

Japanese Society for Laboratory Animal Resources

LABIO 21

ラビオ
No. 62
OCT. 2015



公益社団法人

日本実験動物協会

Tel. 03-5215-2231 Fax. 03-5215-2232
<http://www.nichidokyo.or.jp/> E-mail: jsla@nichidokyo.or.jp

日本実験動物協会創立30周年記念講演

「統合失調症治療薬の開発から上市まで」

【特集】

「コロナウイルスを探る」



**Supporting Your Dream Of Innovation
For Life Science**

Japan SLC, Inc.

「優しい暮らし」のために

日本エスエルシーは動物愛護の精神を尊び
大切な研究テーマにあった実験動物を提供してまいります。



SLC

日本エス エル シー株式会社

— <http://www.jslc.co.jp> —



絵 石井 朗

イラストレーター

1984年よりイラストレーター及川正通氏のスタジオに所属し、エアブラシによるイラストの作成。2000～2012年まで及川スタジオの依頼でコンピューター作画での情報誌（びあ）表紙の制作に携わる。2012年以降は、これ迄に蓄積したコンピューター技術を用いて、イラスト以外にもアニメーション・音楽制作など範囲を拡げて活動している。

エーアイ・イラスト・コンプ社 代表

巻頭言

日本実験動物技術者協会理事長に就任して 4

日本実験動物協会創立30周年記念講演

統合失調症治療薬の開発から上市まで 5

特集 コロナウイルスを探る

コロナウイルス 総説 9

中東呼吸器症候群（MERS） 14

トピックス

ARRIVEガイドライン —動物実験の再現性向上のために— 18

特別寄稿

日動協と私 22

私の研究

フグ毒テトロドトキシンの体内動態解析：

トラフグを用いた毒化モデル実験 24

連載シリーズ 実験動物産業に貢献した人々（20） 28

ラボテック 緊急時の飼料供給体制 30

連載 サル類を対象とした行動解析

サルの‘心の理論’を目の動きから探る 32

オピニオン

実験動物における痛み 37

日本動物実験代替法評価センター（JaCVAM）の紹介並びに

我が国における動物実験代替法の現状 42

日本実験動物学会の動き、日本実験動物技術者協会の動き 45

協会だより、KAZE 46

Göttingen Minipigs™

Global Standard



利点

- ・豊富なBackground dataが検索可能
- ・遺伝管理 ①小型 ②大人しい性格 ③白色皮膚
- ・Technical & Scientific support



オリエンタル酵母グループは研究者様をTotalサポートいたします

- <器材> 飼育ケージ・経口投与器具・保定器具
 <実験動物用飼料> ミニブタ用飼料、特別注文飼料、ドライフルーツ
 <生体材料> 血液・皮膚・臓器
 <ミニブタ受託試験> <ミニブタ受託飼育> <トレーニングサービス>



オリエンタル酵母工業株式会社

バイオ事業本部

〒174-8505 東京都板橋区小豆沢3-6-10

TEL : 03-3968-1192 / FAX : 03-3968-4863

URL : <http://www.oyc-bio.jp>

日本実験動物技術者協会理事長に就任して

日本実験動物技術者協会

理事長：坂本 雄二（千寿製薬株式会社）

平成27年度より日本実験動物技術者協会の第8代理事長を拝命いたしました。産・学という視点で見た場合、産の立場の者として理事長に就任するのは、第3代理事長を務められました、朱宮正剛氏以来の事となります。この機会を良い時と捉え、協会運営の在り方を今までとは少し異なる視点で見直し、当協会の更なる発展に寄与し、その責務を全うすべく、皆様方のご支援、ご協力も得ながら誠心誠意努めて参る所存です。何卒宜しくお願い申し上げます。

当協会は来年の平成28年に設立50周年を迎える長い歴史を持ちます。設立された当時は、技術者と呼ばれるような立場ではなく、単なる作業者的な位置づけであり、専門知識や、技術を十分に身につけている人も殆ど居らず、大事な実験動物を飼育・管理しているという認識を持たなかった人がそれなりにいたのではないかと想像します。そのような状態から、情報提供の場として会報の発行や、演者を招聘して講演会・学習会を企画・開催し、知識を深める場を提供するなど、大学や企業等で働いている作業者を文字通り実験動物技術者へとレベルアップさせていった、当時のパイオニアの方達の取り組みなくして、今は有り得ません。

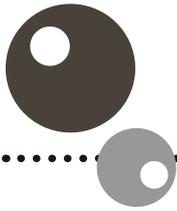
今の時代はというと、情報は

インターネット、各種専門雑誌、他の関連団体の活動などから、距離・時間の如何を問わず入手出来るようになり、加えて実験動物の品質は著しく向上しました。その一方で技術者に求められるのは各々の個性や独創性よりも、マニュアルを遵守し、規則正しく作業が行われる事ばかりが問われているのでは？と感じる時もあるほどです。そのような状況の一方で、実験動物福祉、動物実験倫理への取り組みの重要性は欧米と同様にさらに増し、実験動物を単なる実験のツールの一つとして捉えるのではなく、一つの生命、意識・感情を持った動物として取り扱い、その関わりにおいては間違いなく、「If I were you」「もし、私があなただったら…」の精神で取り組む姿勢を求められてきています。すなわち、我々は科学的研究の一部に従事する職員として、標準化された業務を確実にこなす技術者であるとともに、一人の人間としてこの分野の仕事と向き合う姿勢が問われるようになってきており、我々を取り巻く環境に即した自らの立ち位置の変化を否応なく求められて来ていると感じます。このような社会背景を考える時、当協会の存在意義や目的の中には、軸として不変である部分と、時代に対応して変化(進化)していく部分が必要であると思っています。

このような状況の中、50年という節目の年も見据えながら、井上前理事長が2期、6年に渡り取り組んで来た事を引き継ぎ、昇華させるべく今後の運営方針等を記させていただきます。具体的には、長きに渡る節念でありました協会の法人化を実現させます。また、それに伴い、従来の良さを継承しつつも、一つの団体として7支部と本部がしっかりと結束し、支部間、本部と支部というような横断的活動を積極的に進め、効率の良い技術者教育の場、会員同士の交流の場を作り出していきます。加えて実験動物福祉、動物実験倫理を踏まえた動物実験の適正な実施への貢献を推進する取り組みを恒常的に行ってゆける体制も構築して行きます。

また、昨今の業界内情勢を踏まえ、関連諸団体との交流・対話の場を持ち、将来の実験動物を取り巻く業界全体の好ましい有り方を模索・検討して行きます。

協会の運営においては、個人会員、賛助会員の皆様からの意見ならびに関連諸団体からの意見にも真摯に耳を傾け、適切・的確な判断をしながら、協会運営を行って行く所存です。個人会員、賛助会員の皆様、ならびに関係諸機関におかれましては今まで以上のご支援をお願いする次第であります。



日本実験動物協会創立30周年記念講演

「統合失調症治療薬の開発から上市まで」

大塚製薬株式会社 Qs' 研究所 リーダー
廣瀬 毅



統合失調症と治療薬

統合失調症は思春期後期から成人期に発病する生物学的脳障害で、思考や感覚・知覚の障害、心理社会的機能の低下を引き起こす比較的一般的な精神障害である。有病率は国・人種を問わず全人口の約0.8～1%で、日本では現在80万人程度の患者さんがいるとされ、そのうち入院治療患者は18万人程度である。

この疾患は重い人格障害と思考過程の分裂により特徴付けられ、妄想、幻覚、興奮などの陽性症状と平板な感情、自閉などの陰性症状の2種の症状を特徴とする。

陽性症状は、本人しか聞こえない声が聞こえてくる幻聴、内容的にあり得ないことを強い確信を持って信じてしまう妄想、情報の正しい選別や正確な解釈、適切な応答が出来なくなる思考障害など、統合失調症を特徴づける症状である。そして、上記のような顕在的な症状がなく、喜怒哀楽の感情が乏しくなり、思考と会話が貧困になる陰性症状も統合失調症に特徴的

な症状である。これら統合失調症の主症状の背景には認知機能障害があり、これ自体が本疾患の根本原因であるとも考えられている。

これら症状に関連する生物学的背景には、現在のところ最も確からしいと考えられているドパミン神経の伝達異常状態があるとされる。脳内のドパミン神経路には大きく4種類の経路があり、そのうち情動や感情を司るとされる中脳-辺縁系ドパミン経路における神経伝達亢進と、より高次な情報処理や概念統合を司る中脳-皮質系ドパミン経路における伝達低下が統合失調症の諸症状発現に寄与していると考えられている。こうしたドパミン神経伝達異常を引き起こすようになる病因としては様々な仮説が示唆されてはいるが、現在に至っても明確な原因は解っていない。

統合失調症を治療するための薬剤としては、1950年前半から様々な薬剤が臨床適用され、主にドパミン神経伝達亢進状態を緩和する目的でドパミンD₂受容体アンタ

ゴニスト作用を有する抗精神病薬がその治療と中心となってきた。

ただし、患者さんの脳内で異常が起こっている経路以外の2つのドパミン経路では、正常な伝達が行われており、随意運動を司る黒質-線条体経路や血中プロラクチン濃度を調節する漏斗-下垂体経路においてドパミンD₂アンタゴニストが作用すると、運動障害や高プロラクチン血症などの副作用が発現し、1990年頃までこれらの副作用発現が治療上の問題点としてクローズアップされていた。

その後上述の副作用を軽減するためいくつかの薬理的改善を施した第二世代の抗精神病薬が登場し、それまでの薬剤治療で問題となっていた副作用発現の問題はある程度改善された。しかしながら新しく登場した第二世代の薬剤にも問題となる副作用のあることが次第に明らかとなり、さらに安全で効果の高い薬剤の開発が望まれている。

これら抗精神病薬は旧世代でも第二世代においてもその薬理作用

はドパミン・セロトニン受容体に対する拮抗作用が主で、発現する精神症状を緩和するのみの作用しか持たず、疾患の要因そのものを排除しない対症療法である。平成22年度の厚生労働省、政策創薬総合研究推進事業が作成した各疾患領域における医療従事者が感ずる薬剤治療の満足度と貢献度を対比させた数値に置いても、中枢領域の疾患に対する治療貢献度はある程度高い疾患もあるが、治療満足度は貢献度に比較してそれほど高くはないというアンケート結果が出ている。この資料で示されているが統合失調症における薬剤による治療貢献度は60%程度であるが、治療満足度は30%前後と、医療現場における薬剤のイメージとしてはまだまだ改善の余地があると考えられる結果である。

薬剤開発と問題点

さて、一般的な製薬メーカーにおいて多少の違いはあれ新薬開発のストラテジーはほぼ同じ流れを踏襲している。そのプロセスで最も重要と思われるポイントは医療ニーズへの適合性と開発可能性を左右する、薬剤コンセプトの立案に尽きると考えられる。

このコンセプト立案において開発戦略を左右する重要な2つの側面がある。

一つは疾患を治療するためのキーとなる標的分子の構造・性質などが明確になっている場合で、この場合は開発の流れはかなりスムーズである。標的分子の作用を評価

する実験系を組みやすく、候補化合物を見出すまでの時間とコストも少なく済む。

しかし、疾患の根幹となる標的分子が特定されていない場合は、薬剤開発の方略は非常に難しくなる。疾患原因の生物学的背景や標的分子に対する仮説を立て、その仮説を検証しながら最適な薬理作用を見出し、目的とする薬理作用を有する候補化合物を探索しなければならず、この場合目的達成までに多大な時間とコストと労力が費やされる。

中枢疾患治療薬、特に精神疾患を治療する薬剤開発では、病態背景とそれを繋ぐ生物学的指標・変化が明確にリンクしていないため、殆どが上述した2つの側面の後者の開発を余儀なくされる。

その具体的要因として考えられるのが：

- ①精神疾患を有する動物そのものがない
 - ②薬剤の効果を客観的に測定できない
 - ③薬剤の作用機序が数十年変化していない
- の3点である。

①に関しては分子生物学・ゲノム解析などの研究の進展により、遺伝的手法に基づく人の精神疾患により近い動物モデルが近年創生されてきているが、基本的にヒトにおける精神疾患はヒトでしか発生しないので、モデル動物との距離はまだ遠いのが現状である。

②は統合失調症の疾病原因やバ

イオマーカーが未知であるため、客観的に薬剤の治療効果を判定する指標が今のところ、医師の診断に依るしかない点である。血圧降下剤であれば、血圧を測定することで客観的に効果を評価できるが、精神症状は診断スケールを基準に医師がほぼ主観的な判断で評価するに過ぎない。

③については統合失調症治療薬の持つ薬理作用は基本的にドパミン、セロトニン受容体への拮抗作用であり、これ以外の作用機序では現在のところ統合失調症を治療するのに有益な候補は見出されていない。

つまり、統合失調症治療薬を開発するためにはいくつもの高いハードルを越えなければならないということなのである。

アリピプラゾールの開発

1970年代後半、大塚製薬の徳島研究所は新規コンセプトの抗ヒスタミン薬を開発しようとしていた。その作業の過程で、中枢ドパミン神経伝達を抑制する化合物が見出され、その時点で開発の方向性を統合失調症治療薬開発へと切り替えた。この方向転換がその後の大きな潮流への第一歩であり、その化合物の作用機序が後のアリピプラゾール誕生につながる新規の薬理作用でもあった。

その作用機序とは、ドパミン神経終末にあつて過量にならないようドパミン遊離を自己調節する受容体であるドパミンD₂自己受容体へのアゴニスト作用である。当

図1. ドパミンは悪者ではなく、“人間らしさ”に必要なもの

	従来の薬剤	エビリファイ
ドパミン神経	<ul style="list-style-type: none"> ・症状を起こす悪いもの ・直ちに遮断すべきもの 	<ul style="list-style-type: none"> ・人の活動に必要なもの ・調節し安定させるもの
臨床効果	<ul style="list-style-type: none"> ・できるだけ早く治す ・急性期を重視 	<ul style="list-style-type: none"> ・症状を長期に安定させる ・長期の予後を重視
治療の決め方	<ul style="list-style-type: none"> ・医療者の目線 	<ul style="list-style-type: none"> ・患者さんの目線
訴求ポイント	短期の効果	長期の有用性

時はドパミンD₂受容体アンタゴニストのみが臨床使用されており、それらの副作用がかなり問題となっていたため、直接D₂受容体を遮断せずにドパミン神経伝達亢進状態を緩和する可能性のあるドパミン自己受容体アゴニストは、副作用の発現なく陽性症状を改善する可能性を秘めた薬剤として期待された。しかしながら臨床においてその効果が検証されて、陽性症状は殆ど改善せず、副作用発現は少なかったという結果に終わり、その後の開発を断念した。

しかし開発者はここで諦めず、陽性症状への改善効果を高めるために自己受容体アゴニスト作用と同等のシナプス後部位D₂受容体アンタゴニスト作用を併せ持つ薬剤を開発しようと考えた。その後、研究者たちは会社上層部の理解を得てコンセプトを満たす化合物を探索した結果、1987年にアリピプラゾールを見出した。当時はアリピプラゾールの薬理学的プロフィールを「ドパミン自己受容体アゴニスト+シナプス後部位D₂受容体アンタゴニスト」と研究者たちは

説明していたが、のちの実験からD₂受容体パーシャルアゴニストであることが判明した。

さて、安全性試験をクリアしたアリピプラゾールは1990年より日・米ほぼ同時に臨床試験に入ったが、1999年になってもNDA(新薬承認申請)に必要なデータパッケージのための臨床試験が完了していなかった。そして残りの試験を完結するためには更にこれまでと同額の開発コストがかかるということで、会社の方針は一時ライセンスアウトの方向に進んだ。しかし、この時幸運なことに米国メガファーマのプリストルマイヤーズスクイブ(BMS)との共同開発・販売契約が実現し、その後はBMSの助力もあって急速度で臨床試験が終了し2002年に米国での承認を取得した。

アリピプラゾールの上市と臨床にもたらしたもの

アリピプラゾールは現在世界65ヶ国以上の国々で統合失調症を初め、うつ病や双極性障害躁状態の治療に大きな貢献をしている。

その貢献には、アリピプラゾールの作用機序に託されたある開発哲学が大きくかかわっていると考えられる。

その哲学とは、それまで悪者として扱ってきたドパミンを、精神活動に大事な、必要なものと位置付けた点であろうか(図1)。

従来のD₂受容体アンタゴニスト作用を持つ統合失調症治療薬は、ドパミンは症状を引き起こす良くないもので直ちに排除しなければならない対象と置いた。こうした観点は患者さん側ではなく病気をコントロールしようという医療者側の観点であり、薬剤には即効性が求められた。ところが、アリピプラゾールはD₂受容体パーシャルアゴニストの薬理特性から、人間の精神活動や運動機能に必要な不可欠であるドパミンの伝達状態を常に最適に保ち、安定化させることにより、必要なドパミン信号伝達を遮断しない。言い換えれば患者さんの目線に立った治療効果であり、長期に亘ってドパミンを安定化させる作用は統合失調症という病態にとって非常にフィットし

た薬理作用ではないかと考えられるのである。

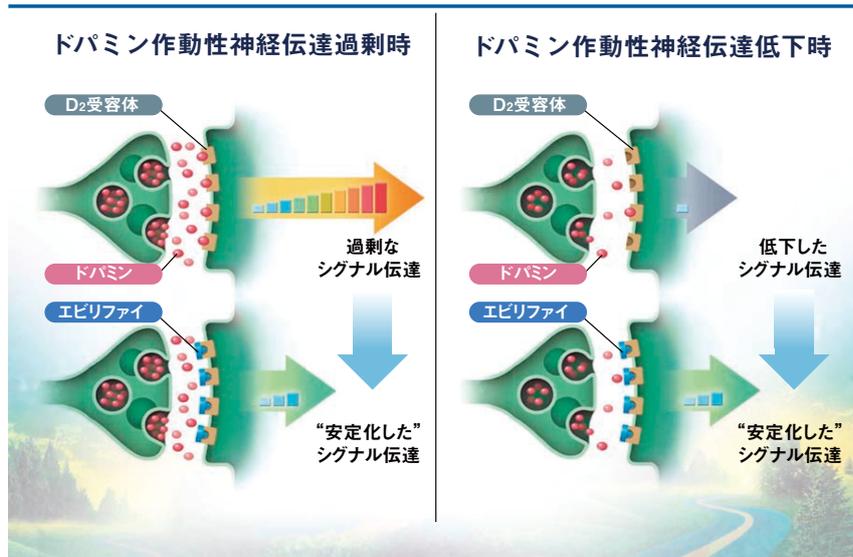
このコンセプトを端的に表現するある実験結果がある。

化合物のドパミンD₂受容体に対するアンタゴニスト作用をスクリーニングするアポモルヒネ誘発常同行動評価試験でアリピプラゾールは他の統合失調症治療薬とは異なる効き方を示したのである。アポモルヒネはドパミンD₂受容体アゴニストで、この薬物を多量にラットに投与すると、持続的で激しい匂い嗅ぎ行動や舌舐め行動が出現する。この時D₂受容体アンタゴニストを投与しておくことアポモルヒネのD₂受容体への結合を遮断して常同行動は抑制されるが、同時にラットが普段見せる正常な行動までも抑制して殆ど動かない状態となる。しかし、アリピプラゾールは常同行動のみを選択的に抑制し、高用量においても正常行動は殆ど抑制しなかった。

この結果は、D₂受容体アンタゴニストは用量を上げると過剰な神経伝達のみならず正常な伝達までも阻害してしまうが、アリピプラゾールは過剰な神経活動のみ抑え、生体に必要な信号伝達にはあまり影響を与えないということを示唆するものである。

この作用様式は脳内のドパミン活動が増大したり低下したり、かたや正常状態の部位もあるといった統合失調症の複雑な病態を治療する上でまさしく理想的な作用プロファイルであると考えられる(図2)。

図2. ドパミンシステム スタビライザー作用

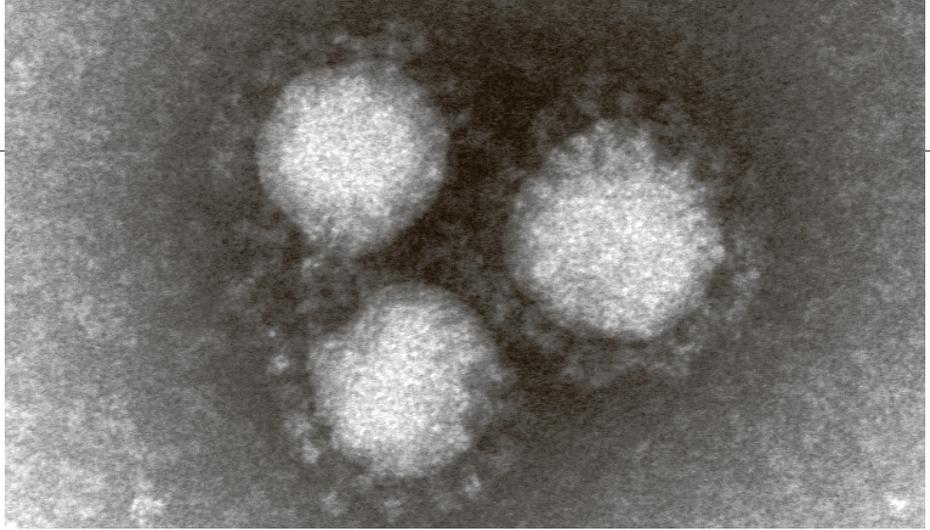


ドパミンD₂受容体パーシャルアゴニストであるアリピプラゾールは臨床適用されてからも上記の作用プロファイルを如何なく発揮し、効力は他の統合失調症治療薬と同等以上でありながら有害な副作用の発現は少なく、非常に安全な統合失調症治療薬としての地位を確立するに至った。その成果は2012年に第11版として公表された米国のモーズレイ処方ガイドラインに第一選択薬としてアリピプラゾールが推奨されている点でも証明されていると言えるであろう。つまり、現在使用している薬が副作用などで継続服用できない問題が生じた際、その代替薬として真っ先にアリピプラゾールが推奨されるということである。

アリピプラゾールはこうした高い安全性と優れた薬効プロファイルから、現在では統合失調症のみならず、抗うつ薬で十分な治療効果が得られない患者さんへの補充

療法として、また双極性障害躁状態急性期・慢性期の症状緩和と再発予防、そしてその高い安全性から小児・青少年の統合失調症治療への適応を取得し、2012年には米国処方箋数No.1の売り上げを獲得した。

日本発の和と匠の精神を元に誕生したブロックバスター、アリピプラゾール開発成功の裏側には、研究者のたゆまない努力と真実を見極める眼力、そしてその研究活動を妨げず大事な芽を摘み取らないように見守り続けた大塚製薬経営陣の経営方針があり、それらが見事に融合した末の結実であったと研究開発に携わった一人として今感じている。



写真：MERS コロナウイルス（国立感染症研究所提供）

コロナウイルス 総説

日本獣医生命科学大学 獣医感染症学教室

教授 田口 文広

要約

コロナウイルス(CoV)はニドウイルス目CoV科に属し、ゲノムRNA (ge-RNA)は約30 キロベース(kb)の(+)鎖で、エンベロープを持つウイルスである。その特徴はmRNA構造にあり、ge-RNA 3'末端から5'側に違う長さで伸長する数本のmRNAから構成され、各mRNAの5'末端にはge-RNA 5'末端に存在するリーダー配列を持つ。CoVの細胞内増殖環は、受容体結合後、細胞質膜かエンドゾーム膜とウイルスエンベロープが融合し、脱殻が起こり、ウイルス複製が開始する。感染細胞内では、ge-RNAからRNA polymeraseなどの複製に必須な蛋白が翻訳され、引き続きge-RNAに相補的な(-)鎖RNAが合成される。更に数本から十数本のサブゲノミック (sg) mRNAが合成される。各sg-mRNA 5'末端のopen reading frame (ORF)から原則的に1種の蛋白が合成され、これらの蛋白とge-RNAが小胞体からゴルジ装置に至る小胞に集合、その内部に出芽して、exocytosisにより、細胞外に放出される。また、CoVには強い病原性を示すウイルスと殆ど病原性を示さないウイルスなどが混在している。最近、動物由来のヒトCoV

が大きな問題となっているが、家畜疾病でも、北米やアジア諸国で哺乳豚に高い病原性を示す感染症が猛威を振っている。

はじめに

ヒトのCoVは、重症急性呼吸器症候群(SARS)発生以前は、ヒトCoV(HCoV)229EやOC43など鼻風邪ウイルスが知られているにすぎず、重症の疾患を引き起こすウイルスがなかったため医学領域での研究は限られていた。SARS発生を機として⁽¹⁾、CoVは医学領域に限らず多く分野で盛んに研究がなされるようになった。SARS-CoV発見後には、ヒトから呼吸器病の原因CoVが幾つか分離された。また、コウモリからSARS-CoV様のウイルス遺伝子が見つかったことから、コウモリがSARSのレゼルボアとして有力となり^(2,3)、これを発端に、コウモリからのウイルス分離が盛んに行われ、多くのCoVがコウモリから見つかっている。SARS発生後10年を経て、中東でSARS類似の重症呼吸器疾患の原因ウイルスとして中東呼吸器症候群(MERS)-CoVが発見され⁽⁴⁾、今日まで発生が散発している。本年5-7月には中東への韓国人渡航者が帰国後、韓国でMERS

感染が拡大し、36名の命が奪われている。

一方、家畜のCoVとしては、豚流行性下痢ウイルス(PEDV)、豚伝染性胃腸炎ウイルス(TGEV)など哺乳豚に病原性の高いウイルスが存在し、PEDV感染では2013年に米国で約800万頭の哺乳豚が犠牲になり⁽⁵⁾、同様のウイルスと思われる株が半年後日本に侵入し、45万頭以上の哺乳豚が死亡した。鶏感染性気管支炎ウイルス(IBV)は頻繁な変異などのために、ワクチンが効きにくいことが知られている。実験動物マウスでは、マウス肝炎ウイルス(MHV)が成熟マウスに不顕性感染し、新生マウスや免疫不全マウスでは致死的な経過を辿る。MHV感染は速やかに他のマウスに伝播し、感染動物と同室或いは同施設で感染拡大する実験動物領域では極めて問題のある感染症である。本稿では、これらのCoVに共通の一般性状、分類、細胞内増殖等について、概説する。

1. 分類

CoVは最初、ヒトや家畜から分離されたウイルスが、粒子表面に特徴的な約20nmの王冠様(コロナ)突起(スパイク)を持つことから、

CoV科と命名された⁽⁶⁾が、その後、CoVの遺伝子構造、転写複製の研究が進むにつれ、CoVと高い類似性を示すアルテリウイルス科ウイルスと共にニドウイルス目としてまとめられた⁽⁷⁾。CoV科はCoV亜科とトロウイルス亜科に分かれている。現在、CoV亜科はアルファ(α)、ベータ(β)、ガンマ(γ)、デルタ(δ)-CoVの4属に分かれ、これまでグループ1から3として分類されていたものが属(α - γ)に格上げとなり、更に新しい属(δ)が一つ加わった(表1)。CoV亜科のウイルスは約30kbプラス鎖のゲノムを有し、トロウイルスは約25kb、アルテリウイルスは約15kbといずれもRNAウイルス中では巨大ゲノムを持つエンベロープウイルスである。ニドウイルスmRNAは特徴的なnested set構造(後述)を持ちnestのラテン語からNido(ニド)と命名された^(7,8)。

2. CoV粒子

CoV粒子は直径約100~120nmである(図1)⁽⁷⁾。これまで粒子形態は円形、楕円形、多形性を示すと報告されてきたが^(7,8)、最近のcryo-electron tomography (CET)解析結果では、殆どが直径

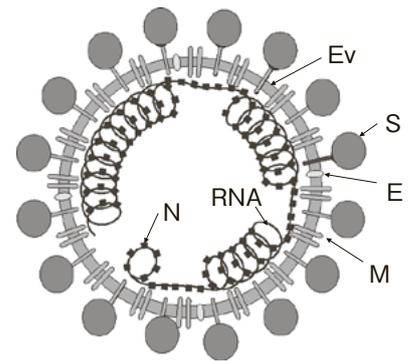


図1: コロナウイルス粒子の模式図
粒子は脂質2重膜からなるエンベロープ(Ev)を持ち、Evには、スパイク(S)、膜蛋白(M)、Ev蛋白(E)が存在する。その内部には約30kbの(+鎖)ゲノムRNAとそれに結合する核蛋白(N)からなるヌクレオキャプシドが含まれている。

約100nmの円形(球形)を示すことが報告されている⁽⁹⁾。また、CoVのヌクレオキャプシドについては、正20面体を示唆する報告もあるが⁽¹⁰⁾、CETの結果から、従来考えられていた螺旋状のヌクレオキャプシドであることが示された⁽⁹⁾。CoV粒子内の約30kb(+鎖)RNAゲノム5'末端はキャップ構造を持ち、3'末端にはポリAが存在する(図3)。5'末端の20kbのORFには、1a, 1bの2個が存在し、1aの終止子ドンの上流に1bのORFの開始点がある。ORF1a, 1bの下流には構造蛋白のORFが数個存在する。その数はCoV種により若干の差がある。基本的な全てのCoVゲノム上の遺伝子としては、5'末端から、非構造蛋白遺伝子ORF1a, ORF1b、構造遺伝子S, E, M, N遺伝子の順で構成されているが、S遺伝子上、下流の領域にも幾つかの非構造蛋白遺伝子が存在する⁽⁸⁾(図3)。ウイルス粒子の構造蛋白としては、ヌクレオ(N)蛋白が量的に最も多く、ゲノムRNAと結合し、ヌクレオキャプシドとなる。ヌクレオキャプシドを包み込むエンベロープには、3種類の蛋白、即ち王冠様突起をなすspike(S)蛋白、integral membrane(M)蛋白、envelope(E)

表1 コロナウイルス亜科の分類

α - コロナウイルス	コウモリCoV 1 コウモリCoV HKU-8 豚流行性下痢ウイルス (PEDV) ヒトコロナウイルス 229E (HCoV-229E) ヒトコロナウイルス NL63 ネコ伝染性腹膜炎ウイルス (FIPV) 伝染性胃腸炎ウイルス (TGEV)
β - コロナウイルス	A 牛コロナウイルス マウス肝炎ウイルス (MHV) ヒトコロナウイルス HKU1-A
	B SARS コロナウイルス (SARS-CoV)
	D コウモリコロナウイルス HKU-9
γ - コロナウイルス	C コウモリコロナウイルス HKU-4 コウモリコロナウイルス HKU-5 MERS コロナウイルス (MERS-CoV)
	伝染性気管支炎ウイルス (IBV) イルカコロナウイルス
δ -コロナウイルス	野鳥コロナウイルス 豚デルタコロナウイルス

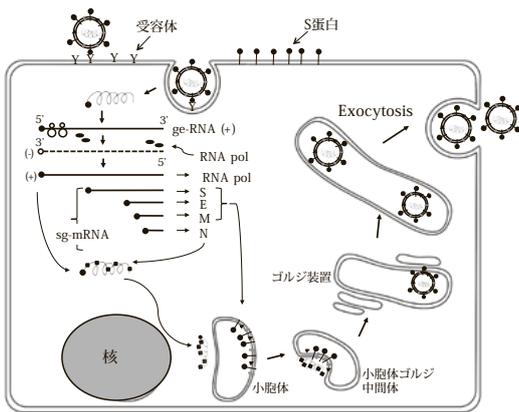


図2: コロナウイルスの増殖環: 粒子は特異的受容体に結合し、脱殻によりge-RNAが細胞室内に侵入する。ge-RNAからRNA polymeraseが翻訳され、更に(-)鎖RNA、ge-RNA、sg-mRNAが合成され、mRNAから蛋白が翻訳される。構造蛋白は小胞体ゴルジ装置中間体(ERGIC)に集合し、ヌクレオキャプシドを含む粒子としてERGIC内へと出芽する。更に、exocytosisにより、細胞外へ感染性粒子として放出される。

蛋白がある。トロウイルス亜科のウイルスはE蛋白を持たない。MHVや牛CoVなどのβ-属CoVには、エンベローブに第2の約10nmからなる小突起を持つウイルスがあり、hemagglutinin-estelase活性があることからHE蛋白と呼ばれている。HE蛋白は、α、γ-属CoVには存在しないが、トロウイルスには存在し、CoVのHEやインフルエンザウイルス(IFV) CのHE蛋白と相同性の高いことも報告されている⁽¹¹⁾。これらのHE遺伝子は他のウイルス(例えばIFV)との組み換えにより生じた可能性が示されている。SARS-CoVでは、他の蛋白質もウイルス粒子エンベローブに組み込まれることが報告されているが⁽¹²⁾。

3. CoVの細胞内増殖環(図2)

a. 細胞内侵入及び脱殻

CoVには幾つかの異なる分子が受容体として働くことが報告されている。例えば、MHVのCEACAM1 (carcino-embryonic antigen-related cell adhesion molecule 1), TGEVやHCoV-229EのAPN (aminopeptidase N)、SARS-CoVのACE2 (angiotensin converting enzyme 2),

MERS-CoVのDPP-4 (dipeptidyl peptidase 4)などが知られている⁽¹³⁾。各CoVはそれぞれの特異的受容体に結合後、S蛋白の生物活性により、エンベローブが細胞質膜か細胞室内のエンドゾーム/ライソゾーム膜と融合し、ge-RNAがサイトゾル内に放出(脱殻)される⁽¹⁴⁾。

b. mRNA合成(転写)

脱殻したge-RNAから翻訳されたRNA polymeraseなどにより、ゲノムと相補的な(-)鎖RNAが合成され、それを鋳型として、ge-RNA、sg-mRNAが合成される。mRNAは、ge-RNAをmRNA-1として、それより小さなmRNAが数本~数十本存在する。その構造は、ゲノムRNAの3'側から異なる長さで5'末端に伸長し、どのmRNAもge-RNAの5'末端に持つ約70ベースからなるleader配列を有する。この構造は、3'-coterminal nested setと呼ばれる(図3)。アルテリウイルスのmRNA構造も同様であるが、トロウイルスでは5'末端のleader配列を欠いている。上述したようなCoVのmRNA構造では、あるmRNAはそれより一つ小さいmRNAの全てのORFを含み、更に5'末端にそのmRNA特異的なORFを持っている。

CoVの転写機構で議論が多いのは、mRNAにどのような機構でge-RNA 5'末端のリーダー

配列が付加されるかということである。最初に提唱されたのは、ge-RNAに相補的な(-)鎖RNAから、その3'末端からleader配列と同じ短い(+)鎖RNA (free leader RNA)が合成され、leader RNAの3'末端にあるtranscription regulatory sequence (TRS)が(-)鎖RNA上にあるTRSと相補的な部位に結合し、(+)鎖RNA合成が3'末端まで伸長しmRNAとなる、という機構であった^(15, 16)。この転写機構は、(-)鎖RNAはゲノムに対応する分子のみが検出され、mRNAに相補的な(-)鎖RNAは存在しないという実験結果に基づいたと仮説である。その後、RNA解析手法が進歩し、各mRNAに相補的な(-)鎖RNAが見つかったことで⁽¹⁷⁾、ge-RNAを鋳型として、各sg-mRNAに相補的な(-)鎖RNAが最初合成され、その(-)鎖RNAを鋳型として、それに相補的なsg-mRNAが合成されるという機構が提唱された。この場合にも、TRSが大きな役割を果たしていると考えられている。現在、どちらの転写機構が正しいのかを立証した実験はない。

c. 非構造蛋白の合成と解裂(図4)

CoVの蛋白合成は基本的に、各

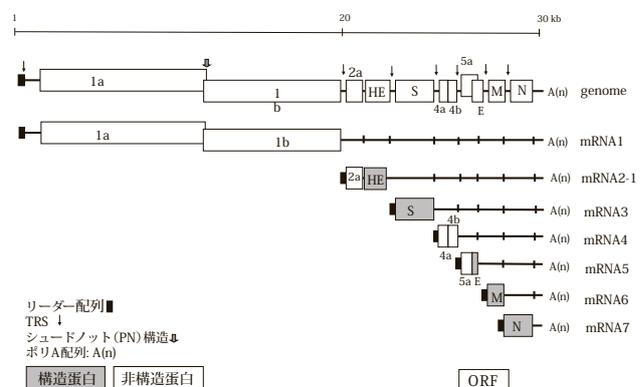


図3: mRNAの構造(3' coterminal nested set)とsg-mRNAからの翻訳 (MH-JHM株の場合): ge-RNAは約30kbからなり、各sg-mRNAはge-RNA 3'末端から異なる長さで5'末端に伸長する8本のmRNAからなる。この構造を3' co-terminal nested setと呼びNidovirus目の共有する特徴である。各mRNAの5'末端に特異的なORFからのみ蛋白合成が行われる。通常のmRNAの特異的ORFは1個であるが、複数の場合もある。例えば、mRNA5は2個のORFから2種類の異なる蛋白質を合成する。

sg-mRNAの5'末端にあるORFだけが翻訳される。ge-RNA (mRNA-1)の5'末端には2個の巨大ORF、即ちORF1a (496kDa蛋白をコード)と1b (362kDa蛋白をコード)が存在する。mRNA-1からは1a蛋白が翻訳されるが、1b蛋白だけが翻訳されることはない。ORF1aと1bの間には複雑な3次構造をしたpseudoknot (結び目のような構造)があり、この構造のためリボソームがCoV ge-RNAの翻訳を進める際、一定の確率でframe-shiftをおこし、1aの終止コドンが読まれることがなく、1bのORFが引き続き読まれることになる。即ち、CoVのge-RNAからは、1aと1a+1bの2種類の蛋白が翻訳される。両者の割合は1aが1a+1bと比べ、数倍高いとも言われている。1aは自らの蛋白分解酵素であるnsp-3 (non-structural protein-3: papain-like proteases)とnsp-5 (main protease)によりnsp-1からnsp-11までの非構造蛋白に開裂する。また、1a+1bはnsp-1~10に加えnsp-12~16までの蛋白に開裂される(図4)⁽⁸⁾。RNA-dependent RNA polymerase (nsp-12)やhelicase (nsp-13)は1b領域から開裂産物として産生される。これらの多くの非構造蛋白はウイルス

増殖に必須であったり、その効率を亢進させる機能があると思われる。SARS-CoVの5'末端から産生されるnsp1蛋白は、細胞のmRNA分解を促進することにより、細胞の遺伝子発現を抑制することが報告されている⁽¹⁸⁾。

d. 構造蛋白の合成

mRNA-2より小さなsg-mRNAの5'末端のORFは、一般に構造蛋白をコードしている。ウイルス種により、ORFの数が異なるので、CoVの基準株MHV (MHV-JHM株)を例に挙げると、3番目mRNAからはS蛋白、5番目からE蛋白、6番目からM蛋白、7番目からN蛋白が翻訳される。例外として、mRNA4、mRNA5では5'末端に2つの特異的なORFを持つ。例えば、MHV-E蛋白はmRNA5の5'特異的な2つのORFの下流のORFから翻訳される(図3)。CoV mRNAは最小のもの(MHVではmRNA7)を除き、複数のORFを持ちながら、原則的に5'末端の遺伝子しか翻訳されないことから、構造的にはpolycistronであり、機能的にはmonocistronである。

e. 粒子の形成

CoV粒子は、小胞体からゴルジ装置に至る小腔(ER-Golgi intermediate compartment: ERGIC)内へと出芽(budding)することにより形成される(図2)。ge-RNAに相補的な(-)鎖RNAからge-RNAが複製され、更にmRNA7から合成された多量のN蛋白がge-RNAと結合し、ヌクレオキャプシド

が形成され、ERGICの膜上に存在するM蛋白の細胞質内ドメインと結合し、更に、S蛋白とM蛋白もお互いの細胞質内ドメインで結合し、ERGIC腔内へ出芽することにより、感染性粒子が産生される^(8,16,19)(図2)。出芽には、E蛋白質の重要性も報告されている。M蛋白はERGICに親和性があり、合成後この部位に留まるが、S蛋白はERGICから細胞質膜まで輸送され、膜融合活性を持つS蛋白は、隣接する細胞のウイルス受容体と結合し、細胞融合を誘導する。小腔内に出芽した粒子はその後、exocytosisにより子孫ウイルスとして細胞外に放出される。最近、PEDVの細胞外放出に関して、細胞膜結合性のプロテアーゼや細胞外に存在するプロテアーゼが細胞からのウイルス放出に重要であることが報告されている⁽²⁰⁾。

4. 病原性

CoVには様々な病原性を示すウイルスが含まれている。多くのウイルスは、呼吸器か消化器に親和性を示すが、病原性の強いウイルスは少ない。表1中では、各属の代表的なウイルスを挙げたが、ヒト、家畜、家禽、ペット、実験動物領域で病原性が高く、問題となっているのはα属ではPEDV、TGEV、FIPVで、β属ではSARS-CoV、MERS-CoV、MHV、γ属ではIBVであろう。また、SARS発症後にコウモリから分離、検出されたウイルスは、αかβ属に属するが、家畜、ヒトに対する病原性はわかっていない。各ウイルス或いはウイルス感染症の詳細に関しては、本誌の特集シリーズとして今後紹介される予定なので、こちらをお読み頂きたい。

あとがき

CoV研究は、効率よくウイルスが増殖する培養細胞が見つからなかったこと、ゲノムが巨大であるた

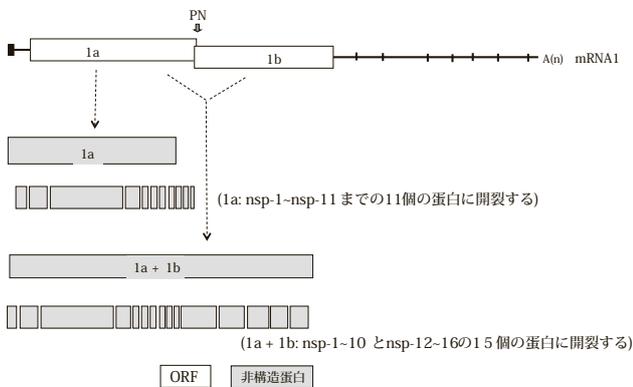


図4:ゲノムRNA (mRNA-1)からの蛋白合成:ge-RNAは5'末端に巨大ORF1aと1bを持ち、その間にはpseudoknot(PN)が存在する。蛋白翻訳は、通常1aの終止コドンで終了するが、20-30%の確立で、PN構造のためframe-shiftが起こり、1a終止コドンが読まれず、引き続き1bの翻訳へと続き、1a+1b蛋白が出来上がる。これらの巨大蛋白は自らが持つプロテアーゼにより、16種類の蛋白に解裂される。

めreverse geneticsの開発が困難なことから、他のウイルスと比べ、分子生物学的な解析は遅れた。しかしながら、幸か不幸か、SARS-CoVの出現により、増殖の分子機構、病原性の解析など基礎的な研究はかなり急速に進み、更に2012年に出現したMERSにより、CoV研究は一層盛んになった。幾つかのCoVでは受容体が同定され、細胞侵入機構についても明らかにされた。CoVの多くは、ヒト、家畜、ペットなどに、主に呼吸器系と消化器系の疾病を引き起す起すが、その病原性発現機構はまだ不明な点が多い。今後これらのCoVの感染機構や病原性発現機構を明らかにしていくことは、その予防、防御法の確立にとって不可欠である。

1. Ksiazek TG et al. (2003) A novel coronavirus associated with severe acute respiratory syndrome. *New Engl. J. Med.* 348: 1953-1966
2. Lau SKP et al. (2005) Severe acute respiratory syndrome coronavirus-like virus in Chinese horseshoe bats. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 102: 14040-14045
3. Ge XY et al. (2014) Isolation and characterization of a bat SARS-like coronavirus that uses the ACE2 receptor. *Nature.* 503:535-540
4. Zaki A et al. 2012 Isolation of a novel coronavirus from a man with pneumonia in Saudi Arabia. *New Engl. J. Med.* 367: 1814-1820
5. Huang YW et al. 2013. Origin, evolution, and genotyping of emergent porcine epidemic diarrhea virus strains in the United States. *MBio* 4:e00737-00713.
6. Tyrell DA et al. (1968) Coronaviruses. *Nature (Lond.)* 220: 650
7. Cavanagh D (1997) Nidovirales: a new order comprising coronaviridae and Arteriviridae. *Arch. Virol.* 142: 629-33
8. Masters P (2006) The molecular biology of coronaviruses. *Adv. Virus Res.* 66 193-292
9. Barcena M et al (2009) Cryo-electron tomography of mouse hepatitis virus: Insights into the structure of the coronavirus. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 106: 582-7
10. Risco C et al. (1996) The transmissible gastroenteritis coronavirus contains a spherical core shell consisting of M and N proteins. *J. Virol.* 70: 4773-77
11. Smits SL et al. (2005) Nidovirus sialate-O-acetyltransferases Evolution and substrate specificity of coronaviral and toroviral receptor-destroying enzymes. *J.Biol. Chem.* 280: 6933-41
12. Weiss SR and Navas-Martin S. (2005) Coronavirus pathogenesis and the emerging pathogen severe acute respiratory syndrome coronavirus. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 69: 635-664
13. Raj V et al. (2013) Dipeptidyl peptidase 4 is a functional receptor for the emerging human coronavirus-EMC. *Nature* 495:251-4
14. 田口文広、松山州徳 (2009) コロナウイルスの細胞侵入機構 ウィルス 59:215-22
15. Lai MMC. (1986) Coronavirus leader-RNA-primed transcription: An alternative mechanism to RNA splicing. *BioEssays* 5: 257-60
16. Lai M.M.C and Cavanagh D (1997) The molecular biology of coronaviruses. *Adv. Virus Res.* 49: 1-100
17. Sethna PB et al. (1991) Coronavirus subgenomic minus-strand RNAs and the potential for mRNA replication. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 86: 5626-3
18. Kamitani W et al. (2006) Severe acute respiratory syndrome coronavirus nsp1 protein suppresses host gene expression by promoting host mRNA degradation. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 103:12885-90.
19. Ujike M and Taguchi F (2015) Incorporation of spike and membrane glycoproteins into coronavirus virions. *Viruses* 7:1700-25
20. Shirato K et al. (2011) Role of proteases in the release of porcine epidemic diarrhea virus from infected cells. *J. Virol.* 85: 7872-80

時代の先端を目指す研究者へのサポート

NAFO VANNY



ベトナム・中国産 カニクイザル
中国・米国産 アカゲザル

harlan™



Hannover Wistar Rat
RccHan™ : WIST

COVANCE.
THE DEVELOPMENT SERVICES COMPANY
Covance Research Products Inc.
Cumberland, VA



CRP.VAビーグル
CRP交雑犬
CRPハウンド

◎預り飼育 ◎非GLP受託試験 ◎各種実験動物 ◎実験動物器具器材

JLA 株式会社 日本医科学動物資材研究所

〒179-0074 東京都練馬区春日町6丁目10番40号
TEL. 03(3990)3303 FAX. 03(3998)2243
URL: <http://www.jla-net.com/> E-Mail: nikagaku@jla-net.com

中東呼吸器症候群 (MERS)

国立感染症研究所 ウイルス第三部 第四室

室長 松山 州徳

はじめに

中東呼吸器症候群 (MERS) と重症急性呼吸器症候群 (SARS) の病原体は、動物に由来するコロナウイルスである。MERS コロナウイルスはヒトコブラクダを、SARS コロナウイルスはキクガシラコウモリを自然宿主として感染しており、種の壁を越えてヒトに感染すると重症肺炎を引き起こす。

MERS とは

MERS コロナウイルスは、2012年にサウジアラビアで発見された重症の肺炎を引き起こす病原体である^[1]。現在 (2015年9月9日) までに1542人の感染者が見つかり、そのうち544人が死亡した^[2]。アラビア半島の各都市で散発的に感染者が見つかるが、病院内での医療関係者への感染も頻繁に確認されている。症例の年齢は0歳から94歳と幅広いが50歳前後で多く、男性の方が女性よりも多い。重症化するのほとんどが成人であり、年齢が高くなるほど死亡率が高い。重症化した症例の多くが併存症 (糖尿病、がん、慢性の心・肺・腎疾患など) を患っていたことも解っている。一方、15歳以下の感染者は全体の2%程度であり、その多くは不顕性感染か軽症である。

今のところ MERS の治療薬やワクチンはないが、これは特別なことではない。数ある呼吸器ウイルスの中で今までに抗ウイルス薬やワクチンが開発された例はほとんど無く、インフルエンザウイル

スでのみ実現されているのが現状である。MERS コロナウイルスによる肺炎を発症した人は、他の肺炎ウイルスに感染した時と同様に、対症的な治療を受けることになる。

感染源

これまでに MERS コロナウイルスが検出された動物は、ヒトとコウモリとヒトコブラクダである。コウモリについては、サウジアラビアのコウモリ (*Taphozous perforatus*) から MERS コロナウイルスと同一の遺伝子断片が検出されているが^[3]、コウモリとヒトの直接の接触は少なく、ヒトへの感染源であるとは考え難い。一方、ヒトコブラクダについては、中東とアフリカの広範囲に棲息する大多数の個体から MERS コロナウイルスに対する抗体が検出されている^[4]。それぞれの地域でヒトから見つかるウイルスと、ラクダから見つかるウイルスの遺伝子の特徴が一致することから、ラクダが感染源であることは疑いのない事実であるといえる。アメリカで行われたヒトコブラクダへの感染実験では、ラクダは鼻風邪になり、ウイルスが35日間にわたって鼻腔に存在することが確認された^[5]。サウジアラビア人の抗体保有率調査では、市中での抗体陽性率、つまり感染した経歴のある人は0.15%であるが、ラクダ食肉処理業者では3.6%とかなり高い。また抗体陽性者の平均年齢は42歳なのに対

し、発症者と家庭内感染者の平均年齢は55歳であった。このことから、ウイルスはまずラクダ取り扱い業者に不顕性感染し、その家族の高齢者に感染することで重症肺炎を引き起こし、さらに高齢者が病院に行くことにより院内感染を引き起こしているという感染経路モデルが考えられている¹⁶⁾。

日本のヒトコブラクダ

我々は、日本国内に棲息するヒトコブラクダがMERSコロナウイルスを保持している可能性を排除するために、全国の動物園と鳥取砂丘のヒトコブラクダから検体を入手し、検査をおこなった。鼻腔ぬぐい液と糞便にウイルス遺伝子は検出されず、血清中にもウイルスに対する抗体は見つからなかった¹⁷⁾。日本国内のヒトコブラクダの個体数は30頭程度であり、それぞれが小さい集団で飼育されているため、ウイルスが伝播する可能性は極めて低い。過去5年間にラクダの輸入実績は無く、MERSコロナウイルスが国内ラクダの中で維持されているとは考え難い。

コロナウイルスについて

そもそもコロナウイルスは、我々の身の回りに棲息するあらゆる動物に蔓延しており、それぞれの動物に特有の種類が存在している。多くの場合、それぞれの動物では軽症である。ヒトのコロナウイルスは4種類(229E、NL63、OC43、HKU1)が知られているが、いずれも全世界的に蔓延している普通の風邪の病原体である。MERSコロナウイルスもラクダの集団では風

邪を引き起こすだけの病原体である。SARSコロナウイルスも同様で、コウモリでは取るに足らない病気であるが、ヒトに感染して重症肺炎を引き起こすようになったと考えられる。人類は最近の13年で少なくとも二度の動物由来コロナウイルスによる重症肺炎のアウトブレイクを経験したわけであり、潜在的な脅威は自然界に少なからず存在していると思われる。一方、強い病原性のコロナウイルスの発生が繰り返し見られる動物もある。子ブタに下痢症を引き起こすコロナウイルス、ブタ伝染性下痢症(PED)は、アジアで稀に発生するが、この3年ほどで南北アメリカ大陸とアジアで大流行し、アメリカ合衆国では700万頭、日本では40万頭もの子ブタが死亡したといわれている。現在も発生は続いており、完全に終息させることは容易ではない。

コロナウイルスは通常、種の壁を超えて感染することはほとんど無いにもかかわらず、MERSコロナウイルスは多くの種類の動物に感染する潜在性をもっている。これまでに確認された感染可能な動物の細胞は、ヒト、サル、ウマ、ラクダ、ヤギ、ウサギ、ブタ、コウモリであり、他のコロナウイルスに例を見ない宿主範囲の広さである^{18,9)}。

実際に動物個体にどの程度感染するのは解らないが、このウイルスが日本に侵入した場合、万が一にもブタやウマに感染しないように気をつけたほうが良さそうである。

MERSとSARSの違い

電子顕微鏡で観察できる形態からMERSとSARSを区別することはできない。典型的なコロナウイルスの形態であり、脂質二重膜のエンベロープに包まれた直径100nmの楕円形で、エンベロープ表面に王冠に似た突起を持つ(図1)。プラス鎖の1本鎖RNAをゲノムに持ち、その大きさは30kbとRNAウイルスの中では最大サイズである。遺伝学的特徴からコロナウイルスは α 、 β 、 γ 、 δ のグループに分けられるが、MERSとSARSは同じ β コロナウイルスに属している。

MERSとSARSは重症の肺炎を引き起こす点において同じである。糖尿病や心臓病の基礎疾患をもつ人で重症化することや、子供では軽症であることも同じである。またそれぞれのウイルスによく似たウイルスがコウモリから検出される点においても同じである。一方、病気の発生頻度や伝播の様子は異なる。SARSは一人の

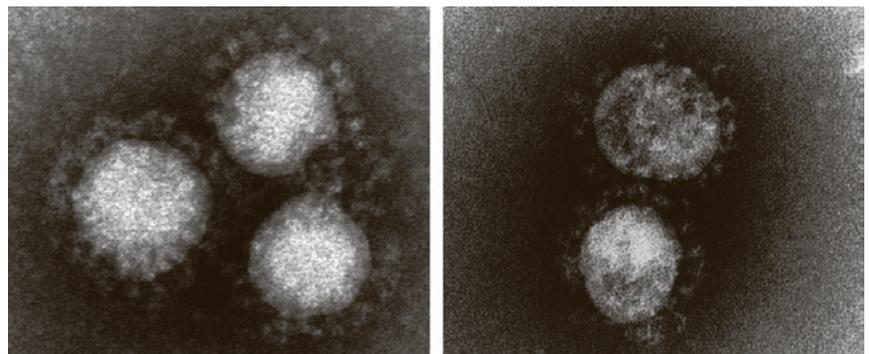


図1. MERS(左)及びSARS(右)コロナウイルスの電子顕微鏡写真(国立感染症研究所提供)

感染者から十数人に感染を広げるスーパースプレッダーを介して、持続的に人から人へ感染が広がったのに対し、MERSは時間をあけて別々の地域で散発的に感染者が見つかる。人から人への感染も見られるが、家族や病院での濃厚接触による感染のみである。院内感染の例では、1人から10人以上に感染したこともあるが、市中においては肺炎患者から肺炎患者を連続的に生じさせるような感染は起こっていない。また、SARSの流行した期間は2002年の1月から翌年の7月ごろであり、短期間で8,098人に感染し、急速にピークを迎えて消えていったのに対し、MERSは1例目が確認されてから3年の間、毎日のように少数の感染者が見つかり続けている。それぞれのウイルスの特徴を表1に示す。

韓国での感染拡大

2015年5月から7月にかけて、韓国の病院でMERSコロナウイルスの感染拡大が見られたことは記憶に新しい。アラビア半島に旅行した1人の帰国者から185人に感染が広がり、そのうち36人の死亡が確認された。これまでも世界各国からの旅行者がアラビア半島で感染し、帰国後に発症した例は報告されているが、それぞれの国でヒトからヒトに感染した数は多くても3人であり、韓国での185人への感染は、想定外の事態であった。韓国でMERSの感染拡大は病院の中だけであり、特に多くの人に感染を広げたのは、3人だけである。大多数の感染者は他人に感染を広げていないし、市中にウイルスを広げた様子も見られな

かった。季節性インフルエンザが数週間で世界中に広がることに比べると、MERSコロナウイルスの伝播力は極めて弱いといえる。

WHOによる調査

9月9日から13日にかけて、韓国では世界保健機関(WHO)による調査がおこなわれ、感染拡大の原因が報告された。1つ目の指摘として、最初の感染者の発見が遅れたことが挙げられた。遅れた原因は、医師の予備知識や検査対応のルールが不十分であったためである。最初の感染者はMERSと診断される前に3つの病院を渡り歩き38人に感染を広げたことがわかっている。2つ目の指摘として、患者が適切な診療を求めて次々と病院を渡り歩く、「ドクターショッピング」の常態化が挙げられた。1例目の感染者のみならず、今回MERS陽性が確定した人の中には病院を渡り歩いた例が何人も確認されている。さらに3つ目の指摘として、多くの家族や知り合いが緊急治療室にまでお見舞いに来ることが挙げられた。今回病院内で感染した人の34%は家族や友人であった。他にもWHOの指摘には、病室の空調の不備や、家族による付き添い看護が挙げられている。このような医療事情が病院内での感染拡大を生み出す原因になったと考えられる。

日本への侵入と検査体制

今のところMERSはアラビア半島だけで地域流行している病気であるといえる。この病気が終息する気配は全く見られないことに加え、中東地域のラクダにウイル

スが蔓延していることから、日本人の旅行者が感染して帰国する可能性は十分に考えられる。厚生労働省は迅速にMERSの検査がおこなえるように、日本国内の地方衛生研究所と政令指定都市の保健所72箇所、および検疫所16箇所にPCR検査セットを配布した。さらに感染症法を改正してMERSを「2類感染症」とし、感染した人やその疑いのある人に対して入院措置や就業規制をおこなえるようにした。MERS疑い例として検査される患者は、「38度以上の発熱と急性呼吸器症状に加え、14日以内にアラビア半島及び周辺国に渡航した人」である。MERS感染が疑われる患者から検体が採取され、リアルタイムPCRによるウイルス遺伝子の検出がおこなわれる。

おわりに

今後、日本国内でMERS感染者が見つかる可能性は多分にあると思われる。韓国の事例から、感染拡大の防止にはMERS感染者の早期発見と適切な隔離が大切であることは明らかである。医療関係者と検査担当者の情報共有と迅速な対応は当然のことであるが、加えて一般の人、特に中東からの帰国者にも協力をお願いしたい。MERSを発症したかもしれないと思っても、すぐに病院へは行かず、まずは保健所や検疫所に電話で相談し、指示に従って適切に行動していただくことである。関係者が情報を共有し、コミュニケーションすることで、MERSのみならずあらゆる感染症のリスクを抑え込むことができるはずである。

表1. ヒトに感染するコロナウイルスの特徴

	MERS(中東呼吸器症候群)	SARS(重症急性呼吸器症候群)	229E, OC43, NL63, HKU1(鼻風邪)
発生年	2012年～現在(2015年8月)	2002年～2003年	毎年
発生地域	アラビア半島とその周辺	中国広東省	人類に蔓延している
死亡者/感染者	495 / 1382	774 / 8098	不明 / 70億?
感染者の年齢	0～94歳, 平均50歳	0～100歳, 平均41歳	多くは5歳以下
症状	重症: 高熱, 肺炎, 腎炎, 下痢	重症: 高熱, 肺炎, 下痢	軽症: 鼻風邪, 上気道炎
重症者の特徴	糖尿病等の慢性疾患, 高齢者	糖尿病等の慢性疾患, 高齢者	通常は重症化しない
感染経路	咳, 飛沫, 接触	咳, 飛沫, 接触	咳, 飛沫, 接触
伝播の特徴	限定的な人から人への感染	持続的な人から人への感染	持続的な人から人への感染
潜伏期間	2～14日	1～10日	数日(不明)
自然宿主	ヒトコブラクダ	キクガシラコウモリ	ヒト
ヒト-ヒト感染	1人→1人以下(濃厚接触)	1人→数人(不特定多数)	1人→多数

参考文献

- Zaki AM, van Boheemen S, Bestebroer TM, et al. 2012. Isolation of a novel coronavirus from a man with pneumonia in Saudi Arabia. N. Engl. J. Med. 367:1814-20.
- 2012-2015 Case List of MoH/WHO Novel Coronavirus MERS nCoV Announced Cases - FluTrackers.
- Memish ZA, Mishra N, Olival KJ, et al. 2013. Middle East respiratory syndrome coronavirus in bats, Saudi Arabia. Emerg. Infect. Dis. 19:1819-23.
- Reusken CBEM, Messadi L, Feyisa A, et al. 2014. Geographic distribution of MERS coronavirus among dromedary camels, Africa. Emerg. Infect. Dis. 20:1370-4.
- Adney DR, van Doremalen N, Brown VR, et al. 2014. Replication and shedding of MERS-CoV in upper respiratory tract of inoculated dromedary camels. Emerg. Infect. Dis. 20:1999-2005.
- Müller MA et al., Presence of Middle East respiratory syndrome coronavirus antibodies in Saudi Arabia: a nationwide, cross-sectional, serological study. Lancet Infect Dis. 2015 Jun;15(6):629.
- Shirato K et al., Middle East respiratory syndrome coronavirus infection not found in camels in Japan. Jpn J Infect Dis. 2015;68(3):256-8.
- Barlan A, Zhao J, Sarkar MK, Li K, et al. 2014. Receptor variation and susceptibility to Middle East respiratory syndrome coronavirus infection. J. Virol. 88:4953-61.
- Chan JF-W, Chan K-H, Choi GK-Y, et al. 2013. Differential Cell Line Susceptibility to the Emerging Novel Human Betacoronavirus 2c EMC/2012: Implications for Disease Pathogenesis and Clinical Manifestation. J. Infect. Dis.

私たちは「実験動物技術者集団」です。

We are Technologist of Laboratory Animals.

みなさまの開発・研究のためのパートナーとして、
医療や科学の明るい未来のお手伝いを致します。

- 実験動物総合受託事業
- 技術者派遣事業
- 職業紹介事業



本 社 〒160-0022 東京都新宿区新宿5丁目18番14号 新宿北西ビル7階 TEL 03-6457-3751 FAX 03-6457-3752
 西日本事業部 〒530-0001 大阪府大阪市北区梅田1丁目11番 4-1100号 大阪駅前第四ビル 11階 10号室 TEL 06-4799-9820 FAX 06-4799-9011
 九州事業部 〒814-0021 福岡県福岡市早良区荒江3丁目11番 31号 シティーガーデン荒江 701号 TEL 092-831-8865 FAX 092-831-8867

【一般労働者派遣事業 (総) 13-080297】
【有料職業紹介事業 13-ユ-080309】

 株式会社 アニマルケア
www.animal-care.co.jp

●お気軽にお問い合わせください

 0120-011419

ARRIVEガイドライン —動物実験の再現性向上のために—

順天堂大学大学院 医学研究科 アトピー疾患研究センター
准教授 久原 孝俊

東京大学大学院 農学生命科学研究科 実験動物学研究室
教授 久和 茂

プロローグ

Nature 誌（2013年8月1日号）において、「医学生物学論文の70%以上が再現できない」という衝撃的なニュース記事が掲載された：医学生物学において、少なくともひとつだけ再現性のある事実がある——実験結果を再現することができない研究が連綿としておこなわれているという事実である¹⁾。

ドイツの製薬企業バイエル社が2011年におこなった内部調査によると、67のプロジェクトの約2/3において、関連する前臨床試験の正当性を確認することができなかった。2012年には、米国の製薬企業アムジェン社の科学者たちは、がんに関する53編の重要な論文の実験結果のうち、89%は再現することができなかったと報告した。

研究資金提供機関である米国国立保健研究所（NIH）は、たとえば臨床研究へとつながるような基礎研究に関しては、研究費を提供する前に実証実験を要請することを検討している。NIHのこのようなトップダウン方式の改革に対して、ある企業は、ボトムアップ方式の改革をとうろくとしている。す

なわち、科学者たちが自分たちの研究結果を第三者機関に実証してもらうことを希望するか否かを検討し始めたのである。

2012年、NIHは2回のワークショップを開催し、研究結果の再現性の問題に関する分析をおこなった。そして2012年10月、NIHの幹部たちは、動物実験がかかわる研究費申請や論文発表に際しては、さらに厳しい基準を設けることが必要であることを提唱した。その基準においては、少なくとも、動物がどのように無作為化されたか、実験処置は盲検化されたか、1群匹数をどのように決定したか、そしてデータ処理はどのようにおこなったか等について記載すべきであることが提唱されている。

さらに、2014年6月6日付“The Chronicle of Higher Education”に小さな、しかし興味深い記事が掲載された²⁾。

NIHは、主要な科学雑誌（*Nature* 誌や *Science* 誌を含む）の編集者を招集し、研究の再現性に関する一連のガイドラインに署名をさせた。NIH所長Francis S. Collinsは、

（2014年）6月5日、半年に1回開催される諮問委員会において、次のように語った。「およそ40名の編集者たちが、各誌に発表された論文の再現性を保証するための責務に関する基本的条項に合意した」と。しかしCollinsは、それらの条項の内容については詳述しなかったし、またそれらの文書の配布もおこなわなかった。*Science* 誌の代表者は、それらの原則はまだ素案であると考えられるという理由により、その内容については公表しなかった。

Collinsは、各誌の編集者たちがそれぞれの科学雑誌において、過去に発表された論文の再現性に関する調査記事を掲載することに関して協議をしたと述べた。さらに多くの科学雑誌においても同様な改善を進めることによって、科学研究の信頼性はさらに向上するであろうとつけ加えた。

科学実験の再現性の問題は、いまに始まったことではない。よく知られている例として、2005年にスタンフォード大学内科学教授のJohn P. A. Ioannidisは、*PLOS Medicine* 誌に科学論文の分析結

果を発表し、実験結果には誤りが多いことを指摘した³⁾。Collins およびNIH副所長のLawrence A. Tabakは、2014年1月、*Nature*誌において、医学生物学研究の分野における実験の再現性を保証するシステムは複雑であり、適正に機能していないので、改善をする必要があると記載した⁴⁾。

今回の科学雑誌の編集者たちとの協議は、NIHが資金を提供する研究の質を向上させ、かつ研究費の提供を公平に実施するためにNIHがおこなっているいくつかの活動のうちのひとつにすぎない、とCollinsは諮問委員会で述べた。科学雑誌編集者たちとの協議は、ひきつづき開催される予定であり、今後は製薬企業の代表者も参加することになっている。NIHの担当者たちは、科学研究の再現性を向上させるための方策について、製薬企業からも意見を求める意向であり、また製薬企業が望まない結果が得られたときにも、それらの結果を製薬企業が透明性をもって公表すべきであることを強調している。さらに、NIHの研究者たちに対して、論文の数よりも質が重要であることを強調した。

NIHにおけるこのような動きは、現在の科学研究における過熱競争への対抗策として執られたものである。Collinsは言う、「そのような過熱競争のもとでは、科学者および科学雑誌編集者ともに論文の発表を急ぐあまり、論文の正確性や完璧性の保証が充分になされなくなるのではないだろうか。

そしてこの問題は、とくに動物実験において顕著である」。このことは、人間の安全性や費用に大きな影響を及ぼす。

NIH諮問委員会委員のひとりであるエール大学内科学教授Harlan M. Krumholzは、「実験結果を再現することができないことは、かならずしも、当該科学者/実験者が不正をしたことを意味するものではない。しかしNIHは、この再現性の問題を改善するために努力をしなければならない立場にある」と述べた。

ARRIVEガイドライン

上記「医学生物学論文の70%以上が再現できない」ということに関して、最近は欧米において、「ARRIVE (Animals in Research: Reporting *In Vivo* Experiments) ガイドライン」⁵⁾のことがしばしば話題になっており、2014年10月に米国テキサス州サンアントニオにて開催された第65回米国実験動物学会(AALAS)大会においてもしばしば話題となった。翻って、わが国においては、一部の人は「ARRIVEガイドライン」のことをよく知っているものの、一般的には(わが国の)動物実験/実験動物関係者のなかには、「ARRIVEガイドライン」のことをよく知らない人たちも少なくないのではないだろうか。「ARRIVEガイドライン」をすべてそのまま、わが国の論文投稿システムなどにとり入れる必要があるか否かは別としても、まずわが国の動物実験/

実験動物関係者に「ARRIVEガイドライン」の内容を周知することが肝要であると考えられる。以下、簡単に「ARRIVEガイドライン」のことを紹介したい。

過去10年のあいだに、医学生物学関連の論文の発表のしかたが不適切であることがさまざまな分野において指摘されてきた。このことは、かならずしも臨床研究分野にかぎられたことではない。実験方法を適切に論文に記載しないことによって、科学的、倫理的、あるいは経済的に大きな損失が生じる。このことは、とくに動物実験において顕著である。

英国の「3Rs 研究センター」(National Centre for the Replacement, Refinement and Reduction of Animals in Research: NC3Rs)の調査によると、無作為に抽出した271編の論文のうち、研究の目的、使用動物匹数、動物の性質(たとえば、種、系統、性別、年齢、体重等)などを記載した論文は、わずか59%であったという⁶⁾。さらに、大部分の論文において、動物を無作為に抽出(群分け)したこと(「無作為化」)、またはブラインドで実験を実施したこと(「盲検化」)が明記されていなかった(87%または86%の論文において、それぞれ「無作為化」または「盲検化」について明記されていなかった)。統計学的処理について適切に記載していた論文はわずか70%であった。

査読者による精査(ピアレ

ビュー)によって、これまで論文の質が保たれてきた。したがって、科学界は論文のなかに必要な情報がすべて含まれていることを保証しなければならない。しかし、どのようにしてそのような必要な情報をすべて論文に記載するシステムを確立するかが大きな課題である。

論文のなかにどのような情報を記載すべきかということに関するガイドラインは、研究者(論文執筆者)や査読者が論文を書いたり査読をしたりする際に大いに役立つことが示されている。過去10年のあいだに、そのようなガイドラインがいくつか作成されてきた。

現在のところ、医学生物学関連の学術雑誌のなかで、動物実験に関連してどのような情報を記載すべきかについてガイドラインを明確に示している雑誌は少ない。たとえば、調査をした271編の論文において、使用動物匹数を記載した論文はわずか4%であった。そのような背景のなかにおいて、2010年、ARRIVEガイドラインが作成された。ARRIVEガイドラインには、20項目にわたるチェックリストが掲載されている(表1)。動物を使用した研究に関する論文には、これら20項目の情報を記載すべきである。

ここで、注意しなければならないことがある。それは、ARRIVEガイドラインは、柔軟性をもって、広範囲な研究領域および実験プロトコルの報告に対応するべきものであり、絶対的規範ではな

いということである。すなわち、本チェックリストの項目のなかには、かならずしもすべての研究にあてはまらないものもあるということを理解しておかなければならない。また、ARRIVEガイドラインを適用することによって、科学の自由な創造性が抑圧されるようなことがあってはならない。

エピローグ

ARRIVEガイドラインは、下記URLにて閲覧することができる。

<https://www.nc3rs.org.uk/arrive-guidelines>

このウェブサイトを見ると、ARRIVEガイドラインの中国語版、イタリア語版、ポルトガル語版、スペイン語版も掲載されている。筆者らは、まずARRIVEガイドラインのことをわが国の関係者に周知することが肝要であると考えた。そこで、本年(2015年)1月、NC3Rsの科学部長(Science Manager)であるKatie Lidster博士にARRIVEガイドラインの日本語版をNC3Rsのウェブサイトに掲載することを提案したところ、ただちに、「それは、素晴らしいアイデアです。日本語版ARRIVEガイドラインは、きわめて有益なものとなることでしょう」という返信をいただいた。われわれが作成した日本語版ARRIVEガイドライン(表1)は、現在、客観的な第三者によるチェックを受けている。近い将来、NC3RsのウェブサイトにARRIVEガイドライ

ンの日本語版が掲載されることであろう。本稿に掲載されているARRIVEガイドライン(表1)には、今後、若干の修正が施されるかもしれない。まずは、わが国の関係者がARRIVEガイドラインを読んで、どのようなかたちで、わが国の論文投稿システムなどにとり入れるべきかを真摯に検討していただきたい。生命や生物は、本質的に個体差(バラツキ)を内包している。だからこそ、われわれ科学者は、医学生物学研究の再現性をできるかぎり向上させるために、最善の努力を怠ってはならないのである。

文献

1. M. Wadman: *Nature* 500, 14–16, 2013.
2. P. Basken: *The Chronicle of Higher Education*, 6 June, 2014.
3. J. P. A. Ioannidis: *PLOS Medicine* 2(8): e124. doi:10.1371/journal.pmed.0020124, 2005.
4. F. S. Collins *et al.*: *Nature* 505, 612–613, 2014.
5. C. Kilkenny *et al.*: *PLoS Biol* 8(6): e1000412. doi:10.1371/journal.pbio.1000412, 2010.
6. C. Kilkenny *et al.*: *PLoS ONE* 4(11): e7824. doi:10.1371/journal.pone.0007824, 2009.

表1. NC3Rs ARRIVEガイドライン(動物実験:In Vivo実験の報告)

項目	推 奨
標題	1 論文の内容をできるかぎり正確かつ簡潔に記載すること。
要旨	2 背景、研究の目的(使用した動物種および系統の詳細を含む)、主たる方法、主要な知見、ならびに研究の結論を正確に要約すること。
緒言	
背景	3 a. 研究の動機および状況が理解できるように、十分な科学的背景(先行研究に関連する参考文献を含む)を含めること、かつ実験の方法および実験の論理的根拠を説明すること。 b. 使用する動物種および動物モデルがなぜ、どのようにして科学的目的を達成することができるのか、また必要に応じて、当該研究とヒトとの関連について説明すること。
目的	4 当該研究の主目的および副次的目的、ならびに検証しようとする仮説について明確に記載すること。
方法	
倫理的陳述	5 当該研究にかかわる、倫理的審査に関する許可の種類、関連する免許(例:動物(科学実験)法1986)、および動物のケアと使用に関する国または機関のガイドラインを明示すること。
研究計画	6 それぞれの実験について、次の項目を含む研究計画の詳細を簡潔に記載すること。 a. 実験群および対照群の数 b. 動物に処置を割り振る際(例:無作為な群分け)および結果を評価する際(例:盲検を実施した場合は、誰がいつ盲検を実施したか)に執られた、主観的な先入観による影響を最小限にするための措置 c. 実験単位(例:1匹の動物、1群の動物、または1ケージ内のすべての動物)。 どのようにして複雑な研究計画を実施したかを示すためには、時系列表またはフローチャートが有用であろう。
実験処置	7 実験および実験群(対照を含む)に関して、実施したすべての処置について正確かつ詳細に記載すること。たとえば、 a. どのように(例:薬剤の処方と用量、投与の部位と経路、使用した麻酔薬および鎮痛薬(薬物の効果を確認する方法を含む)、外科処置、安楽死法)。使用した特別な機器の詳細情報(供給業者を含む)を記載すること。 b. いつ(例:時刻) c. どこで(例:ホームケージ、実験室、水迷路) d. なぜ(例:使用した麻酔薬、投与経路、薬剤の用量などを選択した根拠)
実験動物	8 a. 使用した動物の詳細情報(種、系統、性別、発育段階(例:齢の平均値または中央値および齢の幅)、および体重(例:体重の平均値または中央値および体重の幅)を含む)を記載すること。 b. 関連情報を記載すること。たとえば、動物の供給元、国際的系統名、遺伝子変異の状態(例:ノックアウトまたはトランスジェニック)、遺伝子型、健康および免疫状態、投薬を受けていないことまたは 実験に使われていないこと、以前に行われた処置等。
住居および飼養	9 次の項目に関する詳細情報を記載すること。 a. 住居(施設のタイプ:例:特定病原体フリー(SPF);ケージまたは住居のタイプ;床敷の材料;同一ケージ内の動物数;魚類用水槽の形状および材質等) b. 飼養条件(例:繁殖プログラム、明暗サイクル、温度、魚類のための水質等、飼料のタイプ、給餌・給水方法、環境エンリッチメント) c. 実験前、実験中、または実験後に実施された、福祉に関連する評価および介入
サンプルサイズ	10 a. 実験において使用した動物の総数、および実験群における動物の数を明確に記載すること。 b. サンプルサイズを算出するための詳細情報を含め、どのようにして動物数を決定したか説明すること。 c. 該当する場合は、実験を何回に分けて実施したか明示すること。
実験群への動物の振り分け	11 a. どのようにして動物を実験群に振り分けたか詳細に記載すること(該当する場合は、無作為な群分けまたは群のマッチングを含む)。 b. 異なる実験群の動物の処置や評価を実施した順序を記載すること。
実験の帰結	12 評価した主たる実験の帰結および副次的な実験の帰結(例:細胞死、分子マーカー、行動の変化)を明確に示すこと。
統計学的方法	13 a. 解析に利用した統計学的方法を詳細に記載すること。 b. 統計処理したデータセットに関して、解析単位を明確に記載すること(例:1匹の動物、1群の動物、1個の神経細胞)。 c. データが統計学的手法の前提を満たしているか否かを評価するために利用した方法を記載すること。
結果	
基本データ	14 実験群に関して、処置または実験の前の、関連する動物の特性および健康状態を報告すること(例:体重、微生物学的状態、ならびに投薬を受けていないことまたは実験に使われていないこと)。(これらの情報は、多くの場合、表にすることができる。)
解析した数	15 a. 解析に使用した各群における動物の数を報告すること。絶対数を報告すること。(例:10/20;50%は不可。) b. 解析に含まれていない動物またはデータが存在する場合には、その理由を説明すること。
結果および評価	16 実施した解析の結果を精度とともに報告すること(例:標準誤差または信頼区間)。
有害な事象	17 a. 重要な有害事象について詳細に記載すること。 b. 有害事象を減少させるためになされた実験プロトコルの修正について記載すること。
考察	
解釈/科学的含意	18 a. 研究の目的および仮説、最新の理論ならびに関連する研究成果(文献)を考慮に入れながら結果を解釈すること。 b. 研究の限界(可能性のある先入観の原因、動物モデルの限界、および結果に関連する不正確さを含む)について意見を記述すること。 c. 研究における動物を用いない代替法への置換、動物に対する苦痛の軽減、もしくは動物数の削減(3Rs)に関して、当該実験方法または実験結果の意味するところについて記載すること。
一般化の可能性/外挿	19 ヒトとの関連性を含めて、当該研究の知見を他の動物種または他の器官・器官系に外挿することができる可能性があるか否か、およびどのようにして外挿することができるかについて意見を記述すること。
資金調達	20 当該研究におけるすべての資金源(助成金番号を含む)を列挙し、すべての資金提供者の役割を記載すること。

日動協と私

元公益社団法人日本実験動物協会 参与 関 武浩

そもそも私が勤めていた会社（日本農産工業）が社団法人日本実験動物協会（日動協）の会員であったことから日動協という名前は知っておりました。平成8年（1996）の後楽園会館で開催された日動協の総会には代表権行使者の代理として出席した記憶があります。そのときは私が日動協で働くことになるとは思っても見なかったことでした。日動協事務局の仕事をして見ないかと誘われたのは、平成15年の10月であり、結局日動協でお世話になった期間は11年8か月となりました。当初の面接での印象は場所が狭いこと、事務所の人員が少ないこと、またパソコン等事務設備が充実していないことでした。また、前任者の神林さんは3月末までは勤めるとのことであり、私の勤め始めは3月ごろからとっていました。11月4日から来て欲しいと言われたことには正直驚きました。3月末までは引き継ぎということもあったのでしょうか、机もなく、日本実験動物技術者協会関東支部の机を借りるかまたは隣の部屋の会議室（元和室）の机を利用するかの状況でした。このような状況、雰囲気ですべていつまで続けられるかの思いもありました。

その当時の事務局長は宮本伸昭 常務理事であり、就任してから4か月たったばかりの時期のようでした。宮本常務理事も事務室が狭い、設備が不十分と思われていたのでしょうか、私を待っていたかの如く事務所の改修をしたい、パソコンについて改善したいなどの相談がありました。私は未だ臨時雇いであり日動協に慣れていないにもかかわらず、私が担当するのが当然のような雰囲気を取り組みが始まりました。そのため、サーバを管理している社団法人中央畜産会（中畜）にも状況を伺いに同行しました。日動協のパソコンは平成9年に情報提供拠点整備事業の助成を得て中畜のネットワーク（LIN）に参加し、インターネットのアクセス権を得たものであり、パソコンは2台設置されているものの、インターネット接続は1台のみでした。既に、民間企業ではネット社会への対応が必須とされ、パソコンなしの事務業務は考えられませんでしたので、早急にパソコンの増設、更新並びに事務所内LANの構築を行い、事務の効率化に取り組みました。私は、日動協の仕組みが判らず、どのように取り組めばよいかを相談しながら進めたものでした。

一方、事務所は日本実験動物協同組合から賃借しているのですが、個人用住宅を事務所に改修したもので、事務室と会議室は別の部屋になっておりました。会議室は狭くその上コピー機、印刷機も置いてありましたので日常事務においてコピーをとるのも面倒な状態でした。このような状況から、洋室と和室の仕切り壁を取り払い、床、壁、天井のリフォームを行うこととなりました。それに先立ち壁際、会議机の下に置いてある書類、小冊子等を整理し、不要なものは捨てました。この選別等により日動協のこれまでの流れが少し判ってきました。事務所の改造は平成16年2月の祭日、週末の3日間で行い、その工事に立会いましたが、工事中は事務所内に居場所がなく、工事のチェックも必要であることから遠くには行けず、寒い思いをしたことを思い出します。

その後、ファクシミリをロール式からコピー紙使用機種への変更、電話回線を1回線から2回線に変更等事務所機能を充実させました。これらパソコン等の整備される前は日動協教育セミナーフォーラムの案内等は文書が主体であり、セミナーの場合、会員、賛助会員、実験動物1級・2級技術

者向け文書は約5,000通におよび、費用もさることながら発信業務も大変なものでした。前任者はパソコンもなくこのような業務をよくこなして来たものと思いました。

日動協の組織には感心いたしました。総会、理事会、運営会議があり、会社等ではその下に部、課などがあるのですが、日動協では各専門委員会が設置され、その任務は各分野の専門的事項について調査、報告、遂行することを任務としております。事務局も提言いたしますが、各専門委員会等で企画、提言された業務を共に遂行するという体制であり、非常に弾力的かつ柔軟的に運用されております。例えば、平成15年度の組織では専門委員会として、「生産利用技術開発小委員会」、「教科書改訂小委員会」がりましたが、平成16年度ではこの二つの小委員会は役目を終えたとしてなくし、新たに「実験動物福祉・調査評価委員会」、「20周年記念行事準備委員会」および「インストラクターWG委員会」を発足させております。

日動協の業務内容は現在、実験動物福祉調査・評価、実験動物利用計画審査、生産対策、モニタリング技術、請負・派遣対策、情報(LABIO 21)、情報開示、教育・認定と多岐にわたりますが、何れも各関係の専門家が委員として携わり、企画・提言・業務の遂行をして頂いております。事務局の人員が少ないながらも、日動協が多

くの業務を担って行けるのはこのシステムと各専門委員の先生方や指導員の方々等の協力によるものです。すなわち、日動協は人と人との繋がりで事業を推進してきているということです。理事・監事18名、専門委員約60名(理事等は重複)、教育・認定関係における技術指導員約230名であり、これらの方々には何らかの形で協力をして頂いています。教育・認定制度における、実験動物技術者資格認定試験の試験方式の変更(各地における学科試験の実施等)、1級試験における大学特例制度の実施、高度技術者研修(モルモット、ウサギ、ブタ)の開催、各種実習テキストの作成等は教育・認定委員会の委員および技術指導員の方々がいって成し得たことです。これら制度の改革において、委員会で企画が提案されて、事務局でできるかどうか問われた場合、私はまず実行することを前提にして取り組みました。私も教育・認定の制度改革等において、その一員として加えて頂いたことに喜びを感じています。

また、LABIO 21の作成、20周年記念誌、30周年記念誌の作成は情報委員会(元情報専門委員会)の担当ですが、私はLABIO 21のNo.16から事務局の一員として企画・編集に携わらせて頂きました。今回、日動協を離れるまでNO.61までの企画から発送まで関わりましたが、各号とも10数

名の執筆者に原稿、校正依頼等を行ってきました。その方々は延べ数百名になると思いますが、今から考えると非常に協力的な方が多く、多くの方々の協力があったLABIO 21が発行されてきたものと思います。また、企画会議、割付編集会議の終わった後は毎回と言っていいほど、有志により懇親会を行っておりました。特に、割付会議の後の懇親会は次回の企画に留まらず実験動物業界の裏話など、LABIO 21の紙面にはそのまま掲載できないような話を毎回お伺いすることができました。それは本当に楽しいひとときでした。これらの話は録音し、何らかの形で後世に残したいと言っていたのですが、これだけは実現させることができず残念に思います。

11年8か月間は日動協20周年記念行事の準備等に始まり、今回の30周年記念式典を終えて役目を終えたということで大きな感慨を覚えます。この間、名刺、メールアドレス、住所録などを見ますと約1,000名の方々とやり取りがあったと思われれます。30周年記念式典ではそのうちの120名の方々に会ってきたことは望外の喜びでした。そして、在職中に皆様方とお会いできたことそしてお教えいただいた数々のことなどは私の大切な財産となりました。紙面を借りて御礼申し上げます。

私の研究

フグ毒テトロドキシンの体内動態解析： トラフグを用いた毒化モデル実験

東京海洋大学 海洋科学部 食品生産科学科

教授 長島 裕二

県立広島大学 生命環境学部 環境科学科

助教 松本 拓也

はじめに

フグは無形文化遺産に登録された「和食」のシンボルで、芸術的な薄作りのフグ刺し、体の芯まで温まるフグ鍋、魚とは思えない食感の唐揚げ、さらに、皮から抽出したコラーゲン(ゼラチン)豊富な煮凝り、熱燗のひれ酒、極めつけは西施乳と言われる白子焼きと、フグは日本の食と食文化を語るには欠かせないのでできない食材である。その一方で、古くから「フグは喰いたし、命は惜しし」と言われるように、毒魚としても有名である。現在でも毎年フグ中毒が起こり、悲しいことに死者も出ている¹⁾。

わが国の食の安全確保を担う食品衛生法に従えば、フグは毒をもつため原則食用禁止である。しかし、日本では古くから食経験があり、フグを安全に食するための除毒技術が確立されており、行政においては厚生労働省が食用できるフグの漁獲海域、種類、部位を定め、その上で各地方自治体がフグの取り扱い者ならびに施設に資格を与え、厳重な安全確保の対策がとられているので、例外的に食用が許可されている。このことを知らずに素人判断での調理や注意を怠ったときに中毒事故が起こる。上述のフグのフルコースは専門店に出向かないと味わうことはむずかしいが、有毒な部位を取り除き安全に加工されたフグ刺しやフグ鍋材料はデパ地下、スーパーマーケット、通販などで販売されているので、家庭でも安心してフグ食

を楽しむことができる。

フグの毒化機構はいまだ謎に包まれた部分が多い。フグ毒の本体はテトロドトキシン(tetrodotoxin, TTX)(図1)で、フグはTTXを自ら産生するのではなく、主に餌を介して体内に取り込み、高濃度のTTXを肝臓や卵巣など特定の組織に蓄積する^{2, 3)}。今のところ、自然界におけるTTXの第一次生産者は海洋細菌と考えられており、これを起点とした食物連鎖によってTTXは生物濃縮され、フグが毒化すると推測されている(図2)。しかし、フグ毒は何を原料にしてどのように作られるのか？フグはどうやって毒をもつようになるのか？そもそもフグはいったい何のために毒をもつのか？という根本的な疑問についてはっきりとした答えがないのが現状で、多くの研究者がフグの毒化機構を明らかにしようと精力的に研究を進めている。本稿では、筆者らが行ってきたトラフグを実験動物として

用いた毒化モデル実験の一部を紹介する。なお、フグ毒に関する図書や総説が多数出版されているので、興味のある方は参考にさせていただきたい^{2,8)}。

フグの毒化モデル

トラフグは完全養殖(親魚から卵を採り、人工授精させて孵化した仔魚を飼育して、性成熟した成魚から産卵(採卵))できる数少ない魚種である。このため、人工的に孵化させ、TTXとの接触を絶った条件下で飼育すると、TTXをもたない無毒のトラフグが作出される。この無毒トラフグにTTXを含む餌あるいはTTXを含まない餌を与えると、前者は毒化されて主

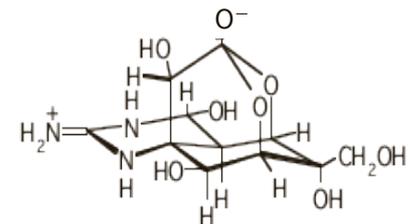


図1 テトロドトキシンの構造



図2 フグの推定毒化経路 (文献4から転載)

として肝臓にTTXを蓄積したが、後者は無毒のままであった⁹⁻¹¹⁾。同様にして、一般魚のイシダイ、マアジ、マダイにTTX含有の餌を与えてもTTXを蓄積しなかった^{5, 12)}。これらの結果から、トラフグは元来TTXをもたず、外部からのTTX摂取によって毒化することが明らかになった。そして、フグは他の魚にはない毒化の特別な働きがあることが示唆された。

TTXがフグに対して外来性異物であるなら、フグはどのようにしてTTXを体内に取り込み、肝臓など特定の組織に蓄積するのだろうか？ 著者らは、TTXの体内動態を定量的に評価するため、薬剤の挙動や体内分布を速度論的に評価する薬物動態解析法を導入し、麻酔下の養殖トラフグにTTXを投与して、同一個体から経時的に採血するin vivo実験モデルを構築した。

TTXの血管内投与

最初の試みとして、TTXの血管内投与実験を行った。トラフグ(体重約1kg)の肝門脈にTTX(0.25～0.75mg TTX/kg体重)を急速単回投与すると、血中TTX濃度は投与直後が最も高く、30分以内に急激に低下した後、緩やかに減少し、300分後には投与直後の1/100程度にまで低下した¹³⁾(図3)。血中TTX濃度を対数プロットするとグラフは曲線になり、投与後初期に急速にTTX濃度が減少する“分布相”と、その後緩やかに減少する“消失相”が認められた。このことから、トラフグではTTX投与直後から血液と速い分布平衡をとる組織と、分布平衡になるのに時間のかかる組織があることが示唆された。投与TTX量を増加させると、血中TTX濃度は投与したTTX量に依存して上昇することも明らかになった。

300分間の観察終了後に肝臓を取り出してTTX量を測定したところ、投与量の約60%が肝臓に検出され、血管内に投与したTTXの過半が300分後には肝臓に移行していることが確認された。また、肝臓のTTX蓄積量はTTX投与量と相関していたことから、投与したTTX量(0.25～0.75mg TTX/kg体重)では、肝臓へのTTX蓄積は飽和しておらず、トラフグ肝臓の高いTTX蓄積能がうかがえた。

紙面の都合上、結論しか記載しないが、トラフグ肝門脈にTTX(0.25～0.75mg TTX/kg体重)を投与したときの全身クリアランスは約2000 μ l/min/kg体重、平均滞留時間は約130 min、定常状態の分布容積は約240ml/kg体重と見積もられ、投与したTTX量の間には有意な差はみられなかった($p > 0.05$)。

TTXの消化管内投与

フグが餌を介して毒化するのであれば、経口的に摂取したTTXは消化管で吸収される。そこで、TTXの消化管投与実験を行った。トラフグ(体重約1kg)の消化管にTTX(0.25mg TTX/kg体重)を急速単回投与すると、投与3分後に血中からTTXが検出され、投与30分後に血中TTX濃度は最大(0.46 \pm 0.10ng TTX/ μ l)となり、その後減少し、トラフグ消化管で

TTXは速やかに吸収されることがわかった¹³⁾(図4)。

次に、TTX投与量を0.50および1.00mg TTX/kg体重に増加しても、最大血中濃度はそれぞれ0.45 \pm 0.06ng TTX/ μ lおよび0.53 \pm 0.11ng TTX/ μ lとなり、0.25mg TTX/kg体重のときとほとんど変わらなかったが、最大血中濃度到達時間は投与30分後から150分後に大きくシフトした(図4)。消化管内に投与したTTXがどの程度吸収されて循環血液に到達したのかを“バイオアベイラビリティ”(生物学的利用能)で評価できる。これは静脈投与を1(100%)として、消化管内に投与された薬物のうち全身循環血に到達した割合を表す。0.25mg TTX/kg体重投与のときのバイオアベイラビリティは62%と見積もられ、0.50mg TTX/kg体重では84%、1.00mg TTX/kg体重では42%となった。このことから、トラフグ消化管はTTXを効率的に吸収するものの、TTX吸収には飽和性があることが明らかになった。また、消化管内に投与されたTTXの半分は投与300分後に肝臓から検出された。すなわち、トラフグはTTXを消化管で効率よく吸収し、血液で運搬し、比較的短時間で肝臓に移行させることをin vivoモデル実験で定量的に評価することができた。

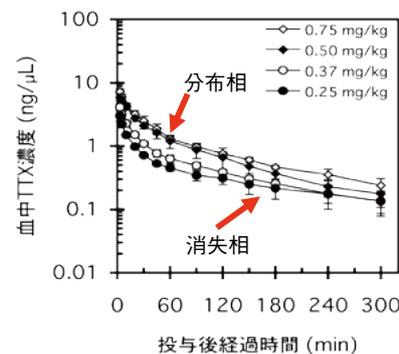


図3 テトロドトキシン肝門脈単回投与時の血中テトロドトキシン濃度の経時変化データは平均値 \pm 標準誤差(n=3)で示す。(文献4から転載)

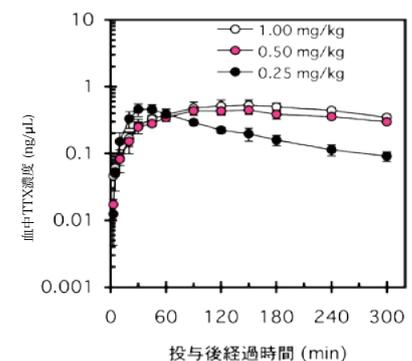


図4 テトロドトキシン消化管内単回投与時の血中テトロドトキシン濃度の経時変化データは平均値 \pm 標準誤差(n=3)で示す。(文献4から転載)

TTXの組織間分布

フグでは肝臓以外の組織にも毒が分布しており、過去の給餌飼育による毒化実験でも、肝臓以外の内臓、生殖巣、皮にTTXが蓄積することが報告されている^{9,11)}。そこで、フグに投与されたTTXが組織間どのように分布するのかを調べるため、トラフグ(体重870~1120g)の肝静脈にTTX (0.25mg TTX/kg体重)を単回投与し、血中および組織中のTTX濃度を測定した¹⁴⁾(図5)。この実験では、前述の実験とは異なり、サンプリングした個体から各組織を摘出するため、サンプリング時間で個体は異なる。

血中TTX濃度は経時的に減少し、腎臓および脾臓のTTX濃度は血中TTX濃度に並行して低下した。筋肉および皮では60分間の実験中、TTX濃度に有意な増減は認められず、両組織ともに低いレベルで推移した。一方、肝臓のTTX濃度は血中TTX濃度の減少に反して経時的に増加する傾向を示し、投与60分後の肝臓TTX量は投与量の63±5%を示した。この結果から、トラフグの組織は以下に示すように、TTXに対して3つの異なった働きをしていることがわかる。

- ①血中濃度と同じ挙動を示す体循環コンパートメント(腎臓、脾臓)
- ②血液からTTXを濃縮して蓄積する抹消コンパートメント(肝臓)
- ③血中TTX濃度と瞬間的な分布平衡が成立しない抹消コンパートメント(筋肉、皮)

コンパートメントとは、薬物動態において同じ挙動を示す組織を1つの区画(コンパートメント)とみなしたものである。

胆汁へのTTX排出

フグが長期間肝臓にTTXを

蓄積し続けることは、給餌飼育実験で実証され、一度体内に蓄積されたTTXは、TTXの投与を中止しても長期間体内に保持される¹⁵⁾。このことから、トラフグでは、TTXの排出は起こりにくいと考えられる。しかし、トラフグ幼魚(平均体重99.5g)にトリチウムラベルしたTTX (0.25mg相当)を腹腔内投与した実験では、投与1時間後のTTX濃度は消化管、腹側の皮、肝臓で高かったが、6日後では胆嚢のTTX濃度が最も高く、皮全体に最も多くのTTXが蓄積されていた¹⁶⁾。この結果は、トラフグ幼魚では肝臓ではなく皮にTTXを蓄積することを見出したもので、トラフグの幼魚と成魚でTTXの蓄積パターンが異なることを示唆した。これについては、その後、Ikedaら¹⁷⁾およびTatsunoら¹⁸⁾によって確認された。TTXをトラフグ幼魚(4ヶ月齢、体重13.2±3.4gおよび6ヶ月齢、体重53.5±6.9g)に筋肉内投与および経口投与してTTXの体内分布を調べた結果、いずれの場合においても、TTXは投与直後に肝臓へ蓄積されるものの、次第に肝臓のTTX濃度は減少し、皮のTTX濃度が高くなることを観察し、トラフグの幼魚と成魚で異なるTTX蓄積パターンを示すとともに、TTXは肝臓から皮へ移行、運搬されることを示唆した。

そこで、筆者らは、トラフグ幼魚(6ヶ月齢、体重81.5±2.0g)にTTX (0.25μg TTX/g体重)を筋肉注射して、組織間のTTX濃度を24時間測定した¹⁹⁾。その結果、血中TTX濃度は、投与1時間後が最も高く(0.53±0.15μg TTX/ml)、その後漸減した(図6A)。肝臓のTTX濃度は血中濃度と同様の挙動を示し、投与1時間後の1.59±

0.10μg TTX/gを最高値として減少傾向を示した。反対に、胆汁のTTX濃度は投与1~8時間後まで直線的に増加し、投与8時間後に0.39±0.05μg TTX/mlに達した。そして、投与24時間後まで高いレベルを維持しており(図6B)、トラフグ肝臓のTTXは一部胆汁へ排出されることを証明した。

トラフグ成魚では、投与されたTTXのほとんどが肝臓に蓄積し、皮にはほとんど分布しないので、TTXは肝臓から胆汁へ排出されないのだろうか?しかし、天然トラフグの成魚は胆嚢(胆汁)も有毒であることから、胆汁へのTTXの移行は起こっているものと推測される。この点については、今後検討する必要がある。

最後に

以上の結果をもとに、トラフグにおけるTTXの体内動態(予想図)を図7にまとめた。トラフグに経口的に摂取されたTTXは消化管で吸収され、肝門脈から肝臓に取り込まれ、特異的に蓄積濃縮される。しかし、TTXは肝臓に留まるのではなく、胆汁や肝静脈に排出される。胆汁に排出されたTTXは消化管で吸収されて再び肝臓に運ばれ腸肝循環を繰り返すため、

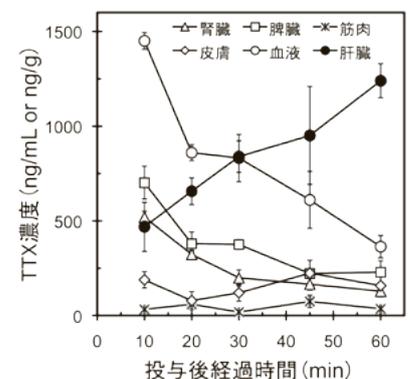


図5 テトロドトキシン肝静脈単回投与時の血中ならびに組織中のテトロドトキシン濃度の経時変化
データは平均値±標準誤差(n=4)で示す。
(文献4から転載)

肝臓のTTX濃度は高いレベルを維持しているものと推測される。

一方、肝静脈から体循環に入ったTTXは各組織に運搬され、腎臓や脾臓では血中濃度と並行した挙動をとる。一般に、薬物が体内から消失する主要な経路は、肝臓での代謝、肝臓から胆汁への排出、そして、腎臓から尿への排泄と言われていることから、TTXがトラフグの腎臓から尿へ排泄されるか興味もたれる。卵巣では性成熟に伴って組織が発達すると肝臓からTTXが運ばれ、高濃度の特異的な蓄積が起こ

る。しかし精巣にはそのような働きがないようである。トラフグ成魚では皮や筋肉はTTXを蓄積しないと考えられるが、幼魚では皮がTTXを濃縮する抹消コンパートメントを構成している。トラフグ体内でのこうしたTTXの運搬や組織への取り込み、保持、蓄積には様々な機能的タンパク質が関与していると推測される。トラフグは全ゲノムが解析、公表されているので、遺伝子情報を活用することで毒化メカニズムが明らかにされる日も近いと期待される。

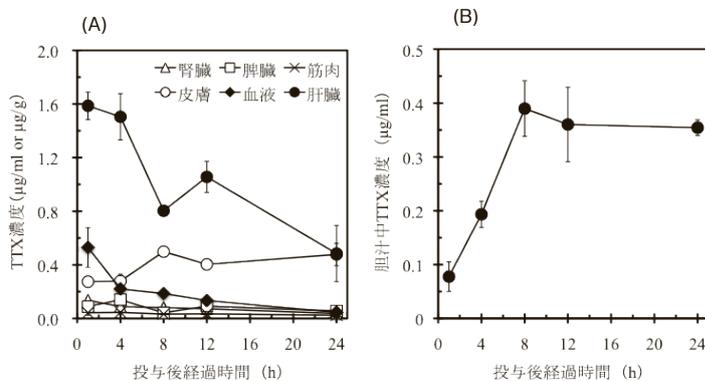


図6 テトロドトキシン筋肉単回投与時の血中ならびに組織中のテトロドトキシン濃度の経時変化 (A) と胆汁のテトロドトキシン濃度の経時変化 (B) データは平均値±標準誤差 (n=3) で示す。

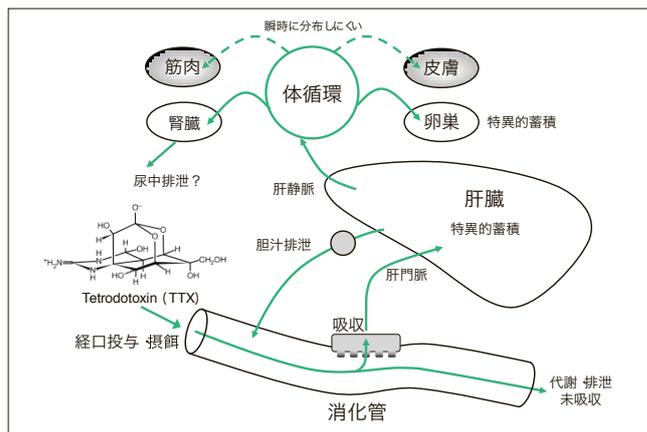


図7 トラフグにおけるテトロドトキシンの体内動態 (予想図)

文献

1) 登田美桜, 畝山智香子, 豊福 肇, 森川 馨: わが国における自然毒による食中毒事例の傾向 (平成元年~22年). 食品衛生学雑誌, 53, 105-120 (2012).
 2) T. Noguchi, O. Arakawa: Tetrodotoxin-Distribution and accumulation in

aquatic organisms, and cases of human intoxication. Mar. Drugs, 6, 220-242 (2006).
 3) V. Bane, M. Lehane, M. Dikshit, A. O' Riordan, A. Furey: Tetrodotoxin: Chemistry, toxicity, source, distribution and detection. Toxins, 6, 693-755 (2014).

4) 長島裕二, 松本拓也: フグ毒化機構解明に向けた最近の研究. Foods & Food Ingredients Journal, 218, 266-275 (2013).
 5) 野口玉雄: フグはなぜ毒をもつか. 日本放送出版協会, 1996.
 6) 野口玉雄: フグはフグ毒をつくらぬ. 日本水産学会監修, ベルソープックス 036, 成山堂書店, 2010.
 7) 塩見一雄, 長島裕二: 新・海洋動物の毒. 成山堂書店, 2013.
 8) 松浦啓一, 長島裕二編著: 毒魚の自然史. 北海道大学出版会, 2015.
 9) T. Matsui, S. Hamada, S. Konosu: Difference in accumulation of puffer fish toxin and crystalline tetrodotoxin in the puffer fish *Fugu rubripes rubripes*. Nippon Suisan Gakkaishi, 47, 535-537 (1981).
 10) S. J. Lin, T. Chai, S. S. Jeng, D. F. Hwang: Toxicity of the puffer *Takifugu rubripes* cultured in Northern Taiwan. Fish. Sci., 64, 766-770 (1998).
 11) 本田俊一, 荒川 修, 高谷智裕, 橋勝康, 八木基明, 谷川昭夫, 野口玉雄: テトロドトキシン添加飼料投与による養殖トラフグ *Takifugu rubripes* の毒化. 日本水産学会誌, 71, 815-820 (2005).
 12) T. Noguchi, O. Arakawa, T. Takatani: TTX accumulation in pufferfish. Comp. Biochem. Physiol. D1, 145-152 (2006).
 13) T. Matsumoto, Y. Nagashima, Y. Kusuhara, S. Ishizaki, K. Shimakura, K. Shiomi: Pharmacokinetics of tetrodotoxin in puffer fish *Takifugu rubripes* by a single administration technique. Toxicol., 51, 1051-1059 (2008).
 14) T. Matsumoto, Y. Nagashima, Y. Kusuhara, S. Ishizaki, K. Shimakura, K. Shiomi: Evaluation of hepatic uptake of tetrodotoxin in the puffer fish *Takifugu rubripes*. Toxicol., 52, 369-374 (2008).
 15) 山森邦夫, 河野迪子, 古川 清, 松居 隆: 結晶テトロドトキシン経口投与による養殖クサフグ稚魚の毒化. 食品衛生学雑誌, 45, 73-75 (2004).
 16) S. Watabe, Y. Sato, M. Nakaya, N. Nogawa, K. Oohashi, T. Noguchi, N. Morikawa, K. Hashimoto: Distribution of tritiated tetrodotoxin administered intraperitoneally to pufferfish. Toxicol., 25, 1283-1289 (1987).
 17) K. Ikeda, Y. Murakami, Y. Emoto, L. Ngy, S. Taniyama, M. Yagi, T. Takatani, O. Arakawa: Transfer profile of intramuscularly administered tetrodotoxin to non-toxic cultured specimens of the pufferfish *Takifugu rubripes*. Toxicol., 53, 99-103 (2009).
 18) R. Tatsuno, M. Shikina, Y. Shirai, J. Wang, K. Soyano, G. N. Nishihara, T. Takatani, O. Arakawa: Change in the transfer profile of orally administered tetrodotoxin to non-toxic cultured pufferfish *Takifugu rubripes* depending of its development stage. Toxicol., 65, 76-80 (2013).
 19) T. Matsumoto, A. Kiriake, S. Ishizaki, S. Watabe, Y. Nagashima: Biliary excretion of tetrodotoxin in the cultured pufferfish *Takifugu rubripes* juvenile after intramuscular administration. Toxicol., 93, 98-102 (2015).

実験動物産業に貢献した人々(20)

柳田知司

YANAGITA Tomoji (1930～)

柳田知司博士の前臨床医学研究への貢献

初めて私が柳田先生にお会いしたのは、先生がまだ30代半ばだったと思います。米国ミシガン大学医学部薬理学教室での研究に区切りをつけ、帰国されたところでした。当時のミシガン大学では、Seevers教授が薬物依存に関する研究を推進され、ここはその領域の世界的拠点でした。米国では、大戦前から薬物依存、薬物乱用が深刻な個人的ならびに社会的問題でしたので、このような課題に取り組む研究は重視され、米国政府からも多額の研究費が投入されていたと聞いております。

ミシガン大学での柳田先生は、アカゲザルを用いた薬物静脈内自己投与方法という薬物依存研究における核心的技術を確立され、これをベースに薬物依存研究を大きく発展されました。この方法により、これまでは不可能とされていた乱用薬物あるいは依存性薬物（モルヒネ、コカイン、アンフェタミン類、アルコール、ニコチンなど）のひきおこす精神依存（薬物に対する強迫的摂取欲求）を、脳の高度に発達したアカゲザルを用いて客観的に観察できるようにされました。

先生は、栃木県足利市の医者

家系に生まれ、1955年に慈恵会医科大学を卒業されて、上記ミシガン大学に留学されました。当時の留学は、通常は1年ないし2年で帰国し、出身大学にもどるのが決まったパターンと聞いております。しかし、先生は、そこでの実績と魅力に富んだ人柄、さらには抜群のコミュニケーション能力により、Seevers教授から、5年間もひきとめられました。当時、ミシガン大学は、日本人研究者（とりわけ薬理学教室出身者）の留学先としては、一つの中心地だったようですが、柳田先生は、その面倒見の良さなどから、ミシガン大学日本人会でも、中心的存在のおひとりだったようです。

米国でも注目されていた柳田先生は、National Institute of Mental Health (NIMH) の研究費を獲得され、日本での研究拠点を探しておられました。当時、我が国の実験動物学のパイオニアである野村達次先生が、実験動物中央研究所（実中研）の敷地の一部を柳田先生の研究を発展させる場として提供されました。このとき、野村先生は、実験動物学体系の中で温められておられた中心的コンセプトの「ヒト疾患モデル動物」と「*in vivo* 実験医学」を柳田先生の構想の

中に見いだされ、それに強く共感し、そこに賭けられたと思います。かくして、実中研医科学部門が1967年に誕生しました。

さて、柳田先生は、まずアカゲザルを中心とした薬物依存研究を中心におき、そのほかには、齧歯類を用いた薬理学的研究をスタートされました。当初から、持続的な研究発展のためには財政基盤の確立が不可欠と考えられ、製薬会社と連携しながら新規中枢神経薬候補物質の依存性評価や薬理作用検索に関する受託試験も実施されました。やがて研究や業務の範囲も毒性試験/安全性試験にも広がり、部門の名前も前臨床医学研究所と変わって行きました。この段階では、精神薬理部、薬理部のほかに、病理毒性部、血液化学部なども整備され、医師、獣医師、薬剤師、臨床検査技師などのみならず、心理学、工学、応用数学（コンピュータ）、理学部、農学部などの大学卒業者も加わりました。筆者もその中の一人で、大学では心理学を専攻しました。柳田先生は、異分野の若い人たちを積極的に採用され、前臨床医学研究所は、やがて総数でおおよそ100名くらいとなりました。当時の日本社会では普通だった所員旅行、忘年会などでは、柳田先

生が率先して会をもちあげ、あるときは歌を唄い、またあるときは踊りをみずから披露されました。このほかにも先生は積極的に会合をもち、若い人たちに仕事の進め方のみならず、生き方について、またお酒の楽しさについて語り合う機会を設けられました。

柳田先生は、日本薬理学会で常に薬物依存に関する研究発表をリードされ、当時から数千人規模の学会では、実中研は、薬物依存や精神薬理学の研究発表に関して中心的な機関の一つに高められました。先生は、薬理学会以外では、日本神経精神薬理学会、日本臨床薬理学会、その他多くの学会や研究会の創設と運営、発展に貢献されました。また、CINP (The International College of Neuropsychopharmacology) などの国際学会の日本での開催成功に、その学問的実績、抜群の知名度、英語表現力、人脈などのフル活用により、大きく貢献されました。

当時の前臨床医学研究所で、他に先駆けて先生が推進されたことを、私の視点で思いつくままに二つあげてみたいと思います。一つは、行動薬理学的研究にコンピュータを導入されたことです。当時のコンピュータは、厳密な温湿度管理下の大きな専用施設に、物量としては圧倒するような IBM などの大型マシンがあり、簡単にはだれもが利用できる代物ではありませんでした。先生は、いち早く、米国 Digital Equipment Cooperation

(DEC) 社製の PDP 8 というラボラトリーコンピュータ導入を決断され、それを扱う優秀なシステムエンジニアも採用されました。そのお陰で、アカゲザルやラットを使用した行動薬理実験の制御、データ解析のシステムが構築でき、当時の我が国では新しい領域であった行動薬理学研究が、実中研において推進されて行きました。

もう一つは、前臨床医学研究所は、1970年代に米国 Food and Drug Administration (FDA) の動向を踏まえて、GLP (Good Laboratory Practice) 体制を整備し始めたことが挙げられます。実験データの正確性、保管性、網羅性という医薬品の安全性評価試験のみならず、科学的データの根幹でもあるコンセプトの重要性を、柳田先生はいち早く認識されておられました。これは、当時の米国の流れに歩調を合わせたものでしたが、わが国ではまだ他にはそのような体制整備を始めたところは多くはありませんでした。上記の二つの事例は、いずれも我が国で初めて、多くの時間と費用をかけて、試行錯誤の中で整備されました。

前臨床医学研究所の発展は、日本の高度成長期と波長をあわせて歩んだ時期がありましたが、1990年代後半になると景気にかげりが見えてきました。また、医薬品の安全性に関する前臨床試験を GLP 体制下で実施する受託試験機関も多数出現し、GLP のお墨付きを受けたデータなら、どこのものでも同じであるとい

う本来あるべき標準化が進み、試験受託は価格競争の様相を呈してきました。前臨床医学研究所は、1989年には株式会社組織となり、財団法人の実験動物中央研究所からは独立して、経済的難局を乗り切る試みをしましたが、財政的な問題から1996年に、特別清算手続きにより閉鎖されました。

研究所閉鎖により、職を失った多くの所員は、これまでに培った思考様式、知識、技術、行動力をベースにして、それぞれ新たな職を得て、新しい職場で、再びそれぞれの道を切り開いて行きました。ここで、人の命に限りがあると同様に、組織にも寿命があることを学びましたが、その寿命は少し短すぎたかもしれません。

筆者は、前臨床医学研究所の閉鎖後に、その後の人生の時間を、名目ではなく、実質的な意味において、より充実させるにはどうしたら良いかを深く考えさせられ、その方向に向けて行動する機会を与えられたと思っています。前臨床医学研究所の存在については、現在の実中研グループの中であってさえあまり知られていません。しかし、そのような部門は確かに存在し、それが我が国の前臨床医学研究に一つの道筋をつけたこと、そこでの個人としての柳田知司博士の実践力と指導力が決定的な役割を果たしたという客観的事実を、ここに記録としてとどめさせていただきたいと考えます。

(安東 潔 記)

緊急時の飼料供給体制

日本実験動物飼料協会 事務局

日本実験動物飼料協会の緊急時における飼料供給体制について、ご紹介いたします。

当協会では、東日本大震災をきっかけとして、加盟会社間で協議し、当協会の事業継続計画(BCP)の策定や加盟会社間の緊急連絡体制の構築に取り組んでまいりました。これは、災害発生時にお客様ならびに日本実験動物飼料協会加盟会社の生産活動または試験・研究活動に支障を来たさないよう、実験動物用飼料を安定供給することが、主な目的となります。

当協会では、まず災害の規模を小、中、大の3段階に分けました。この場合の災害とは、「天災」・「事故」・「テロ」等であり、結果として実験動物用飼料の供給体制(製造または物流)に著しく支障を来たす状況を指しています。表1にそれぞれの災害規模の区分と概要を纏めました。

これらの災害規模に応じ、次の通り、加盟会社の協力体制を構築することとしました。但し、いずれ

の場合においても災害発生から3日目までに安否および被災状況の確認、そして加盟会社間での相互連絡により物流回復までの期間を想定することとしています。

(以下に述べる日数はいずれも目安であり、災害の程度、内容により対応が早まる場合もあれば、遅れる場合もあることをご了承いただきますようお願い致します。)

小規模災害発生時 この区分の場合、加盟会社の製造工場は被災していないと想定しており、主な対応は物流に関する協力体制の構築となります。上述の通り、災害発生後3日目までに物流回復までの期間を想定し、その後7日目までに、加盟会社間で共同運送便の検討や飼料の相互融通など物流協力体制を決定、構築します。本区分時には、最大1ヶ月まで協力体制を継続することを想定しています。

中規模災害発生時 この区分の場合、加盟会社の一部の製造工場が損壊することを想定しており、

小規模災害発生時の物流協力体制に加え、製造協力体制の構築が重要と考えています。災害発生後10日目までに、加盟会社間で情報共有の上、当面の物流対応と製造協力体制の検討(必要であれば外部への協力要請)を行い、30日目までに製造協力体制を構築、45日目までには運用を開始します。本区分時には、最大6ヶ月まで協力体制を継続することを想定しています。この6か月と言う期間は、先の東日本大震災において損壊した工場が復旧まで要した時間を参考に設定いたしました。

大規模災害発生時 この区分の場合、加盟会社の製造工場全てが大きく損壊することを想定しており、加盟会社の協力体制だけでは対応が困難であることから、外部との協力体制の構築が重要と考えています。本区分災害発生後10日目までに、加盟会社間で情報共有の上、当面の物流対応と外部協力の検討を行います。外部協力を検討する際には、第一に海外

表1 規模による災害の区分と概要

区分	内容
小規模災害	加盟会社の製造工場を含む地域は被災せず、加盟会社の顧客を含む地域が被災し、局所的な地震・災害により物流等が遮断される状況。復旧まで1～2週間、最大1ヶ月を想定
中規模災害	地震、津波または火災により加盟会社の一部の製造工場が損壊し、加盟会社間の製造協力体制が必要な状況。製造の復旧まで1～2ヶ月、最大3ヶ月を想定。
大規模災害	大規模な津波等で加盟会社の製造工場全てが大きく損壊し、加盟会社の協力体制のみでは対応できない状況。製造の復旧まで3ヶ月以上を想定。加盟会社のみでは対応不可の為、外部協力を求める。

実験動物飼料の輸入の可否を検討し、それが困難な場合においては、国内の畜産飼料工場での代替製造、ペットフードメーカーからの代替品購入または製造を検討します。その後30日目までに外部協力体制の構築を行い、60日目までには運用を開始します。本区分時には、最大6ヶ月まで協力体制を継続することを想定しています。以上について、フローチャートを図に示します。

これまで述べてきた通り、特に災害規模が大きくなった場合には、当協会の対応だけでは、お客様への飼料供給にかなりの時間を要してしまうことが想定されます。実際に東日本大震災の時は、津波による直接的な被害のみならず、石油製品、電気、ガス等の供給制限または港湾施設へのダメージ等により、工場の稼働、原

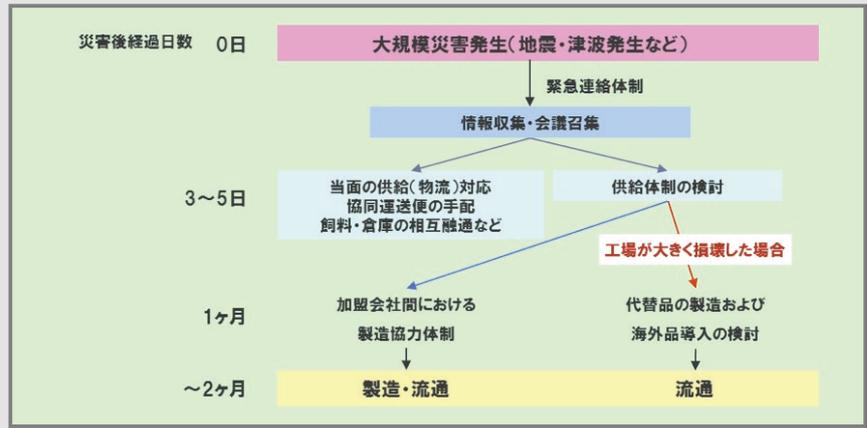


図 大規模災害発生時対応フローチャート

料供給、物流等に制限を受けるケースもございました。

当協会としては、今後も継続して、よりお客様の研究活動に支障を来さない為に、1ヶ月分の在庫を常に備蓄するよう体制を構築するなど、緊急時の方策を検討して参りますが、一方でお客様に対しても、常日頃から災害に備え、約1ヶ月分の飼料在庫を備蓄して頂けるようお願いした

いと考えています。また、当協会のBCPについても、必ずしも十分に対策が検討されつくしているとは言い難く、お客様からのご意見、ご指摘等を頂きながら、さらに充実したBCPの策定に向けて取り組んでいく所存です。今後も、実験動物用飼料の安定供給を含めた質的向上に取り組んでまいりますので、よろしくお願い申し上げます。

バイオ研究のパートナー

株式会社ケー・エー・シー

実験動物の飼育管理

研究者・技術者派遣

各種実験受託

- ◇ 遺伝子改変動物維持繁殖
- ◇ 薬理試験
- ◇ 病理標本作製
- ◇ 細胞培養
- ◇ 抗体作製

試薬提供

- ◇ 肝細胞
- ◇ ヒト肝セルラインHepaRG®
- ◇ ヒト組織・血液・皮膚
- ◇ 薬物トランスポーター
製品・受託試験
- NEW ヒト膵臓β細胞セルライン
“EndoC-BH1 cells”



□ 本社

〒604-8423
京都市中京区西ノ京西月光町40番地
TEL: 075-801-9311
FAX: 075-801-7688
E-mail: ac@kacnet.co.jp

□ 東京支社

〒110-0005
東京都台東区上野1丁目4-4
藤井ビル3F
TEL: 03-5807-7161
FAX: 03-5807-7163
E-mail: tokyo@kacnet.co.jp

□ 生物科学センター

〒520-3001
滋賀県栗東市東坂531-1
TEL: 077-558-3971
FAX: 077-558-3972
《各種実験受託》
E-mail: bseigyo@kacnet.co.jp
《試薬提供》
E-mail: shiyaku@kacnet.co.jp

詳しくは弊社ホームページをご覧ください

<http://www.kacnet.co.jp>

サル類を対象とした行動解析

サルの‘心の理論’を目の動きから探る

玉川大学 脳科学研究所 基礎脳科学研究センター
神代 真里、鮫島 和行

はじめに

‘心の理論’とは、Premack & Woodruff¹の「Does the chimpanzee have a theory of mind?」(チンパンジーは心の理論を持つのか?)という論文で提言され、‘個体の行動の目的など(心の状態)を推測する脳内システム’のことを指す。‘心の理論’を有するとは、個体が心の状態を自己や他個体に帰属させることである¹。例えば、あるヒトは幼い子どもが高い棚の上に置かれた人形を見ながら泣いている行動を見て、この子は「人形を取りたい」のだな、とその子どもの行動の目的、すなわち心の状態を推測することができる。Premack & Woodruff¹は、この推論システムによって、個体の行動の予測が立つという理由から‘理論’と呼んだ。心の状態とは、目的(purpose)や意図(intention)であり、他にも、例えば「ジョンは幽霊を信じる」の信じる(believe)、考える(think)、知る(know)、推し量る(guess)、疑う(doubt)、そして、ふりをする(pretend)、などである。Premack & Woodruff¹は、チンパンジーが他個体の行動のシークエンスを観察することにより、他個体が直面している問題とそ

の解決策の関係を知ることができたと考察し、‘心の理論’の基盤は観察学習であるとした(樋口と望月²によれば、模倣は一般的に行動上的一致をさすが、観察学習は観察の手続き、学習された反応の遂行や反応の結果としての強化なしに単に刺激のシークエンスにさらされるだけで学習が生じるかどうかを決定するような手続き、とその結果の行動上の変化をセットで含むことである。いずれにしても他個体が引き起こす学習事態であり、総称としては“模倣”を用い、その中の一分野を“観察学習”と考えればよいとしている)。我々は、‘心の理論’の基盤とされる模倣にとって重要なことは、単に見るだけではなく共同注意—他者が見るところを見ること³—を有すること^{4,5}であると考え。

共同注意の経験を積むと、他個体の行動を観察する機会が増えることは予想できる。共同注意経験によって観察学習が促進された場合、他個体の行動をシークエンスとして捉えている可能性は高い。これは他個体の目的などを推測する脳内システムという‘心の理論’を学習する場を増やすことに繋がる。結果、他個体の将来の行動

を予測できるようになるだろう。我々は、マカクサル(以後、サルと呼ぶ)に共同注意行動を教育して、‘心の理論’の神経基盤を調べることを目的としている。サルを対象とする長所は、他個体の行動予測時の目の動きを行動解析により調べることができ、かつ、個体が心の状態を他個体に帰属している時の神経細胞応答までを研究できることである。‘心の理論’の神経基盤を探求するには、行動予測が推論に基づくことを行動解析により証明する必要がある。本稿では、‘心の理論’における共同注意の役割と、他個体の行動予測に関連するサルの目の動きを行動解析により検出することの重要性を概説する。

共同注意

共同注意を用いることで、相手の注意を考慮し‘心の理論’を有するようになる、との見解がある^{6,7}。同種間であれば、サルは視線を追従して相手と同じ対象を見るという共同注意をする⁸が、ヒトとサル間での報告はなかった。Kumashiro, et al.^{4,5,9}は、ヒトとサル間における共同注意の確立を試みた。初めはサルに、ヒトとのアイコンタクトを教えた。次に、

心の理論 —推論システム—

サルに pointing (サルが手全体を使用して方向を指し示すので指さし行動ではなく pointing と記述する) を教えた。サルは、欲しい対象を見た後にヒトの目を見る、という交互凝視を伴いながら、意図的な pointing を示すようになる⁹。交互凝視は他者の目と対象を交互に見る行動であり、意図的なコミュニケーションの一つと考えられている¹⁰。また、サルがヒトの視線方向を社会的手がかりとして利用するかどうかを二者択一課題で調べた。ヒトは左右いずれかの手に餌を隠し持ち両手をサルに差し出して、頭部を動かさずに餌の入っている方の手へ視線を向ける。サルは餌の入っている方の手を選択すると餌を得る。サルの正答率は約90%であった⁹。さらに、意図的な pointing をさせる課題において、サルはヒトの目を見ているかどうかを調べた。サングラスでヒトの目を隠した条件では全く pointing をしなかったが、ヒトの目が見える条件では、ヒトに対して100%の割合で欲しい餌に対して pointing をした⁹。ヒトとの共同注意経験を長く積むと、餌など欲しい対象を要求する pointing だけでなく、サルの見ている対象にヒトの注意を向ける pointing、すなわち protodeclarative pointing —前宣言的指さし、も出てくる⁹。まとめると、サルは異種であるヒトと共同注意も意図的な pointing も示す。

Premack & Woodruff¹ は、「心の理論」を提言した研究で、チンパンジーにおける他個体行動の目的などの推論システムの有無を検討した。テスト1で、一頭のチンパンジーに、ヒトの行為者(以後、行為者とする)がバナナを取ろうとするが届かないという問題場面に直面している4種類のビデオを見せて、行為者の適切な問題解決行動が示されている写真とそうでない写真を提示し、どちらか一方を選択させた。チンパンジーは、24試行中21試行で正解した($p < .001$)。Premack & Woodruff¹ は、チンパンジーは、ヒトがバナナを欲しがって取ろうとしており(意図)、さらにそのヒトはバナナの取り方も知っている(知識)、つまり行為者の意図と知識という心の状態を推測したことで、問題の解決策を示している写真を選択することができたと考察した。

テスト1での問題はバナナが取れないという単純なものであったので、テスト2では日常的なルーチン行動で起こるような4種類の問題場面が設定された。例えば、行為者がカギのかかったケージから出ようとしている、行為者の持っていたホースが蛇口に適切についておらず汚い床をきれいに洗い流すことができない、壊れたヒーターの前で行為者が寒がっているなどのビデオである。これらの問題に対して、最初の問題であればチンパンジーが鍵の

写真を選択すると正解となり、次の問題では取り付けられたホースの写真、最後は紙につけられた火の写真が正解である。チンパンジーは、12試行すべて正解した($p < .001$)。チンパンジーが問題場面のビデオには映っていない鍵の写真や火のついた紙の写真を選択したことは、単に物理的なマッチングで問題解決を導いたと説明されるものではないとされた。チンパンジー自身が、ヒーターをつけたり、ホースを蛇口につけるなどの行動を実際に行ったことはない。チンパンジーは、トレーナーが日常的なルーチンとして遂行する行動のシーケンスを観察したのみであった。このことから、チンパンジーが正しい問題解決写真を選択できたのは観察学習による、とされた¹。

しかしながら、他個体の問題解決策を見ていた個体が、その行動を繰り返す模倣によって容易に問題解決ができるかという、ヒト以外の霊長類では難しいとされる。ケーラー¹¹は、ただ見るだけでは問題は解決されないという例を上げている。賢いチンパンジーは、天井につるされたバナナを取る時に、箱をバナナの下まで移動させて、その上に登ってバナナを取る。それを見ていた他のチンパンジーが同じ状況に置かれると、そのチンパンジーは箱の上に立って何かを始める姿勢を示したが、すぐに箱から降りてバナナの下に走り寄って、そこで出来る限り高く飛ぶ、という行動を示

した。確かにこのチンパンジーはバナナと箱を結び付けようと試みた。もう一度、賢いチンパンジーが解決策を見せても、そのチンパンジーは箱をあちこちに動かしかし始めただけであった。箱の動かしかし始めとバナナの下に箱を置くという最終的な位置関係を把握できず、問題解決の行動シーケンスを繰り返すことができない、模倣できないのである。ケーラー¹¹は、単に見ることだけでは、行動のシーケンスを正しく関係づける保障にならないと述べる。先ほどの模倣に失敗したチンパンジーは、箱が行為者と分離されており、結果的に箱をあちこちに動かす行動を取ったのだろう。

我々は、共同注意、つまり行為者が見ている対象に注意を向ける、ことによって行為者とその対象が関係づけられると考える⁴⁵。共同注意が‘心の理論’の基盤になる模倣に重要な役割を果たすと考えられる根拠として、共同注意の教育を受けたサルは、ヒトの行為や体の動きの模倣を示す⁴⁵という証拠がある。共同注意経験は、相手が‘ある対象を扱う意図を持った行為者’であるということの学習を促進させるのではないだろうか。

誤信念課題

‘心の理論’の検出に利用されるテストとして、「誤信念課題」がある¹²⁻¹³。このパラダイムは、「あるヒト(A)がXを ○という入れ物に隠して部屋を出るが、別のヒト

(B)が部屋に入りXを△という他の入れ物に移動させる。Aが戻ってきた際、どの入れ物を探すか」を言語で問う課題である。‘心の理論’を有する、つまりこの課題を通過するということは、“Xを取りたい”というAの目的を推測し、かつ、“Aは○の中にXがある”という知識を持っていることを知ることによって“Aは○の中にXがあると知っている”と知るので、Aは○の入れ物の中に手を入れてXを取るだろう”、とAの行動を予測することができる、ということである。現実にはXが△に移動されているにもかかわらず、AはXが○にあると信じているので、この課題は他者の誤った信念を推測できるかどうか鍵となる。初期の研究では、誤信念課題を通過するのは4歳頃と考えられてきた¹³が、近年、Onishi & Baillargeon¹⁴は、15か月の乳幼児でも非言語課題であれば、他者の行動の予測ができることを、目の動き、注視時間から検出した。

非言語誤信念課題を用いた自閉症研究から、視線行動を解析することで興味深い結果が得られている。Senju, et al.¹⁵は、高機能自閉症のアスペルガー症候群の人達は言語教示の誤信念課題は通過する¹⁵⁻¹⁶が他者との社会的な相互関係に困難を示すことの矛盾に着目し、アスペルガー症候群者の非言語誤信念課題中の注視行動を調べた。この非言語誤信念課題におけるビデオのシナリオを説明する。ビデオに行為者が

正面を向いて映っており、行為者の前には右と左に箱が置かれている。そこに人形が登場して左右の箱のうち一方にオモチャを隠すのを、その行為者は見ている。行為者と箱の間には板が置かれ、その板には箱の上に位置する箇所には2つの窓があり、行為者は窓を開けてから箱の中のオモチャを取る。このシナリオのポイントは、行為者が手を伸ばす前に、2つの窓にライトが付き同時にチャイムが鳴ることにある。すなわち、ビデオを見ているヒトは、行動の直前の刺激によって行為者が窓をあけて手を伸ばすことが予測できる。問題は、このとき行為者がどちらの窓を開けると予測するか、である。テストのシナリオでは、行為者が後ろを見て目をそらしている間に、人形が箱に隠したオモチャを取り出して、もう一つの箱に移動させてから、それを取り去る。その後、後ろを見ていた行為者が振り返って正面を向いた際、窓のライトが光りチャイムが鳴る。もし、誤信念を正しく推測し行為者の行動を予測するのならば、ライトが光ってチャイムが鳴った時に、行為者が後ろを見る前に人形がオモチャを隠した箱の方にある窓(正解となる方の窓)を見ると予想される。大人のアスペルガー症候群の人達の目の動きを解析した結果、正解の窓へサックードしたのは約半数(19人中8人)しかいないことが分かった。定型発達群の人達に比べてアスペルガー症候群の人

達は、行為者の顔への注視時間も少ないが、正しい窓への注視時間の偏りも少なかった。このことは、アスペルガー症候群者は言語報告による誤信念課題を通過するという報告¹⁵⁻¹⁶と矛盾する結果だと言える。Senju, et al.¹⁵は、他者行動に対する予測的な目の動きは、他者の心的状態を社会的に関連する情報として処理する推論システムを要求し、一方、言語誤信念課題を通過する能力は、タスク構造や言語教示による言語を仲介とする推論システムで獲得されるのだらうと述べている。

現在まで、非ヒト霊長類では誤信念課題を通過することは難しいと考えられている。我々は、Senju, et al.¹⁵の非言語誤信念課題を参考にしながらサル用に作り直したビデオを、共同注意を教育したサルに見せて、サルが他個体の行動を予測するような視線の動きを示すのかを検証しようと考えている。サルであれば、言語に影響されることなく、他個体との社会的相互関係に関連する誤信念の推論システムを目的の動きから探ることができる。

おわりに

本稿では、‘心の理論’における共同注意の役割を鑑み、「サルとヒト間で共同注意経験を増やすことが、‘心の理論’の基盤とされる観察学習を促進し、他個体の行動の目的などを推論する脳内システムとする‘心の理論’を有する

ことに繋がる」という仮説を提案した。この仮説を検証するためには、共同注意を教育したサルとそうでないサルの他個体に対する視線行動の違いを定量的に調べることが重要である。近年、視線計測技術が発達し、サルの視線の動きを、サルの頭部を固定することなしに記録することができるようになった。共同注意や模倣中のみならず、他個体行動のシークエンスへの目の動き、および、誤信念課題における目の動きの検出によって、より厳密にサルが‘心の理論’を有するののかという問いへの解答が得られるだらう。このような行動解析は、‘心の理論’への行動変容の同定および行動評価の確立に繋がり、ヒトでは難しい単一神経細胞レベルの‘心の理論’における神経基盤の解明の糸口となるにちがいない。異種間の社会的コミュニケーション研究をヒトの社会的コミュニケーション研究へと発展させることで、行動解析の意義はより一層深くなる。

参考文献

1. Premack, D., & Woodruff, G. (1978). Does the chimpanzee have a theory of mind? *Behavioral and Brain Sciences*, 4, 515-526.
2. 樋口義治と望月明 (1983). 社会的学習 佐藤方哉(編) 現代基礎心理学6-学習II (pp.155-182).
3. Butterworth, G., & Jarrett, N. (1991). What minds have in common is space: Spatial mechanisms serving joint attention in infancy. *British Journal of Developmental Psychology*, 9, 55-72.
4. Kumashiro, M., Ishibashi, H., Uchiyama, Y., Itakura, S., Murata, A., & Iriki, A. (2003). Natural imitation induced by joint attention in Japanese monkeys. *International Journal of Psychophysiology*, 50, 81-99.

5. Kumashiro, M., Yokoyama, O., & Ishibashi, H. (2008). Imitation of body movements facilitated by joint attention through eye contact and pointing in Japanese monkey. *PLoS ONE*.
6. Emery, N. J. (2000). The eyes have it: the neuroethology, function and evolution of social gaze. *Neuroscience and Biobehavioral Reviews*, 24, 581-604.
7. Baron-Cohen, S. (1995). *Mindblindness: an essay on autism and theory of mind*. Boston: MIT Press/Bradford Books.
8. Emery, N. J., Lorincz, E. N., Perrett, M. W., Oram, M. W., & Baker, C. I. (1997). Gaze following and joint attention in rhesus monkeys (*Macaca mulatta*). *Journal of Comparative Psychology*, 111, 286-293.
9. Kumashiro, M., Ishibashi, H., Itakura, S., & Iriki, A. (2002). Bidirectional communication between a Japanese monkey and human through eye gaze and pointing. *Current Psychology of Cognition*, 21, 3-32.
10. Anderson, J., Kuwahata, H., & Fujita, K. (2007). Gaze alternation during "pointing" by squirrel monkeys. *Animal Cognition*, 10, 267-271.
11. Wケラー (1971). *ゲシュタルト心理学入門書* (田中良久, 上村保子訳) 東京大学出版会
12. Wimmer, H., & Perner, J. (1983). Beliefs about beliefs: Representation and constraining function of wrong beliefs in young children's understanding of deception. *Cognition*, 13, 103-128.
13. Baron-Cohen, S., Leslie, A. M., & Frith, U. (1985). Does the autistic child have a "theory of mind?" *Cognition*, 21, 37-46.
14. Onishi, K. H., & Baillargeon, R. (2005). Do 15-month-old infants understand false beliefs? *Science*, 308, 255-258.
15. Senju, A., Southgate, V., White, Sarah, & Frith, U. (2009). Mindblind eyes: an absence of spontaneous theory of mind in asperger syndrome. *Science*, 325, 883-885.
16. Happé, F. G. E. (1995). The role of age and verbal ability in the theory of mind task performance of subjects with autism. *Child Development*, 66, 843-855.

ノーサンのバイオ技術

ノーサンは研究に携わる皆様のご要望を直接うかがい
満足していただける商品とサービスをご提供し、
研究のお手伝いを致します。

FEED

実験動物用飼料

マウス・ラット・ハムスター用
ウサギ用・モルモット用
イヌ用・ネコ用・サル用

疾患モデル動物用飼料

放射線照射滅菌飼料

昆虫用飼料

ADME

薬物動態関連業務

薬物代謝関連試薬販売
大腸菌発現系ヒトP450販売
ヒトP450抗体販売

日本農産工業株式会社 ライフテック部

〒220-8146 横浜市西区みなとみらい 2-2-1 ランドマークタワー 46F
TEL 045-224-3740 FAX 045-224-3737
e-mail : bio@nosan.co.jp

実験動物における痛み

順天堂大学大学院 医学研究科 アトピー疾患研究センター

准教授 久原 孝俊

プロローグ

1987年、前島一淑博士(当時、慶應義塾大学医学部教授)からSCAW (Scientists Center for Animal Welfare)の動物実験における「苦痛カテゴリー」に関する資料を翻訳するよう依頼された。同年12月に翻訳原稿を作成し、翌1988年1月20日、日本実験動物協会(日動協)の「実験動物海外技術情報」第7号¹⁾に掲載した。このSCAWの「苦痛カテゴリー」の日本語訳は、その後、多くの大学や研究機関等において広く利用されることとなり、今日に至っている。そのなかにおいて、「カテゴリー E」の実験は、それによって得られる結果が重要なものであっても決しておこなってはならない、と記載されている(翻訳した)。しかし、筆者はそのときすでに、「カテゴリー E」の実験がおこなわれ得ることを知っていた。

筆者は、現在、慶應義塾動物実験委員会の外部委員を務めている。過日、委員会の席上、松尾光一博士(慶應義塾大学医学部教授)より本論文²⁾を紹介された。この論文においては、実験動物が被る痛み、とくに「カテゴリー E」の苦痛に関する深い考察がなされている。本論文を筆者のみが読んで

そのままにしておくのはもったいないと感じ、その内容を本誌に掲載することを思いついた。本稿が「カテゴリー E」の実験をおこなうことについて、われわれが深く考察し、そして実験動物が被る苦痛について考えるよすがとなれば幸いである。本稿は、米国のシステムにもとづいた記載になっているが、わが国における動物福祉(とくに、実験動物における痛み)について考えるうえでも、大いに参考になるものである。1987年に前島一淑(KM)博士に翻訳を依頼され、そしてその28年後に同じ医学部の松尾光一(KM)博士に本論文を紹介されたことに、はるかな縁を感じる。

なお本稿は、英語原文の翻訳ではない。英語原文を読んで、そうとうに自由にまとめたものである。「実験動物における痛み」について深く考察したい読者におかれては、ぜひ英語原文にもチャレンジしていただきたい。

実験動物における痛み

医学生物学の研究において動物を使用する場合は、できるかぎり動物に苦痛を与えないことが肝要である。しかし、実験の目的によっては、動物が被る痛みを軽

減しない(鎮痛薬を投与しない)場合もあり得る。麻酔をしていない意識のある動物を用いて、動物の許容限界に近い痛み、あるいはそれ以上の痛みを与えるような処置は、SCAWのカテゴリーでは「E」に分類されている。

実験責任者は、動物実験を開始する前に動物実験計画書を作成し、実験動物が被る苦痛を軽減するための方法を記載しなければならない。動物実験委員会は、提出された動物実験計画書を審査し、承認もしくは却下したり、または修正を求めたりする。「実験動物のケアと使用に関する指針(ガイド)」第8版には、「各機関は、すべての実験動物を監視し、実験動物が被る苦痛を最小限にするよう努めること」と記載されている。これはきわめて微妙な規範であり、実験動物に苦痛を与えることが定言的に禁止されているわけではない。すなわち、研究の目的によっては、実験動物が被る重度の苦痛をわれわれが軽減しない実験が実施されることもあり得るのである。たとえば、関節炎のための鎮痛薬の研究・開発においては、実験群には鎮痛薬を投与し、他方、対照群には鎮痛薬を投与しないことが考えられる。「カ

テゴリー E」の実験を承認するためには、はたして、われわれはどのような基準を定めればよいのだろうか？

1959年、William M. S. RussellとRex L. Burchは、動物実験における「非人道性」を軽減するための枠組みを示した^{3, 4)}。彼らは、動物が被る苦痛には、実験の目的のために直接与えられるものと偶発的に与えられるものがあると指摘した。直接的な苦痛は、たとえば、疼痛の研究のために動物に与えられる痛みなどであり、偶発的な苦痛は、たとえば、がんの治療法の研究のために動物に癌を形成させ、そのがんが進展して引き起こされる痛みなどである。RussellとBurchの原則は、「直接的」な痛みおよび「偶発的」な痛みの両方に適用されるものである。RussellとBurchは、いわゆる3つのRを提唱した。動物に重度の苦痛を与える場合は、動物実験計画書に当該実験の正当性を明確に記載し、かつ当該実験の代替法がないことも記載しなければならない。

1985年、米国省庁間動物実験委員会は、「試験、研究、および教育において使用される脊椎動物の使用とケアに関する原則（「原則I」）」を公表した。「実験動物のケアと使用に関する公衆衛生局（Public Health Service: PHS）の規範」および「動物福祉法（Animal Welfare Act: AWA）」はともに、厳密に「原則」に従って策定された。「原則」とこれら2つの連邦法

に記載されている動物の痛みに関する事項を次に示す。

- ・人間に対して痛みをひき起こすような処置は、動物に対しても痛みをひき起こすものと考えられる。
- ・実験の目的を達成することができる範囲において、動物が被る不快感や苦しみや痛みを避ける、または最小限にする。
- ・科学的な必要性がある場合にかぎり、必要最小限の期間/時間において、鎮静薬、麻酔薬、鎮痛薬の使用もしくは安楽死処置を保留することができる。

ここにおいて、死はかならずしも動物にとって有害作用であるとはとらえるのではなく、死/安楽死処置は究極的な鎮痛処置であるとはとらえるべきであることに留意されたい。重度の苦痛を被っている動物を殺処分しない場合は、その正当な理由を記載しなければならない。がんによって引き起こされる痛みはその例である。たとえば、齧歯類にがんをひき起こした場合は、人間の患者のような疼痛管理（24時間体制でカテーテルを通して鎮痛薬を投与したりすること）をおこなうことは実際的ではなく、また鎮痛薬が実験結果に影響を及ぼすことも考えられる。したがってそのような場合、齧歯類においては、安楽死処置を施すことが最も適切である。

動物福祉に関する規範を動物実験に適用することは、個人（実

験者）はもちろん、各機関の責務である。さらに具体的には、各機関の動物実験委員会の責務である。すなわち、麻酔薬や鎮痛薬を使用せずに重度の苦痛を動物に与えることを承認するのは、各機関の動物実験委員会である。さらに、各機関の動物実験委員会は、使用動物種やそれぞれの機関の立場などにもとづいて、外部機関（たとえば、米国農務省（USDA）、米国国立保健研究所（NIH）実験動物福祉局（OLAW）、国際実験動物ケア評価認定協会（AAALAC International）など）の検証/査察を受ける。

上述のように、現行の動物実験/動物福祉関連法規のもとにおいては、麻酔薬や鎮痛薬を使用せずに重度の苦痛を動物に与える実験を実施することは可能である。もちろん、RussellとBurchの3Rsの原則は尊重されなければならない。

はたして、われわれは苦痛をとまわらない動物実験を達成することができるのだろうか？動物実験委員会は、実験処置によって引き起こされることが予想される痛みについて考察し、そのような痛みをどのようにして最小限にすることができるかについて協議する。各機関における動物実験委員会の協議内容（議事録等）は、各機関の内部資料であるが、1971年以来毎年、米国農務省のホームページには、苦痛のカテゴリー別に分類された動物実験の

一覧表が掲載されている。この米国農務省の年次報告書によると、2002～2009年のあいだに実施された動物実験のうち、およそ7～9%が「カテゴリー E」であった。すなわち、これらの「カテゴリー E」の実験においては、鎮痛薬を使用せずに実験処置がおこなわれた。その理由は、鎮痛薬が実験結果に影響を及ぼすからである。ここで注意しなければならないことがある。米国の動物福祉法のもとでは、動物実験において最もよく/多く使用されているマウスやラットは、法律の対象動物になっていないということである。すなわち、上記米国農務省の年次報告書には、マウスやラットの使用は含まれていない。また、この米国農務省の年次報告書においては、痛みと苦しみを区別していない。たとえば、痛みはまったくひき起こさずに恐怖のみをひき起こす処置も「カテゴリー E」として報告される。

実験例:

人間における心筋梗塞の治療法を開発する目的のために、各種成長因子を用いた実験が計画された。実験処置として、マウスを開胸して冠状動脈を結紮する(もちろん、開胸手術にあたっては、適切な麻酔薬を使用しなければならない)。このような実験においては、どのような鎮痛薬をどのくらいの用量で投与すればよいのだろうか?

このような問いに答えるため

には、実験によって立証することができる事実(facts)と価値(values)について考察することが肝要であろう。現行の関連法規のもとでは、動物が被る苦痛に配慮することに価値を置いて、できるかぎり動物が被る痛みを軽減することが規定されている。この実験例においては、たとえば、次の事項に関して考慮することが必要であろう。

- ・マウスは痛みを感じるか?
- ・開胸手術は、どの程度の苦痛をマウスにひき起こすか?
- ・心筋梗塞は、マウスに痛みをひき起こすか?
- ・マウスが痛みを被っているときは、どのような兆候を示すか?
- ・どのような鎮痛薬がマウスに有効であるか? 適切な用量と投与頻度は?
- ・鎮痛薬の投与は、実験結果にどのような影響を及ぼすか?
- ・鎮痛薬を投与しない場合は、実験結果にどのような影響を及ぼすか?
- ・マウスにおける心筋梗塞は、どの程度、人間の心筋梗塞のモデルとなり得るか?
- ・鎮痛薬は、マウスにどのような副作用を及ぼすか?

このような問いに答えることはむずかしい。とくに、遺伝子改変マウスにおいてはむずかしいであろう。もし、マウスにおける心筋梗塞が人間の心筋梗塞のモデルとなり得ないのであれば、こ

の実験を実施する正当性はない。もし、マウスがこれらの実験処置によって痛みを感じないのであれば、鎮痛薬について考慮する必要はない。最も単純に考えて、もし鎮痛薬が実験結果に影響を及ぼさないのであれば、実験実施者は、マウスに鎮痛薬を投与しなければならない。

動物実験は、人間を用いた研究にくらべ、外部の変動要因をコントロールしやすいという利点がある。ある種の鎮痛薬が実験結果に影響を及ぼすことが考えられる場合においても、(鎮痛薬を使用しないことによって生じる)痛みによってホメオスタシス(恒常性)が乱されて、実験結果に影響を受けることがあることを理解しなければならない。すなわち、鎮痛薬が実験結果に影響を及ぼすという理由のために、鎮痛薬を使用しないことを選択する場合には、(鎮痛薬を使用しないことによって生じる)痛みの影響について慎重に検討しなければならない。

将来へ向けた提言

われわれは、どのようにして実験動物が被る苦痛を軽減することができるのだろうか? いくつかの考えられる提言を次に示す。

1) 論文には詳細な情報を記載すること。

「ARRIVEガイドライン」*には、動物を用いておこなわれた研究論文においては、麻酔薬および

鎮痛薬の詳細について記載すべきであることが推奨されている。

2) 情報の収集に努めること。

かならずしも、“PubMed”を利用した文献検索が最善であるとはかぎらない。たとえば、動物実験/実験動物専門家のメーリングリストによる情報がきわめて有用な場合もある。専門家同士のコミュニケーションが重要である。

3) 痛みの認識に関する良質なデータを作成すること。

痛みの兆候を判定することがむずかしい動物種(たとえば、マウス、鳥類、カエル、魚類など)の痛みに関する研究を推進することが重要である。

4) 実験動物モデルが人間の疾病のモデルとなるか否かについて考察すること。

薬剤が実験結果に及ぼす影響、または苦痛が免疫機能、行動、もしくは腫瘍生物学に及ぼす影響についてよく調べる。たとえば、鎮痛薬を使用した場合と使用しなかった場合において、がんの転移がどのような影響を受けるかをよく調べた後、鎮痛薬ががんの転移に影響を及ぼすことがわかったときは、鎮痛薬を使用しないことを選択することができる。すでに述べたように、痛みそのものが実験結果にどのような影響を及ぼすかについて考察せずに、鎮痛薬を使用しない選択肢を採用してはならない。

5) 鎮痛薬を使用するときは、ケアの基準を変更すること。

鎮痛薬と同様に、麻酔薬も広範

囲にわたる長時間の影響を動物に及ぼす。しかしながら(だからといって)、麻酔をせずに外科学的処置(手術)を実施することはあり得ない。適切な対照動物を用いて、麻酔薬の使用法を標準化することによって、麻酔薬によってもたらされる変動要因を最小限にすることができる。現在のところ、鎮痛薬の使用に関しては、麻酔薬の使用(必須)と同等のレベルには達していないものの、いつの日か同等のレベルに達することが期待される。

6) 動物実験委員会における動物実験計画審査の倫理基準をたえず改善すること。

米国のシステムにおいては、動物実験の倫理に関する責務は、各機関の自主管理にもとづいている。異論の多い事項に関しては、関係者のあいだでさまざまな議論がなされて、それらの結果のいくつかは関連法規の修正につながっていった。その一例として、より苦痛の少ない人道的エンドポイントを設定し、使用する動物の匹数を増やすことによって実験における個々の動物の苦痛が軽減できるなら、そのような研究計画を選択すべきである、すなわち(ケース・バイ・ケースではあるものの)、“refinement”は“reduction”より優先される、というコンセンサスが現在では得られている⁵⁾。

7) 研究領域によって動物が被る苦痛の許容限界を設定する。

現在、限られた額の研究費の配

分は、それぞれの研究費申請書の内容を審査して配分されている。たとえば一般的に、人間や動物の生命を脅かすような重篤な疾患に関する研究費は、生命にかかわらないまれな疾患に関する研究費にくらべ、多く配分される。他方、動物実験委員会が、動物が被る苦痛の正当性を判定する場合は、そのような研究領域の差を勘案しない。はたして、研究領域によって、動物が被る苦痛の許容限界を異なるレベルに設定することはできるのだろうか？

8) 動物が被る苦痛を終了させるためのキャンペーン。

米国動物愛護協会は、大学において実験動物に対して軽減することのできない重度の苦痛を与えないよう要請するキャンペーンを展開している。これは、「カテゴリーE」の実験を事実上禁止することを求めるものである。そうすると、たとえば、がん患者の疼痛管理の研究は、たとえ得られるベネフィット(がん患者の疼痛緩和)が大きくても、実施することができなくなってしまうであろう。このような研究を実施するためには、社会の大きな変革が必要である。

9) 動物が被る苦痛カテゴリーについて報告するためのよりよいシステムを確立すること。

上述したように、1971年、米国農務省は、3Rsの推進を目標として、動物が被る苦痛の程度を報告するシステムを作成した。苦痛カテゴリーの定義の不明確さ、科学

の発展にともなう苦痛の基準の見直し、ならびにマウスやラットが対象動物になっていないことなどのために、米国農務省の苦痛に関する年次報告書の有用性は低い。苦痛カテゴリーの分類をわかりやすく見直したり、あるいは新たに「E+ (Eプラス)」のカテゴリーを設けたりすることによって、動物が被る苦痛カテゴリーについて報告するためのさらによりシステムが確立されるのではないだろうか？

エピローグ

もの言わぬ動物の痛みや苦しみを判断するのはむずかしい。動物が人間と同様な感覚で痛みや苦しみを感じているか否かについては、議論の分かれるところである。しかし、動物実験をおこなう場合、実験動物が被る苦痛の程度を判定することができないときは、その動物が人間であると仮定して、人間と同様の苦痛を知覚しているものとして、動物を取り扱わなければならないものと思う。実験動物に対する過度の感情移入や擬人化は好ましくないのかもしれないが、われわれが実験動物の被る苦痛について考えるとき、実験動物とわれわれ(実験実施者、実験動物技術者、実験動物管理者等)との関係を人間の患者と医師、看護師等の関係と同等のものにとらえることによって、実験動物の福祉は大きく向上す

るものと思う。もちろん、第一義的に、(動物)実験の目的は達成されなければならない。実際、動物がいかにか細に痛みや苦しみを感じているかを示す一例として、文献(6, 7, 8)を参照していただきたい。動物実験にかかわる者はすべて、実験動物が苦痛を被っていることを自覚してほしい。そのためには、実験動物をよく^み看る/^み診る(「見る」ではない)ことが肝要である。

医学生物学の研究、試験、教育等において、動物実験の果たす役割はきわめて大きい。動物実験の成果は、人間および動物の健康増進のために大きな貢献をしてきた。たとえば、薬剤やワクチンなどの開発・製造、あるいは新たな外科的手技や治療法などの開発において、動物実験は重要な役割を果たしてきた。現在の科学のレベルでは、すべての動物実験を無くすことはできないと思う。しかし筆者は、将来いつの日か、実験動物が被る苦痛を軽減することができる、もしくは無くすことができる日が来ることを、または動物を使用せずに実験をおこなうことができる日が来ることを願うものである。そのためには、現在における実験動物を使用した研究が必要であるということを書いて掲筆する。

* 本誌に掲載されている「ARRIVEガイドライン——動物実験の再現性向上のために——」(18～21ページ)を参照されたい。現在、久和 茂博士(東京大学)と筆者により、「ARRIVEガイドライン」の日本語訳の作成が進められている。本誌が発行される頃には、英国の「3Rs研究センター」(National Centre for the Replacement, Refinement and Reduction of Animals in Research: NC3Rs)のホームページに「ARRIVEガイドライン」の日本語訳が掲載されていることであろう。

- 1) 久原孝俊:動物福祉のためのサイエンティストセンターによる動物のケアおよび使用に関する委員会を効果的に運営するための勧告。実験動物海外技術情報. 7, 14-17, 1988.
- 2) L. Carbone: Pain in Laboratory Animals: The Ethical and Regulatory Imperatives. PLoS ONE. 6(9), e21578, doi:10.1371/journal.pone.0021578, 2011.
- 3) W. M. S. Russell and R. L. Burch: "The principles of humane experimental technique". Methuen, London. 1959.
- 4) 久原孝俊:3つのRとRussellとBurchと。アニテックス. 23(5), 23-33, 2011.
- 5) B. Cass(翻訳:久原孝俊):英国における動物実験(1)。LABIO 21. 15, 16-22(とくにP. 20), 2004.
- 6) 久原孝俊:マウスは同種他個体の痛みを共感することができるか? LABIO 21. 29, 39, 2007.
- 7) 久原孝俊:適正な動物実験の実施のために——とくに動物実験の苦痛度分類について——。実験動物と環境. 16(2), 127-133, 2008.
- 8) 久原孝俊:適正な動物実験の実施のために——とくに動物実験の苦痛度分類について——。実験動物技術. 43, 109-114, 2008.

日本動物実験代替法評価センター (JaCVAM) の紹介並びに我が国における動物実験代替法の現状

国立医薬品食品衛生研究所
安全性生物試験研究センター 安全性予測評価部 第二室
室長 小島肇夫 (日本動物実験代替法評価センター事務局)

1. 序論

日本における動物実験代替法の現状を説明するにあたり、日本動物実験代替法評価センター (JaCVAM: Japanese Center for the Validation of Alternative Methods) の活動を紹介させて頂いた後、昨今の動物実験代替法の動向をまとめた。なお、動物実験代替法 (Alternative to Animal Testing, 以下、代替法と記す) とは、動物実験の3Rs (Reduction: 削減、Refinement: 苦痛の軽減、Replacement: 置換え) を指す用語であり¹⁾、動物実験を行うことを前提にしている。「代替法」というと、「置換え」をイメージされるかもしれない。この場合は、in vitro試験あるいは Alternative non-animal test (動物を用いない代替法) を指す。

2. JaCVAM²⁾

2-1 組織

2-1-1 国内組織

JaCVAMの役割は、その設置規則に定められた「化学物質等の安全性評価において、国民の安全を確保しつつ、動物実験に関する3Rsの促進に資する新規動物実験代替法を行政試験法として、可能な範囲での導入

に貢献すること」である。これにより、我が国の医薬品等の製造販売承認申請資料の作成および審査、化粧品基準の改正等並びに化学物質、農薬の適正な規制への寄与を目的としている。本目的のために、JaCVAMは対象物質の安全性に係る試験法の有用性とその限界および行政試験法としての妥当性についての評価と、それに必要なバリデーションを実施するとともに、関連分野における国内及び国際協力並びに国際対応に携わっている。

この活動の適正な運営を図るために、設置規則では、運営委員会、顧問会議、評価会議、資料編纂委員会、バリデーション実行委員会および第三者評価委員会をおくことになっている。これら組織の関係を図1に示す。これら組織の中の最高決定機関は運営委員会であり、JaCVAMが検討すべき新規・改訂試験法の選考とその評価のための計画に関して、その科学的妥当性と評価実施に必要な予算および人的資源について審議し、決定する。また、評価会議の最終報告書について審議し、行政試験法として妥当とされた試験法について、JaCVAMとしての意見書を添え、

厚生労働省の担当部局に伝達するとともに、公表している。さらに、顧問会議の委員、評価会議の委員、試験法毎の資料編纂委員会委員長、試験法毎のバリデーション実行委員会委員長および第三者評価委員会委員長を指名することになっている。

2-1-2 国際組織

JaCVAMは、代替法国際協調 (ICATM: International Cooperation on Alternative Test Methods) の一員として³⁴⁾、欧州動物実験代替法評価センター (EURL ECVAM: European Union Reference Laboratory for alternatives to animal testing)、米国動物実験代替法省庁間連絡会議 (ICCVAM: Interagency Coordinating Committee on the Validation of Alternative Methods)、韓国動物実験代替法評価センター (KoCVAM: Korean Center for the Validation of Alternative Methods) とともに、2009年から覚書を交わし、重複した活動による時間と経費の無駄を省き、試験法ガイドライン (TG: Test Guideline) の成立を円滑に進めるため、相互協力している。JaCVAMはICATMとの国際協調を念頭に活動している。

2-2 成果

2-2-1 OECDおよびICH試験法ガイドライン

JaCVAMは、ICATMの協力を得て、日本で開発された眼刺激性、皮膚感作性試験などの代替法について、バリデーションや第三者評価を実施し、経済開発協力機構 (OECD: Organisation for Economic Co-operation and Development) 等のTGの開発を目指している。これらの情報はJaCVAMホームページ

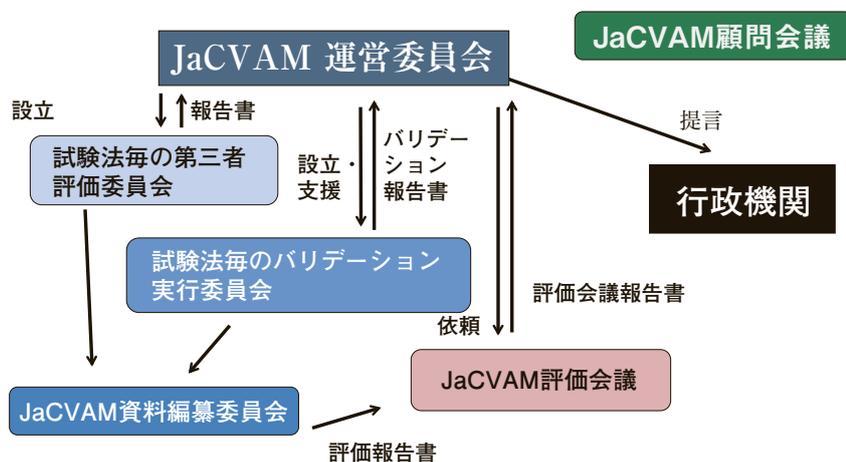


図1. JaCVAM 組織

で逐次更新している²⁾。

2015年までに表1に示すように、ヒト健康に関する6本のOECD TGの成立に貢献した(400番台のTG)⁵⁾。このうち、本年度、1) Bhas 42 形質転換試験(Bhas法)、2) 眼刺激性試験代替法 短時間曝露(STE: Short Time Exposure)法、3) ヒトエストロゲン受容体- α の転写活性化アッセイ(ER-STTA)の公定化に深く関与した。残念ながら、Bhas法はガイダンスに留まったため、表1には加えていない。この他、OECDの作業計画では⁶⁾、日本から提案した試験法として、以下の3試験法が検討されており、来年度も1~2試験法がTGとして承認される予定である。

- 1) 皮膚感作性試験代替法h-CLAT (Human Cell Line Activation Test)
- 2) 皮膚感作性試験代替法IL-8 Luc アッセイ
- 3) ヒトアンドロゲン受容体結合による活性化・拮抗作用物質を検出する試験 AR-EcoScreen

さらに、表1に示すように、JaCVAM主導でバリデートされた活性酸素種を指標としたROS (Reactive Oxygen Species) アッセイが、日米EU医薬品規制調和国際会議(ICH: International Conference on Harmonisation of Technical Requirements for Registration of Pharmaceuticals for Human Use)による「S10医薬品の光安全性評価ガイドラインについて」に収載され、厚生労働省医薬食品局審査管理課長より、平成26年5月21日に発出され

た(薬食審査発0521第1号)^{7,8)}。このように、JaCVAMは2005年の設立以来、日本人が開発した方法をTGとして成立させるため活動を行っている。

2-2-2 JaCVAM評価会議報告書

昨年度、以下の試験法を厚生労働省医薬食品局審査管理課および医薬食品局審査管理課化学物質安全対策室に提案した²⁾。

- 1) 新規試験法提案書 2013年改訂 OECD TG 438ニワトリの摘出眼球を用いた眼刺激性試験(ICE法: Isolated Chicken Eye Test) (平成27年1月)
- 2) 新規試験法提案書 皮膚感作性試験代替法ペプチド結合性試験(DPRA: Direct Peptide Reactivity Assay) (平成27年3月)

表2に示すように、これまでも多くの有用な代替法を行政に提案している。

3. 試験法の行政的受入

医薬部外品の製造販売承認申請等に添付する資料については、動物実験代替試験法等の利用に関してOECD等により採用された代替試験法あるいは適切なバリデーションでそれらと同等と評価された方法に従った試験成績であれば、当該品目の申請資料として差し支えない旨を示している。この通知に加え、厚生労働省では医薬部外品の許認可に代替法の利用をさらに促すため、表3のようなガイダンス等を発出している⁸⁾。このガイダンスも継続的な検討を続けている。

4. 我が国において開発された試験法の動向

以下にTGを目指す候補試験の現状を示す。試験法の公定化には国際的な評価(バリデーションおよび第三者評価)が必須であるとともに⁹⁾、行政的な必要性が問われることになる。そこで、JaCVAMが仲介し、ICATMの支援を受けた開発・評価を進めている。

4-1 バリデーション

- 1) 経済産業省主導のプロジェクトにて住友化学が開発した“発生毒性スクリーニングHandI-Luc EST法”においては、日本化学工業会の支援でバリデーションを実施中である。
- 2) 農業生物資源研究所の竹澤らが開発した眼刺激性試験代替法 Vitrigel-EIT (Eye Irritation Test) については、農林水産省プロジェクトにおけるバリデーション実験が終了した。
- 3) 眼刺激性試験代替法 LabCyte CORNEA-MODEL1については、日本動物実験代替法学会の支援でバリデーションを開始した。

4-2 国際的な第三者評価

- 1) 東北大相場らの開発した皮膚感作性試験代替法IL-8 Luc アッセイのJaCVAM主導による国際的な第三者評価が実施されている。
- 3) 眼刺激性試験代替法 細胞毒性試験SIRC-CVS (Crystal Violet Staining) 法のJaCVAM主導による国際的な第三者評価が実施されている。

なお、過去の第三者評価は欧米依存であったが、昨今はJaCVAM主導の国際的な評価を施行している。

5. 最後に

本稿で紹介した試験法はいずれもTGまたはバリデーションの過程にあるもののみである。現在開発中の試験法の中で、反復投与毒性や発生毒性などの代替を目指したものもあり、今後、より複雑な毒性試験に有益な代替法が開発されることを期待している。

表1. JaCVAMが公定化に関与した試験法ガイドライン^{5,7)}

分類	試験法
皮膚刺激性試験	OECD: <i>In vitro</i> Reconstructed Human Epidermis (RhE) Test methods, LabCyte EPI-Model: TG439 (2013)
眼刺激性試験	OECD: Short time exposure (STE) assay for eye irritation testing, TG 491 (2015)
皮膚感作性試験	OECD: Nonradioactive LLNA protocol, LLNA: DA : TG442A (2010)
	OECD: Nonradioactive LLNA protocol (LLNA: BrdU-ELISA) : TG442B (2010)
遺伝毒性試験	OECD: <i>In vivo</i> comet assay, TG 489 (2014)
内分泌かく乱スクリーニング	OECD: Performance-based Test Guideline for stably transfected transactivation <i>in vitro</i> assays to detect estrogen receptor, Revised TG 455 (2015)
光毒性試験	ICH HARMONISED TRIPARTITE GUIDELINE: Guideline on Photosafety Evaluation of Pharmaceuticals S10 (2013)

表2. JaCVAMが厚生労働省に受入れを提案した試験法²⁾

No.	試験法
1	皮膚腐食性試験: Vitrolife-Skin, EpiDerm
2	眼刺激性試験 牛摘出角膜の混濁および透過性試験 (BCOP)
3	眼刺激性試験 鶏摘出眼球試験 (ICE)
4	眼刺激性試験 フルオレセイン放出試験 (FL)
5	皮膚感受性試験 LLNA: DA
6	急性眼刺激/腐食性
7	皮膚感受性試験 LLNA: BrdU-ELISA
8	皮膚感受性試験 rLLNA
9	皮膚感受性試験 <i>In Chemico</i> , ヘプテド結合試験 (DPRA)
10	皮膚刺激性試験: Episkin, EpiDerm, SkinEthcs, LabCyte EPI-MODEL
11	皮膚透過性試験
12	急性経口毒性試験への細胞毒性の利用
13	BG1Lucエストロゲンレセプター転写試験 アゴニストおよびアンタゴニスト

謝辞

すべてのJaCVAM協力者の皆様にこの場をお借りして感謝したい。本活動は、厚生労働本省試験研究所試験研究費「健康安全確保のための研究費：国際的動向に対応する新規安全性試験法およびその評価手法の開発」の支援を受けて実施された。

参考文献

1) JaCVAM (2015) Available at: <http://jacvam.jp/>

- 2) JaCVAM (2015) Available at: <http://jacvam.jp/>
 3) EURL ECVAM (2015) Available at: <http://eurl-ecvam.jrc.ec.europa.eu/>
 4) ICATM, National Toxicology Program (2015) Available at: <http://ntp.niehs.nih.gov/pubhealth/evalatm/iccvam/international-partnerships/index.html>
 5) OECD test guideline (2015) Available at: http://www.oecd.org/document/40/0,3746,n_2649_34377_37051368_1_1_1_1,00.html
 6) OECD WORK PLAN FOR THE TEST GUIDELINES PROGRAMME (2015) Available at: <http://www.oecd.org/officialdocuments/displaydocumentpdf/?cote=ENV/JM/>

表3. 代替法ガイダンス一覧⁸⁾

No.	試験法
1	皮膚感受性試験代替法としてのLLNAを化粧品・医薬部外品の安全性評価に活用するためのガイダンス
2	光毒性試験代替法としての <i>in vitro</i> 3T3 NRU光毒性試験を化粧品・医薬部外品の安全性評価に活用するためのガイダンス
3	皮膚感受性試験代替法としてのLLNA: DAを化粧品・医薬部外品の安全性評価に活用するためのガイダンス
4	皮膚感受性試験代替法としてのLLNA: BrdU-ELISAを化粧品・医薬部外品の安全性評価に活用するためのガイダンス
5	眼刺激性試験代替法としての牛摘出角膜の混濁および透過性試験法 (BCOP) を化粧品・医薬部外品の安全性評価に資するためのガイダンス
6	眼刺激性試験を化粧品・医薬部外品の安全性評価に活用するためのガイダンス
7	眼刺激性試験代替法としての鶏摘出眼球試験法 (ICE) を化粧品・医薬部外品の安全性評価に資するためのガイダンス

- TG(2014)47&doclanguage=en
 7) 医薬品の光安全性評価ガイドライン (2015) Available at: http://www.pmda.go.jp/ich/s/s10_14_5_21.pdf
 8) 独立行政法人 医薬品医療機器総合機構 (2015) Available at: <http://www.pmda.go.jp/operations/shonin/info/iyakubugai.html>
 9) OECD, Guidance document on the validation and international acceptance of new or updated methods for hazard assessment, No.34 (2005) OECD Series on Testing and Assessment: Testing for Human Health. Available at: <http://www.oecd.org/env/ehs/testing/seriesontestingandassessmenttestingforhumanhealth.htm>

殺菌

環境にやさしいオゾンのおかげで

オゾンガスくん蒸装置 HZ-100 オゾン水生成機 OW-20Z



オゾン発生装置を用いた飼育室や実験室などのクリーンアップ(物理洗浄、殺菌、脱臭)からオゾン機材の販売まで承ります。

販売

● 実験用動物 ● 関連商品 ● 実験動物輸送

飼育受託

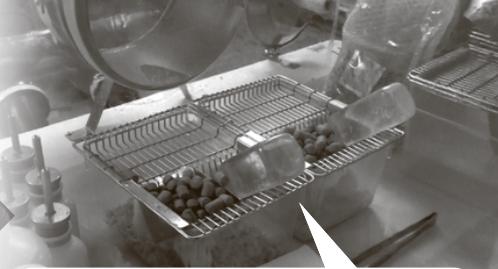
● 実験動物全般の飼育管理業務(オープンシステム・バリアシステム・アイソレータシステム等) ● 飼育施設環境管理(洗浄業務から各種環境測定まで) ● 実験支援・代行 ● 各第三者認証への対応

技術受託

● 遺伝子組換え動物の維持・繁殖 ● 無菌動物の作出・維持 ● 実験受託(非GLP) ● 施設クリーンアップ

無菌

ビニールアイソレータ飼育で



無菌マウスの作出と維持・繁殖・供給をお受けします。飼育環境は月1回の無菌検査を実施し、安心です。また、ノトバイオト実験受託や無菌マウスの受託試験・器官採取も承ります。

取扱い実験動物

TsI: C57BL/6Ncr (GF)
 TsI: BALB/cCr (GF)
 TsI: ICR (GF)

三協ラボサービス株式会社
 SANKYO LABO SERVICE CORPORATION, INC.

本社 東京都江戸川区西一之江2-13-16
 本社営業部 TEL.03-3656-5559 FAX.03-3656-5599
 skl-tokyo@sankyolabo.co.jp

北陸営業所 TEL.076-425-8021 FAX. 076-491-1107
 skl-hokuriku@sankyolabo.co.jp

札幌営業所 TEL.011-881-9131 FAX.011-883-1176
 skl-sapporo@sankyolabo.co.jp

つくばラボ TEL.029-829-3555 FAX. 029-862-5555
 skl-tsukuba_Labo@sankyolabo.co.jp

最新、詳しい情報はこちらで www.sankyolabo.co.jp

日本実験動物学会の動き

平成27年度 維持会員懇談会

日 時:平成27年 11月27日(金)13:30～18:30
 場 所:中央大学 駿河台記念館 285号室
 〒101-8324 東京都千代田区神田駿河台3-11-5
 講演会:無料(当日参加は自由ですが、出来るだけ事前の参加登録をお願いします)
 意見交換会:5,000円/人
 主 催:(公社)日本実験動物学会
 後 援:日本製薬工業協会、(公社)日本実験動物協会、日本実験動物協同組合 他(予定)

第4回 実験動物科学シンポジウム

テーマ:新たな疾患モデル動物が切り開く橋渡し研究
 日 時:平成27年12月11日(金)13時～18時
 場 所:加計学園50周年記念館ホール(岡山理科大学)
 参加費:無料(当日参加は自由ですが、出来るだけ事前の参加登録をお願いします)
 主 催:(公社)日本実験動物学会、岡山実験動物研究会
 後 援:岡山理科大学

第6回 実験動物管理者研修会

日 時:平成28年2月29日(月)～3月1日(火)
 場 所:東京大学山上会館大会議室
 参加費:4,000円(会員)、5,000円(非会員である維持会員団体職員)、6,000円(非会員)
 定 員:100名
 その他:受講者には資料を配布、受講修了証を発行
 主 催:(公社)日本実験動物学会
 後 援:環境省、厚生労働省、農林水産省、文部科学省

上記の各催事のプログラム、参加申し込み等については日本実験動物学会のホームページ(<http://www.jalas.jp/>)に掲載しますので、そちらでご確認ください。

第63回日本実験動物学会総会

メインテーマ:インビボ実験医学－Bench to Bedside－
 大会長:伊藤 守(公益財団法人 実験動物中央研究所)
 日 時:平成28年5月18日(水)～20日(金)
 場 所:ミュウザ川崎シンフォニーホール

プログラム、参加申し込み等については第63回日本実験動物学会総会ホームページ(準備中)をご覧ください。

日本実験動物技術者協会の動き

北海道支部

講習会等	期 日	場 所	テーマ
第49回支部勉強会 (講演会)	10月1日(木)	北海道大学 遺伝子制御研究所 (札幌市北区)	「ここまで進んだ遺伝子改変マウス作製技術」 講師:森岡裕香先生

関東支部

講習会等	期 日	場 所	テーマ
実験動物の感染症と 検査および微生物 クリーニング	10月23～ 24日(金～土)	(公財)実験動物中央研究 所(川崎市)	微生物クリーニング、微生物検査、帝王切開など http://www.jaeat-kanto.jp/ 参照
第17回REG部会	11月14日(土)	東京都健康長寿 医療センター(板橋区)	ゲノム編集技術の話題、ミニシンポジウム 「プロトコルに書かれない生殖・発生工学技術のコツ」を 中心に講演会内容を企画、検討中 http://www.jaeat-kanto.jp/ 参照
イヌの取り扱いと 実験手技基礎	11月21(土)～ 22日(日)	慶應義塾大学 (信濃町)	イヌを用いた基本的な取扱と採血、 投与などの手技、手術体験 http://www.jaeat-kanto.jp/ 参照

東海北陸支部

講習会等	期 日	場 所	テーマ
実験動物技術講習会	11月中旬の予定	名古屋近郊で 現在調整中	小動物を用いた実技を中心とした講習会 http://www.jaeat-tokai.org/ 参照

関西支部

講習会等	期 日	場 所	テーマ
平成27年度 ウサギ・モルモ ット上級実技講習会	10月24日(土)～ 25日(日)	神戸学院大学 (神戸中央区)	ウサギ、モルモットに関する実験動物1級技術者レベルの 技術講習会。 http://www.jaeat-kansai.org/ 参照。
平成27年度 実験用ブタの取 り扱い及び実験手技 講習会(仮題)	2016年1月30日 (土)～31日(日)	岡山大学自然科学研究 支援センター動物資源 部門(岡山市北区)	近年注目を集めている実験用ブタの取り扱い、実験手技に ついて、実験動物技術者として実践で役立つ技術を学ぶ。 (関西支部としては初の開催となります) http://www.jaeat-kansai.org/ 参照
平成27年度春季大会・ 関西支部総会	2016年3月5日(土)	大阪大学銀杏会館(予定)	未定

九州支部

講習会等	期 日	場 所	テーマ
第35回 九州支部研究発表会	11月7日(土)	九州大学 (福岡県福岡市)	研究発表会並びに特別講演会等

詳細は、日本実験動物技術者協会ホームページ(<http://jaeat.org/>)を参照下さい。

1. 委員会等活動状況

委員会名等	開催日	協議・場所
第1回教育・認定委員会	27.7.7	研修会の計画等について他
微生物モニタリング技術研修会 (実験動物中央研究所)	27.7.10～11	感染症診断・予防実技
第1回実験動物福祉委員会	27.7.15	実験動物福祉に関する冊子の改編について他
試験問題作成小委員会	27.7.18	1級、2級技術者試験問題の作成
実験動物2級技術者学科試験	27.8.23	全国15か所
第1回生産対策委員会	27.8.24	家畜改良センターで系統造成したミニブタについて
通信教育スクーリング (東京、京都)	27.8.29～30	日本獣医生命科学大学、 京都府立医科大学
第1回試験採点・合否判定 小委員会	27.9.1	実験動物2級技術者学科試験の判定
実験動物高度技術者研修会 (白河研修会)	27.9.7～11	(独)家畜改良センター研修所
実験動物1級技術者学科試験	27.9.12	全国8か所
第2回情報委員会	27.9.15	LABIO21 No.63の企画他
第3回モニタリング 技術委員会	27.9.16	ブタの感染症及び微生物学的検査に関する 情報収集について他
第2回試験採点・合否判定 小委員会	27.9.29	実験動物1級技術者学科試験の判定他
第2回教育・認定委員会	27.9.29	教育セミナーフォーラムについて他

2. 行事予定

行事	開催日	場所
サル類の実技研修会	27.11.7	日本獣医生命科学大学
ウサギ、ブタの実技研修会	27.11.7～8	日本獣医生命科学大学
実験動物2級技術者実技試験	27.11.28	日本獣医生命科学大学、 京都府立医科大学
実験動物1級技術者実技試験	27.11.29	日本獣医生命科学大学、 京都府立医科大学
教育セミナーフォーラム2016	28.2.27	東京大学弥生講堂
技術指導員研修会	28.2.28	日本獣医生命科学大学
教育セミナーフォーラム2016	28.3.12	京都府立医科大学

3. 関係団体行事

- ◆ 第49回日本実験動物技術者協会総会
日時：2015年10月9日～10日
会場：グランシップ
(静岡県コンベンションアーツセンター)
大会長：前田 典彦 (京都大学霊長類研究所)
詳細：http://www.jaeat-tokai.org/shizuoka2015/
- ◆ 第3回日本先進工学ブタ研究会
日時：2015年10月16日 13時～17日12時
会場：日本大学会館
世話人：大西 彰 (日本大学生物資源科学部動物資源科学科動物
生殖学研究室)
- ◆ NPO 動物実験関係者連絡協議会第4回シンポジウム
日時：2015年11月28日 13:00～16:30
会場：日比谷コンベンションホール (大ホール)
詳細：http://www.renkyo.or.jp/what_new.htm#symposium4
- ◆ 第28回日本動物実験代替法学会
日時：2015年12月10日～12日
会場：ワークピア横浜
大会長：山影 康次
(一般財団法人食品薬品安全センター 秦野研究所)
詳細：http://jsaae28.umin.jp/
- ◆ 第4回 実験動物科学シンポジウム
日時：2015年12月11日 (金) 13時～18時
場所：加計学園50周年記念館ホール (岡山理科大学)
主催：(公社) 日本実験動物学会、岡山実験動物研究会
詳細：http://okayamaexpanim.sharepoint.com/Pages/
kenkyukaikaisai.aspx
- ◆ 第63回日本実験動物学会総会
日時：2016年5月18日 (水)～20日 (金)
場所：ミューザ川崎シンフォニーホール
大会長：伊藤 守 (公益財団法人 実験動物中央研究所)

4. 海外行事

- ◆ 第66回 AALAS National Meeting
日時：2015年11月1日～5日
会場：Phoenix, AZ
詳細：http://www.aalas.org/national-meeting
- ◆ 第55回 Society of Toxicology Annual Meeting and ToxExpo
日時：2016年3月13日～17日
会場：New Orleans, Louisiana
詳細：http://www.toxicology.org/events/am/AM2016/index.asp



節目の年に

今年には戦後70年の節目の年という。先の大戦が終わった年に生まれた人が70歳に達したことになる。次代の若者が永遠に戦後謝罪を続けることは避けるべきとの安倍首相の70年談話は、戦争を知らない世代には至極当然には思えるのだが、我々日本人にはそう思っても、様々な形で戦後を迎えた各国の思いは、その時、その時の時代背景や時の権力構造の中で様々な主張が交錯するもの、また理解できないわけでもない。が、何事にも基本となる正義があり、極端に限度を超えたり、偏った価値観を振り回しては、まとまるものもまとまらないのも道理であらう。

何度かの動物愛護管理法の改正論議を経て、わが国でも動物実験における動物福祉の在り様が議論され、体制が整備されてきた。種々の基準や指針、ガイドラインが発出された2006年体制が少しずつ実効をあげていると評価はされているが、細部にわたればまだまだ取り組むべき課題は多い。立場を異にする主張が渦巻くとしても、過度に偏った議論に終始することなく社会全体が合意できる体制が整備されることを願うばかりである。

我が日動協も今年で創立30周年を迎えた。30年記念誌でこの30年を振り返ると、先達の皆さんの多くのご苦勞の下に今の現状があることにあらためて敬服する。勢いのあった時代も、混沌とした時代も、やや地盤沈下しつつある時代も、其々の知恵と叡智で乗り切ってきたことを後進の身として肝に銘じて学びたい。

竹は節目ごとに成長点を持ち、節目を起点に新たに成長することや節目ごとにそれまでの過程をリセットして次の成長に向かうことが植物学的に証明されている。竹に倣うまでもないが、我々も節目の年に当たり、過去を振り返りつつ、新たな時代を目指して成長したいものである。

私事ながら、今年の3月で世にいう定年退職となった。思いがけずその後の人生を得て現職にある。定年前と変わらぬ忙しない日々を送ってはいるが、この節目に当たり、せめてこの後は、竹のごとくこれまでの人生をリセットして、日々心を洗いつつ正義が正義として通用する健全な社会に身を置きたいと願っている。

そういえば、高校野球も今年で100年の節目という。懸命に白球を追う澁刺とした若い球児達に健全な明日を願う。まだまだ震災復興とは違い福島の地にあり、頑張ろう日本！、頑張ろう東北！、である。

〔(一財)ふくしま医療機器産業推進機構 大和田一雄〕

STAFF

情報委員会

担当理事	日柳 政彦	MASAHIKO KUSANAGI
委員長	山田 章雄	AKIO YAMADA
委員	大島誠之助	SEINOSUKE OHSHIMA
〃	大和田一雄	KAZUO OHWADA
〃	川本 英一	EIICHI KAWAMOTO
〃	久原 孝俊	TAKATOSHI KUHARA
〃	三枝 順三	JUNZO SAEGUSA
〃	新関 治男	HARUO NIIZEKI
〃	林 直木	NAOKI HAYASHI
〃	山縣 永督	EISUKE YAMAGATA
事務局	武石 悟郎	GORO TAKEISHI
〃	工藤 慈晃	NARIAKI KUDO
〃	畔上 二郎	JIRO AZEGAMI

制作 株式会社 ティ・ティ・アイ TTI

Introducing the Internationally Harmonized
Wistar Hannover GALAS Rat
for Toxicology and Pharmacology



Taconic
Smart Solutions To Improve Human Health

 **CLEA Japan, Inc.**

Global Alliance for Laboratory Animal Standardization



日本クレア株式会社
TEL.03 (5704) 7011 <http://www.CLEA-Japan.com>

登録商標を持つマウス・ラットの生産

私たちチャールス・リバー・グループは
トータルソリューションを提供し、
人類の健康と動物福祉を考えるグローバル企業として、
医薬品などの研究開発分野に貢献してまいります。



プロダクトおよびサービス

遺伝子組み換えサービス

細胞レベルでの*in-vitro*実験

エンドトキシンサービス

各種実験用動物

手術・血清血漿サービス

実験用動物の飼育サービス

受託試験サービス

実験動物のヘルスマニタリング

前臨床および臨床試験

日本チャールス・リバー株式会社

本社 〒222-0033 横浜市港北区新横浜 3-17-6 イノテックビル11F TEL.045(474)9340 FAX.045(474)9341
カスタマーサポートセンター 厚木飼育センター 日野飼育センター 筑波飼育センター 横浜飼育センター
モニタリングセンター 横浜SASセンター 大阪SASセンター
横浜試験サービスセンター 大阪試験サービスセンター