

Japanese Society for Laboratory Animal Resources

LABIO 21



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

【特集】

「ゲノム編集と実験動物(Ⅱ)」

「実験動物の性差について」

【研究最前線】

「オートファジー欠損マウスの解析から見出した新規オートファジー機構」

【トピックス】

「宇宙での小動物飼育について」



未来に繋げる技術と信頼



SLCの業務内容

- 生物検定・安全性試験・薬理試験を含む様々な試験に最適な動物の生産・供給。
 - SPF動物 ● 疾患モデル動物 ● Tg動物 ● Conventional動物
- ◆ 安全性試験(非GLP)および薬効薬理試験などの受託サービス。
- ◆ トランスジェニックマウス・ラットおよびノックアウトマウスの作製。
- ◆ マウス・ラットのSPF化(子宮切断術・受精卵移植)、受託飼育、体外受精および顕微授精技術を用いた希少動物の飼育のお手伝い。
- 臓器摘出モデル動物・痛覚過敏モデル動物・薬物病態モデル動物・カテーテル挿入モデル動物・特殊処置モデル動物などの外科的病態モデル動物の供給。
- PMI社製マウス・ラット・モルモット・ウサギ・新世界ザル・イヌ・フェレット等の飼育飼料の供給。
 - 一般飼育用飼料 / LabDiet ● 特殊飼料 / TestDiet

PMI社HPアドレス <http://www.labdiet.com> | LabDietの日本語資料は日本エスエルシー(株)へご請求ください。

上記の ■ 項目のお問い合わせは本社各エリア営業専用電話までお問い合わせください。
上記の ◆ 項目のお問い合わせはBTセンターまでお問い合わせください。



SLC

日本エス エル シー株式会社
〒431-1103 静岡県浜松市西区湖東町3371番地の8
TEL (053) 486-3178(代) FAX (053) 486-3156
— <http://www.jslc.co.jp/> —

営業専用 TEL 関東エリア(053)486-3155(代)
関西エリア(053)486-3157(代)
九州エリア(0942)41-1656(代)

BTセンター (053)437-5348(代)



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

第64回日本実験動物学会総会の開催にあたって(大和田一雄) 4

特集 ゲノム編集と実験動物(Ⅱ)

マウスのゲノム編集(水野聖哉) 5

遺伝子改変ラットの効率的な作製法とその有用性(吉見一人) 9

特集 実験動物の性差について

性差を考慮した基礎薬学研究を目指して

(黒川洵子、三枝香都貴、山崎泰広) 14

国内製薬企業の動物実験における雌雄使用の現状と今後(山田久陽) 18

実験動物の使用における雌雄バランスについて:

生産業者の現状と今後(森村栄一) 22

研究最前線

オートファジー欠損マウスの解析から見出した新規オートファジー機構

(清水重臣) 25

トピックス

宇宙での小動物飼育について(白川正輝、湯本茜 ほか) 29

ラボテック

小動物サーカディアンリズム自動計測システム「AutoCircaS」

(鈴木孝洋) 35

実験動物1級・2級技術者試験を受験して 38

活動紹介

九州実験動物研究会(小野悦郎) 41

筑波実験動物研究会(山海直) 42

ほんのひとりごと 43

日本実験動物学会の動き 44

日本実験動物技術者協会の動き 44

協会だより 45

KAZE 46

時代の先端を目指す研究者へのサポート

ベトナム・中国産 カニクイザル

中国・米国産 アカゲザル

Hannover Wistar Rat

RccHan™ : WIST

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

第64回日本実験動物学会総会の 開催にあたって

日本実験動物学会第64回総会（学術大会）

大会長 大和田 一雄

（一般財団法人ふくしま医療機器産業推進機構）

このたび第64回日本実験動物学会総会（学術大会）を担当させていただくこととなりました。会期は平成29年5月25日（木）～27日（土）、会場はビッグパレットふくしま（福島県郡山市）で開催させていただきます。伝統ある本学会総会をお引き受けするにあたり、一言ご挨拶申し上げます。

あの2011年3月11日の大震災から早くも6年が経過しました。ともすると風化しがちな世情のなか、被災地では復旧・復興に向けて多くの事業が展開されています。「フクシマ」では地震や津波の災害に加え、原発禍も加わり、その復興には多くの年月を要することが予想されています。

その様な背景をふまえ、ライフサイエンスの基盤研究や基盤技術の開発を担う科学者集団からのメッセージとして、メインテーマを「ライフサイエンスが復興を促進する」とさせていただきました。この思いにご共感いただき、できるだけ多くの皆様にフクシマの地に足を運んでいただきますようお願い申し上げます。

上記の趣旨にのっとり、基調講演、特別講演、教育講演、シンポジウム、セミナー、ワークショップ、器材展示会、市民公開講座など、多様な企画を準備しておりま

す。今回は一般講演をポスター発表のみとさせていただきましたが、広い会場を有効に活用し、通常のポスター発表とは一味違った形で、ポスター展示エリアでショート口演を交えたご発表をいただき、発表者にも参加者にも満足のいく発表や議論の機会を提供させていただく予定です。上記のサイエンティフィックイベントに加え、懇親会をはじめ、スペシャルイブニングセミナーなどふくしまならではのソーシャルイベントも用意してお待ち申し上げます。詳細は、<http://sympo.adthree.net/jalas64/>にてご確認ください。

ご存じの様に、ふくしまは医療機器産業のメッカでもあります。今大会では、医療機器開発、医工学研究、等をテーマとして取り上げ、基礎研究から安全性評価、臨床への橋渡しという観点から、種々議論を深めていただければと考えています。併せて、この分野で使用が必須と考えられる実験用「ブタ」についてもあらためて焦点をあててみたいと考えています。これらの視点が我が国の今後の実験動物科学のさらなる発展に寄与できればと願っております。

今回の会場は、参加者の皆様は

もとより器材展示の企業の皆様にも十分にご満足いただける広い展示場が整備されています。例年通り、実験動物器材協議会のご支援の下、器材展示会を開催する予定ですので、ご出展をお考えの企業や団体の皆さまは奮ってご準備をお願い致します。器材展示会場においては企業展示プレゼンテーションステージを設け、展示企業の皆様にブースでのご案内だけでなく、このステージから自社の新製品などを積極的にPRしていただくことと致しました。我が国の実験動物業界が今日あるのは、アカデミアはもとより、器材、動物、飼料、また実験動物ユーザーなど、関連の企業の皆様の連携とご尽力の賜物と考えておりますので、参加者と企業の皆様が至近距離で交流できる場を提供すべく万全の準備を整えてお待ちしております。

郡山は、東京から77分と交通至便な場所にあります。一歩足を踏み入ると、猪苗代湖や会津、裏磐梯など、多くの観光名所があり、またおいしいお酒にも事欠きません。

是非、福島の地に足を運んでいただき、現在の「ふくしま」を体感していただければ幸いです。



マウスのゲノム編集

筑波大学生命科学動物資源センター

水野 聖哉

はじめに

シンプルな仕組みにも関わらず強力な切断活性を保持するCRISPR/Cas9は遺伝子改変動物作製に革命的な影響をもたらした。特に、実験用マウスの分野では、すでに確立されていた高度な胚操作技術とCRISPR/Cas9システムが速やかに融合し、受精卵ベースのゲノム編集にて数多くの遺伝子改変マウスが世界中で作出される様になった。この受精卵ベースの遺伝子改変マウス作製に関しては、本邦からユニークな研究が多数報告されている。本稿ではこれらの報告を軸にCRISPR/Cas9による遺伝子改変マウス作製について紹介する。なお、ラットや霊長類の受精卵でのゲノム編集法についても質の高い研究が報告されているが¹⁻³、本稿はマウスの受精卵でのゲノム編集に焦点を絞った解説とした。

受精卵ベースのゲノム編集で作製される各種遺伝子改変マウス KO マウス

受精卵に guide RNA (gRNA) と Cas9 を導入し単純な一箇所切断を生じさせると、切断部位が非相同末端再結合を介して修復される。その際に生じる indel 変異がフレームシフトの原因となる

と遺伝子の機能が不全となり、いわゆるノックアウト (KO) マウスが得られる。また、同時に二箇所を切断すると、各切断末端同士が結合し、その間の領域が切除 (excision) される。本稿では前者を indel-KO と、後者を ex-KO とし区別する。indel-KO マウスは非常に高い効率で得られるが、野生型の配列との差が数塩基対であるため、系統化後の遺伝型解析が煩雑になる。また、indel 変異下流に存在する「メチオニンをコードしていた ATG」が開始コドンとなることで N 末短縮型のタンパク質が翻訳される可能性⁴がある点も注意が必要である。一方、ex-KO は誘導効率では indel-KO に劣るが遺伝型解析は容易である。メガベース単位の切除も可能であるため⁵、転写調節領域の同定にも利用可能である⁶。

点変異マウス

ヒトで発見された疾患感受性の一塩基多型 (または変異) の影響を *in vivo* で解析したい場合に、その点変異を再現した遺伝子改変マウスが有用である。点変異マウスはドナー DNA を用いると受精卵ベースのゲノム編集で作出することができる。ドナー DNA とは切断部位の上下流に相同な

配列の間に任意の変異配列が設置されたDNAである。合成一本鎖DNAドナーをgRNA/Cas9と共に受精卵に導入すると、ドナーを介した相同組換え修復経路により点変異が誘導される⁷。既存の遺伝子ターゲティング法でも点変異マウス作製は可能だが、ポジティブセレクションが必要なため、薬剤耐性遺伝子やloxP(またはFRT)配列が点変異部位に隣接する。ゲノム編集技術はこれら副産物がない点変異誘導を可能にしたが、それは同時に点変異を検出し得るルーティンな遺伝型解析手法が要求されることを意味する。そこで我々は、点変異を生じさせる際に、そのすぐ近傍で汎用制限酵素認識配列が生じる様な同義置換を共導入している。ただし、同義置換はmRNAの2次構造やタンパク質の合成速度に影響する可能性があるため⁸、これらを考慮した上でその後の*in vivo*研究を進めなくてはならない。

KIマウス

標的遺伝子座に目的の外来遺伝子が導入されたKnock-in (KI)

マウスは多くの研究で使用される。FLAGなどのエピトープタグKIマウスは特異的な抗体が存在しないタンパク質においてもその局在や他のタンパクとの相互作用を明らかにすることができる。蛍光レポーター遺伝子KIマウスは目的とする遺伝子発現の可視化や細胞トレーシングに有用である。また、ヒト遺伝子をマウスのホモログ遺伝子座にKIした遺伝的ヒト化マウスはヒト病態モデルとして医薬品開発に利用される。これらのKIマウスも受精卵ベースのゲノム編集で作製可能である。筆者らは合成一本鎖DNAを用いたゲノム編集で72塩基対のノックインに成功した(未発表)が、それ以上の長さをもつ遺伝子断片のノックインには、一般に、二本鎖DNAドナーが要求される。なお、本稿では、合成一本鎖DNAドナーで作製可能なKIマウスをTag-KIとし、それ以上の長さの遺伝子断片がKIされたマウスをFragment-KIとして区別する。Fragment-KIマウスはその高い有用性から多くの施設で作製が試みられてきたが、そ

の作出効率は低い⁹。現在、このFragment-KI効率を上昇させるために様々な技術開発が報告されており、本稿ではその数例を「効率的Fragment-KIマウス作製への挑戦」の単元で紹介する。

floxマウス

現在、全遺伝子の約30%は胚発生に必須であると見積もられている¹⁰。これらの致死性遺伝子の機能を成体の各組織で解析するために、lox配列依存的DNA組換え酵素であるcreを特定の組織でのみ発現する「creドライバーマウス」と目的の遺伝子部位が36塩基対のlox配列で挟まれた「floxマウス」の交配より得るcKOマウスが頻用されている。このfloxマウスを受精卵ベースのゲノム編集で作製する方法として以下の二つが報告されている。一つ目はゲノム二箇所を同時に切断後、各部位において一本鎖DNAドナーによりloxPを独立にKIする方法である¹¹。もう一つが、二箇所同時切断後に長鎖二本鎖DNAドナーを介して目的の遺伝子部位がfloxされた配列自身をKIする

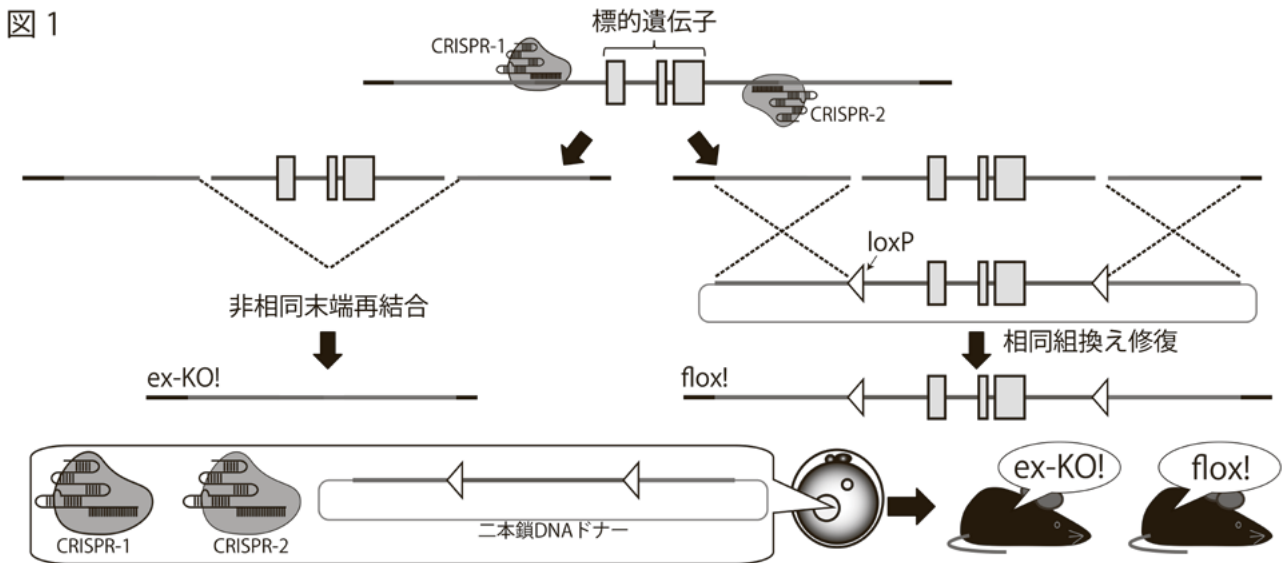


図1 二本鎖DNAドナーを用いたfloxマウスの作製
CRISPRによりゲノム二箇所を同時に切断されたゲノムは非相同末端再結合またはドナーDNAを介した相同組換え修復により修復される。どちらの経路で修復されるかはランダムなため、数十匹のマウスを作製するとex-KOマウスとfloxマウスが同時に得られる。

表1 マウス受精卵でのゲノム編集法

方法	前核マイクロインジェクション				細胞質マイクロインジェクション				エレクトロポレーション			
	gRNA	Cas9	ドナー-DNA	引用	gRNA	Cas9	ドナー-DNA	引用	gRNA	Cas9	ドナー-DNA	引用
KO	DNA	DNA	—	15	DNA	DNA	—		DNA	DNA	—	
	RNA	RNA	—	17	RNA	RNA	—	13	RNA	RNA	—	21
	RNA	Protein	—	18	RNA	Protein	—	18	RNA	Protein	—	22
点変異 & Tag-KI	DNA	DNA	合成一本鎖	7	DNA	DNA	合成一本鎖		DNA	DNA	合成一本鎖	
	RNA	RNA	合成一本鎖	29	RNA	RNA	合成一本鎖	13	RNA	RNA	合成一本鎖	23
	RNA	Protein	合成一本鎖	20	RNA	Protein	合成一本鎖		RNA	Protein	合成一本鎖	22
Fragment-KI	DNA	DNA	二本鎖	16	DNA	DNA	二本鎖		DNA	DNA	二本鎖	
	RNA	RNA	二本鎖	11	RNA	RNA	二本鎖	11	RNA	RNA	二本鎖	
	RNA	Protein	二本鎖	19	RNA	Protein	二本鎖		RNA	Protein	二本鎖	

方法である¹²。どちらも方法においても非相同末端再結合によるex-KOアレルをもつマウスが副産物的に得られるのが本戦略の魅力である(図1)。なお、筆者の施設では後者の方法で良好な結果を得ている。

作出方法の多様化

CRISPR/Cas9を使用した各種遺伝子改変マウス作製の方法は複数報告されている。大きく分けると「gRNAとCas9 mRNA」、「gRNAとCas9を発現するDNAベクター」、「gRNAとCas9タンパク」を導入する3つの方法である。各作出方法の細かな条件は表1に示す引用論文を参照してもらいたい。

gRNAとCas9 mRNA

WangらはgRNAとCas9 mRNAを細胞質にマイクロインジェクション(Micro-Injection: MI)で導入することで、世界で初めてCRISPR/Cas9によるKOマウス作製を達成し、更に、これらを合成一本鎖DNAドナーとともに細胞質MIすることで点変異やTag-KIも誘導できると報告した¹³。また、これらを二本鎖DNAドナーとともに核内にMIすることで7,000塩基対を超える長さのFragment-KIマウスも作製可能である¹⁴。

gRNAとCas9を発現するDNAベクター

MashikoらはgRNAとCas9の両者を発現するpX330プラスミドを核内にMIすることでKOマウスの作製に成功した¹⁵。このpX330の核内MIでは1メガベース以上のex-KOが作製でき、合成一本鎖ドナーまたは二本鎖DNAドナーを使用することで、点変異・Tag-KI・Fragment-KI・floxマウスの作出も可能である^{5, 7, 16, 12}。前述の方法に比べ切断活性は低いとの報告があるが¹⁷、三者の中では一番安価かつ安定性が高い。ただし、発現ベクター自身がゲノムに挿入される可能性がある点に注意が必要である。

gRNAとCas9タンパク質

SungらはgRNAとCas9タンパクを核内または細胞質へMIすることでKOマウスが作製できると報告した¹⁸。その後、ドナーDNAと共に核内にco-MIすることで、各種遺伝子改変マウスが作製できることが示された^{19, 20}。一度外部から供給されるだけのCas9タンパク質は受精卵に残存する期間が短いため、目的以外の部位が切断されるオフターゲット効果が少ないと考えられる。加えて、切断活性が高いCas9タンパクが各試薬メーカーより比較的安価で市販されるようになってきたため、今後、更に使用頻度が高ま

ると予想される。

エレクトロポレーション

受精卵へのMIで各種遺伝子改変マウスを作出できるが、MIは手技の習熟に時間がかかることや高価な顕微鏡とインジェクターが必要であることが問題である。そこで、受精卵エレクトロポレーションによるゲノム編集法が開発された²¹。gRNAとCas9 mRNAもしくはgRNAとCas9タンパク質の混合溶液中に受精卵を並べ、電氣的に受精卵内へRNAとタンパク質を導入するだけでKOはもちろん、点変異マウスやTag-KIマウスも作出される^{22, 23}。更なる応用として、卵管内の受精卵にエレクトロポレーションでgRNAとCas9を導入することで、一度も胚を体外培養することなくゲノム編集マウスを作製できる方法も報告され²⁴、エレクトロポレーションは急速に広まっていく技術として期待される。

効率的Fragment-KIマウス作製への挑戦

Fragment-KIマウスは、その高い利用価値にも関わらず、受精卵ベースのゲノム編集での作製効率が低い。そのため、KI効率を上げる試みが行われている。KIは非相同末端再結合でなく相同組換え修復の経路を介して生じる。

そこでMaruyamaらは非相同末端再結合の際に重要な役割を担うLig4を小分子Scr7で阻害することでKI効率を上昇させることに成功した²⁵。

長鎖の二重鎖DNAドナーを用いた際には、核内MIに比べ細胞質MIでのKI効率が低い。Nakaoらは、長鎖二重鎖DNAドナーが核膜通過に時間がかかることがその原因であると考え、DNA修復を遅らせるcytochalasin Bを使用することで、KI効率を高めた¹⁴。一本鎖DNAは二本鎖DNAより容易に核膜を通過するが、化学的に合成される一本鎖DNAはその長さが200 merまでに限られる。そこで、Miuraらは目的の配列をもつ二本鎖DNA断片を一度RNAに転写し、再度逆転写することで長鎖一本鎖DNAを調整し、この長鎖一本鎖DNAをドナーとすることでKIマウスを効率的に作製した²⁶。本技術は二本鎖DNAドナーでの

KIが困難であるエレクトロポレーションへの応用にも期待されている。

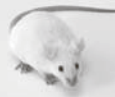
おわりに

受精卵ベースのゲノム編集法が確立されたため、短期間でより自由な遺伝子操作が可能となった。更に、重度免疫不全マウス系統²⁷や野生由来マウス系統²⁸での遺伝背景に縛られない遺伝子改変も可能になってきており、全く新しい視点から研究を進めることできる。今後は、強力なゲノム編集技術を巧みに利用し、実験用マウスの特性を鑑みながら、科学の発展に寄与できるような遺伝子改変マウス作製とその解析を行っていききたい。

引用文献

1. Kaneko, et. al., Sci Rep. (2014) 4:6382.
2. Yoshimi, et. al., Nat Commun. (2016) 7:1043.
3. Sato, et. al., Cell Stem Cell. (2016) 19:127-38.

4. Makino, et. al., Sci Rep. (2016) 6:39608.
5. Mizuno, et. al., Sci Rep. (2015) 5:13632.
6. Ohmura, et. al., J Clin Invest. (2016) 126:865-78.
7. Mizuno, et. al., Mamm Genome. (2014) 7-8:327-34.
8. Hunt, et. al., Trends Genet. (2014) 7:308-21.
9. Oji, et. al., Sci Rep. (2016) 6:31666.
10. Adams, et. al., Dis Model Mech. (2013) 6:571-9.
11. Yang, et. al., Cell. (2013) 154:1370-9.
12. Nakagawa, et. al., Sci Rep. (2016) 6:27857.
13. Wang, et. al., Cell. (2013) 153:910-8.
14. Nakao, et. al., Genesis. (2016) 54:65-77.
15. Mashiko, et. al., Sci Rep. (2013) 3:3355.
16. Hasegawa, et. al., Exp Anim. (2016) 65:319-27.
17. Horii, et. al., Sci Rep. (2014) 4:4513.
18. Sung, et. al., Genome Res. (2014) 24:125-31.
19. Jung, et. al., Transgenic Res. (2016) 5:1142-8.
20. Nakagawa, et. al., Biol Open. (2016) 5:11315.
21. Hashimoto, et. al., Sci Rep. (2015) 4:319-27.
22. Wang, et. al., J Genet Genomics. (2016) 10:e0142755.
23. Takahashi, et. al., Sci Rep. (2015) 5:11406.
24. Maruyama, et. al., Nat Biotechnol. (2015) 33:538-42.
25. Miura, et. al., Sci Rep. (2015) 5:12799.
26. Li, et. al., Sci Rep. (2014) 4:5290.
27. Hirose, et. al., Sci Rep. (2017) 7:42476.
28. Mianné, et. al., Genome Med. (2016) 8:16.



貴重なデータを保持した実験動物を安全・確実・清潔に全国へお届けします。

お客様の多彩なニーズにお応えできる車両をご用意

- 1 t 保冷車 (空調車) 9 台
- 2 t 保冷車 (うち空調車 3 台) 4 台
- 3 t 保冷車 PG (空調車) 3 台
- 4 t 保冷車 エアサス (空調車) 1 台
- 4 t 保冷車 エアサス PG (空調車) 2 台
- 4 t 保冷車 (温調車) 1 台
- 4 t 保冷車 (空調車) 2 台



カーテン・フィルタ・ネズミ返し

積載室の温度管理や虫を防ぐためのカーテン、大気中の砂・ほこり・カビ・菌等の不純物を防ぐためのフィルタ、積載室の動物 (遺伝子改変動物) の逃亡防止のためにネズミ返しの設置をしています。



マウス・ラット輸送箱
滅菌した輸送箱を事前にお届け致します。

サル輸送ケージ
特定外来生物の飼養等の許可を受けているケージをご用意しております。

ブタ用荷台柵
ケージに入らないブタ・遺伝子改変ブタにご対応致します。



最大 1 億円の車両保険

保冷装置、温度調節機などの破損、故障の際に運送中のものが壊れたり、死んでしまった場合は補償になります。万が一動物輸送中に冷蔵機が故障した場合の対応は菱重コールドチェーンの全国のロードサービスで 24 時間 365 日対応します。



千葉県成田市新田 280-1
TEL 0476-73-2403
FAX 0476-73-2419

葛生運送

http://www.kuzuu.transport.com
info@kuzuu.transport.com

遺伝子改変ラットの効率的な作製法とその有用性

大阪大学大学院医学系研究科附属共同研 ゲノム編集センター
吉見 一人

実験用ラットの利点と欠点

ラットはマウスと同様に代表的な実験用哺乳動物であり、100年以上前からヒトの疾患解明に向けた基礎研究、治療法・予防法の開発を目指した薬効・安全性評価などに広く利用されてきた。特に、神経学・行動学の分野でも優れたモデルとされ、最近では、マウスでは見られないような互いを助け合う共感性行動をラットは示すことが報告されている¹。また、マウスに比べて体が大きく外科的処置を比較的簡単に行えるため、脳への電極挿入や光遺伝学的手法を用いた局所的な神経細胞の操作²などにも重宝されている。最近では、日本のNBRPラット (<http://www.anim.med.kyoto-u.ac.jp/NBR/>) や米国のRGD (<http://rgd.mcw.edu/>) を筆頭に、ラットのデータベースも充実している。様々な系統や疾患モデルラットの遺伝学的情報、生理学的情報が整理・公開され、リソースとしても利用できるようになっている。

一方で、遺伝子機能解析モデルとしては、マウスに大きな後れをとっている。マウスでは1970年ご

ろから体外受精・胚操作などの生殖工学技術が確立され、1980年代後半にはES細胞を用いた遺伝子ノックアウトマウスの作製ができるようになった。マウスの全ゲノム配列もいち早く解読されてデータベースが整備され、まさにマウスは遺伝子の生理機能解析における代表的なモデルとして確立されている。一方ラットは、生殖工学技術は発展していたものの、安定したラットES細胞の樹立ができずノックアウトラットの作製が長い間できなかった。2008年によく次世代に伝わるES細胞が樹立され³、2010年にp53遺伝子ノックアウトラットが報告されたが⁴、マウスに比べて実に20年近くの間を要した。しかし、ほぼ同じタイミングでゲノム編集技術が登場したことで技術的なハードルが下がり、ラットのみならず多くのモデル生物で遺伝子操作が実施されつつある。

ラットにおける遺伝子改変の変遷

現在のように遺伝子改変ラットの作製が簡単にできるようになる以前、遺伝子変異ラットの作

出には、トランスジェニック法やミュータジェネシス法が主に用いられていた。トランスジェニック法は、外来遺伝子DNAを受精卵に導入する技術で、外来遺伝子がゲノム上にランダムに挿入され、過剰発現させることができる。一方、ミュータジェネシス法は、Sleeping BeautyなどのトランスポゾンやENUなどの化学変異原を導入することで、ゲノム上にランダムに変異を誘発できる。導入した変異配列のスクリーニングを簡易化・低コスト化することで、狙った遺伝子の変異ラットを選抜することができることが示されてきた⁵。しかし、1万匹規模の大きなリソースやシーケンス解析が必要となるため、やはり個々の研究室レベルで遺伝子変異ラットを作成することは難しい。汎用性の高い遺伝子改変技術の確立は、ラット研究が広がりを持つために必要な課題であった。

こうした状況の中、ゲノム編集技術が登場したことで、ラットのみならずモデル動物を扱う多くの研究に革命がもたらされた。第一世代のゲノム編集ツールである

ZFNやTALENは、特定のDNA配列を認識するDNA結合ドメインと、DNAを切断するFok Iヌクレアーゼとを融合した人工ヌクレアーゼとして開発された⁶。1組の人工ヌクレアーゼを設計して受精卵に注入するだけで、標的配列にDNA二本鎖切断が誘導され、欠失や挿入変異を導入できる。また、相同配列を持つドナーDNAを同時に導入することで、標的部位をドナーDNA配列に改変するノックインもできる。この方法を用いることで、ES細胞を用いずに標的遺伝子を改変できるようになった。実際にラットにおいても2009年、ZFNによるノックアウトが⁷、2010年にはTALENによるノックアウトラットが初めて報告され⁸、現在でも多くの遺伝子改変ラットが作製、報告されている。

CRISPR/Cas9を用いた遺伝子改変ラットの作製

様々な生物種に対してZFNやTALENが応用されつつある中、新たなゲノム編集ツールCRISPR/

Cas9が登場したことで、マウスや細胞株でも爆発的に利用されるようになった。CRISPR/Cas9は、gRNAがゲノム上のPAM配列の上流20塩基を認識して結合することで、Cas9ヌクレアーゼが二本鎖切断を導入する。その結果、ZFNやTALENと同様にノックアウト、ノックインを行うことができる。加えてZFNやTALENに比べて複雑なベクター構築が不要で調製が格段に簡単になり、多くの研究者の間に広まっている。CRISPR/Cas9が登場した当初は、gRNAの配列によっては全く変異が生じない場合があった。そのため、複数のgRNAを設計して細胞レベルで二本鎖切断導入効率を確認し、もっとも効率の良いgRNAを選抜する必要があった。しかしCas9への核移行シグナルの付加、アミノ酸配列の最適化などがなされ、改良型Cas9が作成され、条件検討にかかる時間は減っている。現在では多くの企業からこうした切断効率の良いCas9発現プラスミドやCas9タンパク質、またgRNAが販売さ

れ、まさにReady-to-useの形で購入・利用することができる(表1)。

CRISPR/Cas9コンポーネントの受精卵への導入法は、従来のトランスジェニック動物作製と同様に、顕微鏡下でガラス針から注入するマイクロインジェクション法が主流である。この方法は確実に受精卵内へ導入することができる一方で、熟練した技術と高価な設備が必要なため、使用できる研究室は限られている。最近、エレクトロポレーション法を用いた導入法が開発され、こうした問題は解消されつつある。受精卵に電気パルスを与えることで微細な穴をあけることで、一度に約100個程度の受精卵にDNAやRNAを導入できる(表1)。実際にラット受精卵においても効率的に遺伝子改変ラットが作製されている⁹。

一本鎖オリゴDNAを用いたノックイン

現在ではもっぱら標的部位を特定配列に改変するノックインがいかにか効率よくできるか、という点が焦点になっている。ノックインができれば、外来遺伝子の安定的導入に加え、内在性遺伝子の詳細な機能解析、特に発現部位や発現時期の操作、ライブイメージング等が可能になり、研究におけるモデル動物の有用性が非常に高まる。ノックイン動物の作製は、Cas9 mRNA および gRNA に加えて、相同配列を持つドナー DNA を受精卵に同時に導入する必要がある。

表1 CRISPR/Cas9の受精卵への導入方法とその特徴

条件	利点	欠点	
Cas9の導入形態	プラスミド	大量調製が簡単 繰り返し利用可能	モザイク性が高い Tgのリスクがある 毒性が高い
	mRNA	一過性発現 毒性が低い	In vitro転写が必要 高価
	タンパク質	一過性発現 購入できる	データが少ない
受精卵への導入法	マイクロインジェクション	確実に注入できる 一定量を導入できる	熟練した技術が必要 生存率が低い
	エレクトロポレーション	取り扱い・手技が簡単 作業が早い	多くのRNA、タンパク質が必要
ノックイン用ドナーDNA	一本鎖オリゴ	調製が簡単 高効率	改変可能サイズが小さい (~200bp)
	プラスミド	長いサイズの改変 (1kb<)	効率が低い ホモロジーアーム付加等の 操作が必要

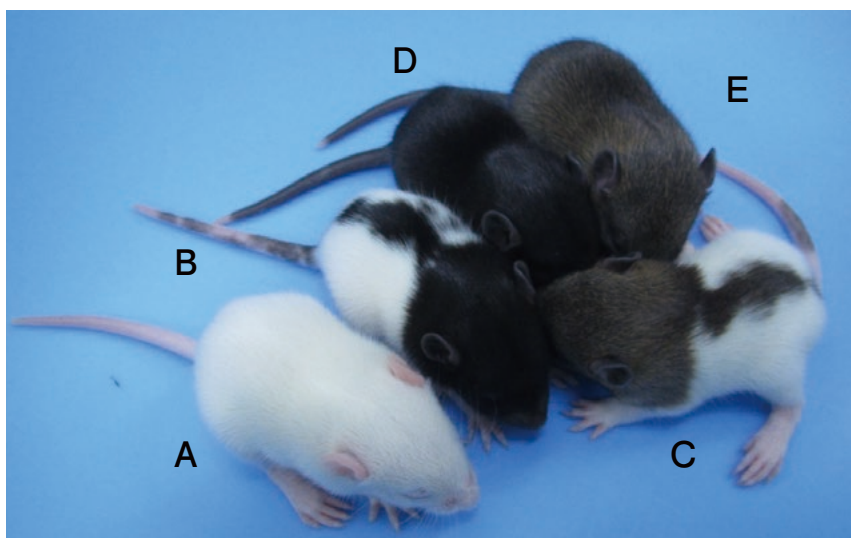


図1 CRISPR/Cas9と一本鎖オリゴDNAを用いて作製したノックインラット
A) アルビノラット、B) 1塩基置換により黒色に修復されたラット、C) 19塩基挿入によりアグーチ色に修復されたラット、D) レトロトランスポゾン除去により頭巾斑が修復したラット、E) ノンアグーチ、頭巾斑がともに修復したラット。

このドナーDNAには通常、プラスミドDNAと一本鎖オリゴヌクレオチド(ssODN)が用いられている。

我々も毛色関連遺伝子を対象に、ssODNを用いて様々なパターンのノックインラットの作製を行い、ノックイン技術の効率化・有用性を示してきた。例えば、アルビノのF344ラットが有している*Tyr*遺伝子の一塩基変異に対し、野生型SNPを含むssODNを共導入することで、一塩基置換により黒色の毛色を示すノックインラットを作製した。また、ノンアグーチ色の原因である*Asip*遺伝子の19塩基欠損変異、頭巾斑の原因である*Kit*遺伝子のレトロトランスポゾン挿入変異についても、野生型配列のssODNを設計・導入した。その結果、19塩基挿入およびレトロトランスポゾンが除去されて表現型が修復されたノックインラットの作製も成功

した(図1)¹⁰。

ssODNは、設計から入手までが簡単で、ノックイン効率も約1-3割と高いことから、一塩基置換などの短い配列の挿入・置換に適している。しかし、現在のオリゴDNAの合成は最大200塩基までであり、長鎖の一本鎖DNAを入手することが難しい。そこで、Nickaseを用いた手法により、長鎖一本鎖DNA (long single strand DNA: lssDNA) を合成し、ノックインラットの作製に応用した。その結果、*Thy1*遺伝子下流に約1kbの2A-GFP配列を導入することに成功した¹¹。この他同じ手法により、Flox配列の導入、リピート配列置換など、様々なパターンの遺伝子改変にも成功している(未発表)。今後、合成できる一本鎖DNA長は伸びることが予想され、数kb程度の遺伝子改変、特に内在遺伝子のタグ化、コンディショナルKOの作

製に広く用いられることが期待される。

プラスミドDNAを用いたノックイン

動物モデルを用いる際、生物種差が問題になることがしばしばある。例えば、ヒトの相同遺伝子を破壊したとしても、ヒトと同様の表現型がでない時がある。これは、動物とヒトとの間で、発現部位や発現量、スプライシングバリエーションなどが異なることが原因と考えられる。すなわち、動物の相同遺伝子の破壊と同時にヒト由来遺伝子を導入ができれば、ヒト体内での発現や機能を模倣した有用なモデル動物になりうる。特に、BACなどを用いてヒト特異的プロモーター下でイントロン領域を含む完全長のヒト由来遺伝子を導入できるようになれば、生物種差の問題点を改善することができる。

長い配列を標的部位に導入したい場合は、ssODNではなくプラスミドやBACなどの二本鎖DNAを使用する必要がある。これまで、プラスミドをドナーとして相同組み換え修復を利用して遺伝子を改変したノックインマウス、ノックインラットの作製は報告されている¹²⁻¹⁴。一方で我々は、異なる修復過程を利用した新しいプラスミドノックインラット作製法、2ヒット2オリゴ法(2H2OP法)を開発した¹¹。この2H2OP法では、2種類のgRNA、2種類のssODN、プラスミドDNAをまとめて受精卵に導入する。その際、CRISPR/Cas9が

「はさみ」としてゲノム上とプラスミド上の標的配列を切断し、二本のssODNが「のり」としてゲノムとプラスミドを上流と下流をそれぞれ結合修復することで、プラスミドDNAを特定のゲノム上に正確にノックインすることが可能となる(図2)。実際に2H2OP法を用いて、CAG-GFPプラスミドのノックイン、BACプラスミドを用いたノックインにも成功している。加えて、標的部位を増やすことでゲノム領域の大規模欠失とプラスミド導入を同時に行うこともできるなど、応用性が高い。ゲノムとプラスミドの結合部位に変異が入りやすいといった改善部分はあるが、こうした正確性や効率性を改良することで、汎用性の高いノックイン作製法になると考えている。

ヒト疾患モデルとしての遺伝子変異ラットの有用性

現在のところ、やはりマウスが遺伝子機能解析モデルのファーストチョイスであることに変わりはない。しかし前述したとおり、マウスでは表現型が出ないことや、ヒトと大きく異なる表現型を示すことが少なからずある。そのため、複数の生物種を用いて遺伝子機能を解析することは、その遺伝子の普遍的機能や種特異的機能を明らかにするうえで重要である。最近の遺伝子改変研究から、ラットがマウスよりも人に近い表現型を示す例が報告され、ヒト疾患モデルとしての遺伝子改変ラットの有用性

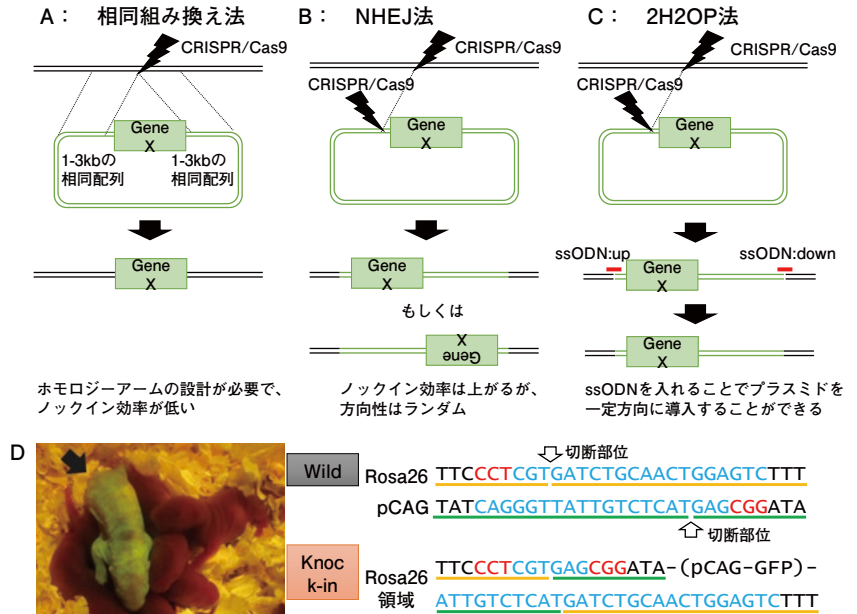


図2 新たに開発したノックイン法2H2OP法の概略と従来法との比較 A-C) 従来法の相同組み換えや非同源性末端結合修復 (NHEJ) を利用した方法に比べ、2H2OP法はプラスミド改変の必要がなく、方向性も規定できる。D) 2H2OP法で作製したCAG-GFPノックインラット (矢印) およびそのシーケンス結果。Rosa26領域にpCAG-GFPが挿入されている。

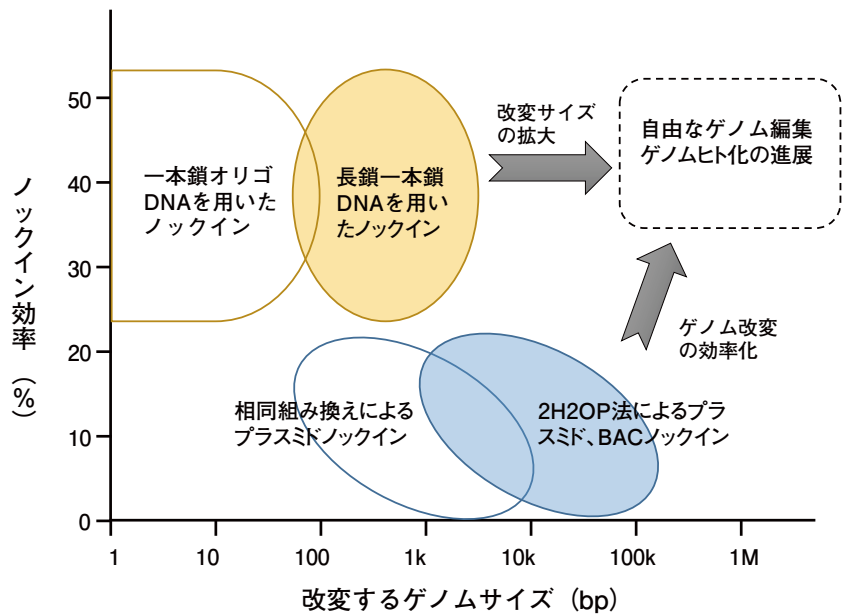


図3 開発した新規ノックイン法 (lssDNA法、2H2OP法) の位置づけ概念図 長鎖一本鎖DNAを用いることで効率を保ったまま長い配列のノックインが可能に、また2H2OP法を用いることで最大200kbと大きなサイズのノックインが可能になった。今後、より大きいサイズを改変する、またその効率を上げる技術や手法が開発されることで、自由自在なゲノム編集やゲノムヒト化に近づくと考えられる。

が示されつつある。

例えば、家族性大腸腺腫症の原因遺伝子である*Apc* 遺伝子のKOマウスは、腸管内に多数の腫瘍を

形成することから、ヒト大腸がんモデルとして利用されてきた。しかし、腫瘍の主な形成場所は小腸であり、経時観察も

難しかった。一方で*Apc* 遺伝子 KO ラットはヒトと同様に大腸にも腫瘍を自然発症することが明らかになった¹⁵。そのため内視鏡を用いることで特定の腫瘍について経時観察や外科的処置を行うことが可能で、有用なヒト大腸がんモデルとして利用されている¹⁶。

また、*Prkdc* 遺伝子 KO マウスは T、B 細胞を欠失することで免疫不全を示すことが知られている。一方で、ホモ欠失でも正常に生存し、ヒトで見られる胎性致死や細胞増殖能の低下は見られない。しかし *Prkdc* 遺伝子のホモ KO ラットは、免疫不全に加えて大幅な体重減少や細胞増殖能の低下がみられ、ヒトの表現型に似ていることが明らかになった¹⁷。

脂肪萎縮に関連する *Bscl2* 遺伝子は、マウスでは脂肪組織と精巣で強く発現している一方で、ラットではヒトと同様に脳でも強く発現していることが明らかになった。実際に KO ラットを作製して解析した結果、空間作業記憶の低下などの神経系異常がみられるなど、マウスでは見られない表現型が報告されている¹⁸。

このように利用するモデル動物によって、発現部位、発現量に大きな差があり、得られる表現型は大きく異なる。マウス以外の動物における遺伝子改変のハードルが下がったことで、実際に遺伝子改変モデルづくりを行う前に、生物種差の影響を考え、どのモデル動物が本当に適切かを検討することが

重要になるだろう。

終わりに

ここでは、ラットにおける遺伝子改変の現状と遺伝子改変ラットの有用性について紹介した。特にノックイン技術の進展は多くの研究者の課題であり、今回は我々の開発した lssDNA 法、2H2OP 法を紹介したが、様々な手法により改変できるゲノムサイズの拡大や、ノックインの効率化が行われている(図3)。また、受精卵だけでなく、生体内でゲノム編集を行う手法なども開発されており、ゲノム編集を用いた遺伝子改変動物の作製技術は確実かつ急速に進歩している。今後は特に、ヒト疾患で同定された SNP 変異を導入する、動物のゲノム領域をヒト由来ゲノム配列に大規模に置き換える、ゲノムヒト化動物の開発が進展していくと予想される。私自身もこうしたゲノムヒト化技術を用いてヒトの進化過程を明らかにしたいと考えている。今後、ラットに限らず多くの新しいヒト疾患モデル動物、ゲノムヒト化動物が作出され、遺伝子の新たな生体機能の発見や、医学創薬研究、再生医療研究の発展に貢献することが期待される。

参考文献

- 1) Ben-Ami Bartal I *et al.*, Empathy and pro-social behavior in rats. *Science*. 334. 1427-1430 (2011).
- 2) Diester I *et al.*, An optogenetic toolbox designed for primates. *Nat Neurosci*. 14. 387-397 (2011).
- 3) Li P *et al.*, Germline competent embryonic stem cells derived from rat blastocysts. *Cell*. 135. 1299-1310 (2008).

- 4) Tong C *et al.*, Production of p53 gene knockout rats by homologous recombination in embryonic stem cells. *Nature*. 467. 211-213 (2010).
- 5) Mashimo T *et al.*, An ENU-induced mutant archive for gene targeting in rats. *Nat Genet*. 40. 514-515 (2008).
- 6) 真下 知士, 山本 卓(編), All About ゲノム編集—実験医学増刊号、羊土社、Vol.34 No.20 (2016).
- 7) Geurts AM *et al.*, Knockout rats via embryo microinjection of zinc-finger nucleases. *Science*. 325. 433 (2009).
- 8) Tesson L *et al.*, Knockout rats generated by embryo microinjection of TALENs. *Nat Biotechnol*. 29. 695-696 (2011).
- 9) Kaneko T *et al.*, Simple knockout by electroporation of engineered endonucleases into intact rat embryos. *Sci Rep*. 4. 6382 (2014).
- 10) Yoshimi K *et al.*, Allele-specific genome editing and correction of disease-associated phenotypes in rats using the CRISPR-Cas platform. *Nat Commun*. 5. 4240 (2014).
- 11) Yoshimi K *et al.*, ssODN-mediated knock-in with CRISPR-Cas for large genomic regions in zygotes. *Nat Commun*. 7. 10431 (2016).
- 12) Wang H *et al.*, One-step generation of mice carrying mutations in multiple genes by CRISPR/Cas-mediated genome engineering. *Cell*. 153. 910-918 (2013).
- 13) Wu Y *et al.*, Correction of a genetic disease in mouse via use of CRISPR-Cas9. *Cell Stem Cell*. 13. 659-662 (2013).
- 14) Yang H *et al.*, One-step generation of mice carrying reporter and conditional alleles by CRISPR/Cas-mediated genome engineering. *Cell*. 154. 1370-1379 (2013).
- 15) Amos-Landgraf JM *et al.*, A target-selected *Apc*-mutant rat kindred enhances the modeling of familial human colon cancer. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 104. 4036-4041 (2007).
- 16) Irving AA *et al.*, The utility of *Apc*-mutant rats in modeling human colon cancer. *Dis Model Mech*. 7. 1215-1225 (2014).
- 17) Mashimo T. *et al.*, Generation and characterization of severe combined immunodeficiency rats. *Cell Rep*. 2. 685-694 (2012).
- 18) Ebihara C *et al.*, Seipin is necessary for normal brain development and spermatogenesis in addition to adipogenesis. *Hum Mol Genet*. 24. 4238-4249 (2015).

(日動協ホームページ、LABIO 21 カラーの資料の欄を参照)

性差を考慮した基礎薬学研究を目指して

静岡県立大学 薬学部 生体情報分子解析学分野

黒川 洵子、三枝 香都貴、山崎 泰広

はじめに

多くの疾患の発症・病態・治療に性差があることが明らかとなっており、生物医学研究では、早急な対応が求められている。NIH グラントによる研究計画書に動物実験を含む場合、動物の取扱に関し NIH の方針に準拠することが求められる。2015年6月には、声明 (NOT-OD-15-103) が発出され、ヒトおよびほ乳類を用いた全ての研究計画において、性による結果の違いの可能性を議論することが NIH グラント申請の要件とされた。2016年施行に向けて、米国の各大学グラントオフィスは対応を迫られた。今後、その流れは、我が国にも波及すると思われるので、臨床を対象とした研究だけでなく、基礎薬学研究においても注視すべきであろう。

創薬研究分野では、特に、医薬品有害事象の男女差に注目が集まっている。その背景として、市場から撤退した薬剤の80%は女性に対する有害事象が原因だとする報告 (2001年、米国の連邦監査調査による) がある。この報告が起点となって、従来の創薬研究では男性しか対象にしていなかったことへの反省が生まれ、現在では全ての治験で性差が考慮されるようになってきている。一方で、既に承認されている医薬品を使用した治療の中には、必ずしも女性に対して最適というわけではない治療が行われている場合もあるだろうと考えられている。しかし、疾患の発症や薬物反応

の性差の分子メカニズムはもとより、性差そのものについても、限定的にしか解明されていないのが現状である。

この流れの中で、我々は不整脈疾患の発症率における男女差に着目した研究を行ってきた。薬剤の副作用として発症する致死性不整脈は、女性での発症率が高いことが特徴である。この発症性差の分子メカニズムとして、性ホルモン受容体を介したNOシグナル経路が関連することを提唱している。薬物性不整脈以外にも、副作用や薬物反応における性差が見つかってきている。今後、性差の分子メカニズムを解明して臨床に反映させる「性差薬学」を推進するのは、基礎薬学研究者の使命である。性差薬学を進める上で、実験動物を使って雌雄で比較する機会が増えて行くであろう。雌の実験動物では性周期を考慮する必要があり、これまで扱った経験がない研究者に対して、知識の普及も急務である。

本稿では、性差医学の歴史から、基礎研究における性差の考慮の重要性をあぶり出し、薬剤有害事象における男女差に関する我々の研究を事例として、雌の実験動物を利用した研究方法について論じる。

性差医学の歴史

性差医学とは、男性と女性の生理学的な違い、疾患における臨床的な違いを解明しようとする学問である。そして、性差医学において明らかにされたエビデンスに基づ

いて実践される医療が性差医療であり、男女の違いに応じた薬物療法もこれに含まれる。

性差医学が立ち上がる前の状況を少し述べる。従来、生殖器以外の医学薬学研究は、治験も含め、臨床実験も動物実験も多くが男性、雄性を対象に行われてきた。当時、男女共通の臓器の形態・機能には差がないと考えられていたため、男性および雄性から得られた結果が男女の区別なく用いられてきた。その利点としては2つある。一つ目は、実験結果が月経周期に影響されないため、一定の結果が得られやすく、費用と実験期間が節約できるという点である。二つ目は、妊娠の可能性がある成人女性の場合、薬を起因としたリスクを避けられるという点である。これはサリドマイド薬害を受けたFDAからの通達が基となっている。しかし、このようにして、男性中心の医学研究が長らく続けられた結果、女性に関する医学データが極端に少なく、生殖器以外の医療では性別は考慮されないという事態を招いていた。

日本を含め、先進国において、有病率・死亡率の大きな割合を占めるのは心血管病である。従来の男性中心の研究から得られたエビデンスに基づき、コレステロール低下政策が行われた結果、男性では顕著な死亡率低下が見られた¹⁾。一方、女性の場合は、顕著な死亡率低下は見られず、事態は少々複雑だ。閉経前は、エストロゲンの様々な作用のおかげで、心血管病の罹患率は男性に比べ低い。しかし、閉経後、エストロゲンの減少とともに動脈硬化のリスクが急激に高まる。1980年代の終わりには、閉経後の女性における動脈硬化のリスクに対して、コレステロール低下政

策が功を奏さなかったことを米国の研究者らが明らかにした^{2) 3)}。これを受けて、ようやく、非生殖器系臓器に対する女性の医学データがほとんどないことがクローズアップされるようになった。

1990年には、生殖器以外の臓器における性差を考慮した医学研究に関する後れを取り戻すべく、米国 NIH に The Office of Research on Women's Health (ORWH) が開設し、性差研究を推進するために、臨床研究の研究費申請には男女ともに研究対象とすることを条件にした。ほどなくして、1991年には、大規模臨床試験、Women's Health Initiative (WHI) が立ち上がり、閉経後女性の健康障害やQOL低下の原因究明を目的とした前向き試験が開始した。そして、とうとう1994年には、薬剤の治験において被験者の半数を女性にすることを推奨するという通達がFDAによって出された。その後、米国公衆衛生省に The Office on Women's Health (OWH) が設置され、疾病予防事業、医療者の教育、一般への知識の普及活動、女性研究者の地位向上など、より実践的な活動を開始し、性差医学は一般まで広く普及している。

本邦においては、米国での立ち上げ当初からほどなくして天野恵子先生(現:清風荘病院特別顧問)により性差医学が紹介され、2001年には鹿児島大学に我が国初の女性専用外来が創設された。今では、日本各地に女性外来が設立され、医学の新しい領域としての性差医学研究は、臨床を中心に推進されている。

性差医学の現状

性差医学(Gender Specific Medicine:GSM)が臨床研究を中心

として発展してきた経緯は、前述の通りである。一方で、基礎科学の分野においては、生命を維持する基本的な機構には男女差がなく、「種の保存」に関わる生殖機能には大きな差異があるとされてきた。今でも、性分化のメカニズムは、生物学の根幹の課題であり、多くの基礎研究者達を魅了している。これらの研究は、生殖機能に関連する疾患の理解、そして治療への応用に貢献してきた。

生殖器以外の臓器における性差については、女性の閉経後に顕著になることから、女性ホルモンの関与を解き明かせば説明できると考えられたこともあった。しかし、それだけで全てが説明できるほど単純ではなく、生涯を通じて男性と女性を特徴づけるメカニズムの理解には、老化や遺伝子多型や環境などの影響も考慮した新しい研究分野の開拓が必要であることが分かってきた。実際、健康時の身体機能に差はなくとも、疾患の発症・進展・治療経過の個人差には、遺伝子的素因や環境因子が関与することは既に明らかであり、個別化医療の裏付けとなる基礎研究が政策として推進されている。ヒトの男女は、言うまでもなく染色体レベルで大きく異なり、人種・国を問わず、全体の人口がほぼ二分されるわけであるから、性差医療は最も基礎的な個別化医療であるという事も出来るだろう。現在、臨床における様々な男女差を裏付ける細胞レベルの知見も徐々に始動しており、生物学的性差の重要性を裏付けている。

医薬品の有害事象における男女差

生殖器以外の臓器を標的とした薬物の副作用の発現に性差があるであろうことは以前から指摘され

ていた。例えば、薬剤による不整脈症候群(後天性QT延長症候群)は、女性での発症率が高く、臨床データからは女性ホルモンの関連が示唆されていた。当時、性差は、数あるリスク因子のあくまで一つの事例であると考えられていた。

これまでとは異なる温度感で、医薬品の有害事象における男女差に注目が集まったきっかけは、2001年の米国連邦監査調査の報告である⁴⁾。この報告で、市場から撤退した薬剤の8割で、男性に比べ女性に対する有害事象発生率が有意に高いことが示された。これにより、男性のデータのみを用いてデザインされた薬物療法が問題であったことが明らかにされ、業界に衝撃が走った。そして、これまでの反省から、治験において女性がエントリーするためのガイドラインの整備が進み、女性の健康を守る観点が重要視されるようになった。調べてみると、高血圧・心不全治療薬であるアンジオテンシン変換酵素(ACE)阻害薬の空咳を筆頭に、既存薬においても女性特有に見られる副作用が明らかとなってきた(表1)。

特筆すべきこととして、2013年1月に、入眠薬として不眠症の治療に用いられるzolpidem(マイスリー[®])について、女性だけ、用量を半分にする勧告がFDAから発出された。女性は男性よりも薬物が代謝される速度が遅いため、起床後も薬物作用が残ってしまうことがあると分かったからだ。車の運転事故等につながるとして、女性の用量を減らすことが決まった。これは、性差医学が注目されてから初めての男女別薬物療法である。今後、より最適な薬物治療が提供できるように、性差医学研究がさらに推進されることが期待される。

性差薬学研究に向けて

薬剤の開発研究そして薬物療法の基盤となる基礎科学研究において、性別を考慮することが肝要であるという認識が急速に広まっている。2013年には細胞の機能にも性差があるということがNature誌のコメントに掲載された⁵⁾。これを皮切りに、NIHが、動物実験では、雌雄いずれの性別の動物も対象として実験を行うべきというコメントを発表し、2015年6月には、動物の取扱に関するNIHの方針として勧告(NOT-OD-15-103)を発出した。それによると、ヒトおよびほ乳類を用いた全ての研究計画において、性による結果の違いの可能性を議論することをNIH Grant申請の要件とするという強いものであった。2016年施行に向けて、米国の各大学Grantオフィスは対応を迫られたと聞いている。

では、ほ乳類を用いた薬学研究において、どのように雌の動物を扱えば、効率よく薬物作用の性差を評価出来るのであろうか。実は、まだ、標準的な方法はなく、個々の研究者に任されている感はある。まずは、女性ホルモンの影響が大きくなると思われる発情期で実験を行い、性差があると判定出来てから、性周期の他のフェーズにおいても実験すれば良いであろう。性周期判定法としては、ラットやモルモットでは、膣電気インピーダンス計測により、簡便に性周期

各相の判定が可能である。一方、マウスの場合、インピーダンスの変化が小さいことに加え、性周期の各期の持続時間が必ずしも一定ではないことから、膣垢像の鏡検(図1)がスタンダードな方法である。我々は、薬剤投与や高脂肪食摂餌等を行う場合、排卵は発情前期から発情期に変化する夜中のうちにおこることから、薬剤投与から解剖までの期間や摂餌期間に排卵を含むものを発情期群として実験している。

性差の分子メカニズムを解析するには、細胞レベルで性ホルモンを投与して、その濃度作用曲線を生理的濃度範囲と比較する事ができる。我々は、この方法により、薬剤誘発性不整脈に関連する生理的な性差のメカニズムを提唱している⁶⁾。他には、卵巣摘出やエストロゲン投与、エストロゲン受容体関連の遺伝子改変マウスの使用がされてきた。最近になって、性ホルモンの影響だけでなく、染色体由来の影響も細胞の性質に影響することが明らかとなっており、疾患との関わりでの解明が待たれるところである。欧米で開発された性染色体と性腺表現型を転換可能なマウスも有用であろう。内分泌由来と性染色体由来の性差を区別することができ、性染色体の影響も直接的に示すことができるので、新規メカニズムの発見が期待できる⁷⁾。

表1 薬物療法における性差

薬剤名 (もしくは薬物クラス)	適応疾患	女性特有もしくは女性に多く見られる副作用
アンジオテンシン変換酵素(ACE)阻害薬	高血圧、心不全など	空咳(ブラジキニン産生に対する反応が、男性に比べ女性が高い。)
カルシウム拮抗薬(CCB)	高血圧、狭心症など	末梢浮腫(顔や足のむくみ)
クロピドグレル	血栓症、塞栓症	出血傾向
ゾルピデム(商品名:マイスリー [®])	不眠症	女性は、男性の半量投与(2013年ガイドライン制定:代謝が遅いため、起床時に薬の効果が残ってしまい、車の運転などに危険であるため)
ラモトリギン	てんかん、双極性障害など	妊娠時の服用による産出児の口唇裂や口蓋裂

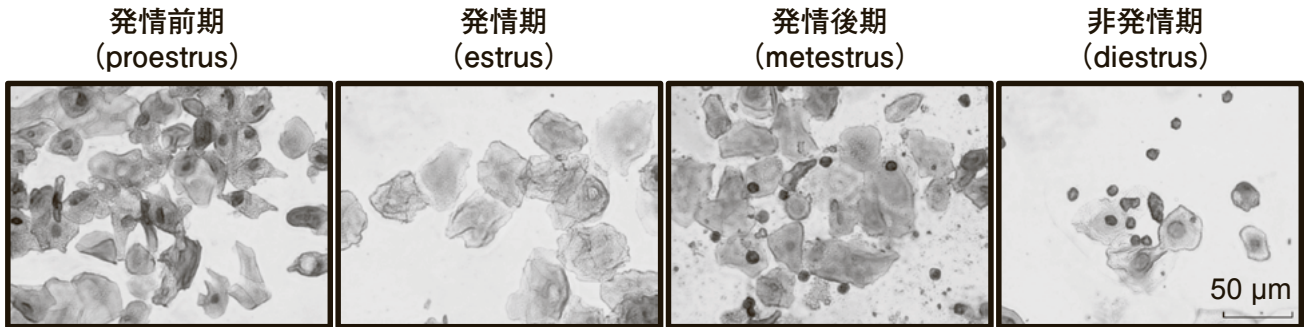


図1 スメアテストによるマウス性周期各相の判定

雌性マウス (C57/BL6J, 8週齢) から採取した膣垢スメア (ギムザ染色) の写真。左から順番に、発情前期 (proestrus)、発情期 (estrus)、発情後期 (metestrus)、非発情期 (diestrus) の顕微鏡画像を示す。有核細胞がほとんどをしめているのが発情前期、無核の角化細胞が95%以上なのが発情期、白血球が現れてきたものが発情後期、ほとんど細胞自体が見られず、白血球がほとんどなものを発情休止期と判別して実験に用いた。

最後に

今後、臨床を対象とした研究だけでなく、動物実験においても雌雄差を検討しなければならないという流れは、我が国にも波及すると予想できる。現在使用されている医薬品の副作用についても、検討の価値があるかもしれない。今後ますます、基礎薬学研究において性差は注視すべき事項であろう。

参考文献

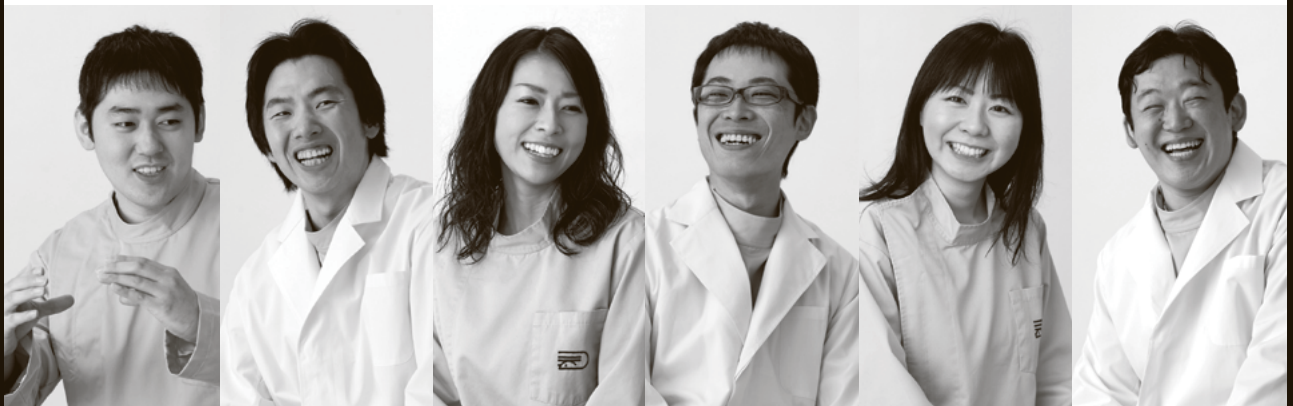
1. von Mering GO, Arant CB, Wessel TR, McGorray SP, Bairey Merz CN, Sharaf BL, Smith KM, Olson MB, Johnson BD, Sopko G, Handberg E, Pepine CJ, Kerensky RA. *Circ* 109: 722: 2004
2. Vaccarino V, Abramson JL, Veledar E, Weintraub WS. *Circ* 105: 1176: 2002
3. Bukkapatnam RN, Yeo KK, Li Z, Amsterdam EA. *Am J Cardiol* 105: 339: 2010.
4. GAO Report Drug Safety: Most Drugs Withdrawn in Recent Years Had Greater Health Risks for Women. GAO-01-286R (January 19, 2001)
5. Pollizer E. *Nature* 500: 23: 2013.
6. Kurokawa J, Kodama M, Clancy CE and Furukawa T. *Pharmacology & Therapeutics*, 168: 23: 2016.
7. Quinn JJ, Hitchcott PK, Umeda EA, Arnold AP, Taylor JR. *Nat Neu Sci*, 10: 1398: 2007.

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 〒810-0001 福岡県福岡市中央区天神5丁目5番8号 福桜ビル5階 TEL 092-753-6697 FAX 092-753-6698

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

実験動物の性差について

国内製薬企業の動物実験における雌雄使用の現状と今後

大正製薬株式会社 医薬事業部門 シニアスペシャリスト室
山田 久陽

はじめに

国内製薬企業における動物実験を取り巻く環境は、研究所・施設の縮小・閉鎖・統合、3Rs(Replacement、Reduction、Refinement)の推進による動物実験からin vitroやin silicoへの移行、企業自体のプロジェクト数の減少、低分子薬から中・高分子薬への転換などにより、各種動物の使用は全体的に減少している傾向がある。ただし、各企業ともプロジェクトの数やその内容により、特定の動物種を多く使用する年度があるのは、容易に想像がつくところである。

一方で、これまでよく取り上げられてきた話題として、雌雄の使用の偏重が挙げられる。米国NIH(National Institute of Health: 国立衛生研究所)では、1990年The Office of Research on Women's Healthが設立され、1993年にNIH Revitalization ActでNIH資金提供の臨床研究には女性もエントリーする必要があり、現在は同臨床例の半分以上は女性となっている。しかし、細胞や動物研究における実験デザインや解析に関しては、対応する改革はなされておらず、非臨床研究論文では、性に基づく考察や解析がないがしろにされており、雄性の動物/細胞に対する過度の信頼については変わっていない¹⁾。このことから、NIHは多次元的に生物医学研究の性に関する包括的問題について焦点を当てる計画を打ち出した。

このように世界的な潮流から考えても、実験動物の雌雄の使用に

関して再度考えるよい機会と思われる、その第一歩として、一部の国内製薬企業の動物実験における雌雄の使用について、日本実験動物学会の小委員会が実態を調査するに到った。本稿は、2016年11月25日に開催された日本実験動物学会維持会員懇談会(実験動物使用の現状と将来-動物数・性差について—製薬業界の実状と今後)において報告した内容から、性差に焦点を当て執筆したものである。

アンケート調査による国内製薬企業の現状把握

国内製薬企業の雌雄の動物使用の実態を調査すべく、日本実験動物学会維持会員の企業の10社にアンケートを送付し、8社より回答を得た。内容は、動物を比較的多く利用すると推察される薬効薬理試験と安全性試験を対象として、各種使用動物ごとに、2010年度の雄の使用匹数を100%とした場合の雌の比率(%)、さらに2015年度の雄と雌の使用匹数の比率(%))について質問した。さらに、各種試験における雌雄の選択と、その根拠となる理由についても質問した。回答があった企業については、第三者によって匿名化後に、データ集計を行った。しかしながら、残念なことに、2010年の雌雄の使用比率の回答が少なかったため、2015年度との比較が正確に実施できなかった。このため、2015年度に使用された各種動物の雌雄の比率と、試験ごとの性選択の根拠やコメントに

ついて以下に紹介する。

薬効薬理試験における雌雄の動物使用の現状について

2015年度の薬効薬理試験における雌雄の使用比率を図1に示す。マウスでは、6社中2社で雌の使用率が雄よりも高く、残りの4社中2社は雌雄ほぼ同様の使用率で、2社は雌の使用率は雄の30%以下に留まる結果であった。ラットでは、6社において雌の使用率は雄に比較し25%以下と低く、サル類では、5社中1社で雌の使用率は雄の約70%であったが、他の4社では雄のみ使用していた。イヌ、モルモット、ハムスター、ウサギに関しては、いずれも雄のみ使用している現状が判明した。以上のように、薬効薬理試験においては、マウスを除けば、ほとんどの動物種で雄の使用頻度が高いことが判明した。

薬効薬理試験における雌雄使い分けの根拠について

それでは、薬効薬理試験において、どのような根拠に基づいて雌雄の使い分けを決めているのだろうか。企業からの回答のまとめを表1に示す。

特徴的であったのは、各企業ともに中枢神経系の医薬品開発の際は、マウス、ラットともに雄を汎用していることであった。その理由としては、参考にしたモデルの論文に基づく、性ホルモン/周期の影響を回避する、との回答であり、性周期の影響についてモデルの根拠

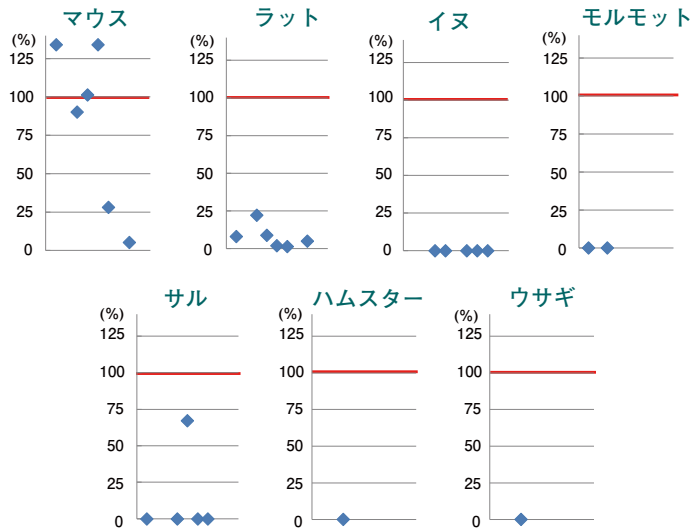


図1 調査対象製薬企業が2015年に薬効薬理試験で使用した各種動物の雌雄比較。縦軸は、雄の使用匹数を100%とした場合の雌の%。◆は各社の回答データ。

表1 調査対象製薬企業の薬効薬理試験における雌雄使い分けの根拠

性	動物種と試験概要	選択理由
♂	マウス・ラット 薬理試験全般	・性周期が無く、安定。ただし、女性ホルモンが関与する疾患には雌を使用。 ・性周期の影響を回避(科学的理由はない)。
♂	マウス・ラット 脳・中枢薬スクリーニング	・モデルの科学的根拠論文(対照データ)のほとんどが雄を使用。性ホルモン変動が大きい雌を行動観察などで回避。ただし、長期観察実験はファイティングが少くない雌を使用する場合もある。遺伝子改変動物でホモKO個体が維持繁殖が難しい場合などは雌雄両方使用する場合もある。
♂	マウス・ラット 脳内遺伝子発現によるスクリーニング	・参考文献で雄が使用。性ホルモン依存の代謝系や性周期の関与が否定できない。
♂	マウス 行動薬理試験	・雌の性ホルモン変動がデータに影響。
♂♀	ラット 中枢試験	・PKの違いでPCP, MK-801の作用が雄雌異なる。
♂	ラット 認知・うつ・脳卒中モデル	・性周期が認知機能・ストレスに影響し、女性ホルモンに脳保護作用がある。
♂	ラット 血糖降下薬 スクリーニングと薬効薬理試験	・本系統の雌は肥満でインスリン抵抗性を有するが、糖質の負荷無しには高血糖を呈さない。
♂	ラット アルブミン尿抑制作用	・血糖値に対する影響を合わせて評価するために、高血糖を呈する本系統の雄で実施。
♀	マウス 代謝性疾患薬理試験	・雄はファイティングし、試験結果に影響を及ぼす。
♀	マウス 感染症薬理試験	・病態モデルの発現程度が、雌が雄よりもマイルド。
♀	ヌードマウス、Balbなどの有毛マウス	・多くの他テーマで過去のPKデータなども雌を使用。継続使用。また、雌雄PK差もある場合があり同一性を使用する。
♀	ヌードマウスがん細胞移植モデル	・雄はファイティングのため群飼不可。卵巣癌、乳癌細胞を用いた担癌モデルなどでは、宿主動物由来の雌性ホルモンが癌細胞の増殖・形質の維持に必要。
♀	マウス オンコロジー	・ファイティングを避ける。
♀	マウス 腫瘍移植モデル	・雄に比較し喧嘩をせず、おとなしく、ハンドリングしやすいなどの通説。
♀	マウス 抗腫瘍試験	・科学的理由はないが、腫瘍の外傷をできる限り避けるため、おとなしい雌を使用。
♀	Tg マウス 薬効試験	・特定のTg動物の雄は行動異常(常同行動、攻撃)が激しく使用しづらい。

論文を確認しているところもあれば、一般的事実と認識して雄を使用しているところもあった。

雄の使用に関しては、Long Evans ラットを用いる新奇物体認識試験では性周期が認知機能に影響を及ぼす²⁾、SDラットを用いる従属的行動減少モデルで性周期がストレスに影響する³⁾、あるいは脳卒中モデルではエストロゲンが脳保護作用を示す⁴⁾など、モデルに関連した根拠論文が回答企業より提示された。さらに、統合失調

症に伴う認知障害のモデルについて、ワーキングメモリや短期記憶は雄ラットが雌に比較して感受性が高く、視覚学習と記憶に関しては雌の感受性が高く⁵⁾、空間ワーキングおよび参照記憶では雄の感受性が高い⁶⁾との報告がある。痛み、気分障害、依存の有望な治療ターゲットであるκオピオイド受容体(KOPR)について、選択的なアゴニストの使用は、雌に比べて雄で抗侵害刺激作用を惹起しやすいとされているが、KOPRを介する抗侵

害刺激/鎮痛の性差は、種、系統、リガンドや疼痛モデルの種類で変わるので注意が必要との報告がある⁷⁾。このように各々使用されるモデルで雌雄差の影響が変わる場合もあるため、モデルの確立時には十分な調査に基づいて雌雄の使い分けを行うべきと考える。

その一方で、中枢関係の医薬品候補ではあるが、近年の動物福祉の向上により群飼育が推奨されるようになったことから、長期観察時にはファイティングを避けるために雌を使用する機会も増えているようである。PCP (phencyclidine) やMK-801 (dizocilpine) を使う際には、PKの違いによる雌雄差が生ずるために雌雄を使用する例もあった。

もう一つ特徴的であったのは、マウスを用いたがん細胞移植モデルなどの試験では、雌を使うという回答で一致が見られたことである。理由としては雄ではファイティングがみられるために、それを回避し、扱いやすい雌を使うということで、これまでの各企業の経験や通説に基づくものであった。近年、がん領域のプロジェクトは各企業とも重点領域と考えられ、前述した雌雄使用の比率で、マウスでは雌の使用比率が高い企業があったのも、この傾向を反映したものと考えられた。

他には、薬理試験全般において、マウス・ラットを用いる場合には、2社から性周期の影響を受けない雄を使うとの回答があり、そのうち1社では科学的根拠はないとのことであった。また、確立された系統の高血糖ラットを使用する際に、一般的にモデルとして感受性が高い雄を使用するところもあった。特定の遺伝子改変マウス、代謝性疾患モデルの評価においても、各々、雄の行動異常やファイティングを回避するために雌を使用するとの回答があった。雌のヌードマウスや有毛マウス(Balb/cなど)を過去から使用

してきており、PKなどのバックグラウンドデータも雌で収集してきたために、雌を継続使用しているとの回答もあった。

以上のように、薬効薬理試験の担当研究者の多くは、モデルの背景にある性差の情報を把握して、効率的に、実験に使用する雌雄の動物を選択しているものと考えられた。

安全性試験における雌雄の動物使用の現状について

安全性試験において、医薬品の製造販売承認に必要な申請資料となる、いわゆるGLPでの一般毒性試験では通常、両性が使用される。医薬品開発の早期のステージでは、GLP試験に供する開発候補化合物を見出すための短期スクリーニングなどの試験が実施され、各々の企業で雌雄の使い方に差異が出るものと思われる。

安全性試験における雌雄の使用比率を図2に示す。マウス、ラット、イヌ、サル類の雌雄比は、雄のほうが使用比率は高いものの、前述した薬効薬理試験のように大きく雄に傾倒している傾向はなかった。モルモットとハムスターは、雄のみを使用しているようであるが、ウサギに関しては、使用している5社中4社は雌のみを使用しており、生殖発生毒性試験において、妊娠動物を購入している可能性も考えられた。ここで注意すべきは、グラフは各企業のGLP試験を含めた2015年におけるすべての安全性試験の雌雄の使用比率を示したものである。おそらくGLP試験実施に際した雌雄の動物が含まれていることを考慮しないとイケない。

安全性試験における雌雄使い分けの根拠について

安全性試験における雌雄の使い分けについて、表2に示す。ここでは、両性を使用するGLP試験以外の試験に関する回答である。雌雄の動物を使う企業は、マウス、ラッ

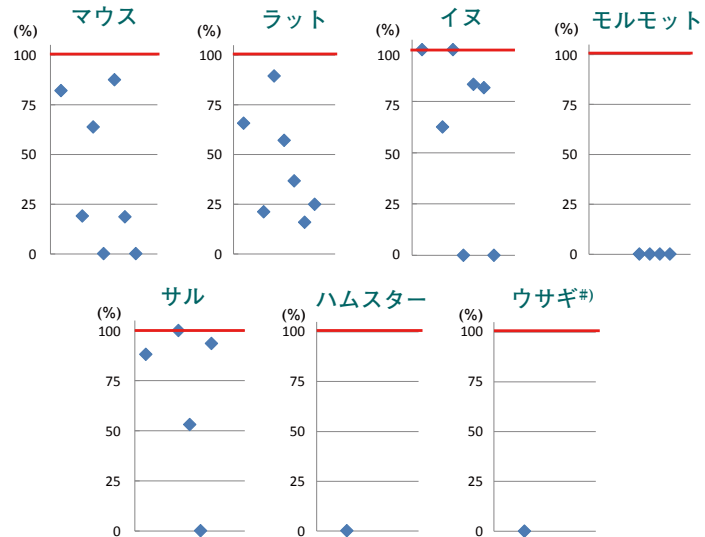


図2 調査対象製薬企業が2015年に安全性試験で使用した各種動物の雌雄比較。縦軸は、雄の使用匹数を100%とした時の雌の%。◆は各社の回答データ。※8社中4社は雌のみを使用すると回答（グラフ中には記載されていない）。

ト、イヌ、サル類の短期反復投与試験において、当該試験をGLP試験の用量設定のためと位置づけており、雌雄で各々情報を得るために両性を使うとの回答であった。その他、マウス、ラット、イヌ、サル類の早期あるいは短期反復投与試験においては、性周期/ホルモンの影響の回避のため雄を使用、あるいはマウスとラットの試験では、初めての化合物の毒性試験には雄を使うと決めている企業もあった。マウスとラットの場合は通常雄の使用であるが、化合物の特徴を考慮し、雌雄あるいは雌のみを使用することもある。イヌとサル類の試験では、個体評価を重視する点で、雌雄を用いることを原則とし、化合物の特徴などを考慮し、片性のみで行うこともあるようだ。また、化合物量が少なく済むとの理由で、イヌは雌を反復毒性試験に使用している企業もあった。安全性薬理試験において、麻酔下ラットの心血管系への影響を検討する試験では、心血管系へのリスク評価に限られるため、性差は考慮せず片性で雄を使用としている。同じく、無麻酔下サルの心血管系への影響をみる試験では、ラットと同じ理由で性差は考慮せ

ず片性で良いとしているが、社内でバリデーション試験を実施し、反応性に性差はないことまで確認した上で、雄と雌を使用している企業もあった。

以上のように、GLP試験の前に実施される開発早期の安全性試験では、性周期/ホルモンの影響を回避する目的で、あるいはこれまでの使用してきた経緯でバックグラウンドの豊富な雄の使用が多いように思われた。安全性試験に関しては、GLPの一般毒性試験では両性を使った試験が行われるため、開発早期ではコストやスピードを重視して、片性で評価している企業が多いものと考えられた。

おわりに

実験動物の雌雄の使用に関して、一部の国内製薬企業にお願いして、薬効薬理試験と安全性試験における各種動物の雄と雌の使用比率を調査した。全体を通して、雄の使用に偏っている傾向が判明したが、薬効薬理試験では、各々のモデルの文献を参考にしたり、これまでの経験により性を選択したりしている傾向があった。安全性試験では、医薬品開発の早期の段階では、性に依存した影響の少ない

表2 調査対象製薬企業の安全性試験における雌雄使い分けの根拠

性	動物種と試験概要	選択理由
♂♀	マウス、ラット、イヌ、サル 7日間反復用量設定試験	・GLP試験のための用量設定試験では、両性の毒性情報が必要。
♂	マウス、ラット、イヌ、サル 早期毒性試験	・科学的理由はないが、性周期の影響を回避するため雄を使用。
♂	マウス、ラット、イヌ 短期反復毒性試験	・性ホルモンの影響が少ない。
♂	マウス、ラット 1週間反復毒性試験	・初めての化合物の毒性試験は雄で統一。
♂	マウス、ラット スクリーニング試験	・性周期の影響を排除し、群単位で評価することを意図して、雄性を用いることを原則。ただし、化合物の特徴などを考慮の上、両性もしくは雌性のみを用いることもある。
♂♀	イヌ、サル スクリーニング試験	・個体評価を重視する点から、非げっ歯類では両性を用いることを原則。ただし、化合物の特徴などを考慮の上、片性のみを用いることもある。
♀	イヌ 反復毒性試験	・化合物量が少なくて済む。
♂	麻酔下ラット 心血管系への影響	・心血管系へのリスクポテンシャルを確認するため、性差は考慮せず、片性でよい。
♂♀	無麻酔サル 心血管系への影響	・心血管系へのリスクポテンシャルを確認するため性差は考慮せず、片性でよい。社内バリデーションの結果、反応性に明確な性差はないと判断。ただし、雌の方が日間差が大きいいため、血中濃度などの暴露で有利な場合に優先する。

参考文献

1. Clayton J.A. and Collins F.S. NIH to balance sex in cell and animal studies. *Nature*, 509, 282-283, 2014.
2. Abbott K.N., Morris M.J., Westbrook R.F. and Reichelt A.C. Sex-specific effects of daily exposure to sucrose on spatial memory performance in male and female rats, and implications for estrous cycle stage. *Physiol. Behav.*, 162, 52-60, 2016.
3. Wiersielis K.R., Wicks B., Simko H., Cohen S.R., Khantsis S., Baksh N., Waxler D.E. and Bangasser D.A. Sex differences in corticotropin releasing factor-evoked behavior and activated networks. *Psychoneuroendocrin.*, 73, 204-216, 2016.
4. Koellhoffer E.C. and McCullough L.D. The effects of estrogen in ischemic stroke. *Transl. Stroke Res.*, 4, 390-401, 2013.
5. Leger M. and Neill J.C. A systematic review comparing sex differences in cognitive function in schizophrenia and in rodent models for schizophrenia, implications for improved therapeutic strategies. *Neurosci. Biobehav. Rev.*, 68, 979-1000, 2016.
6. Jonasson Z. Meta-analysis of sex differences in rodent models of learning and memory: a review of behavioral and biological data. *Neurosci. Biobehav. Rev.*, 28, 811-825, 2005.
7. Rasakham K. and Liu-Chen L-Y. Sex differences in kappa opioid pharmacology. *Life Sci.*, 88, 2-16, 2011.

雄を選択するようであった。

製薬企業にとっては、両性を用いる必要がないと判断した試験においては、コストや開発スピードの背景から、的確な片性を選択し、結果として雄に使用が偏重する傾向を生じている。企業側としては、現状、何の問題も生じていないため、これを是正するためには、学会

や各種団体の呼びかけなど外部からの力が働かない限り、このような状況は延々と続いてゆくものと考えられた。

最後に、アンケート調査にご協力をいただいた企業の方々に、この場をお借りして心より深謝申し上げます。

バイオサイエンス
トータルサポート企業として
生命科学の発展に
大きく貢献する
株式会社ケー・イー・シー

実験動物飼育管理事業・
受託試験事業・研究用
試薬提供事業の
3つの柱で製薬会社や
大学等研究機関の
ニーズにお応えしています。

株式会社 **ケー・イー・シー** 京都市中京区西ノ京西月光町40番地

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

実験動物の性差について

実験動物の使用における雌雄バランスについて：生産業者の現状と今後

公益社団法人 日本実験動物協会
森村 栄一

はじめに

実験動物の供給は、初め農家が生産し実験者に供給されて来た。その動物は時として感染症を患った動物として供給され、実験を行う現場において実験成績を乱した時代があった。その後、1980年代に入り医薬品の研究開発においてGLPが導入され、動物実験を行う施設では特定の病原体がフリーであることが確認された動物(SPF動物)の使用が求められ、実験動物生産業者は衛生管理を徹底したバリア施設で微生物と遺伝管理を強化した生産管理体制を作り上げ、高品質な実験動物の安定供給に努めて来た。二十一世紀に入ると、自然科学の分野において個々の遺伝子DNAだけでなくゲノム分析が急激に進み、遺伝子組換え動物が多数作出され、実験動物を取り巻く環境を変える一因となった。

このような背景の中で雄の偏重利用は、実験動物の供給を担ってきた実験動物生産業者にとっては長年の懸念事項であり、とりわけ実験動物は片性での実験が多く見られ、両性を用いた実験報告は安全性試験以外には非常に少ないことが現実である。これは、雌の性周期が大きくかかわっており、雄は性周期と

いうものがないため性周期による変動を考慮する必要は無く、実験成績を評価する際、支障をきたす事はない。これら理由で蓄積されたデータは更に雄の使用を助長する事になった。

実験動物総販売数の現状について

(公)日本実験動物協会による実験動物販売数調査ではサル類を除き2004年以降のマウス・ラット・モルモット・ウサギ・イヌの販売数は大きく減少をしている。2001年の販売数を100%とした時に、2013年はマウス60%、ラットと犬40%、モルモットとウサギは30%となっており、この10年間で実験動物の販売数量は約半分まで減少しており、先ずはこの減少している原因を探っ

てみた。(図1)

実験動物を取り巻く市場環境の変化について

実験動物を取り巻く市場環境の変化は実験動物使用状況、ならびに、それらを供給する実験動物生産業者へ大きな影響を与えた。市場環境の変化としては2001～2007年には製薬メーカーの相次ぐ合併や、多くの外資系製薬会社が研究所を閉鎖した。日本脳炎ワクチン接種の積極的推奨の差し控え、そして、2006年体制(実験動物福祉体制が確立)が整備された。

2008～2010年にはリーマンショック、東日本大震災とそれに伴う計画停電などが追い打ちをかけた実体経済へ波及し、国内外の経済に

2013年総販売数調査結果

動物種	実績匹数
マウス	3,962,028
ラット	1,220,645
モルモット	101,042
ウサギ	59,803
犬	6,440
サル	2,966

実験動物総販売数調査
2001年匹数を100%とした変動比

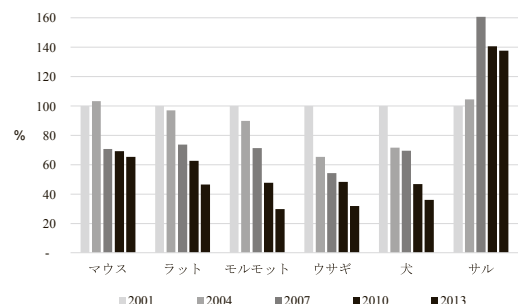


図1 実験動物総販売数調査(2001年～2013年)
出典：(公)日本実験動物協会(年間の総販売数調査)

表1 動物実験を取り巻く市場環境の変化

年代	市場環境の変化
2001-2007	<ul style="list-style-type: none"> 製薬メーカーが相次ぎ合併 外資系製薬会社の研究所が相次ぎ閉鎖 日本脳炎ワクチン接種の積極的勧奨の差し控え 2006年体制（実験動物福祉体制が確立） <ul style="list-style-type: none"> 「動物の愛護及び管理に関する法律」（動物愛護管理法）改正 「実験動物の飼養及び保管並びに苦痛の軽減に関する基準」環境省 「農林水産省の所管する研究機関等における動物実験等の実施に関する基本指針」農林水産省 「研究機関等における動物実験等の実施に関する基本指針」文部科学省 「厚生労働省の所管する実施機関における動物実験等の実施に関する基本指針」厚生労働省 「動物実験の適正な実施に向けたガイドライン」日本学術会議
2008-2010	<ul style="list-style-type: none"> 外資系製薬会社の研究所が閉鎖 リーマンショックによる実体経済への波及→デフレスパイラル 東日本大震災と計画停電 2011/3/11
2011-2013	<ul style="list-style-type: none"> 山中教授がノーベル生理学・医学賞受賞 2012/12 「動物の愛護と管理に関する法律」改正 平成25年6月 実験動物福祉の自主管理の更なる推進を図るべく、日動協、HS財団、国動協・公私動協が「第三者による評価・認証制度」を開始

表2 動物実験の性差についての過去の実態

過去の実態(~2012)	従来理由
実験動物の使用にあつてはこれまで薬の研究・開発では論ずるまでもなく雄性動物が使用されてきた。	雌性の性周期が大きく関与。マウスやラットは発情期時に自発運動量が顕著に増加し、摂餌量が著しく低下する。その結果、生化学値が変動する。

学会の見解	生産者
第52回日本実験動物学会総会「動物実験における性差の問題を考える」 結論：雄性の偏重利用に科学的根拠はなく、曖昧な根拠による雄性に偏った動物実験の現状を穏やかに修正していく事が、科学的立場からも動物福祉の立場からも望ましいとし、科学根拠に乏しい雄性利用の現状を正していく努力も実験動物関係者には求められていると結論付けた。	動物実験が雌雄の別なく等しく使用されることを願ってきた。 しかし、現実には生産者だけでは到底解決できるものではない。生産者を取り巻く市場環境は年々縮小している。このような状況下で実験動物の生産者は、無駄な経費を発生させないように雌雄の販売比率と収益性を勘案しながら、研究者の求める良質で特性を管理された動物の供給に努めてきた。

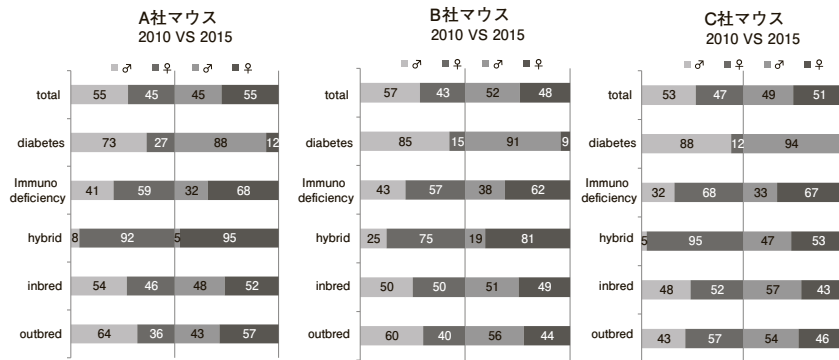


図2 マウス雌雄出荷実績対比 (%) 実験動物 生産大手3社 2010年/2015年

深刻な影響を及ぼした。

2011～2013年に入ると「動物の愛護と管理に関する法律」の改正により実験動物の自主管理の更なる推進が図られた。また医療用iPS細胞が樹立され再生医療の研究を大きく推し進め、医薬品の開発における動物実験の方向性を変えた。

このような環境下においても実験動物生産者は科学実験が要求する「再現性・信憑性」を担保することに努め「整備された実験動物」*の供給に努めている。(表1)

実験動物の性差について

動物実験を行う現状はこれまで

と同様に雄の偏重利用は継続して見られ、実験動物生産業者は、この現実に対し、雌雄両性の使用の継続を提案したが、実験動物を用いた科学実験においては雌性の性周期が大きく関与すること、マウス・ラットは発情期時に自発運動量が顕著に増加し、摂餌量が著しく低下すること、その結果により生化学値が変動することなどを理由に使用が避けられてきた。(表2)

偏重使用を裏付けるデータとして国内の大手実験動物生産業者3社からのマウスとラットの出荷比率が提供された。このデータによればマウスとラットの2010年と2015年の間での雌雄の出荷比率の傾向に大きな変化は見られなかった。マウスでは総合的には偏重利用は無いように見えるが、動物の系統特性によっては大きな偏りが見られる。ラットについては雄80%、雌20%と雄を中心とした従来の使用と全く変わらない状況にある。残念ながら科学研究に用いられる実験動物は未だに雄を主体に用いられていることが分かった。(図2、図3)

実験動物の性差についての最近の動き

実験動物の性差に関する最近の動きとして、2005年に動物の愛護及び管理に関する法律の一部改正が行われた際、「動物を科学上の利用に供する場合の配慮」として1) Replace 代替、2) Reduction 削減に加え、3) Refinement 苦痛の軽減が法律の中に組み込まれた。実験動物を用いた科学実験を適切に実施するため実験動物福祉の更なる推進を図るべく「第三者による評価・認

証制度」もこの時期に始まった。

また、日本実験動物学会では、すでに第52回日本実験動物学会総会において「実験動物における性差の問題について」と題してシンポジウムが開催され、次の結論を導き出している。「雄性の偏重利用に科学的根拠はなく、曖昧な根拠による雄性に偏った動物実験の現状を穏やかに修正していく事が、科学的立場からも動物福祉の立場からも望ましいとし、科学根拠に乏しい雄性利用の現状を正していく努力も実験動物関係者には求められている。」としている。

動物福祉の先進国である欧米では、実験動物の性差についても再考する必要がある時代に入ったとして、米国NIHは2014年9月に「NIHは前臨床研究の性別を考慮した新しい政策を展開する準備をしています。科学は男女ともにあることで良くなりますから、女性と男性の生物学的な完全な理解を促進することが私たちの目標となります。この政策を通じてNIHは、男性と女性のための医学の進歩につながる科学を強化していきます。」というコメントを提示している。(表3)

まとめ 生産業者からの提案

このような状況を踏まえ、実験動物を生産する実験動物生産業者には、今後どのような活躍の場が与えられるか予測は出来ない。しかし、今後、科学実験がどのような方向に発展を遂げていくか、未知な部分はあるが、研究者が求める実験動物を衛生管理の整った環境で微生物と遺伝管理を確実にやり、高品質な実験動物を安定供給することが我々の役

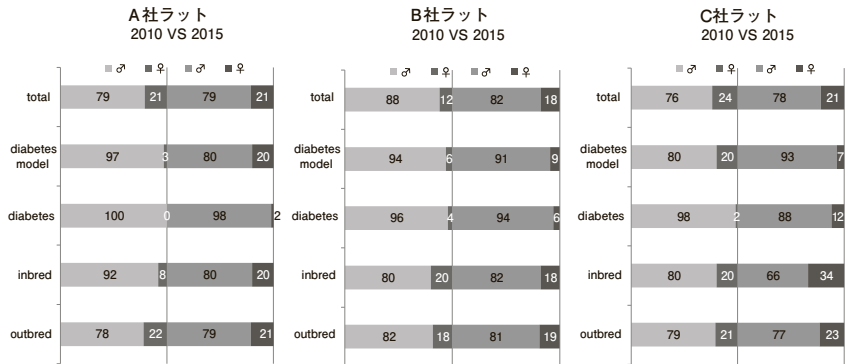


図3 ラット雌雄出荷実績対比 (%) 生産大手3社 2010年/2015年

表3 動物実験の性差についての最近の動き

現在の状況 (2014~2016)	現在~将来に向けての取り組みと理由
<p>動物愛護管理法の順守 動物実験における使用匹数の削減=安楽死動物の削減</p> <p>NIHの動向 1993年に、NIH Revitalization Act でNIH資金提供の臨床研究には女性のエントリーが必要。細胞や動物研究における実験デザインや分析に対応する改革はなされていない。 非臨床研究の公表論文の問題=雄の動物と細胞に対する過度の信頼</p>	<p>2014年9月23日寄稿(抜粋)</p> <p>「NIHは、前臨床研究の性別を考慮した新しい政策を展開する準備をしています。科学は男女ともにあることで良くなりますから、女性と男性の生物学的な完全な理解を促進することが私たちの目標となります。この政策を通じてNIHは、男性と女性のための医学の進歩につながる科学を強化していきます。」</p>
<p>学会</p> <p>実験動物施設管理における管理者の養成</p> <p>研究者レベルでの雄性の偏重利用の見直し、現実はおく一部でのみ</p>	<p>生産者</p> <p>第三者認証の取得=第三者評価</p> <p>雌雄の使用バランスの改善が生産計画の改善と飼養スペースの削減によるコスト削減を達成</p>

割と自負している。今回のまとめとして以下3点を実験動物生産業者として提案する。

1. 実験動物の偏重利用に関しては、産学で協力して解消する必要があると考える
2. 雌雄両性を上手く活用することで、余剰動物の削減につながり生産スペースのコントロールが可能になる
3. 偏重利用解消に向けた研究に関しては、基礎データの収集の為の支援協力を目指す

*:「整備された動物」とは

1) 実験動物の生産供給・維持には実験動物の持つ遺伝子の適正な管理(育種/系統)が実行されて初めて実現できる。実験動物の繁殖におい

て継代の経過と共に遺伝的分岐は起こる。ジーンプールが小さいとボトルネックを起こす。したがって、適正な育種/系統管理をすることが必要である。

2) 実験動物(クローズドコロニー、近交系コロニー並びに病態モデルコロニー等)の維持管理はジーンプールの管理であり、遺伝子解析等の技術による特性の維持管理である。この動物が示す生物学的・生化学的データが基礎データとなる。

3) 系統維持管理された動物をベースに作製された遺伝子組換え動物はその生物学的特性に合目的な動物実験において用いられるべきであり、これらの動物はバックグラウンドの動物に戻ることはできない動物である。

オートファジー欠損マウスの解析から 見出した新規オートファジー機構

東京医科歯科大学・難治疾患研究所・病態細胞生物学分野
教授 清水 重臣

はじめに

オートファジー（自食現象）とは、細胞内の自己構成成分（例えば、不要なタンパク質や傷害を受けたオルガネラなど）を分解する細胞機能である。大隅良典先生が「オートファジーの仕組みの解明」により、2016年のノーベル医学・生理学賞を授賞されてから、その生物学的な重要性や医学的応用に急速に注目が集まっている。オートファジー研究は、大隅先生の手による酵母の遺伝学的解析をきっかけに急速に発展し、哺乳動物のオートファジー分子の同定を経て、現在ではオートファジーの生体での役割の解明に注目が集まっている。私たちは、オートファジー欠損マウスの表現系を解析する過程で、新しいタイプのオートファジーを発見したので、その概要を記す。

オートファジーとは何か？

前述のごとく、オートファジーとは自己構成成分を分解する細胞機能の1つである。では、このオートファジーは、私たちの体の中で、いつ、どこで、どのように機能しているのだろうか？オートファジーは、体内の全ての細胞において、細胞が定常状態に有る時には

緩やかに機能しており、変性したタンパク質や古くなった細胞小器官（ミトコンドリアなど）を壊す作業を行なっている。即ち、いわゆる新陳代謝を担っているのである。一方、細胞に強いストレスが加わると、オートファジーの活性は一気に上昇し、ストレスにより傷害を受けた細胞内成分を積極的に除去し、細胞を傷害から守ろうとする。例えば、放射線に曝露したときなどに、このような現象が起きる。従って、このような重要な機能に変調が生じると、生体に異常を来すことは容易に想像ができる。

オートファジーの形態はユニークな特徴を有しているため、電子顕微鏡などを用いることによって、オートファジーの多寡を解析することができる。オートファジーは、まず隔離膜と呼ばれる「柿の種」様の構造物の形成から始まる。この隔離膜は、伸長すると共に湾曲し、分解するべき細胞質やオルガネラを囲い込み、オートファゴソームと呼ばれる二重膜の構造体が形成される（二重膜の構造体は、ミトコンドリアとオートファゴソームだけである）。オートファゴソームはリソソームと直接融合し、その結果、オートファゴソームの内

容物が、様々なリソソーム消化酵素によって消化される¹⁾ (図1)。

哺乳動物細胞においてオートファジーの実行に関わる分子は、これまでに30種類以上発見されているが、その多くは大隅先生が酵母を用いて同定された分子である。即ち、オートファジーは酵母から哺乳動物まで、極めて良く保存された細胞機能であることが分かる。これらの分子の中でも、Ulk1, Beclin1, Atg5, Atg7, LC3などは、オートファジーの実行には欠かせない分子として考えられている²⁾。具体的に、Ulk1やBeclin1は隔離膜の形成に必要な分子である。続いて起こる隔離膜の伸長やオートファゴソーム形成にはAtg5やAtg7が重要な役割を担っている。また、LC3は水溶性タンパク質のため、通常は細胞質に存在しているが、オートファジー誘導時にはphosphatidyl ethanolamineが共有結合して脂質化し、オートファジー膜に局在するようになる。この現象は、オートファジーの指標として頻用されている (図1)。

オートファジー欠損マウスの表現型から得た着想

哺乳動物のオートファジー分子

が明らかになると、次々と遺伝子欠損マウスが作成され、生体におけるオートファジーの役割が解析されるようになった。その結果、オートファジーの実行に必須と考えられてきたAtg5やAtg7を欠損したマウスは、出生直後に死亡することが見出され、生体におけるオートファジーの重要性は間違いが無いことが確認された³⁾。また、これらの分子を神経特異的に欠損させると神経変性疾患様の症状が現れ、筋肉特異的に欠損させると筋萎縮が起こるなど、様々な臓器レベルでも重要な機能を担っていることが明らかとなった。

しかし一方で、私たちはこれらのマウスの表現系に違和感を感じた。即ち、Atg5欠損マウスは確かに生直後に死亡するものの、この時点までは全く正常であり、少

なくとも母体環境内ではオートファジーが必要でないように思われたからである。また、臓器特異的Atg5 (Atg7) 欠損マウスの中でも、神経系や筋肉系など明らかな異常を示すマウスもいる中で、ほかの臓器特異的マウスでは異常を示さない例も少なくない。これらのマウスの知見を基に、私たちは、Atg5 依存的なオートファジーを代替する別のオートファジー機構が有るのではないかと考えるようになった。

新規オートファジー機構の発見

そこで、この代替メカニズムの存在を検討するために、野生型マウスとAtg5欠損マウスから調整した細胞に、様々な刺激を加えて電子顕微鏡を用いて観察した。す

ると、栄養飢餓の時には、野生型細胞でのみオートファジーが観察され、Atg5欠損細胞ではオートファジーは誘導されなかった。一方で、全く同じ細胞にエトポシド (DNA傷害誘導剤) を加えた時には、両細胞ともほぼ同程度の大規模なオートファジーが誘導されていた。さらに、オートファジーの重要な機能であるタンパク質分解を解析したところ、Atg5欠損細胞においても正常細胞と同様に、エトポシド投与によるオートファジー依存的タンパク質分解が確認された。これらの結果より、Atg5を必要としないオートファジーの存在が明らかとなり、このオートファジーを私たちは“alternative autophagy” (以下、「新規オートファジー」と記す) と命名した⁴⁾。

Atg5 依存的オートファジーの研

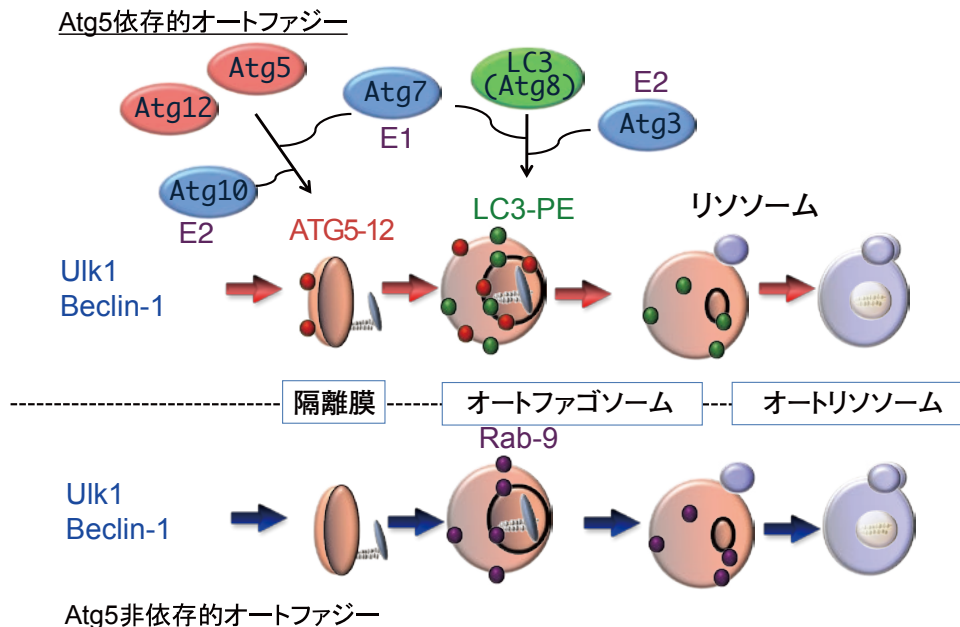


図1 オートファジーの模式図

オートファジーには、Atg5に依存した反応 (上段) と依存しない反応 (下段) が存在する。どちらの反応も、(1) 隔離膜の形成、(2) 伸長、(3) オートファゴソームの形成、(4) オートリソソームの形成 (リソソームと融合) の順序で進行する。Atg5 依存的オートファジーの場合には、ATG5-12 複合体が隔離膜の伸長に必須である。LC3-PE は ATG5-12 複合体依存的に隔離膜に結合し、オートファゴソーム形成に寄与する。ATG5-12 複合体の形成にはユビキチン様の反応が必要であり、Atg7 が E1、Atg10 が E2 として働く。また、LC3-PE の形成にもユビキチン様の反応が必要であり、Atg7 が E1、Atg3 が E2 として働く。Atg5 非依存的オートファジーの場合には、ゴルジ膜を利用して Rab9 依存的にオートファゴソーム形成が進行する。

究が、酵母の解析を端緒として急激に進んだことを踏まえて、私たちは酵母における新規オートファジー機構の有無を検討した。具体的には、Atg5欠損酵母細胞に様々な化合物を添加し、オートファジー誘導の有無を位相差顕微鏡と電子顕微鏡を用いて観察した。その結果、抗真菌薬のアンホテリシンB1に新規オートファジー誘導活性が存在することが明らかとなった。即ち、アンホテリシンB1を投与したAtg5欠損酵母細胞の電子顕微鏡像では、①細胞質中のオートファゴソーム形成、②オートファゴソームと液胞(哺乳動物細胞のリソソームに相当)との融合、が観察されたのである⁵⁾。これらの結果より、新規オートファジーも、酵母から哺乳動物まで良く保存された細胞機能であることが明らかとなった。

二つのオートファジーの使い分け

では、Atg5依存性のオートファジーと新規オートファジーの共通点と相違点は何であろうか?また、どのように使い分けられているであろうか?まず、共通点に関しては、どちらのオートファジーも寸

分変わらない形態で実行されるという点、囲い込んだ細胞内成分を分解するという点あげられる。さらには、上流で機能する分子Ulk1やBeclin1などと、最下流で機能するLamp1などは共通に利用されている(図1)。一方で、シグナル途中に関与するAtg5,Atg7,LC3などの分子はいずれも共通ではない。また、Atg5依存性のオートファジーの隔離膜がミトコンドリアに近接した小胞体膜から伸長していくのに対し、新規オートファジーはゴルジ体のトランス側の膜と後期エンドソームの膜を起源としている。

さらに、重要な点は、これら2種類のオートファジーが分解する産物には一定の選択性がみられるということである(但し、両方のオートファジーが同じ基質を分解するケースもある)。基質選択性が見られる代表として、p62タンパク質が挙げられる。p62タンパク質はAtg5依存性のオートファジーの基質として良く知られているが、新規オートファジーでは分解されない。一方で、ゴルジ体に蓄積した分泌タンパク質などは、主に新規オートファジーによって分解されている。これら2種類の異なる

オートファジー機構は、1つの細胞内で同時に活性化されており、異なる基質を分解しているものと考えられる。

新規オートファジーの生理的役割

では、新規オートファジーはどのような生理現象に関わっているであろうか。代表例として、赤血球が最終分化する時に生じるミトコンドリア除去機構があげられる。赤血球は、赤芽球、網状赤血球を経たあと脱核とミトコンドリアの除去が行なわれて成熟赤血球となる(図2A)。ミトコンドリアの除去は、脱核後24時間以内に行なわれ、これはオートファジーによって実行されていることが古くから示唆されていた。実際に、私たちが電子顕微鏡を用いて正常マウスの網状赤血球を観察したところ、ミトコンドリアを2重の膜で囲んでいるオートファゴソーム、ミトコンドリアの一部を分解しているオートリソソームが観察された。即ち、ミトコンドリアの除去がオートファジーによって行われているは間違いのないものと確認された。さらに、Atg5を欠損したマウスにお

A

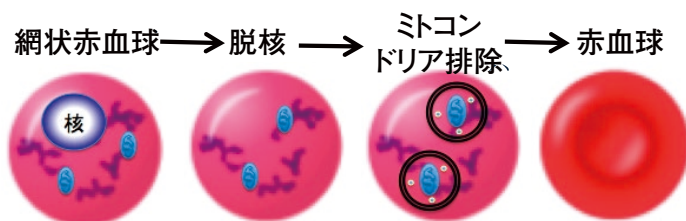
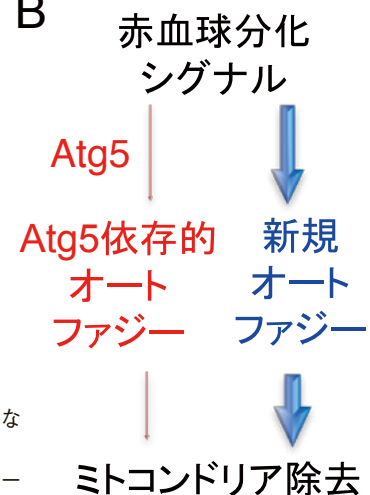


図2 赤血球からのミトコンドリア除去は新規オートファジーが行なう

A: 赤血球の最終分化は、網状赤血球から脱核、ミトコンドリア排除が起って、最終的な成熟赤血球となる。

B: 模式図: 赤血球からミトコンドリアが除かれる時には、Atg5を利用するオートファジーの関与は小さく、Ulk1を利用する新規オートファジーが関わっている。

B



いても、ミトコンドリアを囲んだオートファゴソームやオートリソソームが同程度に観察され⁶⁾、このオートファジーは新規オートファジーによるものであると考えられた。そこで、電子顕微鏡を用いて、ミトコンドリアの多寡を胎仔肝臓(赤血球の造血の場である)と血液で検討したところ、Atg5欠損マウスにおけるオートファジーは野生型マウスとほぼ同程度であり、赤血球の多くはミトコンドリアを失っていることが確認された。一方で、新規オートファジー制御に関わっているUlk1を欠損したマウスにおいては、オートファジーが誘導されず、赤血球内にミトコンドリアが多数残存していた⁶⁾。これらの解析より、赤血球の最終分化

時にみられるミトコンドリア除去は、Atg5依存的なオートファジーではなく、Ulk1に依存した新規オートファジーに依存していることが証明された(図2B)。なお、この赤血球最終分化時のオートファジーもトランス・ゴルジ膜に依存して実行されていた。

おわりに

本稿では、Atg5やAtg7に依存しない新規オートファジー機構の同定から生理機能までを概説した。Atg5依存のオートファジーに比して、新規オートファジーに関する知見は充分ではない。具体的には、①新規オートファジー実行のメカニズムの詳細、②新規オートファ

ジーの生理機能、③新規オートファジーの変調による疾患など、今後解決していくべき問題は多い。

引用文献

- (1) Mizushima N. Physiological functions of autophagy. *Curr Top Microbiol Immunol* 335: 71-84, 2009
- (2) Nakatogawa H et al. Dynamics and diversity in autophagy mechanisms: lessons from yeast. *Nature Rev Mol Cell Biol* 10: 458-467, 2009
- (3) Kuma A et al. The role of autophagy during the early neonatal starvation period. *Nature* 432: 1032-1036, 2004
- (4) Nishida Y et al. Discovery of Atg5/Atg7-independent alternative macroautophagy. *Nature* 461: 654-658, 2009
- (5) Yamaguchi H et al. Golgi membrane-associated degradation pathway in yeast and mammals. *EMBO J* 35: 1991-2007, 2016
- (6) Honda S et al. Ulk1-mediated Atg5-independent macroautophagy mediates elimination of mitochondria from embryonic reticulocytes. *Nature Commun* 5: Article number4004, 2014

環境にやさしいオゾンのおかげで

殺菌

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。

オゾンガスくん蒸装置
HZ-100

オゾン水生成機
OW-20Z



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

ビニールアイソレータ飼育で

無菌

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、ノトパイオー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

宇宙での小動物飼育について

白川 正輝¹、湯本 茜¹、芝 大¹、小林 拓恵¹、水野 浩靖¹、
小久保 年章²、高橋 智³

¹ 宇宙航空研究開発機構 有人宇宙技術部門・きぼう利用センター

² 量子科学技術研究開発機構 放射線医学総合研究所

³ 筑波大学 医学医療系および生命科学動物資源センター

はじめに

国際宇宙ステーション (International Space Station:ISS) は、日本、米国、ロシア、カナダ、欧州各国の計15ヶ国の国際協力により建設・運用されている、地上から約400 km上空の軌道を回っている有人の施設である。ISSの内部は1気圧の空気で満たされ、宇宙飛行士が地上と同じような服装で活動できる。日本は、「きぼう」実験棟を2008年に打ち上げ、長期間の微小重力や複合放射線など、宇宙でしか得られない環境を利用して様々な実験を行っている。特に生体への影響として、ヒト(宇宙飛行士)は重さの負荷がかからない微小重力環境での長期滞在により、骨量減少、筋萎縮、バランス感覚低下などが生じる。このような現象は、地上での加齢や寝たきりによる体の変化と類似していることから、宇宙環境を利用して、地上社会への還元を目的とした多くの生命科学的研究が行われている。宇宙飛行士はISSで筋量減少等を防ぐために毎日2時間の運動を行っているが、そのような運動を行わない動物では、より急速かつ顕著に微小重力の影響が進行すること、組

織・遺伝子レベルでの詳細な解析が可能であること、サンプル数確保や条件を統一しやすいことから、様々なモデル生物を用いた宇宙実験が行われている。JAXAはこれまで、植物、細胞、線虫、水棲生物等を用いた実験を進めてきたが、より幅広い地上研究との連携を強め、ヒトへの還元を図るため、2013年より新たに哺乳類の小動物(特にマウス)を用いた研究環境の整備を進めてきた。従来の宇宙でのマウス実験は、重力影響については宇宙と地上の比較であり、重力以外の影響も混在した。我々は、より科学的に厳密な重力影響評価を行うため、純粋に重力環境のみが異なるマウス飼育環境の開発を目指した。また、宇宙では飼育ケージ等の機器にトラブルが生じても迅速な対応が図れない場合もある。飼育群全体への拡散を防ぐため、複数のケージで飼育しリスクを分散させること、さらに、トラブルが生じても個体毎の状態を識別し、解析精度を高めることができるよう、各マウスの状態を個別に観察できる1匹用の飼育ケージを開発した。2016年8月には、世界初となる宇宙での長期(35日

間)の微小重力(以下、 μG (Micro Gravity))と人工重力(以下、AG (Artificial Gravity))環境での同時飼育やISSからの全匹の生存帰還を含め、JAXAの最初のマウス飼育ミッションを成功裏に完了した。今後はこれら「きぼう」の研究環境を最大限活用し、加齢研究等につながる骨代謝制御、筋維持・萎縮、これらのトリガーとなり得る重力感知機構、老化や環境適応に伴う遺伝子的・エピジェネティックな変化に関する研究などの重点的・継続的な推進を図る方針としている。本稿では、きぼうの小動物飼育装置の機能実証と併せて実施した初回のミッションの概要を述べる。

きぼう小動物飼育装置

(1) 海外の動向ときぼう小動物飼育装置の特徴

宇宙でのげっ歯類の飼育については、ロシアは1970年代から無人の地球周回衛星で、米国(NASA)は1980年代よりスペースシャトルで数多く実施している。ISSでは、イタリア宇宙機関が2009年に約90日間のマウス飼育を行った実績がある。NASAは2014年から

2016年末までにISSで既に3回のマウス実験を行っており、今後も継続的・重点的に実施する計画である。JAXAは、新たに装置を開発するにあたり、他国にない以下のような特徴を持たせるコンセプトとした(図1)。

①微小重力(μG)に加え人工重力(AG)環境での飼育を実現

宇宙で重力に着目した生物実験を行う場合、打上げ時のロケットや地球帰還時のG(静荷重)や衝撃、宇宙船の地上帰還からマウス受領までに数日間要することによる地上(1g)環境への再適応などを考慮する必要がある。これに対し、 μG 環境と遠心機による宇宙でのAG(地上と同じ1g)環境で飼育した場合の2群の差を比較することで、他の影響を除去でき、重力だけに起因する生物影響を詳細に調べることが可能と考えられる。1977年に、ロシアが無人の宇宙船に遠心機を搭載し、ラットの約18日間の飼育を一度行ったが¹⁾、その

後はISSを含め宇宙での哺乳類に対するAG環境は実現されていなかった。一方「きぼう」には、直径約30cmの遠心機を備え、 μG 、AG環境の比較が可能な遠心機付き生物実験装置(Centrifuge-equipped Biological Experiment Facility: CBEF)が既に搭載されている。これにマウス飼育ケージを取り付けるコンセプトとし、宇宙での飼育と打上げ、帰還用のケージに集中して開発を行うこととした。これにより全体の開発期間を約2年間に短縮でき、2015年にCBEFに取り付ける装置部分を事前に打ち上げ、機能点検を完了した。2016年には実際にマウスを打ち上げ、世界で初めて μG 、AG環境での長期同時飼育を実現できた。

②生存状態での地上への帰還

地上の研究者による専門的な解析、宇宙での影響に対する地上での回復過程の観察等が可能となるよう、宇宙からマウスを生存状態で帰還させるコンセプトとした。

これまで、長期飼育後の生存帰還を計画したロシアやイタリアのげっ歯類の実験では、生存割合は半分程度であった。遠心機による重力環境の比較群を持たないNASAのげっ歯類の実験は、帰還時の重力変動や地上帰還後の1gへの再適応の影響を考慮し、現在は全匹を軌道上で安楽死・解剖する(重力影響に関しては地上

対照群と比較を行う)コンセプトとしている。一方JAXAは、①の人工重力群を有することで(帰還時の影響は両群とも受けるため)、ISSから初めて、全匹を健康な状態で帰還させることを目標とした。初回ミッションでは、打ち上げたマウス12匹全数について100%の生存帰還を実現できた。

③個別飼育

宇宙では機器にトラブルが生じても地上と同様の迅速な対応が困難な場合があり、リスクへの配慮が必要である。社会性のあるマウスの飼育は群飼いが望ましいと考えられるが、宇宙での限られた空間での飼育において、飼育の条件を揃え体重の増加などの成長のばらつきを極力抑えることができる科学的なメリットや、環境条件、行動等を詳細に記録できること、性別や系統の違うマウスを同時に飼育できることなどを考慮し、個別ケージによる飼育をコンセプトとした。これにより、仮に一つのケージでトラブルが生じても他の飼育に伝搬せず、各飼育ケージ内に設置したカメラで各マウスの状態(餌の減り方等)や行動を詳細に観察できるようになり、行動と対応付けた解析が可能となった。また、NASAは群飼いであり、これまでの3回の実験では全てファイティングのない雌マウスを用いている。JAXAの初回ミッションは、宇宙環境の影響としてエピジェネティックな変化が精子を介して次世代に継承されるかを調べるのが研究目的の一つであり、雄マウ

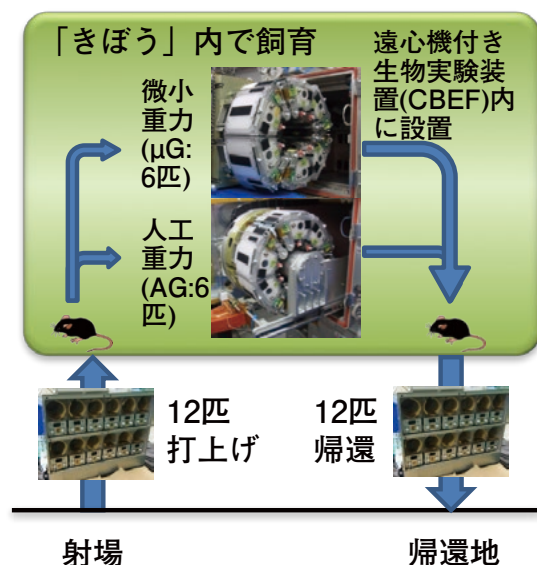


図1 JAXA小動物飼育装置(MHU)の運用コンセプト

表1 JAXA小動物飼育装置(ケージ部分)の主な仕様

	軌道上飼育ケージ	打上/帰還用ケージ
飼育数	マウス12匹(微小重力群6匹, 人工重力群6匹)	マウス12匹
飼育方法	個別飼育(1匹/ケージ)	個別飼育(1匹/ケージ)
飼育期間	設計上30日(ケージユニットの交換により延長可能)	設計上最長10日間
ケージ形状	・床面積:96.7 cm ² 以上、最長部:12.7 cm以上 ・ケージの観察窓が左/右の2タイプ。相互に視認できるよう設置	円筒形、内径:55 mm以上、 最長部:12.7 cm以上
給餌・給水機能	固形餌(ブロック状)のバネによるケージ内柵への押付け	固形餌(円筒形)のケージ内設置
給水機能	約60 mlの水バッグからの給水(クルーが定期的に補充)。 水ノズル2箇所	約60 mlの水バッグ×2個からの給水
排泄物処理	ケージ外部に排泄物回収器を設置し集積 (クルーが定期的に交換)	ケージ外部に排泄物蓄積エリアを設置、 ケージ内通気により集積
観察機能	・暗視機能付ビデオカメラ(1台/ケージ)による連続撮影 ・観察面清掃機能(ワイパ)	なし(今後2つのケージへビデオカメラ設置予定。赤外照明付き)
照明	・白色照明(40-60 lx)及び赤外照明(夜) ・昼夜サイクル時間を設定可能	・白色照明(40-60 lx)のオン/オフ ・昼夜サイクル時間を設定可能

スの利用が前提であったが、個別ケージによりファイティング等がなく長期の飼育を実現できた。なお、軌道上の飼育ケージは左右対称とし、隣り合う面に窓を設けて隣のマウスを視認できるようにしており、個別飼育のストレス軽減

にも極力配慮している。

(2) 飼育装置の概要

マウスを宇宙に打ち上げ、軌道上で飼育し、地上に帰還させるための飼育関係の装置の構成は、打

上げと帰還時のケージ(図2)、軌道上(「きぼう」船内)のCBEFのμG区とAG区(遠心機)に設置する軌道上飼育ケージ(図3)、宇宙飛行士がマウスの軌道上飼育ケージへの

(a) ケージ外観



(b) 各ケージ断面

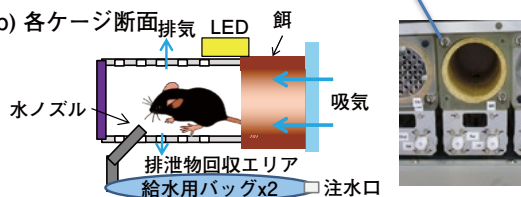
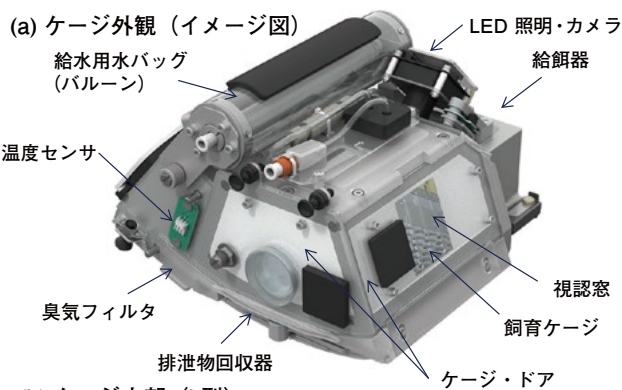


図2 打上/帰還用ケージ



(b) ケージ内部(L型)

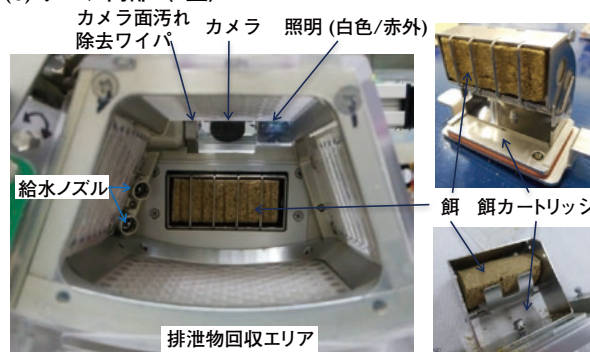


図3 軌道上飼育ケージ

移し替えやケージのメンテナンスを行うためのグローブボックス等からなる。これら全体として小動物飼育装置(Mouse Habitat Unit: MHU)と呼んでいる。表1にMHU(ケージ部分)の主な仕様を示す。MHUは、宇宙(特に地上と異なる μ G環境)で適切に飼育を行うため、以下のような工夫を行っている。なお、 μ G区とAG区に設置する軌道上飼育ケージは同一の構造(交換可能)としており、重力環境だけが異なるよう考慮している。

① μ G環境では、空気の対流がないためマウスが排出するCO₂が局所的に滞留する可能性があり、能動的な換気が必要となる。そのため、各ケージに換気用ファンを2つ装備し、1系統が故障しても継続して換気可能とした。

②排泄物がケージ内に残留したり体に付着しないよう配慮した。空気の流れにより、糞は床面下部の排泄物回収器に蓄積し、尿は壁面及び床面に貼付した吸水シートに付着・吸収されるよう設計した。なお、マウスがシートを齧らないよう、穴をあけたポリカーボネイトを給水シートの上に貼付している。

③各軌道上飼育ケージ内のカメラは、 μ Gではケージ内カメラ観察面に尿が付着し数日でモニタできなくなると考えられるため、その汚れを除去するワイパ(ウォッシュ液排出機能付き)を装備した。本ワイパは、地上からのコマンドで必要な際に遠隔で動作可能とした。

④クルーの作業時間や遠心機の回

転を停止させる頻度を少なくするため、軌道上飼育ケージの餌は地上において1週間程度で消費する量をブロック状の固形餌とした(図3)。

⑤打上/帰還用のケージは、限られた搭載容積内に納めるとともに、打上げ・帰還時の宇宙機の姿勢変更に対応するため円筒形とした(図2)。空気の流れと居住性を確保するため、ケージに適合させ餌も筒形状とした。

MHUの開発にあたり、動物飼育用ケージとしての妥当性や特性を確認するため、設計確認用の要素試作モデルや試験用モデルを製作し、研究者と共同でマウスを用いた各種環境試験や適合性試験を実施した。また、有識者によるアドバイザリ委員会を設置し、試験方針や結果について専門的な観点で評価・助言を受けるとともに、JAXA動物実験委員会に適宜報告した。

軌道上飼育ケージは、マウス飼育に関するガイドライン²³を考慮して設計しているが、CBEFの遠心機に設置するため小型であることから、ケージサイズ等の観点で初回ミッションの研究対象(筋線維の解析等)に支障がないことを事前に確認した⁴。また、軌道上で使用するCBEFの遠心機の利用可能性を評価するため、同サイズ(回転時の半径約15 cm)の地上用遠心機を製作した。ケージ部は遠心力により傾く Gondola 構造としており、77 rpmでケージ内(床面)において1 g(9.8 m/s²)の遠心方向への加速度が付与される。この場合、地上の本来の1 gとの合成力と

してケージ内床面方向に1.4 gの過重力となり、Gondolaは約45度傾いた状態で回転する。同じ1.4 gを10倍の半径(1.5 m)の遠心機(24 rpmで遠心方向1 gとなる)で付加した場合等との比較を行い、マウスに対する15 cm遠心機利用の妥当性を確認した⁵。

過重力環境での飼育は、重力への感受性を事前に地上で調べる実験としても活用している。例えば、宇宙からの帰還後、研究者がマウスを受領するまでに数日かかるため、2 gの過重力環境で飼育後1 gに戻した際の影響の強度や、数日間影響が持続するか等の評価を行っている。これら予備実験段階の過重力実験により、新たな知見の獲得につながっている⁶。

宇宙での飼育の流れと第1回目のミッションの実施結果

(1)第1回ミッションの流れ

MHUを用いた最初のミッションとして、装置の宇宙での機能検証と併せて「マウスを用いた宇宙環境応答の網羅的評価」(代表研究者:筑波大学 高橋智)を行うため、マウス(C57BL/6J雄12匹)の飼育を実施した。なお、JAXA、NASA(ケネディ宇宙センター、エイムス研究センター)及び米国の商業動物実験施設の各動物実験委員会による審査・承認を得ている。

米国フロリダ州でのマウスの馴化等の準備作業を2016年6月25日(現地時間、以下同)より行った。打上げの約24時間前にマウスを打上用ケージに搭載し、宇宙機(米国SpaceX社ドラゴン宇宙船)側に

引き渡した。ロケットは天候等により打上げが延期される場合が多いが、今回、予定どおり7月18日に打ち上げられた。宇宙機がISSに係留し、打上用ケージがきぼう船内に運び込まれた後、マウスはグローブボックス内で宇宙飛行士により軌道上飼育ケージに移し替えられた。

35日間の飼育期間を通して、 μ G、AGの両環境で飼育を継続できた。 μ G環境では数日でカメラ面が汚れたが、ワイパ機能により全飼育期間を通じて各マウスを鮮明にモニタでき、8時間の連続行動観察も実施できた。図4に軌道上飼育開始5日目のモニタ映像のキャプチャ画像を示す(μ G、AG各1ケージのみ)。軌道上飼育ケージは、宇宙飛行士により定期的に餌カートリッジ交換、給水バルーンへの水補給、臭気フィルタ交換、排泄物回収等のメンテナンス作業が

(a) 微小重力(μ G)群



(b) 人工重力(AG)群



図4 軌道上での飼育の様子(軌道上飼育5日目)

行われた。

マウス帰還時は、ISSから宇宙船を切り離す前日(ドアを閉める約6時間前)に宇宙飛行士がマウスを軌道上飼育ケージから帰還用ケージに移し換え、宇宙船内に設置した。宇宙船は8月26日に米国カリフォルニア沖に着水し、船による回収、着岸後、8月28日に帰還用ケージをNASAから受領した。米国西海岸の動物実験施設で開梱した時点で、全匹が健康な状態で帰還したことを確認した。ドラゴン宇宙船内は打上げ、帰還時とも規定された環境条件内に収まるよう制御されておりモニタも可能である。打上げはこれまでNASAの実績があるが、帰還時のマウス搭載は初めてであり、今後生存帰還を計画しているNASAからも成否が注目された。

(2) マウスの一般状態観察

JAXAには専任の獣医師がいないため、ミッション期間中実験動物医学専門医を含む5名の獣医師を委嘱し、軌道上からダウンリンクされた各ケージのモニタ映像(少なくとも1ケージにつき10分程度。ケージの状態変化時や要求に応じて延長)やセンサ値を基に、毎日全マウスの健康状態の確認を行った。摂餌・摂水ができていないなど軌道上で迅速な対処が必要となる場合に備え、翌日の宇宙飛行士の作業スケジュールに反映可能な時刻(日本時間午前9時頃)までに確認を終えることとした。軌道上の宇宙飛行士は分刻みで作業を行っているが、飼育上必要な措置

については24時間以内かつ優先的に実施することをISS運用ルールの一つとして規定している。

モニタ映像(計120分以上)は毎日6GBに及ぶが、獣医師チームが9時まで確認できるよう、データのセキュリティを確保した上でタイムリに配信できる体制とシステムを整備した。事前に情報伝達や判断のシミュレーションを実施し、本番に向けて課題を洗い出した。移し替えなどの重要なイベント時には、獣医師がリアルタイムで画像をモニタできる筑波宇宙センターでの運用管制に立ち会った。これらにより、第1回ミッションでは、結果的にクリティカルな判断には至らなかったが、NASAや軌道上宇宙飛行士に依存せず、動物の状態確認や必要な判断をJAXAが主体的に実施できる体制を確立できた。

(3) 結果速報

研究者チームによる解析により、 μ G、AGの2群間で骨や筋肉の顕著な形態的な差や遺伝子発現に変化が生じていることが確認された。さらに、宇宙滞在マウスを親とした次世代マウスが誕生しており、重力という環境に起因したエピジェネティックな変化が次世代に遺伝するか等の解析を今後実施可能であることを確認している。従来、マウスの重力影響に関しては地上と宇宙との比較のみであったが、今回初めて重力環境の違いだけによる影響を識別できた。また、脚の筋肉の減弱や身体の脂肪の蓄積、肝臓組織の変化など、高齢

者の身体の機能低下(特にサルコペニア)に似た兆候が観察されており、現在詳細な解析を実施している。今後、超高齢化社会における課題解決のきっかけとなるような成果が期待される。

最後に

米国はISSでのげっ歯類利用実験を2014年から重点的に進めており、国際協力によりISS全体としての成果拡大が期待される。JAXAは、加齢研究など地上社会への還元を目指した「地球人」のためのMHU利用推進と併せて、人類が宇宙や惑星に長期滞在する時代を切り拓いていくための「宇宙人」のための活用も検討する計画であ

る。地上では実現できない月や火星の低重力を模擬したAG環境での動物を用いた評価や、重力をパラメータとした応答性評価の研究など、有人宇宙活動の拡大を支持するための科学的基盤の確立に向けたMHUの活用が期待される。

MHUの開発、研究計画策定やミッション実施にあたり、研究総括、アドバイザー、研究者チーム、動物実験委員会、獣医師チーム、NASA、宇宙飛行士、装置開発/支援企業各社、JAXA有人部門等から多大な助言と献身的な協力を頂き感謝します。

参考文献

1. Grigor'ev A. I. and E. A. Il'in. Animals in Space. Herald of the Russian Academy of Sciences, 77 (6), 541-549, 2007.
2. 山内忠平、他. 「新版 実験動物の環境と管理」, アドスリー, 2008.
3. 日本建築学会編. 「実験動物施設の建築および設備」, 第4版, アドスリー, 2014.
4. Shimbo M, Kudo T, Hamada M, et al. Ground-based assessment of JAXA mouse habitat cage unit by mouse phenotypic studies. Exp. Anim. 65 (2), 175-187, 2016.
5. Morita H, Obata K, Abe C, Shiba D, Shirakawa M, Kudo T, Takahashi S. Feasibility of a short-arm centrifuge for mouse hypergravity experiments. PLOS ONE, 10 (7) : e0133981, 2015.
6. Tateishi T, Akiyama N, Miyauchi M, et al. Hypergravity provokes a temporary reduction in CD4+CD8+ thymocyte number and a persistent decrease in medullary thymic epithelial cell frequency in mice. PLOS ONE : 10 (10) : e0141650, 2015.

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▶ ミニプタ用飼料、特別注文飼料、ドライフルーツ
- ◀生体材料▶ 血液・皮膚・臓器
- ◀ミニプタ受託試験▶ ◀ミニプタ受託飼育▶ ◀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>

小動物サーカディアンリズム 自動計測システム「AutoCircaS」

国際科学振興財団 時間生物学研究所
特任研究員 鈴木 孝洋

はじめに

私達の研究室では体内時計の研究をしているが、その研究には1週間や1ヵ月単位でモデル動物の行動を計測し続けることが多々ある。体内時計の研究で最も進んでいるのは約1日周期のリズムであるが、それ以外にも約1ヵ月や約1年周期のリズム等様々な周期の体内時計が研究されている。そういった体内時計の周期等を計測する方法は大きく分けて2通りある。1つはモデル動物の行動を計測し続け、周期的な行動を見出しその周期を計測する方法である。もう一つは遺伝子の発現リズムを計測する方法である。小動物サーカディアンリズム自動計測システム「AutoCircaS」は、前者のモデル動物の行動を数週間連続で計測し続けるための装置として産業技術総合研究所 バイオメディカル研究部門 石田時間生物特別研究チーム(当時)と株式会社タイセー (<http://www.e-taise.co.jp/>) とで共同開発された。私は当時産業技術総合研究所 バイオメディカル研究部門 石田時間生物特別研究チームの立場でAutoCircaSの開発に携わらせて頂いた。私は学部と修士は情報工学を学ばせて頂いており、プログラミングが得意である。博士で農学の分野に来て初めて動物実験をさせて頂いたが、それ以降実験のためのシ

ステムを独自で開発することもあった。そのシステムの1つを製品版として株式会社タイセーと共同開発させて頂くことになり、ソフトウェアの開発は私が担当させて頂いた。ここではその小動物サーカディアンリズム自動計測システム「AutoCircaS」を紹介させて頂く。

体内時計研究での行動自動計測システム

生物はその内部に時計を持っている、最初にこの報告をしたのはフランスの科学者Jean-Jacques d'Ortous de Mairanで、1729年のことであった。彼は植物のオジギソウの葉が約1日のリズムで特定のパターンで動くことを見出し、それが外部からの刺激をシャットアウトした状態でも再現される、つまり、内部に時計を持っていることを報告した。この時Jean-Jacques d'Ortous de Mairanがこの約1日のリズムをサーカディアンリズムと名付けた。サーカディアンリズム circadian rhythm はラテン語の「約」を意味する circa と「日」を意味する dies から作られた。この時の実験は人の目による観察で行われた様である。それから時は経ち、1971年、Dr. Seymour BenzerとDr. Ronald J. Konopkaによって、元々行動周期がサーカディアンリズムのショ

ウジョウバエの3種類の変異体が報告された⁽¹⁾。1つは完全にリズムが無くなってしまふ変異体、もう一つは周期長が短くなる変異体、そして、周期長が長くなる変異体である。当時、遺伝子の実態解明が進み、生物は様々なことが遺伝子によって規定されていることが分かってきていたが、まさか行動まで遺伝子に規定されているとは考えられていなかった時に、行動も遺伝子に、それもたった一つの遺伝子によって変えられてしまうことを示唆した見事な研究だった。この時のサーカディアンリズムの計測は、機械によって自動で行われた。ショウジョウバエの2種類のサーカディアンリズム、行動リズムと羽化リズムに着目し、それぞれを自動で計測できる装置を用意した。そうすることによって大量のショウジョウバエの中から周期に異常のある変異体を見つけ出す事が可能となったのだ。羽化リズムはDr. Colin Pittendrighによって、行動リズムは堀田凱樹博士によってそれぞれ開発された機械が使用された。特に、堀田凱樹博士が開発した赤外線を利用して、赤外線の前を横切った回数をカウントするショウジョウバエ自動行動計測方法はその後ショウジョウバエ行動計測のスタンダードとなった。ショウジョウバエの

この研究の成功を機に、ショウジョウバエ以外の様々な動物でも様々な計測機器が開発され、サーカディアンリズムが計測されてそのメカニズムの解明に貢献してきた。例えばマウスでは回転かごを回した時間を記録する機器がよく利用されている。様々な動物のサーカディアンリズムを計測することが可能となってきたが、今までの機器では不得意なことがあった。それは、同一空間に複数の動物がいる場合の行動計測である。今まではほとんどの計測機器が一つの計測系に1匹の動物が存在することが前提で、複数匹存在していることを想定していない。1匹だけでの行動リズムを計測するだけでも体内時計の分子機構の研究は大いに進んできたが、私達の研究室では複数匹同時に存在する場合に発生する社会性のリズム、雄が雌に求愛する求愛活動リズムに着目していたため、新しい計測システムを開発する必要があった。そこで、複数匹を同時に計測出来る様に画像認識による行動自動計測システムの開発が行われた。それを株式会社タイセーと共に製品用に共同開発させて頂いたものが「AutoCircaS」である。

AutoCircaS の性能

AutoCircaSは温度を一定に保つインキュベータ、昼夜を再現するライト、暗闇でも撮影可能とするための赤外線ライト、撮影するための赤外線カメラ、画像の保存・解析を行うためのコンピュータでハードウェアは構成されている。インキュベータの中に計測したい小動物を入れ、それをカメ

ラによって24時間体制で撮影する。動画としてコンピュータに保存しているわけではなく、1秒に1回、もしくは10秒に1回撮影して画像として保存しているので1日分でも数百メガバイト程度の容量で済み、数か月の連続撮影も可能である。また、ライトを点灯させる時間帯、消灯させる時間帯も設定出来るので、昼夜の再現も出来る。AutoCircaSは撮影だけでなく、撮影した画像を解析する機能も搭載している。解析の基本は撮影された画像の中から対象とす

る小動物の位置を特定し、その座標を求めることである。

1匹で計測した場合、時間毎の移動距離を算出し、グラフ表示することが出来る。また、一度に一つのカメラで1匹しか計測出来ない訳ではなく、画像を複数区間に区切り、その区間内にいる小動物をそれぞれ別で解析することが出来るため、例えば縦4分割、横6分割に区切り、その位置に小動物をセットすれば24匹同時に1匹での行動を計測することが出来る。また、ショウジョウバエの場合、一定時間

AutoCircaS

Automated Circadian System
小動物サーカディアンリズム自動計測システム

産総研 石田時間生物研究チーム共同開発



適用分野

- 時計遺伝子等の基礎研究
- 農業分野 害虫の研究
- 薬学・医学の応用研究
- 新薬の開発

ショウジョウバエ求愛活動リズム



基本機能：

- ・小動物のサーカディアンリズムや睡眠リズムを自動計測
- ・小動物の♂♀の近接状態（求愛行動リズム）を自動計測

特徴：

- ・LED光による昼夜制御、IRカメラによる鮮明画像取得
- ・画像処理を用いた高精度自動位置検出システム

製造・販売



株式会社タイセー

〒273-0104 千葉県鎌ヶ谷市東鎌ヶ谷3丁目23番地54号
 TEL: 047-446-2221 FAX: 047-446-2131
 URL: <http://www.e-taisei.co.jp/> E-mail: taisei@green.ocn.ne.jp
 担当岩城

図1 AutoCircaSパンフレット

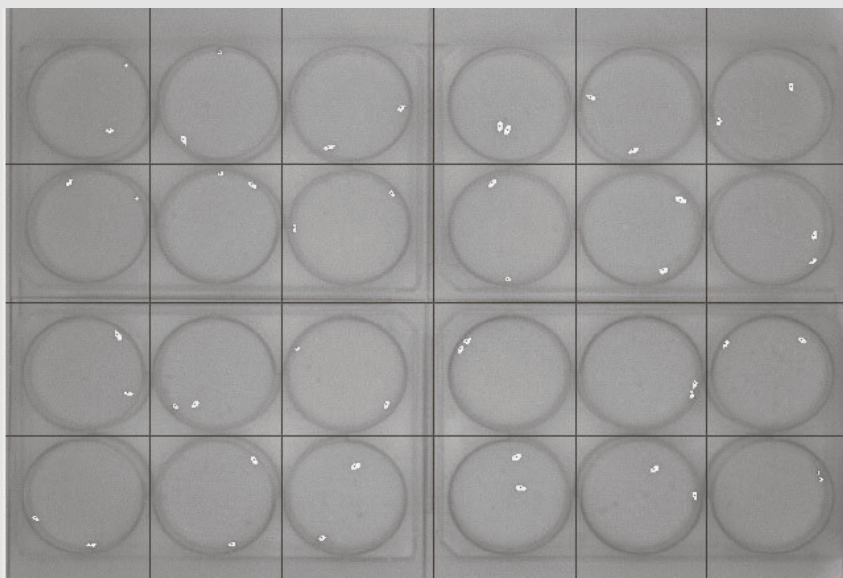


図2 AutoCircaS を用いたショウジョウバエ自動行動計測解析中画像一例

以上不動であったならばそれは睡眠中とみなすことが出来る^(2,3)ので、ショウジョウバエの睡眠時間を求めることも出来る。

私達の研究では求愛活動リズムを計測するために、1つの区間に雄雌それぞれ1匹ずつ、計2匹入れる。そして、それぞれの座標を特定し、2匹の距離が設定された距離よりも近ければ求愛活動中、離れていれば求愛活動中ではないとみなし定義して解析する⁽⁴⁾。時間毎の求愛活動時間割合を算出し、グラフ表示することも出来る。

体内時計研究では良く使用されるカイ二乗検定を用いた周期長解析も行うことも出来る。これによって、撮影した小動物の行動周期が何時間であったかを解析することが出来る。

行動計測の活用

私達は動物と会話することが出来ない。よって、その動物の状態を知りたい場合、その動物の血液検査等生化学的な手法か、もしくは行動を計測する行動学的な手法によってその動物の状態を

推測する。両手法ともとてもよく使用される大事な手法である。

私達の研究室では医学的な目的でも実験動物を用いている。それは、病気のメカニズムを解明し、その病気の治療を可能とする方法を見つけ出すことである。同目的で実験動物を用いて研究を行っている研究グループは多々ある。そして、行動解析もよく行われている。例えばパーキンソン病の場合、症状が不随運動障害なので、それは歩行速度の低下となって現れる。また、睡眠障害もよく報告される症状の一つだが、これらの症状が再現されるパーキンソン病モデルショウジョウバエが2000年にDr. Mel Feanyらによって報告された⁽⁵⁾。報告された当時は行動障害としてショウジョウバエの這い上がり行動に異常が見られることが報告されたが、その後の研究によって、初期症状としてショウジョウバエ歩行速度の低下が報告された⁽⁶⁾。私達の研究室が行った実験ではそういった行動障害が見られる更に前の段階で睡眠障害が見ら

れた(伊藤薫平ら、投稿準備中)。これらは非常に興味深い結果で、なぜならばそれは α シヌクレインの毒性を示唆するものだからである。パーキンソン病の原因として脳内に α シヌクレインが異常蓄積してしまうことが挙げられている。これは解剖学的見地から明らかになってきたことだ。同様にアルツハイマー病ではアミロイド β や τ 、筋萎縮性側索硬化症ではTDP43といった様に神経変性疾患ではその疾患と異常たんぱく質の蓄積がよく関連付けられる。しかし、ここには昔からの大きな問題提起があり、それは、その異常たんぱく質の蓄積はその疾患の原因なのか、結果なのかということである。原因であるならば、その異常たんぱく質を取り除くことが出来れば治療につながる可能性が高いが、結果であるならば異常たんぱく質を取り除いても治療につながる可能性は低い。パーキンソン病における α シヌクレインは原因である可能性が高いことを示した報告がDr. Mel Feanyらの報告だ。彼女らはショウジョウバエにヒトの α シヌクレイン遺伝子を導入した。元々ショウジョウバエには α シヌクレイン相同遺伝子はなく、従ってパーキンソン病も発症しないと考えられていたが、ヒトの α シヌクレインを導入したショウジョウバエではパーキンソン病と同様の運動障害を起こす事を報告した。つまり、 α シヌクレインが原因となってパーキンソン病を発症している可能性が高く、パーキンソン病治療の方向性の一つとして α シヌクレインに着目することが有望となった。

おわりに

今まで治療することが出来なかった疾患を治療するためによく新薬の開発が行われるが、そこでは動物実験が大変貴重なデータを提供してくれる。可能な限りヒトに近い動物を用いる程その結果はヒトでも効果が期待出来るが、上記の様に一見ヒトとはかけ離れている様に見えるショウジョウバエでも貴重なデータを提供してくれる。実際私達の研究室でもショウジョウバエを用いたパーキンソン病やゴーシェ病の創薬のためのスクリーニングに取り掛かっている^(7,8)。その場合も、やはり指標としては行動に着目する。近年ゼブラフィッシュ創薬研究会も開催され、小動物を

うまく活用した創薬への期待が高まっている。AutoCircaSもゼブラフィッシュやメダカの自動行動計測に利用されている。小動物の行動を計測する系を新たに導入したいと考えている方は、是非お問い合わせ頂けると幸いである(taise@green.ocn.ne.jp)。

最後に、本稿を執筆させて頂く機会を頂いたふくしま医療機器産業推進機構の大和田一雄先生に心より御礼申し上げます。

引用文献

1. Konopka RJ, Benzer S. Clock mutants of *Drosophila melanogaster*. Proc Natl Acad Sci U S A. 1971 Sep;68 (9): 2112-6.
2. Hendricks JC, Finn SM, Panckeri KA, Chavkin J, Williams JA, Sehgal A, Pack AI. Rest in *Drosophila* is a sleep-like state. Neuron. 2000 Jan;25 (1) : 129-38.

3. Shaw PJ, Cirelli C, Greenspan RJ, Tononi G. Correlates of sleep and waking in *Drosophila melanogaster*. Science. 2000 Mar 10;287 (5459) : 1834-7.
4. Hamasaka Y, Suzuki T, Hanai S, Ishida N. Evening circadian oscillator as the primary determinant of rhythmic motivation for *Drosophila* courtship behavior. Genes Cells. 2010 Dec;15 (12) : 1240-8.
5. Feany MB, Bender WW. A *Drosophila* model of Parkinson's disease. Nature. 2000 Mar 23;404 (6776) : 394-8.
6. Chen AY, Wilburn P, Hao X, Tully T. Walking deficits and centrophobism in an α -synuclein fly model of Parkinson's disease. Genes Brain Behav. 2014 Nov;13 (8) : 812-20.
7. Suzuki T, Shimoda M, Ito K, Hanai S, Aizawa H, Kato T, Kawasaki K, Yamaguchi T, Ryoo HD, Goto-Inoue N, Setou M, Tsuji S, Ishida N. Expression of human Gaucher disease gene GBA generates neurodevelopmental defects and ER stress in *Drosophila* eye. PLoS One. 2013 Aug 28 (8) : e69147.
8. 石田直理雄、川崎陽久、伊藤薫平 睡眠や認知症機能のツールとしてのショウジョウバエ 研究最前線 LABIO 21, JAN 12-15, 2014

実験動物1級・2級技術者試験を受験して

実験動物2級技術者試験に合格して

静岡県立田方農業高等学校 下山 祐理子

私が実験動物2級技術者試験の勉強を始めたのは、3年生の6月からでした。筆記試験があった8月までは2カ月ほどしかなく、この短い期間の中で学校の勉強と両立させるのはとても大変なことでした。そのため、学校の定期テストまでは少しずつ勉強を進めていき、定期テスト後に本格的に勉強をしました。特に夏休みは図書館や学校など集中できる場所で何時間も勉強をし、家に帰ってからも暇があれば勉強をするようにしていました。初めは膨大な量の過去問を手探り状態で解き進めていきました

が、先輩や先生に勉強の方法を教えてもらいながら自分なりの勉強法を確立することができました。私の勉強法は最初に過去問1年分を解いて、不正解だった問題のどこが間違っていたのか確認しながらノートにまとめていくというものでした。最初は不正解の問題も多く要領が悪かったため、勉強が嫌になることもありました。しかし、多くの問題を解いていくうちに傾向や正解も増えてやる気が出ました。

実技試験までは保定のコツなどを先生に積極的に質問し、放課後等を使って練習するように

していました。また、幼若個体や成熟個体の雌雄判別は、写真を見るだけでなく実際に沢山判別をすることが重要だと思いました。

本番はかなり緊張し、思うようにできませんでした。私が成績優秀者に選ばれたと知ったときは驚きました。このような結果が出せたのも、支えてくださった先生方、共に頑張った友達のお陰です。この経験と感謝の気持ちを忘れずに、大学へ進学後も社会に貢献できるように努力していきます。

実験動物2級技術者試験を受験して

湘中央生命技術専門学校 長谷部 のどか

1年生の頃に初めて実験動物の授業を受けた時から目標だった実験動物2級技術者試験のトップでの合格が達成できて、驚きとそれ以上に喜びを感じています。

筆記試験の対策として、夏休み入ってから週3回学校に行き、模試を受けました。点数は全員書かれた紙が配られ、自分の点数が他の人よりも低く、そして合格点になかなか達することがなかったので悔しい思いをしました。いい点数が取れるようにできなかった問題は何回もやり直し、覚えてないところはテキストに線を引き、できる限り多くのことを覚えようと心がけま

した。試験問題は、少し難しかったので不安でしたが、自己採点では今までで一番いい点が取れたので嬉しかったです。

また、1年生の後期より実験動物の実習で先輩方や講師の方々に手技を教えてもらいましたが、ラットは特に苦手意識があり、あまり上手く保定や投与ができませんでした。春休みに学校に行って教えてもらったり、2年生入ってからの授業で実験動物を扱う時間が増え、卒業生講師の方々に自分が投与しているところを何回も見てもらうことにより、苦手意識もなくなり試験本番ではリラックスして行うこと

ができました。

私がトップで合格できたのは、1年生の頃から手技の練習に付き合ってくれた先生、休日に来てくださった卒業生講師の方々、そして、最後まで一緒に受験した友人たちがいたからだと思います。本当にありがとうございました。この試験を受けて、努力はいつか報われるということを感じました。これから新社会人になり、実験動物と関わる時間がさらに増えるので、これからも努力していきたいと思っています。

実験動物2級技術者試験を受験して

一般財団法人残留農薬研究所 上田 洸平

私は農薬の分析機関で動物を用いた代謝動態試験や、それに伴う動物の飼育管理等の業務に携わっております。試験データの信頼性の担保や実験動物への配慮等の理由から、弊所では動物実験技術者の資格を取ることが推奨されており、業務開始1年後の私にも受験の話がきました。推奨されていたこともありますが、私自身の勉強やスキルアップの絶好の機会であると思いい、受験を決心しました。

学科試験に向け、私はひたすらテキストを読み込みました。帰宅後の勉強はもちろんですが、業務の休憩時間や通勤時間中などの小さな空き時間も無駄にしないよう意識をして取り組みました。ある程度の内容が頭に入ったところで、試験の過去問題

を解いて出題の傾向と十分に理解していない点などを確認するように努めました。無駄のないように考えながら勉強に取り組めたことがよかったのだと思っております。

実技試験対策として、実際に動物を飼育・管理しながら動物の取り扱いや口頭説明を練習しました。一番苦勞したのは口頭説明でした。今まで業務等で動物の取り扱いや投与などは経験していましたが、手技をしなからの説明は一筋縄ではいきませんでした。上司の指導を受けながら練習を重ね、説明や手技の改善をしていきました。対策の甲斐もあり本番では緊張することなく、いつも以上の力を発揮できました。飼育・管理を実践しながら練習できたことや上司

が丁寧に指導してくれたことが実技試験での成功につながったのだと私は確信しております。

熱心に指導してくださった上司や試験に集中できる環境を整えてくださった職場の方々、応援してくださった周囲の人達のおかげで今回良い成績を残すことができました。この場をお借りしてお礼申し上げます。本当にありがとうございました。今後は受験を通じて得られたことを業務や動物実験等へ活かしていきたいと思っております。また、資格を得たことに甘んずることなく知識・技術の向上に努めてまいります。

実験動物1級技術者試験を受験して

長浜バイオ大学 バイオサイエンス学部 アニマルバイオサイエンス学科 菅谷 友美

私は今回の経験を通して2つのことを大きく学びました。

1つ目は、努力が目標を達成するうえで大切なことだということです。私は学科試験の対策を本格的に6月ごろから始めました。勉強法としては、過去問を何回も解いていましたが、正解をただ覚えるのではなく、不正解の回答はどうして違うのかをテキストで確認して理解を深めました。講義のない時間や休日など、空きの時間はほとんど試験勉強に費やしました。夏休みも時々息抜きをしたものの、毎日ほぼ勉強しました。そして自分を信じて頑張った結果、学科試験に受かることができました。さらに、実技も同様に努力

をしたおかげで今回無事1級技術者の資格を取得することができました。これらの経験から、1つの目標を決めて努力を惜しまないことが成功につながるということに改めて実感しました。

2つ目は、試験勉強をする中での周囲の人たちの大切さを学びました。実技試験に向けては、先生やTA、外部講師の方に指導をしてもらうとともに毎日時間をやりくりして自主練習を行いました。自主練習はほかの受験生と一緒に練習を行うようにし、苦手なところや得意なところをお互い教えあう工夫をしました。この一緒に頑張る仲間がいたことが私の中で大きな力となり合格につながったと思いま

す。あきらめそうになった時は、お互い支えあうことができ、何より練習をするうえで苦痛を一時も感じなかったからです。もし1人だったら毎日長い時間集中して練習を出来なかったと思います。この経験から、何かを行う上で周囲の人たちに恵まれていることの大切さを深く知ることができました。

私は将来、この資格を生かして実験動物飼育管理業務や実験補助などの仕事に就きたいと考えています。そのためにも、今回学んだことを今後生かして、技術を向上し、知識をさらに身につけていきたいです。

実験動物1級技術者試験に合格して

一般財団法人 阪大微生物病研究会 針谷 円

この度、無事実験動物1級技術者に合格できて、大変安堵したと共に、成績優秀者に表彰して頂けた事実にただただ恐れ多いことと恐縮するばかりです。

今年度の実験動物1級技術者試験を受験するきっかけとなったのは、昨年に実験動物2級技術者の資格を無事取得したことに伴い、さらに専門的な知識や技術を習得していきたいという思いからでした。

正直に申し上げますと、この時私は2級も1級も難易度に関して言えば、大した差もないだろうと軽く考えていたのですが、1級のテキストの内容や試験範囲を見るや否や愕然としました。

それは、覚えなければならない内容量が圧倒的に多かったこと、また、実技試験の内容の難易度が段違いに難しいものであったことでした。

特に実技に自信がなかったため、実技試験の対策に関しては、藁にもすがる思いで白河研修会に参加させて頂きました。指導員の方々及び同じ実習チームの研修生の方のみならず、研修会に参加されていた多くの皆様到手厚くご指導頂きました。そのおかげで、必修科目であったマウスの実技、特に解剖に関しては、みるみる技術力が向上していくのを実感できました。他にも、指導員の方や実験動物技術

者の方のご指導を直接受けることで、実際に自分自身が指導する立場となった時の参考となるような大変貴重な経験ができたと思います。また、選択科目のモルモットの実技に関しては、実験動物1級技術者の先輩職員の方のご配慮により、業務の合間を縫ってご指導頂きました。

今振り返ってみると、こうして表彰されたのも、関係者皆様からの丁寧なご指導があったからこそと感じます。この場を借りて厚く御礼申し上げたいと思います。また、今後とも色々ご指導を仰ぐ機会もあるかと存じますが、その節はどうぞよろしくお願い申し上げます。

活 動 紹 介

九州実験動物研究会

九州実験動物研究会
会長 小野 悦郎

九州実験動物研究会は、実験動物および動物実験に関する知識や技術を共有し、九州および周辺地域における実験動物学並びに関係諸科学の発展を図ることを目的として、初代会長の故山内忠平先生(鹿児島大学)の呼びかけで1984年6月9日に発足しました。本研究会の発足時に、ケナガネズミ *Diplothrix legata* をモチーフとした研究会のシンボルマークを土屋公幸先生(宮崎医科大学)に作成していただき、現在も「九州実験動物雑誌」の表紙等に使用しています。右の図がそのシンボルマークです。

ケナガネズミは、九州の奄美大島・徳之島と沖縄本島のみ分布する樹上棲の体長25～30cm、尾長25～33cmで背面には長さ6cmの剛毛が生えているネズミで天然記念物に指定されています。

本研究会は、毎年秋に定期的「総会と学術集会」を開催し、同時期に会誌「九州実験動物雑誌」を発行しています。2005年には、若手研究者の活性化を目的に「山内・半田賞」を制定し、九州実験動物雑誌における原著あるいは本研究会総会で発表された演題の中から、特に優れた若手の研究者1名を選んで本賞を授与しています。また、2006年からは、不定期の学術集会として、日本実験動物技術者協会九州支部や日本実験動物協同組合九州支部と共同で「実験動物ジョイントセミナー・イン九州」を開催し、喫緊の課題や情報共有に対応してきています。さらに、海外の実験動物領域の関係者と学術交流を行なうために、本研究会と中国の広東省実験動物学会、海南省実験動物学会および遼寧省実験動物学会との間でそれぞれ学術交流協定を結び、地方の組織同士の交流を実施していました。暫くの間、交流が途絶えておりましたが、一昨年の福岡での本研究会総会から広東省実験動物学会との間で隔年の相互訪問が再開され



ました。詳細は、LABIO 21, No. 67, 24-26, 2017をご覧ください。ただければと思います。

本研究会の役員会や委員会活動は、今期で第12期目を迎えました。国内外交流、技術交流、若手交流、学術集会、情報管理、編集、「山内・半田賞」選考、財務検討、産学連携検討の合計9つの委員会の委員長を理事が兼務する構成です。今期から産学連携検討委員会を新たに発足させ、賛助会員の積極的な活動や共同研究の実施に向けた取組も推進したいと考えています。今年の第35回本研究会総会も既に11月11～12日に鹿児島県指宿市において、日本実験動物技術者協会九州支部研究発表会との合同開催で、準備が進められています。

九州では、来年、熊本で第52回日本実験動物技術者協会総会を、再来年には福岡で第66回日本実験動物学会総会を開催させていただくことになりました。関係者の皆様には、是非とも両総会にお越しいただきたいと存じますので、宜しく願いいたします。



筑波実験動物研究会

筑波実験動物研究会
会長 山海 直

筑波実験動物研究会は、国立感染症研究所(当時)の故長文昭先生の呼びかけで集結した筑波大学の八神健一先生(日本実験動物学会前理事長)、家畜衛生試験場(当時)の福田勝洋先生(日本実験動物協会会長)、国立環境研究所の故高橋弘先生が中心となって発足しました。この4名が発足時に示した「筑波地域という日常的に行き来できる範囲の中で情報や意見を交換できる場を持ち、相互に協力、援助しあえれば有意義である」という言葉が本研究会の目的そのものとなっています。1993年5月に第1回大会が開催され、初代会長として後藤信男先生が選任され、その後、長文昭先生、八神健一先生、吉田高志先生、吉木淳先生、そして私が引き継ぎ現在に至っています。会員数は約100名であり、賛助会員15社のご支援をいただいています。企業と研究機関、技術者と研究者が活発に意見交換できる組織であり、本研究会が共同研究などを行うきっかけにもなっています。

地域研究会ならではの活力と自由度を保ちながらも、毎年、春に総会が開催され会員の意見等を反映した運営がなされています。研究会は春と秋の年2回、招請講演や研究発表を行っています。講演では、新規な情報を収集する機会が少ない技術者や学生らを意識してプログラムを組んでいます。たとえば、ゲノム編集技術が本分野の研究で盛んに利用されるようになってきましたが、このような多くの方が用いる内容についてはシリーズとして取り上げ、DNAの初歩から最新技術まで、さらに飼育管理での注意点などについても合わせて学ぶ、といった取り組みを行っています。毎回、動物倫理・福祉シリーズとして多様な情報を得る機会を設けるなど、継続性が求められる課題への配慮も行っています。前述の4名が記された文書に「大切なことは実

験動物への正しい理解と役割を繰り返し聞き、語り、考えることである」というものがあり、その精神を踏襲しています。この動物倫理・福祉シリーズでは受講証を発行しており、記録を残すことで自らの倫理観を高めていただければと願っています。講演会には、筑波地区以外からもご参加いただいております。会員数を超える多くの方々にご参集いただいております。年2回の講演会に加え、実際に動物に触れながら学ぶ機会として技術講習会を開催しています。多くの先生方にボランティア講師としてご協力いただいております、受講者と講師がほぼ1対1という、受講者にとっては最高の環境での充実した内容になっているのではないかと思います。本年の晩秋には、日本実験動物学会との共催で実験動物科学シンポジウムを開催する予定です。筑波らしさを少しでも提供できればと考え、「宇宙」をテーマに準備を進めています。宇宙開発は飛躍的に進歩しており、宇宙空間で動物実験も成されるようになってきました。夢のある宇宙での研究は、無限の可能性を意識させるものであり、実験動物分野の新たな領域が開拓される現実を共有していただければと考えています。

筑波地区において、第41回(大会長:今道友則先生)と第60回(大会長:小幡裕一先生)の日本実験動物学会学術集会が開催されており、本研究会がそのお手伝いをさせていただけたことを嬉しく思っています。また、本研究会には、研究会の発展に寄与いただいた先生方のご功績を称えることを目的とした制度があり、これまでに名誉会員証を8名の先生方に、特別功労賞を3名の先生方に授与してきました。偉大なる先生方が創り上げてくださった本研究会から、実験動物分野の発展に繋がる情報を発信できればと考えています。

筑波実験動物協会のホームページ:<http://www.talas.jp>



ほんのひとりごと

『馬を巡る旅』

小檜山悟著、株式会社三オブックス
1,500円+税
(平成28年8月1日初版)

筆者は日本中央競馬会（JRA）の現役調教師である。変わった経歴の持ち主で、ナイジェリアで高等学校を卒業し、その時の経験から一時はゴリラの研究者を目指そうかと本気で考えたそうである。帰国後大学入学、馬術部に入ったことが縁でJRA調教師になった人物である。

この一冊は、競走馬だけでなく、我が国内外の馬を丁寧な筆で追い掛けたものである。内容は4章に分け、「神馬を求めて」「島に生きる馬たち」「競馬のある風景」「駆け抜けたゴールの後で」というタイトルで纏められている。

「神馬」では、上賀茂神社の賀茂競馬に日本の競馬の原点を見出し、ま

た他の5か所の神社や地域の神事における馬の役割を読み解いている。「島の馬」では、新潟の粟島、琉球競馬、濟州島の馬について取り上げている。それぞれ在来馬が話題ではあるが、粟島では留学の小中学生を島に招き馬で離島の自然を体験する、という制度があり、牧場で留學生徒に乗馬と馬の精度を義務づけ、「命の教育」という情操教育の一環として紹介されている。その制度には、粟島馬という、昭和7年に絶滅した在来馬の復活の願いが込められているという。もちろんの粟島馬の復活は無理としても馬の島だった昔のように、一年中放牧馬のいる島にしたい夢があるという。何れはその夢が叶うことを祈りたくなる話である。「競馬のある風景」では、賭け事でない珍しい競馬が紹介され、「ゴールの後で」では、競馬界を支える技術や人々に光を当てており、と

くに短、中、長距離馬や側対歩と遺伝子との関係などのインタビューは興味深い。この章では、筆者自身の厩舎の馬を語っている。「さらばスマイルジャック」という項である。「スマイル」は、“ダービーのゴール板前わずか20mでかわされて栄光がすりとおぼれおちた”馬であった。引退後は種牡馬となり、2子を得ているそうだ。筆者はその第二幕を楽しむにしているようだ。

筆者は競馬界に身を置く立場ではあるが、馬を競走馬として見るだけでなく、多様な役割を果たす馬にも注視すること忘れず、さらにその馬に関係する人物にも尊敬の念を以て本書を纏め上げているように見える。その意味で馬に限らずゴリラにも特段の愛情を抱き続ける筆者の気持ちがこの一冊から窺い知れるように思われた。

〔選評：大島 誠之助〕

『絶筆』

新潮社刊 野坂昭如 著
1,600円+税

「この国に、戦前がひたひたと迫っていることは確かだろう。」ちょうど1年前、筆者が亡くなる数時間前に残した言葉。本書は野坂が脳梗塞で倒れて以降夫人に託した口述筆記による日記・エッセイ集である。もともと月刊『新潮』の連載で毎号購読していたのだが、単行本として出版されたのを機に改めて読んだ次第。野坂に興味を持ったのは小学生の頃、

自ら歌ったCMを見て面白いオジサンだなと思ったのがきっかけで中高時代は彼の作品を読みふけたものだ。さて、本書の内容の多くは自身の健康や交友録・思い出話が病床に伏しながらも洒脱に綴られているのだが、彼の原点にあるのはやはり戦争の悲惨さ。飢餓を最も恐れ、再び戦争が起こらないことを願う思いは死の際までブレることはなかった。敗戦前後の実体験に基づく昨今の政治経済や社会状況への批判や食と農業の危機への警鐘を大いに傾聴すべきだろう。破天荒な言動からとかく

物議を醸した人ではあるが、夫人と娘に対する感謝の気持ちがはにかんだ様な言い回しで語られるのは彼の本質を見るようだ。また、「僕はつまるところ、反戦芸人なのだ。心休まる平和な時代にあってこそ価値がある。しかし、いざ戦争になれば、たちまち旗を振って戦争芸人になるかもしれない」というくだりはいかにもNOSAKAを象徴する痛烈な皮肉。國士を気取る輩に聞かせたい言葉である。

〔選・評：工藤 慈晃〕

日本実験動物学会の動き

第64回日本実験動物学会総会

テーマ:ライフサイエンスが復興を促進する
 会長:大和田一雄(一般財団法人ふくしま医療機器産業推進機構)
 会期:平成29年5月25日(木)~27日(土)
 場所:ビッグバレットふくしま
 〒963-0115 福島県郡山市南2丁目52番地

お問合せ:第64回日本実験動物学会総会事務局
 〒164-0003 中野区東中野4-27-37(株)アドスリー
 TEL:03-5925-2840 FAX:03-5925-2913
 e-mail:jalas64@adthree.net
 プログラム、参加申し込み等の詳細は第64回大会ホームページ
<http://sympo.adthree.net/jalas64/> をご覧ください。

日本実験動物技術者協会の動き

第51回日本実験動物技術者協会総会のご案内

「第51回日本実験動物技術者協会総会 2017山形大会」
 会期:2017(平成29)年10月12日(木)~10月14日(土)
 会場:山形テルサ 山形県山形市双葉町1-2-3
 大会事務局:〒990-9585 山形市飯田西2-2-2
 山形大学医学部メディカル・サイエンス推進研究所動物実験
 センター内

事務局担当:福田直樹
 email:jaeat2017@mws.id.yamagata-u.ac.jp
 TEL:023-628-5485 FAX:023-628-5489
 大会HP:<https://www.adthree.com/jaeat2017/>
 参加申込・演題申込は4月1日から開始いたします。その他イ
 ベント情報をHPに順次掲載いたします。皆様の多数のご参加
 をお待ちしております。(大会長 伊藤恒賢)

東北支部

講習会等	期日	場所	テーマ
平成28年度支部総会・特別講演会	4月1日(土)予定	山形大学医学部 山形医学交流会館(予定)	特別講演会「ラット初期胚の基本操作最前線と現状の問題点」(仮題)

詳細は東北支部ホームページ(<https://sites.google.com/site/jaeattohoku2/>)を参照ください。

関東支部

講習会等	期日	場所	テーマ
実験動物の取り扱い、実験手技および比較解剖	8月(金~土)開催予定	慶應義塾大学 (新宿区信濃町)	マウス、ラットの基本的な取り扱い、投与、解剖など

詳細は関東支部ホームページ(<http://www.jaeat-kanto.jp/>)を参照ください。

東海北陸支部

講習会等	期日	場所	テーマ
第3回東海北陸支部総会および研究会	4月15日(土)	名古屋市立大学 (愛知県名古屋市)	支部総会および研究会 講演「技術者の役割」他
平成29年度東海北陸・関西支部2支部交流会	6月17日(土)	セミナー・カルチャーセン ター 臨湖(滋賀県長浜市)	共通テーマ「動物と環境」 講演・シンポジウム(現在調整中)
基本的動物実験手技 (第10回)	7月22日(土) 7月23日(日)	藤田保健衛生大学 (愛知県豊明市)	基本的な技術の習得・向上を中心とし、動物実験における技術者の倫理観、心構えなど、日常の業務にすぐに反映できる内容

関西支部

講習会等	期日	場所	テーマ
関西支部設立50周年記念大会 (平成28年度支部総会)	平成29年4月22日(土)・ 23日(日)	神戸学院大学ポート アイランドキャンパス (神戸市中央区)	「関西支部の50年、そして未来へ一繋(つな)ぐ・ 紡(つむ)ぐ・創(つく)る」
第73回実験動物学習会	6月24日(土)・25日(日)	大阪大学(予定)	実験動物二級技術者レベルの実技講習
平成29年度マウス・ ラット上級技術講習会	7月29日(土)・30日(日)	岡山大学(予定)	実験動物一級技術者レベルのマウス、ラット実技講習

九州支部

講習会等	期日	場所	テーマ
創立40周年記念講演会および 第40回支部総会	4月15日(土)	熊本市医師会館 (熊本市中央区)	40周年記念として講演5題とランチョンセミナーを予 定。

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。

協会だより

1. 委員会等活動状況

委員会名等	開催日	協議内容及び決定事項・場所
第3回実験動物福祉調査・評価委員会	29.1.16	福祉調査報告と調査概要書内容の検討他
教育セミナーフォーラム2017(東京)	29.2.18	東京大学弥生講堂
第12回実験動物技術指導員研修会	29.2.19	日本獣医生命科学大学
第3回総務会	29.3.3	第67回理事会の議題他
教育セミナーフォーラム2017(京都)	29.3.11	京都府立医科大学
第1回情報開示委員会	29.3.14	情報公開状況の確認他
第67回理事会	29.3.14	平成29年度事業計画及び予算他
第2回実験動物利用計画審査委員会	29.3.22	自己点検・評価他
第4回実験動物福祉調査・評価委員会	29.3.22	福祉調査・評価、認証のまとめ他
第4回情報委員会	29.3.31	「LABIO21」No.69の企画

2. 行事予定

行事	開催日	備考
監事会	29.5.15	平成28年度事業、収支決算の監査
第68回理事会	29.5.29	平成28年度事業報告他
第33回定時総会	29.6.13	平成28年度収支決算、事業報告他
「日常の管理」研修会	29.6.24	日本獣医生命科学大学
技術指導員の面接審査	29.6.27	5月に募集開始
微生物モニタリング技術研修会	29.7.7～8	実験動物中央研究所
実験動物2級技術者学科試験	29.8.20	全国の各所
通信教育スクーリング(東京、京都)	29.8.26～27	日本獣医生命科学大学、京都府立医科大学
実験動物基本実技研修会(2級及び1級水準)*	29.8.26～27	日本獣医生命科学大学
実験動物高度技術者研修会(白河研修会)	29.9.11～15	(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	29.9.16	白河、東京、大阪 他
サル類実技研修会	29.10.28	日本獣医生命科学大学
ウサギ及びブタ実技研修会	29.10.28～29	日本獣医生命科学大学
実験動物2級技術者実技試験	29.11.25	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	29.11.26	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2018(東京)	30.3.3	東京大学弥生講堂
技術指導員研修会	30.3.4	日本獣医生命科学大学
教育セミナーフォーラム2018(京都)	30.3.10	京都府立医科大学

*:平成29年度より、2級水準の実験動物基本実技研修会を、東京会場のスクーリングとあわせて開催する予定です。(行事によっては開催日等が変更になる場合もありますのでご注意ください。)

3. 関連団体行事

◆ 第64回日本実験動物学会総会

日 時：平成29年5月25日（木）～27日（土）
場 所：ビックパレットふくしま（福島県郡山市）
大会長：大和田一雄（一般財団法人ふくしま医療機器産業推進機構）
詳 細：<http://sympo.adthree.net/jalas64/>

◆ 第44回日本毒性学会学術年会

日 時：平成29年7月10日（月）～12日（水）
場 所：パシフィコ横浜 会議センター
年会長：熊谷嘉人（筑波大学医学医療系 環境生物学分野）
詳 細：<http://jsot2017.jp/index.html>

◆ 第160回日本獣医学会学術集会

日 時：平成29年9月13日（水）～15日（金）
場 所：鹿児島大学
会 長：高瀬公三（鹿児島大学 共同獣医学）
詳 細：<http://www.meeting-jsvs.jp/160/>

◆ 第51回日本実験動物技術者協会総会

日 時：平成29年10月12日（木）～14日（土）
場 所：山形テルサ（山形県山形市）
大会長：伊藤恒賢
詳 細：<https://www.adthree.com/jaeat2017/>

4. 海外行事

◆ 第68回 AALAS National Meeting

日 時：2017年10月15日～19日
場 所：Austin, TX, US



2016年もいろいろなニュースが世界を飛び交った。中でもBrexitとアメリカ大統領選挙は特筆すべきだ。トランプ大統領の放った大統領令が世界中に混乱を招いている。何週間前のTime誌の表紙にはトランプ氏の写真にThe President of the Divided Statesとの説明があった。彼の大統領就任後いち早く公式会談に臨んだ英国のメイ首相は移民政策に対して何も意見しなかったそうだ。我が国の首相も知らん顔だとのこと。従来アメリカであればこのような大統領の君臨する国にはCIAの工作員を派遣し政権の転覆をはかっていただろうに。この拙文が印刷される頃に世界がどのようになっているか甚だ不安である。地球温暖化の影響で前代未聞の暴風雨が世界を引っ掻き回すようになってきている。真剣に取り組めば今からでも温暖化の影響を極力抑え込むことは可能だそうだ。しかし、科学を信じない、ポストトゥルースやオルタナティブファクトがまかり通る世界になってしまえば、地球を健全な状態に戻すのはほとんど不可能になってしまうだろう。唯一救いがあるとなればアメリカにはこういった難局を切り抜けられる多様性があることだろう。その多様性は移民によって支えられてきた。トランプ政策によって多様性が絶滅させられることのないよう、現存する多様性がなるべく早期に解決への道筋を見出してくれることを切望する。昨年のノーベル文学賞はびっくりぼんのボブディランだった。彼の名曲「風に吹かれて」を口ずさみながら粗暴な嵐が行き過ぎるのを待つことにしよう。

昨年末情報委員会委員の川本英一先生が急逝されました。心よりご冥福をお祈りいたします。

〔山田 章雄〕

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
〃	木藤 実	MINORU KITO
〃	久原 孝俊	TAKATOSHI KUHARA
〃	三枝 順三	JUNZO SAEGUSA
〃	新関 治男	HARUO NIIZEKI
〃	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



REGISTERED ORGANIZATION
No. 2827-ISO 9001



MS
JAB
CM002



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

～Every Step of the Way.～

皆様の医薬品研究開発のあらゆる場面で
われわれCharles Riverは貢献してまいります



プロダクトおよびサービス

遺伝子改変動物の作製

実験用動物

手術・処置動物の作製

受託飼育・繁殖サービス

受託微生物モニタリング

受託試験サービス (国内外)

バイオ医薬品サービス

生体試料

動物実験関連器材

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