内投与したところ、全例が数分以内に覚醒した。

【考察】 今回の検討により、スナネズミにおいてもマウス量のMM” Bを用いることで円滑に開腹手術を実施できることが判明した。ラット量でも十分な不動化を60分程度は維持できる。今回、麻酔の導入や覚醒の前後で、本種で問題視される癲癇も認められなかった。MM” B注射麻酔法は簡便で安価に行える利点がある[5]。不動化や外科手術といった目的に合わせてMM” BやATIの用量を選択することも可能と考えられる。MM” B注射麻酔では吸入麻酔器のような特殊装置を要しない点でも利点を有する。今後、MM” B麻酔の前後で肝・腎障害マーカーを指標に安全性を確認した上で、片側尿管結紮や5/6腎摘出による腎線維化病態の特徴（特に喝水耐性が高い本種での病態特性）を検討してゆく予定である。

【文献】 [1] Kawai-S, *et al.*, *Exp Anim* 60: 481-487 (2011); [2] Kirihara-Y, *et al.*, *Exp Anim* 65: 27-36 (2016); [3] Nakamura-T, *et al.*, *J Vet Med Sci* 79: 1230-1235 (2017); [4] Kirihara-Y, *et al.*, *Exp Anim* 64: 39-47 (2015); [5] 山形大学医学部動物実験センター HP (2017) <http://www.id.yamagata-u.ac.jp/Animal/animal.htm>

肥満糖尿病モデル ZFDM ラットにおける糖尿病発症に対する女性ホルモンの効果に関する検討

○重中 咲希¹、足立 直紀¹、廣小路 知貴¹、谷口 幸雄¹、横井 伯英¹

(¹ 京都大院・農・動物遺伝育種学)

【背景と目的】

女性ホルモンの一種である 17 β エストラジオール (E2) は、糖尿病の発症や膵島障害を防ぐことが報告されているが、その詳細なメカニズムは明らかでない。Zucker fatty diabetes mellitus (ZFDM) ラットは肥満 2 型糖尿病モデルであり、レプチン受容体遺伝子 (*Lepr*) のミスセンス変異 (*fatty*, *fa*) をホモ型で有するオスは生後 20 週齢までに全例が糖尿病を発症し、膵 β 細胞からのインスリン分泌障害と膵島構造の崩壊が観察される。一方でメスのホモ型個体は肥満を呈するものの糖尿病を生涯発症しない。したがって、ZFDM ラットは糖尿病発症および糖尿病膵島障害における性差を解明する上で有用なモデルである。今回、ZFDM ラットのオスに対する E2 投与およびメスに対する卵巣切除を行い、ZFDM ラットの糖尿病発症に対する女性ホルモンの効果について検討した。

【方法】

実験 1) 6 週齢のオスの ZFDM ラットを 2 群に分け、プラセボペレット (対照群) または E2 を 60 日間で 0.72mg 徐放するペレット (E2 投与群) を皮下に留置した。

実験 2) 6 週齢のメスの ZFDM ラットを 2 群に分け、偽手術 (Sham 群) または卵巣切除 (OVX 群) を施した。

いずれの実験においても全個体の体重、血糖値および血漿インスリン値を測定した。

【結果】

実験 1) 対照群は 10 週齢までに全個体が糖尿病を発症した。E2 投与群では 19 週齢までに糖尿病を発症する個体は存在しなかったが、20 週齢以降に発症個体が現れた。対照群の体重増加は、糖尿病発症前から発症初期に該当する 10 週齢ごろまで著しく増加し、次第に増加が緩やかになるのに対し、E2 投与群の体重増加は比較的緩やかに増加し続け 14 週齢で対照群と同等の体重を示した。血漿インスリン値は、対照群では 8 週齢でピークとなり、その後低下した。一方、E2 投与群の血漿インスリン値は 12 週齢までは対照群よりも低値であったが、16 ~ 20 週齢でピークとなった。

実験 2) Sham 群に糖尿病の発症は見られなかった。一方で OVX 群では、3 個体のうち 1

個体が24週齢で糖尿病を発症した。体重の推移には2群間で有意な差は見られなかった。16週齢時点での血漿インスリン値は2群間で有意な差は見られなかった。

以上から、ZFDMラットに対するE2の全身性投与は抗糖尿病作用を有することが示された。

現在、E2の膵島に対する直接的な効果を調べるために、E2添加または非添加条件で24時間培養した単離膵島の網羅的な遺伝子発現解析を行っている。

造血幹細胞の骨髄へのホーミングに重要な働きをするタンパク質とその糖鎖構造についての研究

○ PAN XUCHI、成瀬 智恵、松崎 朋子、浅野 雅秀
(京都大学大学院医学研究科 実験動物学)

【背景】

造血幹細胞（HSC）の移植は、造血器腫瘍や再生不良性貧血などの造血障害の治療に必須な方法である。しかし、HSC 移植後、骨髄への生着不全により致命的となることがある。HSC の骨髄へのホーミング・生着効率を決める因子の同定とその向上は臨床現場の大きな課題である。

当研究室は、各種の機能性糖鎖の形成に重要なガラクトース転移酵素群（ β 4GalTs）に注目し、生体内でのガラクトース糖鎖の機能を解析している。その中の β 4GalT-1 欠損マウスの HSC を致死量の放射線を照射された野生型マウスに移植しても、その生存を維持できず、骨髄へのホーミング効率が著しく低下したことから、ガラクトース糖鎖は HSC 移植後の骨髄へのホーミングに重要な役割を果たしていることを報告している（*Takagaki et al, Sci. Reports, 2019*）。

細胞と細胞の接着・結合に重要な役割を果たす細胞表面分子の多くは、糖鎖修飾により制御されていることがわかってきたが、HSC のホーミングにおける糖鎖の役割はほとんどわかっていない。

【目的】

本研究は HSC がホーミングする際の糖鎖の役割に注目し、ホーミングに必須となる糖鎖部位を明らかにする。(I) HSC の骨髄へのホーミングに関わるタンパク質 CXCR4 において、ホーミングに必須となる糖鎖部位を同定し、(II) 同定した糖鎖を欠損させることで、HSC のホーミング活性が低下することを明らかにする。本研究により HSC が骨髄にホーミングするメカニズムを明らかにすることができれば、移植医療への応用が可能であると考えられる。

【内容】

培養細胞を用いて、HSC の骨髄へのホーミングに関わる糖タンパク質とその糖鎖構造を解析した。

HSC のホーミングに重要な CXCR4 を培養細胞に強発現させ、Wound healing assay および Transwell assay による、リガンド CXCL12 への遊走能力を測定した。続いて、その配列から予想される糖鎖付加部位である Asn (N 型糖鎖) や Ser/Thr (O 型糖鎖) を Gln や

Ala に置換した変異遺伝子を作製し、培養細胞に導入した。野生型の遺伝子を導入した場合の細胞遊走能力と比較して、糖鎖付加可能部位の一部の変異体は、細胞遊走能力が抑えられたことがわかった。

次に細胞遊走に関するシグナルを解析したところ、野生型の遺伝子を導入した細胞は、リガンドと結合して、下流のシグナルを活性化させ、細胞の遊走を促進していた。しかし、糖鎖付加可能部位変異体の細胞は、リガンドが加えられても、下流のシグナルの活性化が見られなかった。現在、糖鎖付加可能部位に変異を導入したマウスを作製中であり、変異 HSC のホーミング活性を解析する予定である。

ガラクトース転移酵素欠損マウスは高免疫原性腫瘍の増殖を抑制する

○魏 恒¹、成瀬 智恵¹、杉原 一司¹、PAN XUCHI¹、池田 月¹、高倉 大輔²、

川崎 ナナ²、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 横浜市立大学大学院 生命医科学研究科)

【背景】 β 4-ガラクトース転移酵素 3 (B4galt-3) は、UDP-ガラクトースを N-アセチルグルコサミンに転移する β 4-Galactosyltransferase (B4galts) 遺伝子のファミリーメンバーである。神経芽腫、子宮頸がん、膀胱がんなど、様々ながんにおいて発現量の変化を示し、臨床的な予後と相関があることが分かっている。しかし、腫瘍の免疫微小環境 (TIME) における B4galt-3 の役割は不明である。

【方法】まず、Crispr/Cas9 システムを用いて B4galt-3 ノックアウト (KO) マウスを作製した。そして、免疫原性の弱い腫瘍細胞と免疫原性の強い腫瘍細胞を野生型 (WT) マウスと KO マウスに皮下移植し、腫瘍細胞の増殖を調べた。フローサイトメトリーおよび RNA-seq を用いて、免疫細胞の浸潤および遺伝子発現の違いを調べた。最後に、LC-MS/MS を用いたグライコプロテオミクス解析を行い、活性化した T 細胞の N 型糖鎖修飾の変化を検討した。

【結果】B4galt-3 KO マウスでは、免疫原性の強い腫瘍細胞の増殖が抑制されたが、免疫原性の弱い腫瘍は WT マウスと差がなかった。B4galt-3 KO マウスでは、腫瘍に浸潤した CD8⁺ T 細胞が有意に増加した。グライコプロテオミクス解析により、B4galt-3 欠損は T 細胞表面のインテグリンの N 糖修飾を変化させることが示された。

【結論】我々は初めて B4galt-3 KO マウスを作製した。腫瘍の免疫微小環境における B4galt-3 の役割は、免疫原性の異なる腫瘍の移植実験により初めて明らかにされた。B4galt-3 欠損は、T 細胞のインテグリンの N 型糖鎖修飾の程度を変えることで CD8 細胞の浸潤を促進し、免疫原性の強い腫瘍細胞の増殖を抑制した。一方、B4galt-3 の欠損はマウスの成長、発育、代謝、生殖に影響を与えなかった。B4galt-3 は安全で効果的な腫瘍治療のターゲットとなる可能性を持っている。

QTL による癌型 K-Ras 肺発癌 modifier 遺伝子の解析

○齋藤 浩充、鈴木 昇

(三重大学 研究基盤推進機構 先端科学研究支援センター・動物機能ゲノミクス部門)

(背景) *K-Ras* 変異は肺癌全体の 30% を占めるにもかかわらず *K-Ras* に対する臨床上利用可能な分子標的薬は無く、治療につながる新たな標的遺伝子の探索が重要な課題である。我々は、*K-Ras* 遺伝子変異から腫瘍が出現するまでの発症過程 (変異後過程) に焦点をあてるため、Cre 組み換え酵素発現により、任意の時期、細胞で癌型 *K-Ras* 遺伝子を発現可能な *Ryr2^{m1Nobs}* マウスを作製した。Cre 発現アデノウイルスを用いた肺気管支上皮細胞特異的な癌型 *K-ras* 遺伝子発現によりヒトの肺胞上皮 2 型様腺がんを発症するモデルマウスを作製した。このマウスにそれぞれ C57BL6(B6) 系統と、A/J 系統の遺伝子背景を導入し、肺発癌高感受性系統 B6-*Ryr2^{m1Nobs}* 及び低感受性系統 A/J-*Ryr2^{m1Nobs}* を樹立した。

(目的) 約 10cM 間隔で、polymorphism マーカーを設定し、F2 マウス 96 匹による QTL 解析 (単点解析) を行った。これまでの探索で、第 3、7、8、9 番染色体において A/J 系統由来の遺伝子座が B6 系統由来の遺伝子座に対して有意に発癌を促進する遺伝子座、第 5、6、11、13、19 番染色体において、有意に発癌を抑制する遺伝子座を見出した。

(結果と考察) 各 QTL 近傍で、系統間で配列に差異があり、かつ発癌関連の遺伝子 81 遺伝子を選び、2 系統の正常肺での mRNA 発現量の比較を行った。系統間で発現に差異のある 51 遺伝子を最終候補遺伝子とした。B6-*Ryr2^{m1Nobs}* 肺腫瘍から細胞株を樹立し、細胞株において発現している 34 遺伝子について siRNA による発現抑制実験によって細胞増殖への影響を検討した。その結果、19 遺伝子で有意に増殖が抑制され、1 遺伝子で増殖が促進された。候補遺伝子の 1 つである *Cdc7* 遺伝子を標的とした、*ROSA-CAS9*; B6-*Ryr2^{m1Nobs}* 肺への gRNA-CAS9 レンチウイルス発癌モデルにおいて有意に腫瘍形成が抑制され、肺発癌促進因子であることが示された。2 系統の遺伝子には、アミノ酸置換を伴う SNP が存在しており、今後、この差異と発癌感受性の関連を明らかにしていく予定である。

マウス胚発生と子宮内の力学的な環境

松尾 勲

大阪母子医療センター研究所 病因病態部門

多くの哺乳動物は、母体子宮内で栄養・ガスなどを供給されて成長し、十分に発育してから生まれる。その間、物質のやり取り以外にも、子宮内環境が、胚の発生・成長に対して何らかの役割を担っていると考えられているが、具体的な機能についてはよくわかっていない。このことは、現代の高度な医療技術においても、哺乳類胚を子宮外で正常に発生・成長させる人工子宮などの技術を確認するうえで大きな障壁となっている。

マウスの受精卵は、子宮内膜へ着床後 1~2 日以内に最初の体軸である前後（頭尾）軸が形成される。前後軸が形成されるタイミングで対称性を持った「球体状」の形をした胚が非対称な「卵円筒形」へと伸長する。この時期の胚はエピブラストと呼ばれる胎児本体となる組織と周りの栄養を吸収する臓側内胚葉組織の 2 層からなる（図 1）。前後軸形成は、この臓側内胚葉層の遠位部に、遠位臓側内胚葉と呼ばれる前方決定因子を発現する細胞集団が現れることで開始される（図 1）。しかし、この遠位臓側内胚葉がどのように胚形状の非対称化（球体から卵円筒形へ）と関連して出現するのかその仕組みは不明であった（図 1; Rossant and Tam, 2008）。

我々の研究グループは、まず着床直後のマウス胚自身の成長と胚を包む母体側の子宮内膜組織の形態変化について解析した。結果、子宮内膜組織の発生に伴った形態変化が、胚の成長方向と合致することがわかった（Hiramatsu et al., 2013）。つまり、胚をより長く「円筒形状」に成長させるように子宮内膜組織が「空洞（凹み）」を作って、胚に圧力をかけていることが示唆された。そこで、子宮組織に似せた人工装置として、微小な「空洞」を再現したマイクロデバイスを作成し、子宮から取り出したマウス胚をデバイスの中で圧迫させて培養した。すると、圧迫された胚は、子宮内と同じ「円筒形状」となり、遠位臓側内胚葉が出現した（図 1; Hiramatsu et al., 2013）。一方、圧迫のない条件で胚を培養すると「球状」形となり、遠位臓側内胚葉細胞も出現しなかった（図 1; Hiramatsu et al., 2013）。

次に、どのような仕組みによって子宮内膜組織からの圧力が遠位臓側内胚葉を出現させるのかを検討した。遠位臓側内胚葉とエピブラストとの境界を作っている基底膜の分布を観察したところ、「円筒形状」に成長した胚では、エピブラスト層と臓側内胚葉層の間の基底膜が遠位側ほどより薄くなるのに対して、「球状」の胚（空洞に入っていない胚）では、基底膜が薄くならないことが分かった（Hiramatsu et al., 2013）。さらに、本来臓側内胚葉層へは移動しないと考えられてきたエピブラスト細胞が、遠位部の基底膜が薄くなって破れた場所から外側の臓側内胚葉層へと進入し、最終的に前方を決定する遠位臓側内胚葉自身及び前方臓側内胚葉になることが明らかになった（図 2; Kimura et al., 2000; Hiramatsu et al., 2013）。以上の結果から、子宮内膜組織から胚が圧迫されて円筒形に伸長することで前後軸が形成される機構が明らかとなった（図 2; Hiramatsu et al., 2013; Matsuo and Hiramatsu, 2016）。

次に、着床直後に子宮内で胚を圧迫する力を生み出している物理的な実態として、子宮筋平滑筋の収縮に着目した。そこで、着床直後の胚に対して、子宮筋からどの程度の圧力が胚にかかっているのか微小な圧力計測プローブを子宮内に挿入して測定した（図 3; Ueda et al., 2020）。その結果、着床前では、胚にかかる圧力の強度・周期性の頻度とも低かったが、着床直後の前後軸形成時期に出産時期と同程度までに最大・最頻となり、その後は減弱していくことが分かった（図 3; Ueda et al., 2020）。更に、この子宮内圧力を 7 割程度弱めると、正常な前後軸形成が妨げられたことから、この圧力が正常な前後軸形成に重要であることが分かった。これまで胚への栄養・ガス供給だけの機能と考えられてきた子宮は、子宮内膜組織からの「圧力」により、胚の成長方向を制御することで、最初の非対称性である前後軸極性を生み出す原動力として働いて

いることが分かった (Ueda et al., 2020)。

その一方で、このような力が胚に直接かかることは、着床障害や胚奇形に繋がる可能性が示唆されていることから、どのようなメカニズムで圧力が緩衝されているのか、解析を進めた。まずマウス胚を覆っている胚体外膜 (細胞外マトリクスからなる基底膜の一種であるライヘルト膜) に注目し、この膜の主要構成成分である *Lama1* 遺伝子欠損胚でどのような異常が見られるか注意深く解析した。その結果、通常、子宮内で「球状」の受精卵から長細く伸長し「卵円筒形状」へと伸長するが、ライヘルト膜を持たない場合、胚は変形し、成長していくことができなくなった (Ueda et al., 2020)。更に、このライヘルト膜をもたない胚に対して、子宮筋からの圧力を減弱させた場合、胚の変形が正常へと回復することが分かった。次に、膜の機能を詳細に解析するため、高解像度の X 線マイクロコンピュータトモグラフィ (マイクロ CT) を用いて非破壊的に子宮内での胚と子宮との境界を形態的に解析した。その結果、膜が存在していると胚と子宮と間に空間が作られるが、膜がないと、その空間が失われ、直接子宮が接触して胚を変形させてしまうことが分かった (図 4; Ueda et al., 2020)。つまり、ライヘルト膜は、胚の正常な発生・成長に必須であり、変形を防ぐ役割を果たしていることが示唆された。

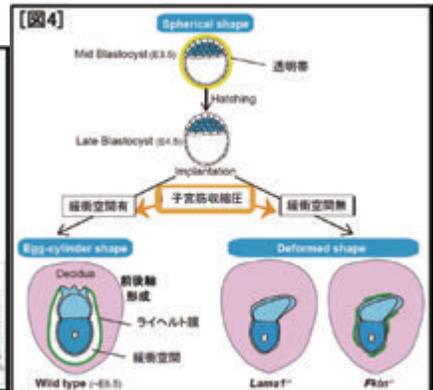
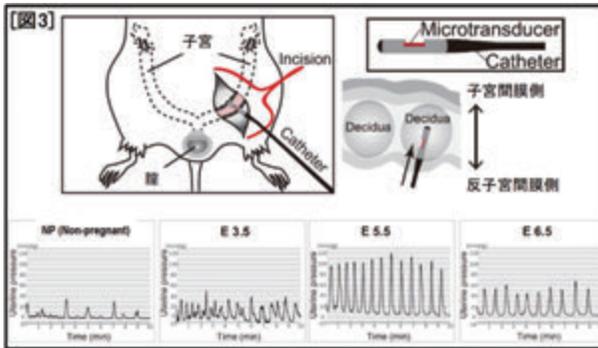
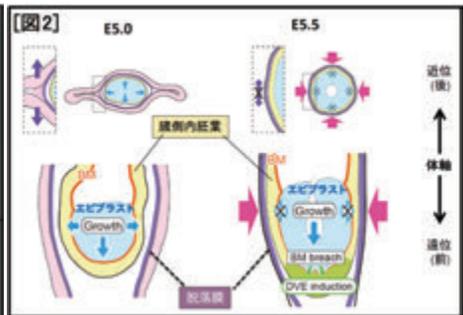
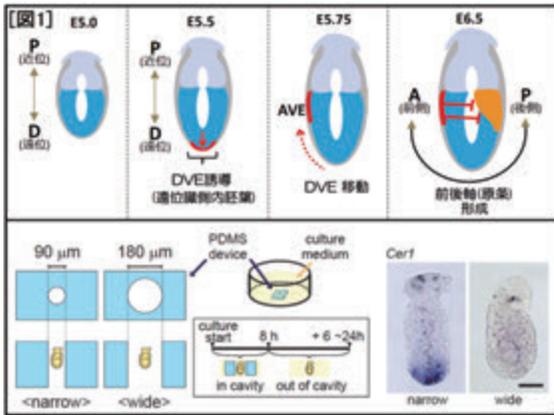
次に、どのような仕組みによってライヘルト膜が子宮内圧力から胚を保護しているのかについて検討した。ライヘルト膜を持つが膜の一部に穴があいている *Fukutin* 遺伝子欠損胚と正常胚との間にどのように差違があるか調べた。結果、ライヘルト膜が密閉されずに穴があいていると、子宮と胚の間に緩衝空間が形成されないため、胚が押しつぶされてしまうことが分かった。実際に、外因性の圧力を胚にかけるとライヘルト膜を持たない胚はつぶれてしまうことが分かった (図 4; Ueda et al., 2020)。

これまで胚を覆っているライヘルト膜は、母体と胎児の間での栄養やガスの交換、母体からの免疫的な攻撃から胚を保護するといった機能を担っていると考えられてきたが、今回我々は、この膜が、子宮筋から生じる圧力に対してクッションとして働き、圧力を適度に調節・緩衝し、胚が発生・成長するために必要な空間を作るという、極めて重要な機能を担っていることを明らかにした (図 4; Matsuo et al., 2022; Ueda et al., 2020)。

現在妊娠した女性の 5%程度が不育症 (2 回以上流産を繰り返す) になり、若年女性でも 10%程度が流産を経験している。しかし、若年性の流産や不育症の原因の多くは、依然として完全には解明されていない。また、生殖補助医療において、体外受精・胚移植後における着床成功率は自然妊娠に比べて低く、妊娠成功への大きなハードルとなっている。今回の研究成果は、原因が特定できない不育症や流産が子宮筋から胚にかかる圧力異常で発症する可能性を示唆している。

References:

- Hiramatsu R, Matsuoka T, Kimura-Yoshida C, Han SW, Mochida K, Adachi T, Takayama S, Matsuo I. External mechanical cues trigger the establishment of the anterior-posterior axis in early mouse embryos. *Dev Cell*. 2013 Oct 28;27(2):131-144.
- Kimura C, Yoshinaga K, Tian E, Suzuki M, Aizawa S, Matsuo I. Visceral endoderm mediates forebrain development by suppressing posteriorizing signals. *Dev Biol*. 2000 Sep 15;225(2):304-21.
- Matsuo I, Hiramatsu R. Mechanical perspectives on the anterior-posterior axis polarization of mouse implanted embryos. *Mech Dev*. 2017 Apr;144(Pt A):62-70.
- Matsuo I, Kimura-Yoshida C, Ueda Y. Developmental and mechanical roles of Reichert's membrane in mouse embryos. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci*. 2022 Dec 5;377(1865):20210257.
- Rossant J, Tam PP. Blastocyst lineage formation, early embryonic asymmetries and axis patterning in the mouse. *Development*. 2009 Mar;136(5):701-13.
- Ueda Y, Kimura-Yoshida C, Mochida K, Tsume M, Kameo Y, Adachi T, Lefebvre O, Hiramatsu R, Matsuo I. Intrauterine Pressures Adjusted by Reichert's Membrane Are Crucial for Early Mouse Morphogenesis. *Cell Rep*. 2020 May 19;31(7):107637.



実験動物におけるアミロイドーシスと伝播

帯広畜産大学 グローバルアグロメディシン研究センター

渡邊 謙一

アミロイドは①細胞外に沈着、②HE では好酸性均質無構造、③コンゴレッド染色陽性で緑色の複屈折性を示す、④超微形態的に枝分かれのない幅 10nm 前後の線維状凝集物といった特徴を有する凝集蛋白の総称である。アミロイドーシスの分類は国際アミロイドーシス学会が2年ごとに発行するISA分類によって分類され、近年の傾向では、amyloid (fibril) という名称は病原性の有無に関わらず前述した生化学的特徴を有する蛋白に対して広く用いられるようになった。一方獣医病理学の分野では、“アミロイド沈着”なのか、“アミロイドーシス”なのかといった病的意義に関する議論がしばしば行われるが、ISA 分類においてもアミロイド沈着により生じる病的状態を amyloidosis として定義している。2020 年の分類では、ヒトでは 40 種類、動物では 10 種類のアミロイドーシスが定義されており、今後新たなアミロイドーシスが報告されると予想される。

自然発生性のアミロイドーシスは稀ではあるものの、実験動物においても多数報告されている。動物のアミロイドーシスの中で最も一般的な AA は、人工飼育下の高齢動物で頻発する傾向にあり、マウス、ウサギ、モルモット、ニワトリ、アヒル、ウズラ、イヌ、ネコ、ヤギ、サル類など動物種は多岐に渡る。AA は炎症性タンパク質である SAA を前駆蛋白とすることから主に炎症惹起による続発性のマウス AA モデルが使用されている。アポリポ蛋白 A-2 に由来する AApoA2 は、マウスで稀に発生するアミロイドーシスであるが、アミロイド原生の高い C 型アレルのみを持つ遺伝子改変マウスが作出され、自然発生性のアミロイドーシスモデルとして使用されている。Alzheimer 病やパーキンソン病などの脳アミロイドーシスを安定的に発症する動物は見つかっておらず、これらの疾患研究にはヒト型 APP や α -synuclein を発現する遺伝子改変マウスが用いられる。ヒトでは脳アミロイドーシスを除けば AL, ATTR の患者数が多く、これらの疾患モデルが求められている。近年、ATTR に関する家族性変異が導入された遺伝子改変マウスが報告されるようになっているが、これらの疾患モデルは確立されていない。

アミロイドは蛋白質の立体構造の一部が変化した構造異性体であるが、アミロイド化した蛋白は“鋳型”となり、正常蛋白の立体構造改変を助長することから、生体内においてアミロイドは“増幅”する。こうした増幅反応はプリオン病の病態仮説にならい、アミロイドーシスに共通する病態仮説として受け入れられている。アミロイドーシスの伝播は細胞レベル、臓器レベル、さらには個体間におけるアミロイドーシスの広がり理解する上でのキーワードとして重要である。

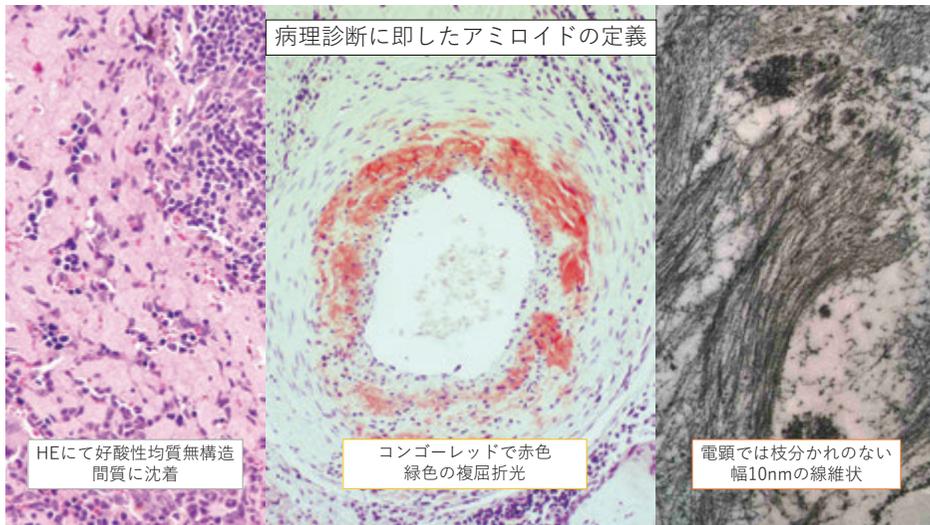
マウスを用いた実験的 AA アミロイドーシスモデルでは短期間に AA の沈着が再現可能

であるが、血中 SAA 濃度の低下に伴いアミロイド沈着量が減少する。医学の進歩に伴い、アミロイドーシスは治療可能な疾患になりつつあるものの、沈着したアミロイドが代謝・吸収される分子メカニズムは解明されておらず、マウス AA モデルにおけるアミロイド沈着量の減少について再度注目が集まっている。前述のマウス AA モデルにおいては、沈着したアミロイドをマクロファージが貪食しているのではないかと考えられてきたが、実際にはアミロイドの貪食像は確認できず、血清中の SAA と凝集体である AA とが流動的に分解と沈着を繰り返していると予想される。

アミロイドーシス研究の黎明期を支えてきたマウス AA アミロイドーシスモデルは、ヒトの全身性アミロイドーシスモデルとしては不完全であるものの、アミロイド沈着の時空間的なシフトを小さなラボでも再現可能であり、依然として魅力的な研究ツールである。

実験動物におけるアミロイドーシスと伝播

帯広畜産大学 グローバルアグロメディシン研究センター
渡邊 謙一



ATTRV30Mの立体構造 Schmidt et al. 2019

Aβ2M K3ペプチドの立体構造 Lie et al. 2009

- 1-数本のprotofilamentがらせん状に絡まり、アミロイド線維を形成
- protofilamentは線維軸方向に折り重なったβシートに富む単量体であり、βシート-ループ-βシートの基本パターンの繰り返しからなる

ヒトおよびマウスAAの立体構造 Liberta et al. 2019

Amyloid nomenclature 2020: update and recommendations by the International Society of Amyloidosis (ISA) nomenclature committee

Merrill D. Benson¹, Joel N. Buxbaum², David S. Eisenberg³, Giampaolo Merlini⁴, Maria J. M. Saraiva⁵, Yoshiki Sekijima⁶, Jean D. Spier⁶ and Per Westermark⁷

Table 1: Amyloid fibril proteins and their precursors in human.

Fibril protein	Precursor protein	Systemic and/or localised	Acquired or hereditary	Target organs
AL	Immunoglobulin light chain	S, L	A, H	All organs, usually except CNS
AH	Immunoglobulin heavy chain	S, L	A	All organs except CNS
AA	(Apo) serum amyloid A	S	A	All organs except CNS
ATTR	Transthyretin, wild type	S	A	Heart mainly in males, lung, ligaments, tenosynovium
	Transthyretin, variants	S	H	PNS, ANS, heart, eye, leptomeninges
Aβ2M	β2-microglobulin, wild type	S	A	Musculoskeletal system
	β2-microglobulin, variants	S	H	ANS
AApoAII	Apolipoprotein A II, variants	S	H	Heart, liver, kidney, PNS, testis, larynx (C terminal variants), skin (C terminal variants)
AApoAIII	Apolipoprotein A III, wild type	S	A	Kidney
AApoAIV	Apolipoprotein A IV, wild type	S	A	Kidney medulla and systemic
AApoCII	Apolipoprotein C II, variants	S	H	Kidney
AApoCIII	Apolipoprotein C III, variants	S	H	Kidney
AGel	Gelsolin, variants	S	H	Kidney PNS, cornea
ALys	Lysozyme, variants	S	H	Kidney
ALECT2	Leukocyte chemotactic factor-2	S	A	Kidney, primarily
AFib	Fibrinogen α ₁ , variants	S	H	Kidney, primarily
ACys	Cystatin C, variants	S	H	CNS, PNS, skin
ABri	AbβPP, variants	S	H	CNS

Fibril protein	Precursor protein	Systemic and/or localised	Acquired or hereditary	Target organs
ADan ^b	ADanPP, variants	L	H	CNS
Aβ ^c	Aβ protein precursor, wild type	L	A	CNS
	Aβ protein precursor, variant	L	H	CNS
AαSyn	α-Synuclein	L	A	CNS
ATau	Tau	L	A	CNS
APp	Prion protein, wild type	L	A	CJD, fatal insomnia
	Prion protein variants	L	H	CJD, GSS syndrome, fatal insomnia
	Prion protein variant (Procalcitonin)	S	H	PNS
ACal	(Pro)calcitonin	L	A	C-cell thyroid tumours
		S	A	Kidney
AIAPP	Islet amyloid polypeptide ^d	L	A	Islets of Langerhans, insulinomas
AANF	Atrial natriuretic factor	L	A	Cardiac atria
APro	Prolactin	L	A	Pituitary prolactinomas, aging pituitary
AIns	Insulin	L	A	Iatrogenic, local injection
ALung	Lung surfactant protein	L	A	Lung
ACor	Corneodesmosin	L	A	Corneal epithelia, hair follicles
AMed	Lactadherin	L	A	Senile aortic, media
AKer	Kerato-epithelin	L	A	Cornea, hereditary
ALac	Lactoferrin	L	A	Cornea
AQAAP	Odontogenic ameloblast-associated protein	L	A	Odontogenic tumours
ASem1	Semenogelin 1	L	A	Vesicula seminalis
AEnf	Enfuvirtide	L	A	Iatrogenic
ACatK	Cathepsin K	L	A	Tumour associated
AEFEMP1 ^e	EGF-containing fibulin-like extracellular matrix protein 1 (EFEMP1)	L	A	Portal veins Aging associated

^aProteins are listed, when possible, according to relationship. Thus, apolipoproteins are grouped together, as are polypeptide hormones.

^bADan is the product of the same gene as ABri.

^cAlso called amylin.

^dNot proven by amino acid sequence analysis.

^eFull amino acid sequence to be established.

Amyloid nomenclature 2020: update and recommendations by the International Society of Amyloidosis (ISA) nomenclature committee

Merrill D. Benson¹, Joel N. Buxbaum², David S. Eisenberg³, Giampaolo Merlini⁴, Maria J. M. Saraiva⁵, Yoshiki Sekijima⁶, Jean D. Spier⁶ and Per Westermark⁷

Fibril protein	Precursor protein	Systemic and/or localised	Acquired or hereditary	Target organs
ATTR	Transthyretin, wild type	S	A	Heart mainly in males, lung, ligaments, tenosynovium
	Transthyretin, variants	S	H	PNS, ANS, heart, eye, leptomeninges

前駆蛋白が血中に存在するもの → 全身性
前駆蛋白が局所で産生されるもの → 限局性

前駆蛋白をコードする遺伝子に変異が認められるもの → 遺伝性
遺伝子変異を伴わないもの → 孤発性

ATTR V30M (p.V50M or c.148G>A)

トランスサイレチンアミロイド 30番目のアミノ酸がバリンからメチオニンに置換される遺伝型 cDNAに準ずる表記では開始コドンから数えて148番目の塩基がグアニンからアデニンに置換される

疾患名: 野生型ATTRアミロイドーシス (老人性アミロイドーシス、心アミロイドーシス)
遺伝性ATTRアミロイドーシス (家族性アミロイドポリニューロパチー I, II型)

Amyloid nomenclature 2020: update and recommendations by the International Society of Amyloidosis (ISA) nomenclature committee

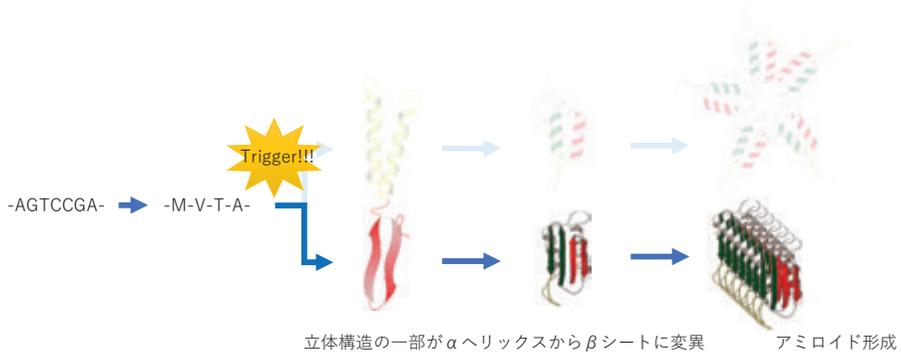
Merrill D. Benson¹, Joel N. Buxbaum², David S. Eisenberg³, Giampaolo Merlini⁴, Maria J. M. Saraiva⁵, Yoshiki Sekijima⁶, Jean D. Spier⁷ and Per Westermark⁸

Table 3. Amyloid fibril proteins and their precursors in animals.

Fibril protein	Precursor protein	Systemic and/or localised	Affected organs or syndrome	Species
AL	Immunoglobulin Light Chain	S,L	Plasmacytoma	Cat, Horse
AA	(Apo) Serum Amyloid A	S	Chronic inflammation or Infections	Many mammalian and avian species: mouse, cat, cow, dog, duck, guinea pig, etc.
AApoAII	Apolipoprotein AII	S	Age-related	Dog
AApoAIII	Apolipoprotein AIII	S	Age-related	Mouse
ATTR	Transthyretin	S	Age-related	Vervet monkey
AFib	Fibrinogen A α	S	Age-related	Stone marten
A β	A β precursor protein	L	Age-related	Dog, sheep, wolverine
AIAPP	Islet Amyloid Polypeptide	L	Islets of Langerhans, Insulinoma	Apes, cat, racoon
ALys	Insulin	L	Islets of Langerhans	Octodon degus
ACas	A-S2C casein	L	Mammary gland	Cow

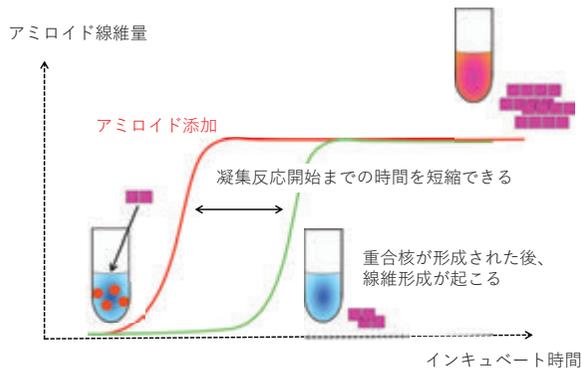
- 動物の全身性アミロイドーシスはほぼAAアミロイドーシスで、AA以外の全身性アミロイドーシスは極めて稀
- 形質細胞関連の限局性ALアミロイドーシス、ネコやサルの膵島アミロイド、脳アミロイドーシス、アミロイド産生歯原性腫瘍や甲状腺C細胞癌関連のアミロイドがよく知られている

Anfinsenのドグマとアミロイド



現実的には何らかのきっかけによりタンパク質が凝集体を形成しうる
→同じ塩基配列から異なる立体構造を有するタンパク質が作られるアミロイドーシスはAnfinsenのドグマの例外の一つである

in vitroでのアミロイド凝集

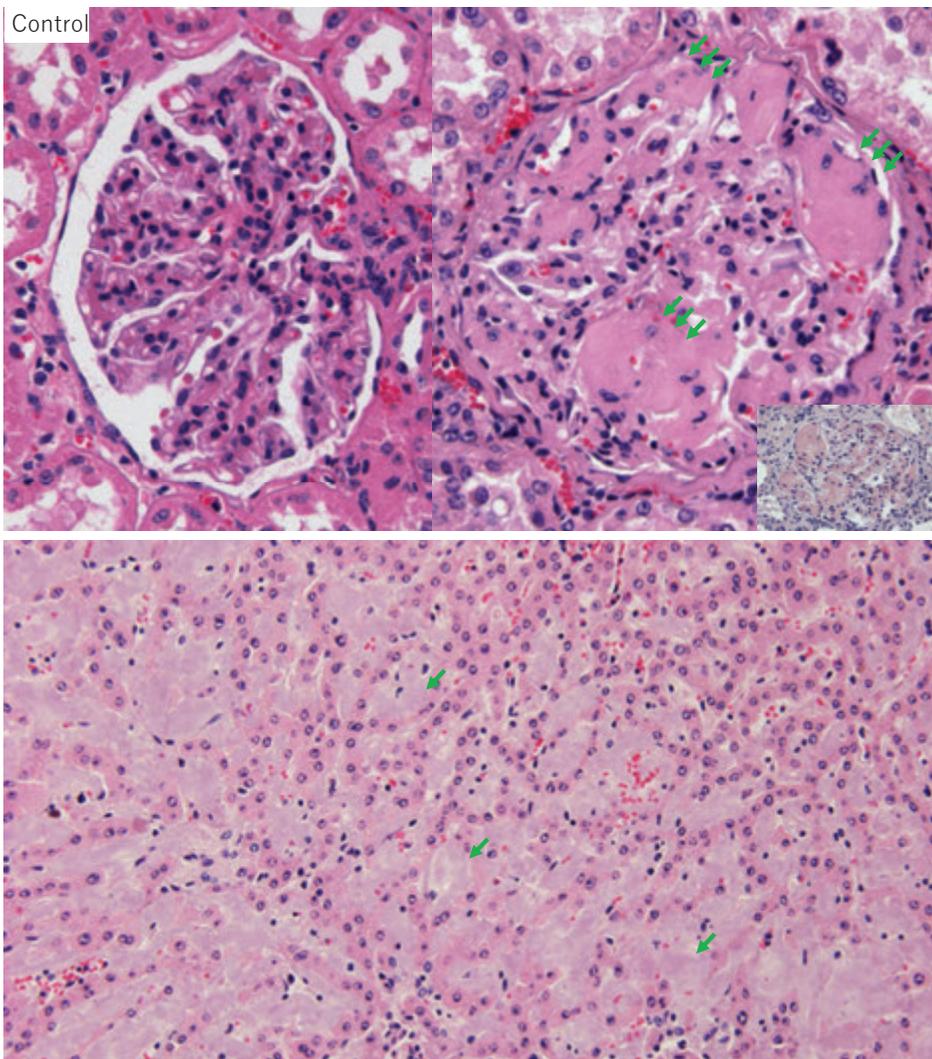


アミロイド線維には、アミロイド凝集を促進する作用がある (Seeding: 伝播)

AA アミロイドーシス (続発性アミロイドーシス)

前駆蛋白: Serum amyloid A (SAA)

- 炎症関連蛋白であるSAAが前駆蛋白であることから、慢性炎症性疾患に続発する
- ヒトでは結核や関節リウマチなどが基礎疾患として重要であり、これら基礎疾患に対する治療が有用とされる
- 国内症例の9割ほどは関節リウマチ関連であったが、抗リウマチ薬の開発により劇的に患者数が減少
- ヒトでは沈着するAAの分子種がN末端側から76残基が主体とされているが、断片化の機序などは不明
- 獣医領域では最も一般的なアミロイドーシスであり、膿瘍や関節炎などの炎症性疾患に続発する
- 水禽類の趾瘤症、動物園動物での発生、シャムやアビシニアンなど一部のネコやチーターでは家族性AAの発生が報告される
- 様々な動物種に発生し、自験例としてはウシ、ヤギ、ヒツジ、イヌ、ネコ、ブタ、ウサギ、モルモット、ハムスター、バイソン、ラクダ、マンドリル、タンチョウ、ジュウシマツ、オウギハクジラなど
 - 動物のAAはコンゴレッドに対する染色性が弱い
 - 動物のAAは協和メディックス社製の抗ヒトAA抗体と広く交差性あり (現在は販売中止)



AL アミロイドーシス

前駆蛋白: Immunoglobulin light chain (L鎖)

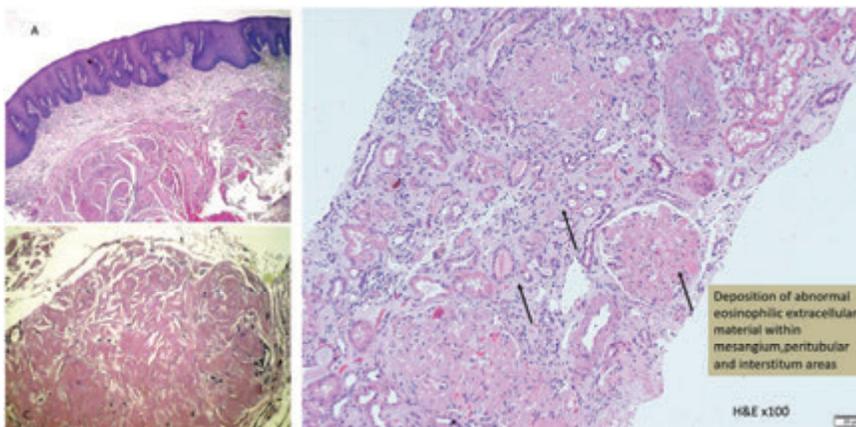
- 多発性骨髄腫に続発する
- 獣医学領域では全身性ALは稀
- 関連する病態として形質細胞腫に続発する限局性ALアミロイドーシスがあるが、これらは多発することはあるが全身性のALとは区別して考えられる
- 定常領域、可変領域などアミロイド化する部位は症例により様々であり、確定診断が困難なアミロイドーシスの代表格である
- 有用な疾患モデルは確立されていない

AHアミロイドーシス

前駆蛋白: Immunoglobulin heavy chain (H鎖)

- 免疫グロブリン重鎖に起因するため、病態はALに類似
- 医学領域においてもまれな病型で、AL同様診断や鑑別が困難

AL アミロイドーシス



Angiero et al. 2010

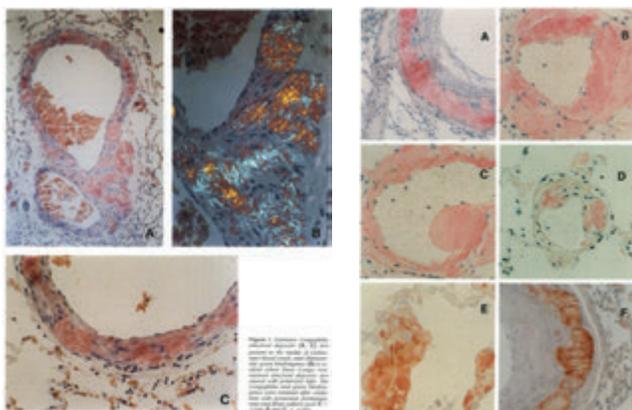
Fuah et al. 2018.

AApoA1アミロイドーシス

前駆蛋白: アポリポタンパクA1

- HDLの主要構成成分であり、HDLの代謝に関与している
 - APOA1遺伝子の変異を伴う遺伝性AApoA1アミロイドーシス、野生型のAApoA1が沈着する孤発性AApoA1がある
 - 遺伝性AApoA1アミロイドーシスでは腎臓や心臓など全身臓器への沈着がみられる
 - 動脈硬化巣など血管へのアミロイド沈着傾向が強い
 - 免疫グロブリンの共沈着がしばしば認められ、ALやAHとの鑑別が困難
 - 動物ではマウスやイヌでの報告がある
 - 肺血管などが好発部位
- AApoA1を疑う症例を稀に経験するが、市販のヒトApoA1抗体では免疫染色が困難であり、診断は難しい

AApoA1アミロイドーシス



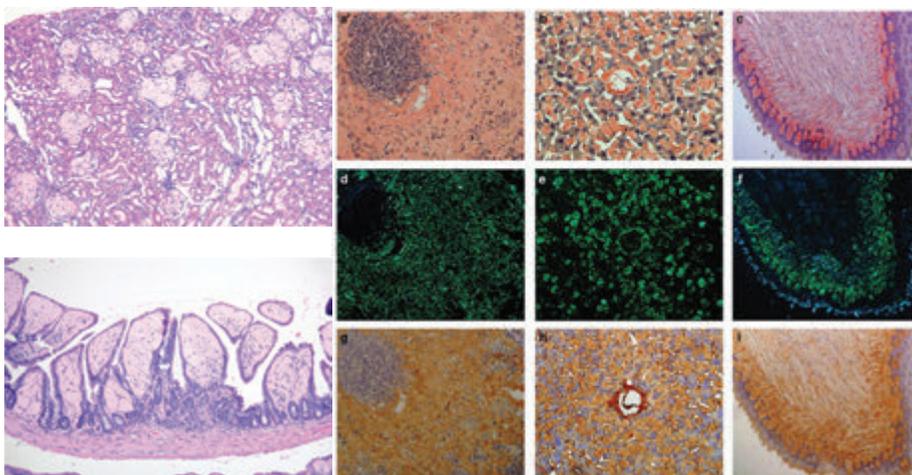
Johnson et al. 1992.
Roertgen et al. 1995.

AApoAII アミロイドーシス

前駆蛋白: アポリポタンパクA2

- HDL表面に結合し、HDLの代謝に関与するアポリポタンパク質
- 骨格筋をふくむ全身にアミロイドが沈着し、老人性アミロイドーシスの一つとされている
- 老化促進モデルマウスであるSAMR1マウスにApoA2の3つのアレルのうち、ApoA2Cアレルの変異を導入することによりAApoA2アミロイドーシスを自然発症する
- AApoA2モデルマウスは自然発症性のアミロイドーシスモデルとしてアミロイドーシス研究に大きく貢献した
- 一部の系統のマウスでは自然発症性に発症することがある
- マウスのアミロイドーシスとしてはAAよりも伝播性が強く、糞便中や唾液、乳汁中にも感染性フィブリルが排出される

➤ マウスAAアミロイドーシスよりも舌や皮膚、消化管粘膜固有層へのアミロイド沈着が顕著

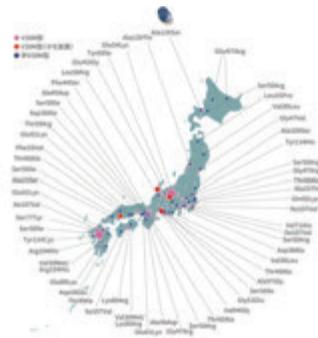


Ge et al. 2007.

ATTRアミロイドーシス: ATTRvt 老人性アミロイドーシス (野生型)
ATTRm 遺伝性ATTRアミロイドーシス (家族性アミロイドポリニューロパシー: FAP 1, 2型)

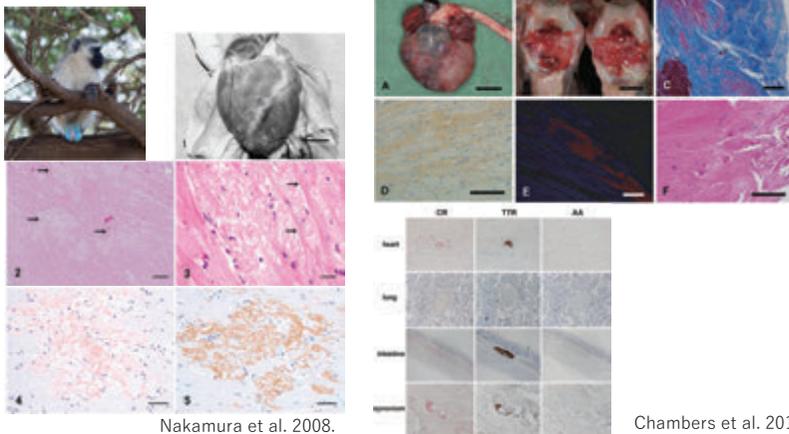
前駆蛋白: トランスサイレチン

- ヒトでは近年着目されるアミロイドーシス
- **心筋間質へのアミロイド沈着が特徴的**で致死的
- 老人性アミロイドーシスは非遺伝性で発症要因は不明であり、心筋生検などによって診断されることがある
- 男性に多い
- ATTRmでは**Val30Met変異**に起因するものが最もよく知られている
- 世界的にはポルトガル、スウェーデン、日本にV30M患者が多く、信州と熊本、石川にFAPの集積地があったことで日本のアミロイドーシス研究が進化したきっかけとなったといわれている
- 動物では老人性のATTRの報告がわずかに認められる程度であり、動物では**ベルベットモンキー**のみで報告される
- TTRは通常4量体で存在しているが、4量体が不安定化し単量体になった後に、アミロイド化すると考えられる



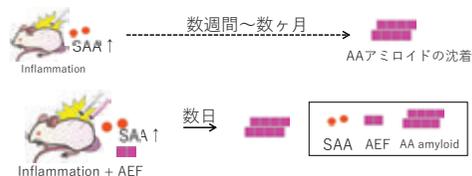
<https://hatramyloidosis.jp/disease-background/hATTR-amyloidosis/epidemiology>

ATTRアミロイドーシス: ATTRvt 老人性アミロイドーシス (野生型)
ATTRm 遺伝性ATTRアミロイドーシス (家族性アミロイドポリニューロパシー: FAP 1, 2型)



AAアミロイドーシスモデル

- ✓ リタイアマウスや劣悪な飼育環境で飼育されていたマウスにはAAアミロイドーシスが散発的に発生することが経験的に知られていた
- ✓ マウスやウサギ、ニワトリ、ウズラ、モルモットなどに硝酸銀やアゾカゼイン、 Freund 完全アジュバント、LPS等を投与し、血清SAA値を高めることで誘発可能
- ✓ 炎症を惹起した動物に対し、アミロイド線維を含む組織乳剤 (Amyloid enhancing factor: AEF) を経口・経静脈・腹腔内など様々な経路で投与することにより、短期間で高率にAAアミロイドーシスを発症する

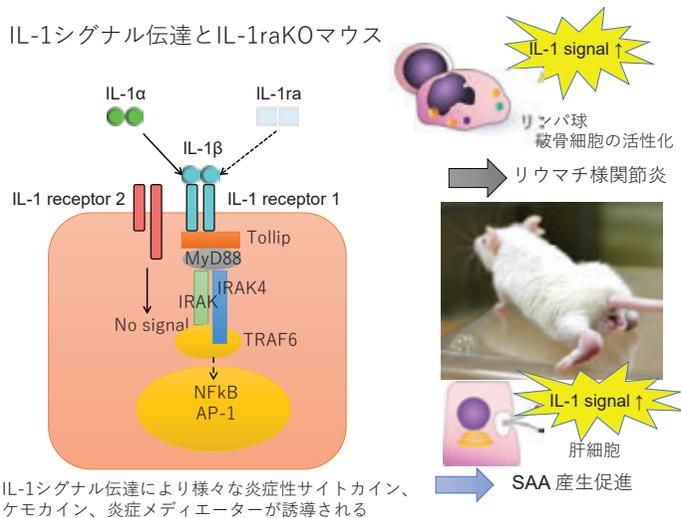


AAアミロイドーシスモデルの課題

- ✓ ICR, BALB/c, C57BL/6など多系統のマウスで実績があるが、実験系としての再現性に難あり
- ✓ マウス以外の動物種では更に再現性に難あり
- ✓ マウスでは全身にアミロイドが沈着することは稀で、機能障害に至る重症例は再現困難
- ✓ 剖検時のアミロイド沈着の有無以外、病態の詳細な検討はなされていない
- ✓ 実験的AAアミロイドーシスでは炎症刺激を中断すると、血清SAA値が低下し、アミロイド沈着量も減少する（病状末期の自然症例を完全には再現できない）
(Ram et al. *Int Arch Allergy Appl Immunol.* 1968)

より再現性が高く、自然例の病態に近い実用的なモデルを作製したい

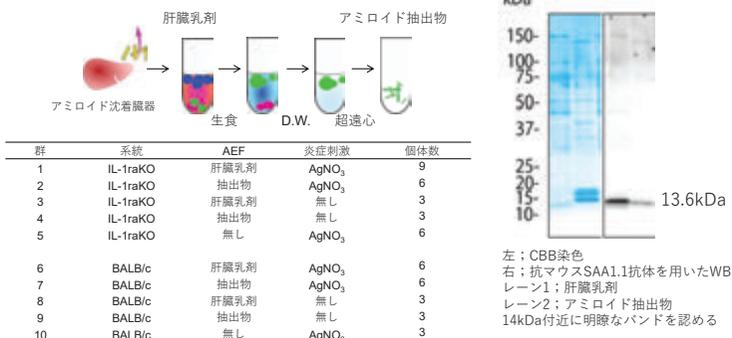
IL-1シグナル伝達とIL-1raKOマウス



材料と方法 1

AAアミロイドーシスの誘発

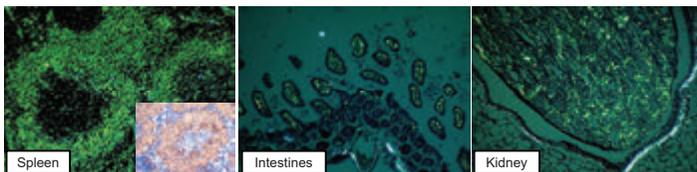
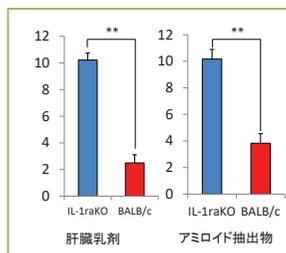
- 12週齢のIL-1raKOおよびBALB/cに対し、硝酸銀水溶液とAEFを投与する（誘発処置）
- AEFとして、臓器乳剤およびAAアミロイド抽出物を作製する
- 誘発処置をDay 0とし、Day 20において剖検、採材を行う
- 肝臓・アミロイド沈着量、アミロイドの分布を調べる



IL-1raKOマウスおよびBALB/cを用いたAAアミロイドーシスの発症

群	系統	AEF	炎症刺激	発症率 (%)
1	IL-1raKO	肝臓乳剤	AgNO ₃	9/9 (100%)
2	IL-1raKO	アミロイド抽出物	AgNO ₃	6/6 (100%)
3	IL-1raKO	肝臓乳剤	無し	0/3 (0%)
4	IL-1raKO	アミロイド抽出物	無し	0/3 (0%)
5	IL-1raKO	無し	AgNO ₃	0/6 (0%)
6	BALB/c	肝臓乳剤	AgNO ₃	6/6 (100%)
7	BALB/c	アミロイド抽出物	AgNO ₃	6/6 (100%)
8	BALB/c	肝臓乳剤	無し	0/3 (0%)
9	BALB/c	アミロイド抽出物	無し	0/3 (0%)
10	BALB/c	無し	AgNO ₃	0/3 (0%)

- AEFと硝酸銀水溶液の両方を投与した全てのマウスにAAアミロイドが沈着
- AEFのみ、硝酸銀水溶液のみを投与した群ではAAアミロイドは沈着しない



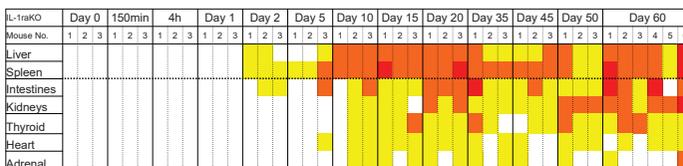
沈着したアミロイドは免疫染色にてSAA1.1に陽性(挿入図)

AAアミロイドの分解と再沈着

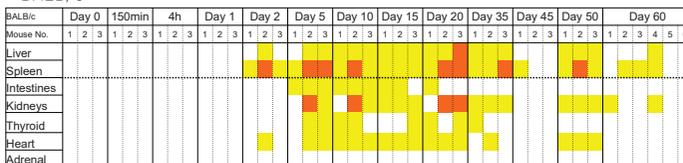
- アミロイド分解過程において再度炎症刺激を行う事(再刺激)により、炎症刺激とAEFによる通常のAAアミロイドーシスの誘発処置よりも重篤なアミロイドーシスを再発する(AAアミロイドの再沈着)。(Nystrom *et al. Amyloid*, 2012)
→このアミロイド再沈着では全身臓器へアミロイドが沈着し、糸球体へもアミロイドが高率に沈着する。
- アミロイド再沈着の機序は不明であり、Nystromらは沈着したアミロイドをマクロファージが貪食することにより断片化し、AEFとして拡散することでアミロイドが再沈着するのではないかと考察している

沈着するアミロイドの分解および再沈着の機序を明らかにすることは、AAアミロイドーシスの病態が進行する機序解明および実験的AAアミロイドーシスと自然例のAAアミロイドーシス症例との病態比較の上で重要な手がかりとなるのではないかと

IL-1raKO



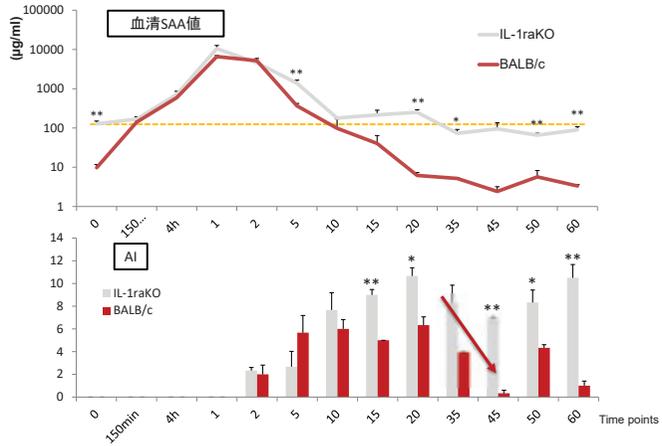
BALB/c



IL-1raKOおよびBALB/cにおけるアミロイドの分布とその経時変化(ヒートマップ)

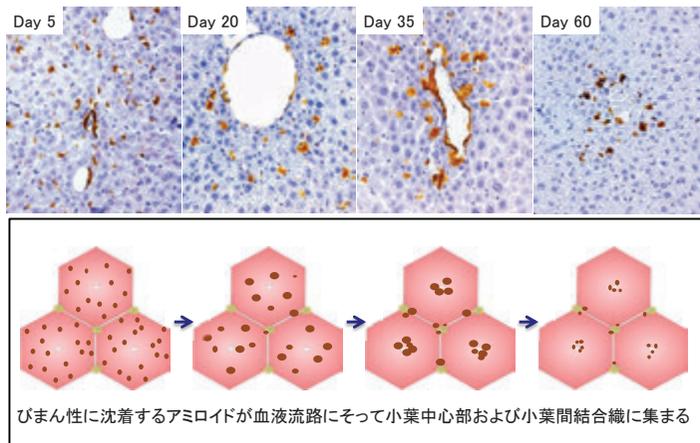
■ ; Score 1 ■ ; Score 2 ■ ; Score 3

→IL-1raKOでは全身臓器へAAアミロイドが沈着するのに対し、BALB/cでは脾臓・肝臓以外へのアミロイド沈着は軽度

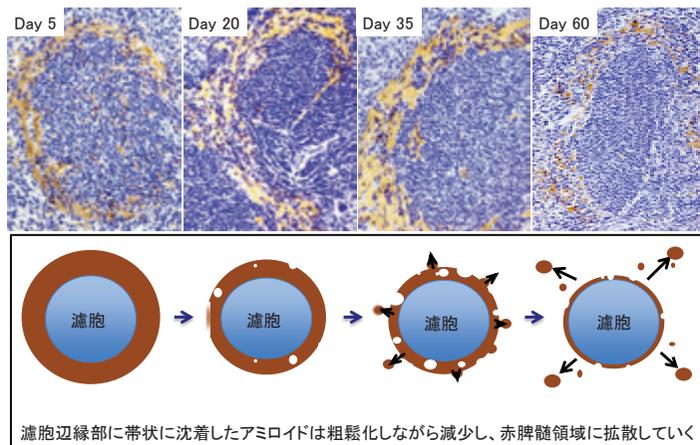


沈着したアミロイドが減少していく過程ではどんな変化が生じているのだろうか？

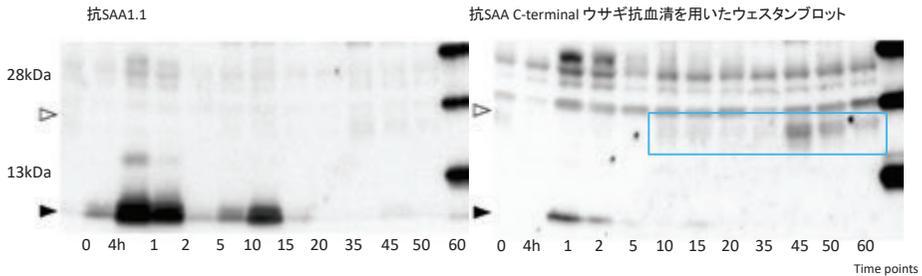
肝臓における沈着パターンの変化



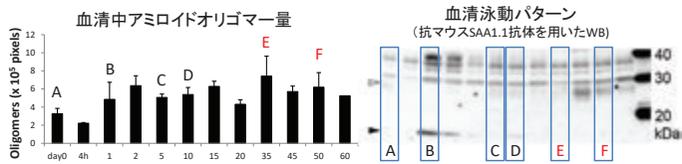
脾臓における沈着パターンの変化



血清中SAAのバンドパターンの経時変化

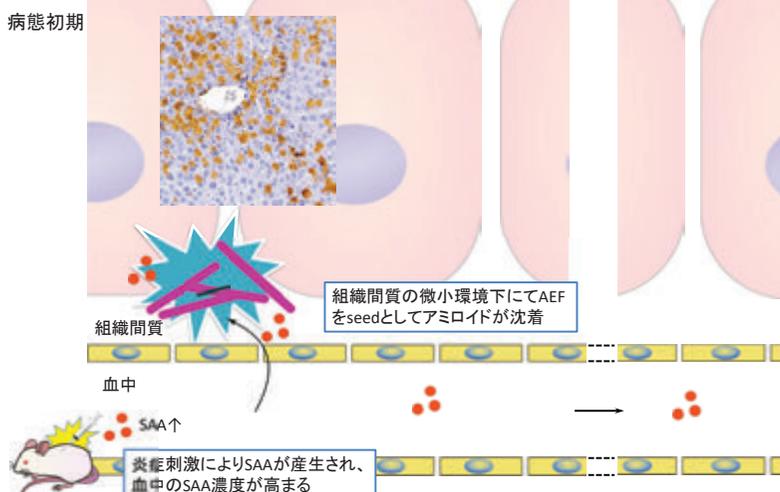


アミロイド沈着量の減少する35日以降の血清中ではSAAダイマーに相当するSAA C-terminal 陽性のバンドパターンを認める

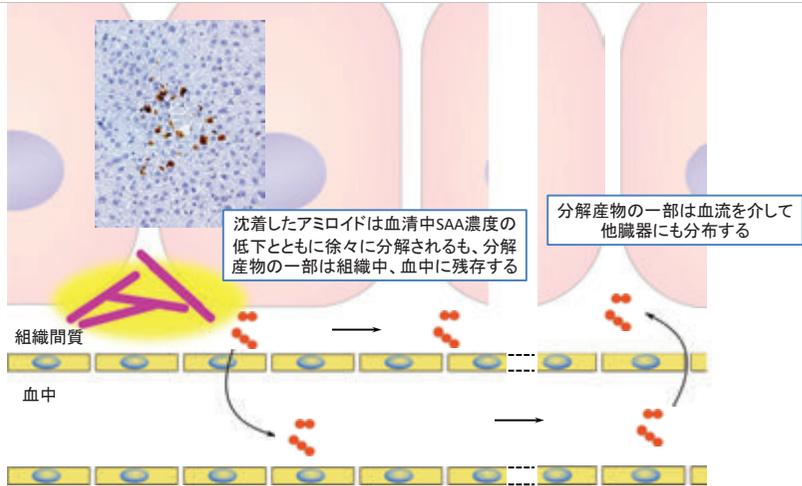


AAアミロイドーシスマウス血清のAEF活性				
群	匹数	投与した血清	発症率 (%)	AI ± SE
A	6	Day 0 血清	0/6 (0%)	0
B	3	Day 1 血清	2/3 (66%)	1.6±0.7
C	6	Day 5 血清	2/6 (33%)	2.0±1.6
D	6	Day 10 血清	3/6 (50%)	0.7±0.3
E	6	Day 35 血清	5/6 (83%)	2.3±0.7
F	6	Day 50 血清	5/6 (83%)	2.7±0.8
G	6	Day5 血清 (No amyloid 対照)	0/6 (0%)	0

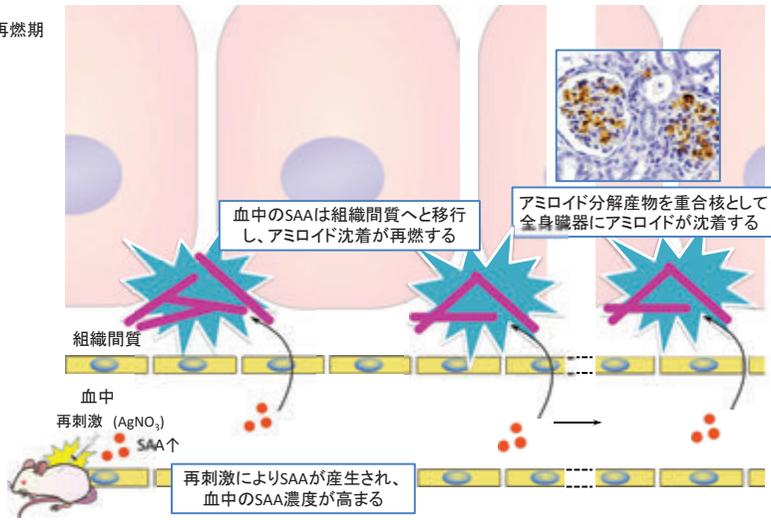
AEF活性を有するAAアミロイドの分解産物、中間体が血清中に存在する



退縮期



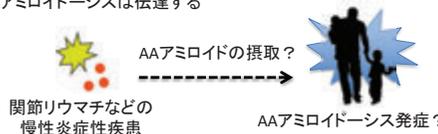
再燃期



AAアミロイドーシスと伝達

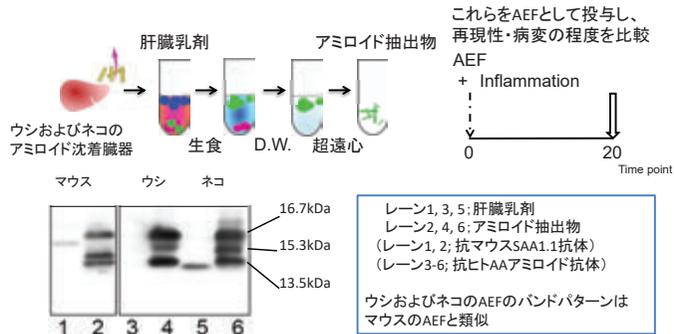
ヒトのアミロイドーシスにおいて異種間の伝達性が報告されているのはプリオン病のみである
→プリオン病は動物からヒトへと種を超えて伝達する

- ヒトおよびウシのAAアミロイドの経口投与によってもマウスにAAアミロイドーシスを誘発できる (Cui *et al. Pathol Int.* 2002)
- フォアグラの経口投与によってもマウスにAAアミロイドーシスを誘発できる (Solomon *et al. Proc Natl Acad Sci U S A.* 2007)
→異種由来のAAアミロイドの摂取により実験的にAAアミロイドーシスはマウスに伝達する
- ウシのAAアミロイドはウサギに伝達した (Horiuchi *et al. Amyloid.* 2008)
- ウシのAAアミロイドはニワトリに伝達した (Murakami *et al. Amyloid.* 2013)
→マウス以外の動物種においても異種由来のAAアミロイドの摂取により実験的にAAアミロイドーシスは伝達する



AAアミロイドへの暴露はアミロイドーシス発症のリスクファクターになりうるのか?
→異種間の伝達を高率に再現可能な実験モデルを用いた検討が必要である

ウシおよびネコAAアミロイドの異種間伝達性

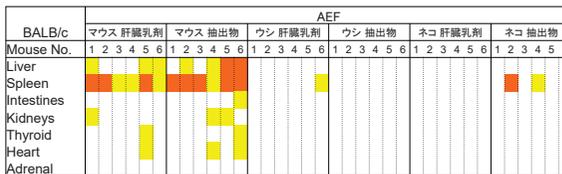
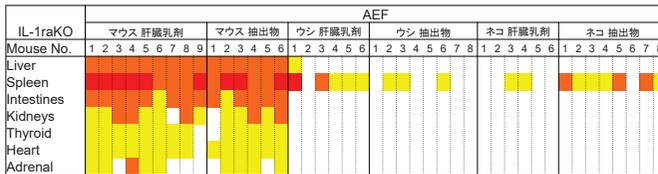


AAアミロイドの異種間伝達性

系統	実験期間 (日)	アミロイド抽出物	発症率 (%)
IL-1raKO	20	ウシ 肝臓乳剤	5/6 (83%)
	20	ウシ アミロイド抽出物	3/8 (38%)
	20	ネコ 肝臓乳剤	2/6 (33%)
	20	ネコ アミロイド抽出物	7/8 (88%)
BALB/c	20	ウシ 肝臓乳剤	1/6 (17%)
	20	ウシ アミロイド抽出物	0/6 (0%)
	20	ネコ 肝臓乳剤	0/6 (0%)
	20	ネコ アミロイド抽出物	2/7 (29%)

IL-1raKOではBALB/cよりも高率に異種間伝達が成立する

アミロイドの分布と各臓器における沈着の程度



ウシおよびネコAAアミロイドを投与した場合、アミロイドは脾臓に局限して沈着する

- 異種由来のAAアミロイドはAEFとして作用する
→種を超えた伝播が起こる可能性は否定できない
- アミロイドの伝播が成立した際には、ホスト由来のアミロイドが沈着するため、条件が整った場合には病態が進行し、重症化する可能性がある
- マウスに対する病原性はseedとして用いたAEFの由来動物によって異なる
→動物由来のAAアミロイドのヒトへの伝播性の評価には、ヒト化マウスなどを用いた検討が不可欠である
- IL-1raKOマウスモデルではWTのマウスモデルと比較し、高率かつ重度のアミロイド沈着が生じる
→関節リウマチ患者や高齢者など伝播リスクの高いケースでは、経口的に摂取したアミロイドが様々なアミロイドーシスの引き金になりうる？

令和5年11月1日 印刷
令和5年11月1日 発行

編集兼発行者 近藤 玄
発行所 関西実験動物研究会

〒565-0871 大阪府吹田市山田丘2-2
大阪大学医学部附属動物実験施設

印刷所 株式会社コンベンションアシスト
E-mail : jalas@cfmeeting.com TEL : 048-400-2790