

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】

「コモンマーモセットの感染症(Ⅲ)」

「人獣共通感染症研究 — ワンヘルスの取り組みと動物実験の役割 — (Ⅰ)」

【研究最前線】

「ヒト—動物キメラの可能性と重要性」

「食物アレルギー病態モデルマウスを用いた葛根湯併用経口免疫療法」

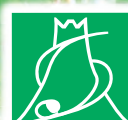


**Supporting Your Dream Of Innovation
For Life Science**

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。

エアアイ・イラスト・コンプ社 代表

巻頭言

日動協による実験動物福祉事業の過去・現在・未来 (佐藤 浩) ————— 4

特集 コモンマーモセットの感染症 (Ⅲ)

マーモセットの下痢症と消化管内微生物 (井上 貴史) ————— 5

特集 人獣共通感染症研究 — ワンヘルスの取り組みと動物実験の役割 — (I)

ワンヘルスの概要 (山田 章雄) ————— 9

研究最前線

ヒト-動物キメラの可能性と重要性 (正木 英樹、中内 啓光) ————— 13

食物アレルギー病態モデルマウスを用いて新たに見出した葛根湯併用経口免疫療法の根本的治療法としての提案 (山本 武) ————— 17

海外文献情報

遺伝的浮動 (genetic drift) と動物実験の再現性 (久原 孝俊) ————— 21

トピックス

実験動物マウスリソース事業の進捗 (吉木 淳) ————— 24

海外散歩

スペイン カタルーニャ訪問記 (山田 章雄) ————— 28

私の研究

薬物依存になりやすいマウス (新田 淳美) ————— 33

ラボテック

実験動物用X線CT ラシータ LCT-200のご紹介 (木村 真輔) ————— 36

読者との対話 LA-house

————— 39

ほんのひとりごと

————— 40

活動紹介

東北動物実験研究会 (三好 一郎) ————— 41

岡山実験動物研究会 (国枝 哲夫) ————— 42

日本実験動物学会の動き

————— 43

日本実験動物技術者協会の動き

————— 43

平成30年度認定実験動物技術指導員及び準指導員

————— 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

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

日動協による実験動物福祉事業の 過去・現在・未来

前自然科学研究機構生理学研究所 特任教授
長崎大学 名誉教授 佐藤 浩

公益社団法人である日動協傘下の実験動物生産施設等においては動物愛護管理法を根拠に定められた「飼養保管基準」の核心、すなわち「動物福祉」という理念に基づいた実験動物生産が問われ、一方、受託試験施設等での動物実験の実施は主として動物愛護管理法による3Rsや3省の動物実験基本指針に則しての倫理性が問われる。日動協では定款に「実験動物の福祉に関連するガイドラインの作成及び相談・助言、評価・認証」が定められ、先駆的な実験動物福祉事業がこれまで展開、続行されてきている。わが国の実験動物福祉の今後の発展を考える意味で本事業の変遷をたどることは重要であることから、過去・現在を概説し、さらにこの福祉事業を今後より充実、確固とするための方策等について私見を述べる。

日動協による生産施設等における実験動物福祉に関する調査・認証事業は、昭和55年(1980)制定の「実験動物の飼養及び保管等に関する基準(旧基準)」と平成18年(2006)の改正基準、平成25年(2013)の最終改正基準(5 Freedomsと自己点検・情報公開・外部検証の追加)に沿って、実験動物の飼育管理等が福祉の観点から適切に実施されているかを調査・認証されるものであり、①平成11年、14年に実験動物福祉実態アンケートを実施したこと。その調査

結果を踏まえて、②模擬調査(第1期福祉調査)が日本学術会議による「動物実験に対する社会的理解を促進するために(提言)」に先立つ形で平成16年(2004)に行われたこと。③平成20年(2008)からは第2期福祉調査へと衣替えされ5年間実施されたこと。④9年間の調査実績(指導・助言)ステップを経て、本調査制度の問題点の把握や課題の洗い出しを図るとともに実験動物福祉に対する意識向上と理解の促進、また自主管理のさらなる推進と網羅性を高める等の目的で、平成25年度(2013)より「福祉認証制度」事業が展開され始め現在に至っているものであり、15年間の実績がある。

キックオフともいえる模擬調査(第1期福祉調査)が書面調査(5項目:16設問)と訪問調査(面談)でスタートして以来、現在進行中の福祉認証制度では調査員3名による書面調査と概ね8時間の訪問調査(2日間:いわゆるラボツアーを含む)を行うもので、福祉調査・評価の対象は最終改正基準の告示内容に則した11項目61設問と、受託試験施設用の動物実験基本指針に則した1項目14設問(計12項目75設問)からなる内容で益々充実されてきている。認証は評価基準により判定し、有効期限は3年間で現在もこのシステムを続行中である。

以上、日動協の調査・認証制度の

変遷を概説した。現在直面している課題とはいえないが、この福祉事業をより充実・発展させる方策について私見を述べる。①認証のための調査員の資格とその明文化:調査員に必要とされる資格や条件を明文化して透明性を高める必要がある。②認証機関の公正さの担保:ごく最近国家規格である「JIS」や国際規格である「ISO」での不正が報じられた。法律に基づく認証機関でも不正が起きうるとはいえ、将来的に日動協の認証制度も公正さを担保する意味で、例えば「日本適合性認定協会(JAB)」のような機関による認証を目指すのも一方策であろう。③環境エンリッチメントや5 Freedomsへのさらなる対応:生産(施設)現場において実現が困難あるいは効果に疑問という面もあるが、実験動物のウェルビーイング増進のためにさらに設問を吟味して配慮する必要がある。④外部検証や認証制度等外部評価の網羅性を高める方策:日動協に限らず経費や体制問題等のためにわが国の外部評価の網羅性の点でまだ問題があると考えられる。一つの取り組みとして最近「実験動物福祉コミュニケーション評議会(仮称)」の発足が報告された。日動協においても小規模施設等に対してのさらなる配慮が必要であろう。以上の方策の検討を提案したい。

特集

コモンマーモセットの感染症 (Ⅲ)



(公益財団法人 実験動物中央研究所 提供)

マーモセットの下痢症と 消化管内微生物

公益財団法人 実験動物中央研究所
井上 貴史

はじめに

コモンマーモセット（マーモセット）は小型で取り扱いやすく、繁殖効率が良いという特徴があり、近年ではトランスジェニックやゲノム編集による遺伝子改変技術の進展により、医学・生物学研究における霊長類モデル動物の一種として定着してきている^{1), 2), 3) 4)}。その一方で、ユーザーや研究領域の増加、多様化によって、マーモセットの飼育管理の課題が再認識されている。これまでの本特集「コモンマーモセットの感染症」(I)、(II)で述べられているように、マーモセットはBウイルスの自然宿主でないなどヒトへの人獣共通感染症のリスクは低いものの、飼育中に認められる疾病とこれに関連する病原微生物の対策が課題となっている^{5), 6)}。特集の第3回目となる今回は、マーモセットの飼育においてしばしば問題となる下痢症に関連する消化管内微生物について掘り下げることにし、実験動物中央研究所（実中研）のマーモセットコロニーにおける経験と調査をもとに解説する。

マーモセットの下痢症と消化管内微生物

マーモセットの飼育管理の現場において、下痢症はもっともよく観察される異常所見の一つである。マーモセットの下痢症にはさまざまな要因が考えられ、これらの要因が複合的に関与していることも推測される（図1）。単純な消化不良、身体的あるいは心理的なストレスによる自律神経の不調、wasting marmoset syndromeと呼ばれる原因不明の消耗性疾患に関連した慢性腸炎、腸内細菌叢のアンバランス（dysbiosis）などが下痢症の要因としてあげられるが、消化管内微生物による感染性腸炎は特に注意を要する。

実中研ではこれまでにマーモセットの消化管微生物の調査を実施しており、下痢症に関連する微生物として、腸トリコモナス *Pentatrichomonas hominis* や腸管病原性大腸菌 enteropathogenic *Escherichia coli* (EPEC)、クロストリジウム・ディフィシル *Clostridium difficile* が飼育コロニーに常在していることが認められて

マーモセットの下痢症

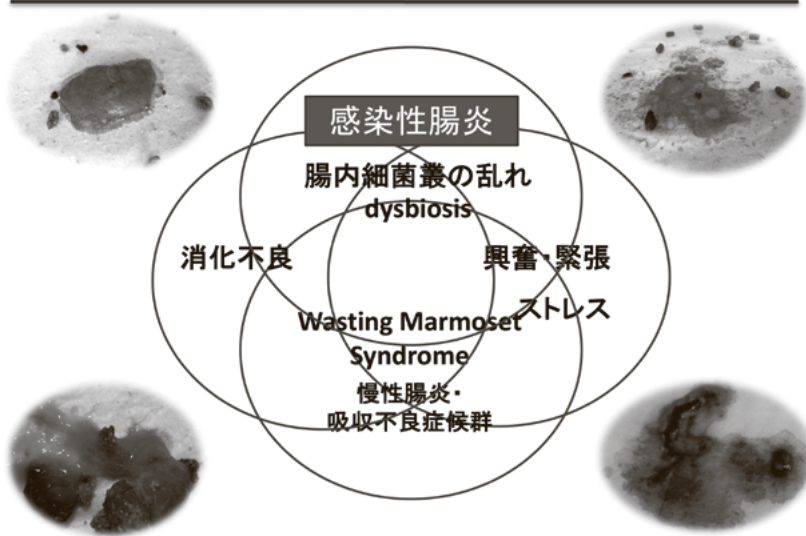


図1. マーモセットの下痢症の要因

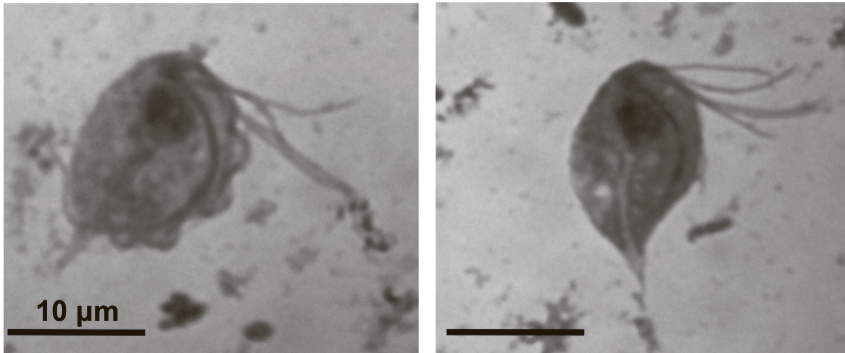


図2. マーモセットの糞便から検出されたトリコモナス (ギムザ染色) 前鞭毛が4~5本であり、属名のPentatrichomonasはpenta(5を意味する)に由来する。後鞭毛は波動膜を形成する。

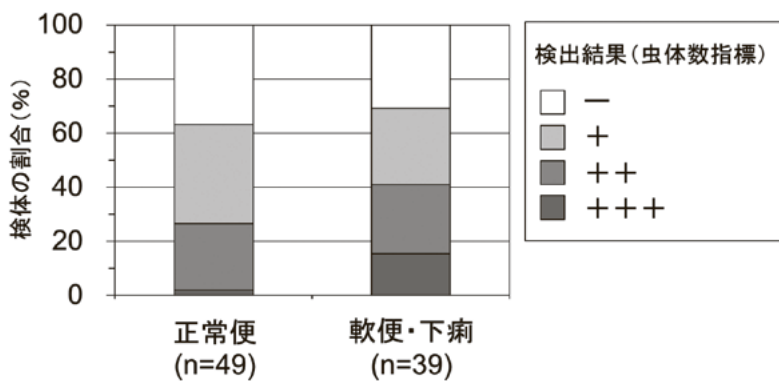


図3. 実中研におけるマーモセット糞便からのトリコモナス検出結果 検査は直接塗抹法により実施した。虫体数指標は、倍率200倍の鏡検で虫体数が多い1視野のカウントによる：+：<10, ++：10-100, +++：>100。

いる。このうち、腸トリコモナスとクロストリジウム・ディフィシルについて後述する。EPECについては次回特集を参照されたい。

腸トリコモナス

トリコモナス類は鞭毛虫類に属する原虫であり、ヒトや種々の動物の消化管や生殖器などに寄生する。マーモセットの大腸にもトリ

コモナスの寄生が認められ、糞便塗抹の鏡検にてしばしば木の葉様の形態で活発に動くトリコモナスが検出される。前回特集(Ⅱ)での報告のとおり、マーモセットの下痢便中に多数のトリコモナスが検出されることがあり、駆虫(投薬)により下痢症が改善されることがあることからトリコモナスが下痢症の一因として疑われている⁶⁾。

実中研における調査では、形態と遺伝子検査によりマーモセットから検出されるトリコモナスが *Pentatrichomonas hominis* (腸トリコモナス) であることを同定している⁷⁾ (図2)。*P. hominis*はヒト、サル類、イヌ、ネコ、ウシなど多種の哺乳類での寄生が認められており、ヒトでは非病原性と考えられている⁸⁾。トリコモナス類の中には、ヒトで膣炎の原因となる *Trichomonas vaginalis* (膣トリコモナス) やウシの流産やネコの下痢症の原因となる *Tritrichomonas suis* (= *T. foetus*, ウシ胎仔トリコモナス) などがあるが、*P. hominis*の病原性については幼犬の下痢症との関連が疑われる報告があるが明らかではない⁹⁾。実中研で実施した糞便の直接塗抹法によるスクリーニング調査の結果では、下痢便と正常便で陽性率に差は認められなかったことから、*P. hominis*がマーモセットにおいて強い病原性をもたないことが示唆されている。しかし、同調査では正常便と比較して下痢便中に認められるトリコモナスの虫体数は多い傾向であり、腸トリコモナスと下痢症との関連性は否定できない(図3)。そのため、下痢便中に多数のトリコモナスが検出された際にはメトロニダゾールなどの投薬により駆虫することが推奨される⁶⁾。加え

て、直接塗抹法の鏡検での形態による種鑑別は困難であり、マーモセットから*P. hominis*以外のトリコモナス類や鞭毛虫類が検出される可能性についても留意しておく必要がある⁵⁾。

また、調査ではマーモセットから検出された*P. hominis*とヒト、イヌ、ネコ、ウシ、ブタに由来する*P. hominis*との種内変異についてITS (internal transcribed spacer) 領域の塩基配列を用いて解析した⁷⁾。ITS領域はリボソームRNA 遺伝子間のスペーサー領域であり、変異性に富むために各種生物にて種内変異の解析に用いられる。実中研のマーモセット由来の*P. hominis*とGenBankに登録されている他の宿主由来の*P. hominis*とを比較したところ、塩基配列の変異は1%未満と少なく、マーモセット由来のものはヒト、ブタ、イヌ由来のものと完全に一致するという結果であった。このことから、マーモセットが保有する*P. hominis*はマーモセット固有の特別な株ではなく、他種の動物が保有するものと性状に差がない可能性が高いと考えられる。また、*P. hominis*は宿主特異性が低くなく、マーモセットと他の宿主との間で伝播している可能性が示唆される。

クロストリジウム・ディフィシル

クロストリジウム・ディフィシル *Clostridium difficile* は、ヒトを含む多種の哺乳類の腸管内や土壌などの環境中に棲息している偏性嫌気性の芽胞形成するグラム陽性桿菌である。*C. difficile* は健康なヒトでも定着が認められる一方で、抗菌薬投与による腸内細菌叢の攪乱などにより大腸内で異常増殖、毒

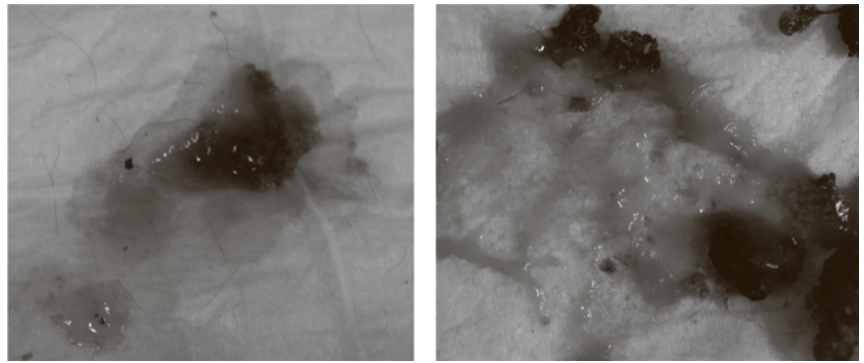


図4. *Clostridium difficile* 毒素が検出されたマーモセットの粘性下痢便

素産生し、下痢症や偽膜性大腸炎を引き起こすことが知られている。*C. difficile* はヒトにおいて抗菌薬関連下痢症の主要原因となっており、汎用される抗菌薬に耐性を示すことから院内感染症病原体として問題となっている。新世界ザルではワタボウシタマリンでの*C. difficile* に起因する偽膜性大腸炎による死亡例の報告があり¹⁰⁾、最近ではマーモセットにおいて*C. difficile* が下痢症や大腸炎の原因菌となることが明らかになってきている¹¹⁾。

実中研における調査では、マーモセットの糞便から毒素（トキシシン）を保有する *C. difficile* が分離されており、本細菌が下痢症や衰弱、致死的な偽膜性大腸炎 (*C. difficile* 腸炎) の要因となることを認めている。同調査では健康マーモセットにおいても糞便中に菌体抗原が検出されており、飼育コロニーに常在していることが考えられる。一方で、罹患個体と同一や隣ケージで飼育している個体がしばしば *C. difficile* 腸炎を発症することから水平感染の存在も示唆されている。

C. difficile 腸炎を疑う臨床徴候としては、急激

な体重減少や元気消失、下痢便（特に粘性のもの、図4）食欲不振、無便、これらの抗菌薬投与後の発症、などが挙げられる。飼育中のマーモセットにおいてこのような徴候が観察された際には検査による診断と治療が推奨される。診断には、イムノクロマト法による *C. difficile* 検査キット (*C. diff* Quik Chek コンプリート (Abbot) など) が有用である。これらの検査キットでは便を用いて迅速で簡便に *C. difficile* の毒素および抗原の検出が可能である (図5)。治療には *C. difficile* に感受性の抗菌薬であるメトロニダゾールまたはバンコマイシンの投与が有効である。実中研の処方例としては、ヒト用量を参考にメトロニダゾール 30 mg/kg/day またはバンコマイシン 50 mg/kg/day (日に2回に分けて投与) を 10 ~ 14日間としている。



図5. イムノクロマト法 *Clostridium difficile* 検査キット この検体では菌体抗原 (GDH) (Ag) および毒素 (Tox) が検出された。

経口投与が難しい場合にはメトロニダゾール注射薬（アネメトロ、ファイザー）を用いて皮下投与している。また、動物の状態に応じて流動食による栄養補助や皮下輸液による脱水改善を施す必要がある。C. difficile腸炎は上記の投薬により改善が認められるが、投薬終了後に再発することがあるため注意が必要である。再発性のC. difficile腸炎に対してはヒトにおいて有効性が認められている糞便移植療法がマーモセットでも試みられており、改善効果が報告されている¹¹⁾。

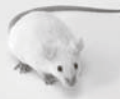
おわりに

マーモセットの下痢症の要因としては未だ不明な点があるものの、今回挙げたようないくつかの病原微生物の関与が明らかとなっ

ている。現状の対策としては、発症時の検査、治療が可能であるが、これらの微生物は糞便を介して伝播するものであることから、衛生管理の向上によってこれらの感染性腸炎の予防に努めることが第一である。

- 1) Sasaki E et al.(2009) Generation of transgenic non-human primates with germline transmission. Nature 459: 523-527.
- 2) Sato K et al.(2016) Generation of a nonhuman primate model of severe combined immunodeficiency using highly efficient genome editing. Cell Stem Cell 19(1):127-138.
- 3) 佐々木えりか (2009) 遺伝子改変霊長類作出, LABIO21,38:14-16.
- 4) 佐藤賢哉, 佐々木えりか (2017) 先天性免疫不全マーモセットの作出, LABIO21, 67:10-14.
- 5) 岡本宗裕 (2018) コモンマーモセットの感染症 (I) 総論, LABIO21, 72:6-8.
- 6) 片貝祐子 (2018) コモンマーモセットの感染症(II) 臨床現場の治療症例と感染症モデル, LABIO21,73:18-22.

- 7) Inoue et al.(2015) Pentatrichomonas hominis in laboratory-bred common marmosets. Exp Anim 64(4):363-368.
- 8) CDC, DPDx - Laboratory Identification of Parasites of Public Health Concern. <https://www.cdc.gov/dpdx/pentatrichomonas/index.html>
- 9) Gookin JL et al. (2005) Molecular characterization of trichomonads from feces of dogs with diarrhea. J parasitol 91(4):939-943.
- 10) Rolland RM et al.(1997) Five spontaneous deaths associated with Clostridium difficile in a colony of cotton-top tamarins (Saguinus oedipus). Lab Anim Sci 47(5):472-476.
- 11) Yamazaki Y et al.(2017) Faecal transplantation for the treatment of Clostridium difficile infection in a marmoset. BMC Vet Res 13(1):150.



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

「人獣共通感染症研究 —ワンヘルスの取り組みと 動物実験の役割—」(I)

ワンヘルスの概要

東京大学 名誉教授 山田 章雄

はじめに

近年、我が国においてもワンヘルス (One Health) という言葉が定着してきたように思われるが、ワンヘルスという概念がなぜ必要なのかという点については、必ずしも共通の理解が醸成されているとは言いがたいのではないだろうか。ワンヘルスという概念は概念にとどめるだけでは全く意味がなく、その概念の求めるところを実践して初めてその意義が見いだされる。本稿ではワンヘルスがなぜ必要で、その実践により何がもたらされるかについて考えてみたい。

ワンヘルスとは

ワンヘルスの基本につながる考え方は古く、Rudolf Virchow が「ヒトと動物の健康は密接に関連している。医学と獣医学の間には境界はないし、またあってあってはならない」と述べていたことはあまりにも有名である。しかし医学獣医学の進歩ならびに細分化と相俟って両者の関連性は薄れてゆく。その状況

を憂慮した獣疫学の父といわれる Calvin Schwabe は One Medicine という言葉をもって両者の連携の重要性を説いた。医療と獣医療が個々に進展するのとは対照的に、動物に関連するヒトの健康危害を最小限にすることを目的とする獣医公衆衛生はヒトの公衆衛生の一部を担い、特に食品衛生や人獣共通感染症対策などの分野における重要な役割を演じてきた。

しかし世界的な人口増加、経済のグローバル化、農業の高度化、気候変動などは、生態系の著しい変化をもたらし、また未開の地への人間の流入を加速させた。こういった背景は、野生動物が保有する感染症の病原体が、家畜やヒトへスピルオーバーすることを加速し、これまでに類を見ない新興感染症の発生を人類に経験させつつある。特に高病原性鳥インフルエンザウイルスが次のパンデミックを引き起こす可能性が論じられたことにより、ヒト、動物、環境の3極が密接に関連する境界域で

発生する新興感染症の制御には、これら3極を包含する視点からの対策が不可欠であることの認識が深まったのである。即ち、ヒトの健康、動物の健康、健全な環境は、相互依存の関係にあり、それぞれの健康あるいは健全性が保証されて初めて確保できるのである。そのためにはこれらの3分野における密接な連携が極めて重要であるとする考え方が、ワンヘルスである。

人獣共通感染症制御とワンヘルス

既に述べたように新興感染症への対応としてのワンヘルス概念の重要性が再認識されるようになったわけだが、新興感染症は生態系ニッチに潜んでいた病原体が、何らかの原因で野生動物から家畜あるいはヒトへスピルオーバーすることによって生じると考えられている。2002年から2003年にかけて発生した重症急性呼吸器症候群 (SARS) や2009年のパンデミックインフルエンザ、さらには2014年の西アフリカにおけるエボラウイルス病など、メディアでセンセ

特集「人獣共通感染症研究—ワンヘルスの取り組みと動物実験の役割—」は、日本実験動物学会 第7回実験動物科学シンポジウム「人獣共通感染症研究—ワンヘルスの取り組みと動物実験の役割—」(企画: 山田靖子先生 (東京大学)、有川二郎先生 (北海道大学)) で取り上げられた講演内容を、企画された先生方の了解を得て各演者の先生方にご執筆いただき、4回に分けて掲載する予定です。

ーショナルに報じられる傾向があることから、新興感染症に対する関心はそれなりに高い。一方、世界各地には特定の地域で限定的に流行しているいわゆるエンデミックな感染症が存在する。中でも顧みられない熱帯病と称される感染症のうちでも顧みられない人獣共通感染症は対策が後手に回ることもあり、低開発諸国の貧困層にとって極めて重大な問題となっている。世界的に見てこれらの人獣共通感染症は毎年25億人に健康被害をもたらす、270万人の命を奪っているとされる。しかしながら、被害者の多くが低開発諸国の貧困層であるという理由から、メディアをはじめとした注目度があまり高くなく、対策が遅れがちである。実際には2014年のエボラウイルス病では11,316人の死亡と22億ドルに及ぶ経済損失があったとされるが、エンデミックな人獣共通感染症の代表ともいえる狂犬病では、毎年59,000人の命と86億ドルが失われている。この事実は顧みられない人獣共通感染症対策がいかに重要であるかを物語っているわけだが、この対策にもワンヘルス概念の導入は極めて重要であるといえる。

LABIO 57号掲載の拙著でも触れたが、ワンヘルス概念はかなり拡大解釈され、比較医学やトランスレーショナル医学の分野にまで及ぶようになった。しかし、拡大は実は分断にもつながる。再び原点に立ち返り、人獣共通感染症の制御を実現するための有効な手段として、ワンヘルス概念の実践について改めて考える必要があると思われる。新興感染症であれ、

顧みられない感染症であれ、人獣共通感染症はヒト、動物、環境の狭間で生じてくる。人獣共通感染症対策として重要なことは、「リアクティブ」から「プロアクティブ」な対応にシフトすることである。即ち人獣共通感染症の発生を予見し、早期に検出し、迅速な封じ込めを行うことである。この対応スキームがきちんと働けば、人獣共通感染症のもたらす影響を激減させることが可能になる(図)。要するにワンヘルスとはヒト、動物、環境の3極の交わる部分における公衆衛生基盤の強化に他ならない。そしてワンヘルスの実践とは、公衆衛生基盤を盤石にするため、知識や資材の共有、訓練や教育などにおける協同を通じて、無用な重複を排除し、行動の迅速化、効率化を図ることであると考えられる。さらに重要なことは特定の疾患を対象にするのではなく(vertical approach)、総合的な取り組み(horizontal)にシフトしていくことである。

ワンヘルスの実践で期待されること

世界銀行が最近公開した文書によれば、中低所得の139か国における公衆衛生並びに家畜衛生基盤強化には年間19億から34億ドルが必要だが、それだけの投資をしても結果として100年に一度程度と予測されるパンデミックが阻止できれば年間300億ドルの出費を避けることができる。世界中でワンヘルスの実践によりその克服を目指している薬剤耐性菌(AMR)問題においても、2030年までに1000億ドルを投じて、抗菌薬の全

ての分野における慎重使用を実現させることにより、2200億から7000億ドルの損失を避けることができるとしている。国際的取り組みだけでなく、地域レベル、国家レベル、さらには国内の様々なレベルでワンヘルスが実践されることによる恩恵は計り知れない。繰り返しになるがワンヘルスの実践とは、グローバルな公衆衛生基盤の強化である。国連の推進する持続可能な開発目標(SDGs)の実現にも欠かすことのできない活動である。特に目標3に謳われている「すべての国々、特に開発途上国の国家・世界規模な健康リスクの早期警告、リスク緩和およびリスク管理のための能力を強化する」ことはまさしくワンヘルスの実践なのである。

ワンヘルスをめぐる国内外の動き

ワンヘルス理念の国際的共有のため、様々な国際会議が継続的に開催されている。主なものとしては、この6月に第5回が開催された国際ワンヘルス会議(International One Health Congress)が挙げられる。世界保健機関(WHO)、国際獣疫事務局(OIE)、国連食糧農業機関(FAO)は、それぞれが共同してワンヘルス実践に必要な多くの技術的な支援を、様々なガイドラインやワークショップを通じて加盟国に提供している。世界銀行(World Bank)、アジア太平洋経済協力会議(APEC)などの機関・団体もワンヘルスに強い関心を寄せている。アメリカ疾病制御センター(CDC)は人獣共通感染症・新興感染症センターにワンヘルス事務

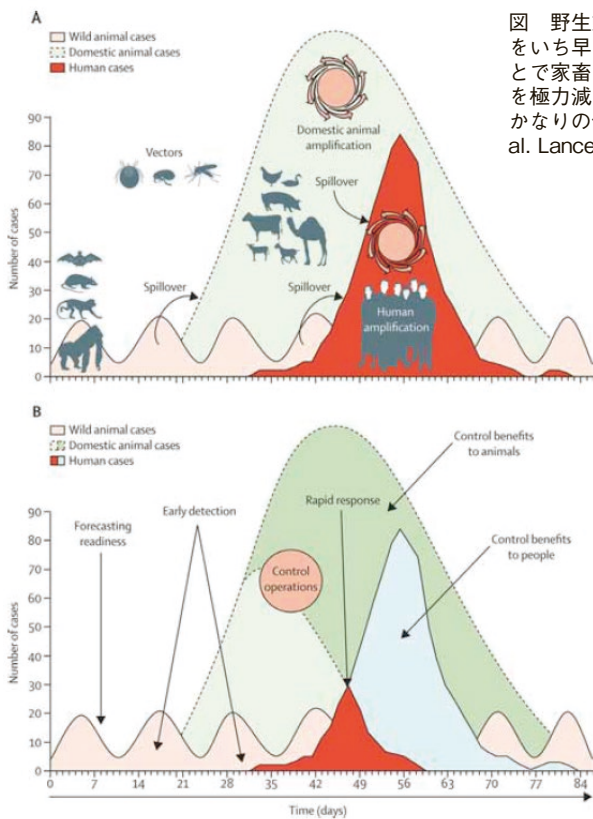


図 野生動物における感染症の発生をいち早く検出し、早期対応することで家畜やヒトへのスピルオーバーを極力減らすことができ、その結果かなりの便益が期待できる Karesh et al. Lancet 380, 1936-1945, 2012

例があるようには思えない。大学の取り組みも北大、東大にワンヘルスを標榜する部局がみられるが、後者での取り組みは全く不明であるし、他大学の取り組みも不明である。特に感染症対策は疾患特異的な対応に終始し、全体としてのワンヘルス実践の方向性が定まっていない。

実験動物学とワンヘルス

実験動物学分野でもワンヘルスに関する関心は高まりつつあり、2010年のILAR Journalではワンヘルスの特集が組まれた。その中で、ワンヘルスがヒト、動物、環境の狭間で生じる感染症制御に欠かすことのできない枠組みであるということから、野生動物を対象とする研究の増加が予想され、動物実験委員会 (IACUC) の役割についても変化が予想されることが指摘されている。すなわち、野生動物を用いた研究および動物実験も他の動物実験と同様、IACUCによる審査を受ける必要があるというものである。例えば機関内の実験施設に野生動物を導入して実験を行う場合、その動物特有の飼養環境、飼養方法等について、委員会は適正であるかの判断を迫られることになる。また当該実験に供する野生動物を捕獲する際の麻酔等の方法、その個体が棲息地から除去されたときの生態系に及ぼす影響評価等も、委員会で事前に検討する必要がある。また野生動物の棲息地で、単純な観察を含む様々な研究が実施されると予想されるが、個々の研究が生態系に及ぼす影響等の評価も委員会に委ねられることになるかも

局を設置し、国内外のワンヘルスに関する活動の推進及び支援を実施している。また米国ではワンヘルスコミッション、ワンヘルスイニシアティブ、ワンヘルスプラットフォームなどといった団体が精力的に活動し、ワンヘルス理念の普及に努めている。上記3団体の提唱で毎年11月3日を世界ワンヘルスデーとし、各地で様々な啓発活動が行われる。また、ワンヘルス教育も今後を担う人材の確保という点で極めて重要だが、米国の多くの大学にはワンヘルス教育のプログラムが用意されている。また公衆衛生大学院の認証評価にワンヘルスへの取り組みが求められるようになってきている。東南アジアでは東南アジアワンヘルス大学ネットワーク (SEAOHUN) が立ち上げられ、インドネシア、マレーシア、タイ、ベトナムの10大学並びに米国の2大学が参加している。さらに米国ではワンヘル

サククトが議会に提出され、現在審議中である。

翻って、わが国ではAMR問題への取り組みにはワンヘルスアプローチが極めて重要であるという認識が共有されつつはあるものの、ワンヘルス理念に対するそもそもの理解が深まっているかという点、甚だ心もとない点があるように思われる。特に医師のワンヘルスに対する理解が進んでいないことは感染研の堀田らのアンケート調査結果に如実に表れている。リアクティブからプロアクティブへ、バーティカルからホリゾンタルへ、理念から実践へとといった実際の取り組みは進んでいるようには見えない。確かに国の省庁間あるいは地方自治体の部局間での連携はこれまでよりは進んでいるのかもしれないが、共同シンポジウムの開催、他部局会議へのオブザーバー参加等の域を超えるような、再編あるいは予算措置等の事

しれない。適切な機関外アドバイザーの助言を得るなど、これまでとは違った取り組みが求められてくる。

おわりに

日本は先進諸国の中でも人獣共通感染症の発生は少なく、多くのエンデミックな人獣共通感染症は先人の努力を通じて制御されている。近年のグローバル化によって、人獣共通感染症あるいは家畜の感染症の海外からの侵入を許すことがあるが、関係者の努力で早期に封じ込めることができている。特に高病原性鳥インフルエンザの発生時には、家畜衛生部門と公衆衛生部門の連携で動物における発生の制御はもちろん、ヒトへの感染防止が徹底された。我が国におけるワンヘルスの成功例かもしれない。

い。現在の日本の状況からは、途上国等で必要とされるワンヘルスの枠組みは、取り立てて重要でないのかもしれない。しかし、東南アジアを含むアジア地域は、中小家畜に依存する貧困なポピュレーションを多く抱えていること、生物多様性が高く新興感染症発生のホットスポットであることを考えれば、この地域でのワンヘルス実践は待ったなしである。この地域での感染症制御に貢献することは、日本における人間の安全保障にとっても極めて重要である。科学的あるいは資金的、人的支援を実施していくにあたっては、当事国における状況把握は絶対的に必要である。そのためにも国内での必要性が仮に低くても、ワンヘルス理念の正しい理解とその実践を深めていくことは極めて有意義で

あると思われる。

参考文献

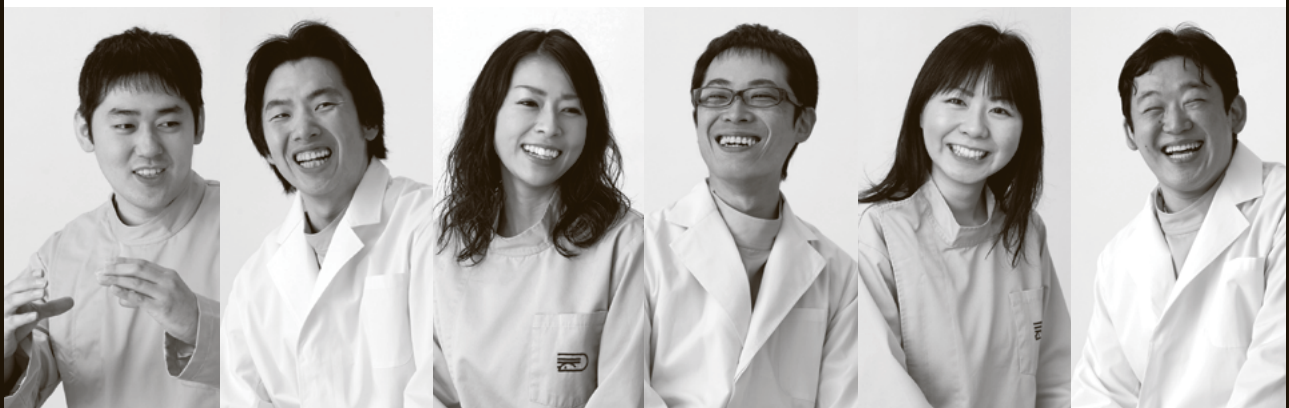
山田章雄 (2014) : 公衆衛生・動物実験・One Health LABIO21, 57, 20-23
 World Bank (2018): Operational Framework for Strengthening Human, Animal, and Environmental Public Health Systems at their Interface.
 Monath, TP, Kahn, LH, and Kaplan, B (2010): Introduction: One Health Perspective. ILAR J. 58, 193-198
 堀田明豊, 棚林 清, 山田章雄 (2015) : 日本の医師と獣医師における One Health に関するアンケート調査、感染症誌 89: 606~608
 Ralph B. Dell (2010): Animal Studies and One Health: IACUC Considerations. ILAR J. 58, 288-290
 Robert S. Sikes John A. Bryan, II (2016): Institutional Animal Care and Use Committee Considerations for the Use of Wildlife in Research and Education. ILAR J. 56, 335-341.
 Yamada A, Kahn LH, Kaplan B, Monath TP, Woodall J, and Conti L (Eds) (2014): Confronting Emerging Zoonoses: The One Health Paradigm. Springer Japan.

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

ヒト-動物キメラの可能性と重要性

正木 英樹 a、中内 啓光 a,b

a. 東京大学 医科学研究所 幹細胞治療部門

b. Department of Genetics, Institute for Stem Cell Biology and Regenerative Medicine, Stanford University School of Medicine

1. はじめに

ヒトiPS細胞の発見によって再び注目の高まった再生医療であるが、これまでに投じられてきた費用に見合った成果が得られたとは言い難い状況である。現在行われている再生医療に関わる研究のほとんどは、培養下で作製された細胞による細胞治療であるが、これらには幾つかの共通した問題点がある。ひとつには、移植に用いる細胞の機能不足である。ES/iPS細胞(=多能性幹細胞)または成体幹細胞から培養下で分化誘導した細胞のほとんどが胎児型の形質を示し、治療効果が得られるほどの機能性を有さない、といった事例はその代表である。また、費用対効果の問題もある。現状では培養下で機能細胞まで終末分化させるコストは非常に高く、仮に治療効果が充分ある場合であっても、移植細胞に寿命がある場合に定期的に移植を行うのは非現実的である。再生医療が他の治療法と比較しても第一の選択肢となるには、これらの問題が解決されなくてはならない。

解決策として、これまで我々は動物生体環境の利用を提案してきた。例えば、培養下で作製

したヒト肝細胞は生体の肝細胞に比べて著しく低い機能性しか有さないが、マウス肝臓に移植することで成熟し、生体の肝細胞と同等の機能を獲得できることが知られている¹。このことは、培養下で作製した細胞の機能性評価を生体環境に移植したのちに行うことの重要性をも示している。また、ヒト多能性幹細胞から培養下で造血幹細胞を分化誘導することは未だ困難であるが、我々は動物体内で分化誘導すると外来性遺伝子発現なしでも機能的な造血幹細胞を誘導できることを報告している²。更には、臓器欠損動物胚に多能性幹細胞を移植したのちに個体まで発生させることにより、標的臓器/組織が移植細胞のみによって構成され^{3,4}、移植に用いた際には充分な治療効果を有することを報告している⁵。また、臓器や器官の前駆細胞を動物体内に移植することで臓器・組織を作製するといったアプローチも行われている⁶。これらの事例は、幹細胞または幹細胞由来細胞と動物生体環境を組み合わせることで、低コストに機能性の高い細胞が得られるのみならず、培養下では作製できない臓器・器官・

組織が得られることを示している。本稿では我々の臓器作製研究を例に基礎研究や再生医療におけるヒト-動物キメラの可能性と重要性をお伝えし、今後解禁が予定される当該研究分野への多くの方の参加を促したい。

2. 胚盤胞補完によるヒト臓器作製の可能性と課題

我々が取り組んでいる“胚盤胞補完”は、遺伝子改変により特定の臓器を形成できなくした動物着床前胚に多能性幹細胞を移植することで、形成される標的臓器が100%移植細胞由来になるというものである(図1)。これまでに膵臓³、腎臓⁴、肝臓等の臓器作製に取り組み、いずれも移植細胞から作製できたことから、論理的にはどの臓器にも適用できると考えている。厳密にはドナー細胞で置換した標的臓器にはホスト動物の血管網や血球細胞、神経細胞等が含まれるが、血管内皮細胞をドナー細胞由来に置換できることも確認しており⁷、遺伝子改変を組み合わせることで臓器に含まれるすべての組織をドナー細胞由来にすることは可能であると考えている。本法により膵臓欠損ラッ

ト体内に作製されたマウス膵臓から膵島を単離し糖尿病モデルマウスの腎被膜下に移植したところ、血糖値をほぼ一生涯に渡って正常化することができた(図2)。ブタ胚においても同法による膵臓作製は成功していることから⁸、齧歯類以外の動物においても胚盤胞補完による臓器作製は成立すると考えられる。

本法によるヒト臓器作製の実現化に向けた最大の技術的課題は、着床前段階の動物胚との間に高効率にキメラ形成できるヒト細胞が確認されていないことである。ヒトに限らず、齧歯類以外の動物種の多能性幹細胞からは、マウス/ラット多能性幹細胞由来キメラのような高度なキメラ個体が未だ得られていない。このような差異は、マウス/ラット多能性幹細胞と非齧歯類動物多能性幹細胞とが反映する発生段階の差に起因すると考えられている(図3)。つまり、マウス/ラット多能性幹細胞が着床前のエピプラストに相当する発

生段階にあるのに対し、非齧歯類動物多能性幹細胞は着床後のエピプラストに相当する発生段階にあるために着床前胚との間にキメラを形成できないということである。現に、マウスの着床後段階多能性幹細胞であるエピプラスト幹細胞(EpiSC)を着床後胚のエピプラストに移植した場合はキメラが形成されることが知られている⁹。このような背景もあり、着床前段階(=ナイーブ型)ヒト多能性幹細胞の開発が非常にホットな研究領域となっている。例えば、サルナイーブ型ES細胞をサル胚盤胞に移植しキメラ個体を得たとの報告がある¹⁰。また、ヒトナイーブ型多能性幹細胞株をマウスあるいはブタ着床前胚に移植し、キメラ胎仔を得たことも報告されている^{11,12}。一方で、サル胚の内部細胞塊をサル胚盤胞に移植した同種間キメラ形成実験において、キメラではなく双子が誕生することも報告されている¹³。このように相反する報告が存在する状況下では、自分の手で検証することが重要である。ただし、日本国内では特定胚指針により、

ヒト細胞を移植した動物胚(=動物性集合胚)を子宮内で発生させることは禁じられている。現在同指針の見直しが検討されているところであるが、現行の指針下で既報のヒトナイーブ型多能性幹細胞のキメラ形成能を検証するため、我々は動物性集合胚を培養下で発生させて評価を行った。その結果、着床後も胚内で生存できたヒトナイーブ型多能性幹細胞は存在したものの、予定胚体外領域に分布していたことから、キメラ形成能を有するとは判定できなかった¹⁴。しかし、培養下での評価はあくまで参考にしかならないため、動物性集合胚の子宮内発生の解禁が待たれる。

一方で、我々は着床後段階にある多能性幹細胞を用いてキメラ個体を作製するアプローチも検証してきた。マウスEpiSCを着床前胚に移植すると24時間以内にアポトーシスを起こしていたことから、EpiSCに抗アポトーシス因子であるBCL2を強制発現させたところ、24時間以降も生存させることができた¹⁵。この胚を子宮内で発生させたところ、

臓器欠損動物の体内で、患者さんの細胞から拒絶反応の起こらない臓器をつくる

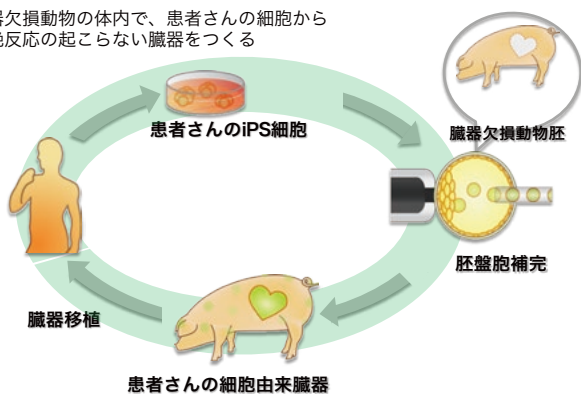


図1. 胚盤胞補完法

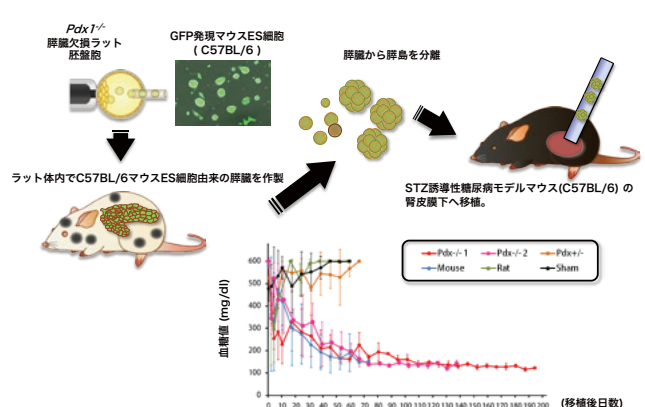


図2. ラット体内で作製したマウス膵臓を用いた糖尿病モデルマウスの治療

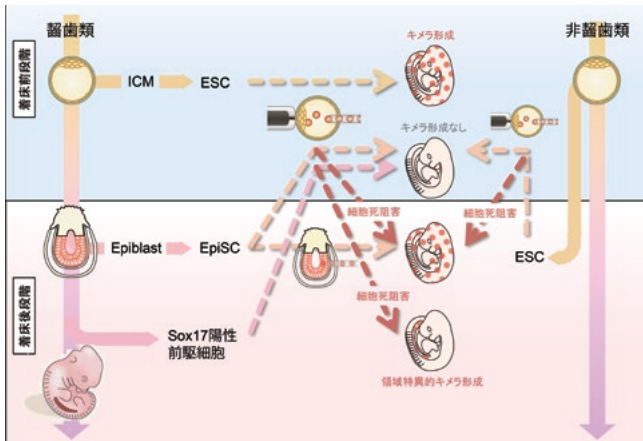


図3. 啮歯類と非啮歯類の多能性幹細胞の違い

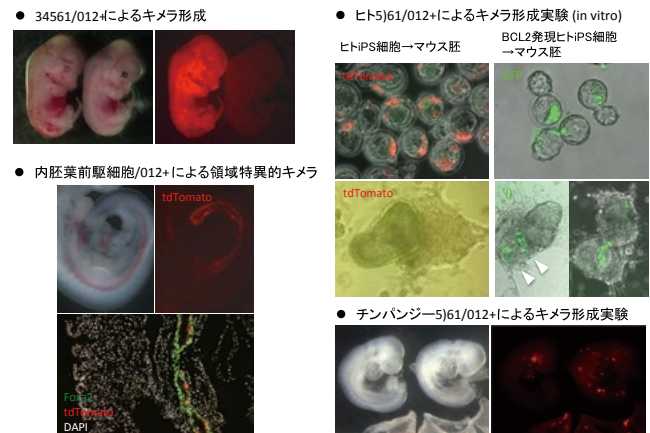


図4. 細胞死阻害によるキメラ形成促進

EpiSC由来キメラ個体が得られた (図4左上)。多能性幹細胞より更に発生段階の進んだ内胚葉系前駆細胞を着床前胚に移植した場合は、BCL2を発現させた群において移植細胞の発生運命に従った腸管特異的キメラが得られた (図4左下)。このことから、移植細胞が着床前段階の発生段階になくとも、アポトーシスを阻害してやればキメラ形成させられることが示唆された。そこで、現行型のヒトiPS細胞にBCL2を強制発現させてマウス胚に移植し、培養下で発生させたところ、移植細胞は着床後も生存していた (図4右上)。しかし、ナイーブ型多能性幹細胞を移植した場合と同様、こちらも移植細胞は予定胚体外領域に分布しており、将来的に胚体がキメラになるかは不明であった。

そこで、ヒトiPS細胞の代替としてチンパンジーiPS細胞を用い、BCL2を強制発現させた株をマウス胚に移植し、子宮内で発生させた (図4右下)。結果、チンパンジーiPS細胞由来細胞は胎仔に寄与しており、ヒトiPS細胞からも同様の方法でキメラ胎仔が得られると予想される。実際に、最近になって中国のグループから、BCL2を強制発現させたヒトES細胞はマウス胚との間にキメラ胎仔を形成することが報告されている¹⁶。ただし、いずれのケースでも、マウス-ラット異種間キメラと比較するとドナー細胞の寄与率が著しく低い。臓器補完を現実的な頻度で成功させるには、ドナー細胞の寄与率を向上させるための何らかの工夫が必要になるだろう。

3. 生命倫理面の懸念と法規制

ヒト細胞を有するキメラ動物には生命倫理上の懸念があり、観点から慎重な取り扱いが必要である。International Society for Stem Cell Researchの提言するガイドラインおよび幹細胞研究の盛んな主要国の規制状況をまとめた (表1)。いずれの国と比較しても現在の日本の規制は非常に厳しく、現在検討されている改定案では英国と同様となる。現在ヒト-動物キメラの作製では米国と中国の研究グループが先行しており、この分野の発展性を考えると、早期の指針改定を望みたい。ヒト-動物キメラにおいて特に懸念されているのは、ヒト配偶子を動物体内で形成してしまう可能性と、ヒト脳のような高次機能を有する動物を形成してしまう可能性で

表1. ヒト-動物キメラ研究の規制状況

	日本 (現行法)	日本 (改正案)	英国	米国	中国	ISSCRガイドライン
霊長類を除く動物胚への移植	培養下で原始線条が現れるまで、または14日間	制限なし (ただし出生した交配の交配は禁止)	制限なし (ただし出生した交配の交配は禁止)	制限なし (ただし出生した交配の交配は禁止)	制限なし	制限なし (ただし出生した交配の交配は禁止)
霊長類胚への移植	培養下で原始線条が現れるまで、または14日間	制限なし (ただし出生した交配の交配は禁止)	制限なし (ただし出生した交配の交配は禁止)	禁止	制限なし	制限なし (ただし出生した交配の交配は禁止)
ヒト胚への移植	禁止	禁止	禁止	禁止	制限なし	禁止

ある。前述のように、既報のどのヒト幹細胞株であっても、ヒト-動物キメラへの寄与率は著しく低い。それでも、動物性集合胚の子宮内発生が解禁された場合には、胎仔期における生殖細胞・大脳皮質への移植細胞の寄与率を複数の発生段階で確認し、キメラ動物の出生まで慎重に進めていくことが必要であろう。仮に生殖細胞あるいは大脳皮質への寄与が高かった場合は分化能を制限した多能性幹細胞、あるいは多能性を有さない前駆細胞をドナーとして利用できることを確認している^{17,15}。できるだけ社会に受け入れられやすい形で、ヒト-動物キメラの有用性を示していきたい。

4. 展望

ここまで述べてきたように、再生医療および幹細胞研究ではヒト-動物キメラが鍵となる技術になるであろう。移植用臓器不足の解消というアンメットニーズに応えるには、現時点では動物生体環境の利用以外の方法がない。ナীব型多能性幹細胞株の性質評価基準としてキメラ形成実験は必須になりつつあるし、培養下で作出した細胞も動物生体環境下に置くことでより正確な性質評価を行うことができるであろう。また、ヒト-動物キメラは従来の動物モデル、培養下で作製したヒト細胞による病態モデル双方の欠点を克服した理想的な病態モデルとも

なり得る。学術的にも、ヒトの特定の細胞系譜の発生プロセスを検証するよいモデルとなるであろう。いずれの面からもヒト-動物キメラを利用した研究は端緒についたところであり、課題も多く残されている。それはすなわち取り組むべきことの多い、可能性に満ちたフロンティアだということである。"臓器補完法"が注目を集め、海外の研究者と共同研究を行う機会が増えているが、その度にヒト-動物キメラの作製に必要な一連の技術は日本の研究者の方が高い水準にあることを実感している。特定胚指針の施行以来、現行の動物性集合胚の規制下で文部科学省に届け出を行ったグループは我々だけであった。指針改定によって動物性集合胚がより使いやすい研究手法となることを機に、是非皆さんの研究にヒト-動物キメラを取り入れて頂き、この新しいフィールドを切り拓いて頂きたいと考えている。

参考文献

1. Sekiya, S. & Suzuki, A. Direct conversion of mouse fibroblasts to hepatocyte-like cells by defined factors. *Nature* 475, 390-393 (2011).
2. Suzuki, N. *et al.* Generation of Engraftable Hematopoietic Stem Cells From Induced Pluripotent Stem Cells by Way of Teratoma Formation. *Mol Ther* 21, 1424-1431 (2013).
3. Kobayashi, T. *et al.* Generation of Rat Pancreas in Mouse by Interspecific Blastocyst Injection of Pluripotent Stem Cells. *Cell* 142, 787-799 (2010).
4. Usui, J. *et al.* Generation of Kidney from Pluripotent Stem Cells via Blastocyst Complementation. *The American Journal of Pathology* 180, 2417-2426 (2012).
5. Yamaguchi, T. *et al.* Interspecies organogenesis generates autologous functional islets. *Nature* 542, 191-196 (2017).
6. Yamanaka, S. *et al.* Generation of interspecies limited chimeric nephrons using a conditional nephron progenitor cell replacement system. *Nature Communications* 8, 1719 (2017).
7. Hamanaka, S. *et al.* Generation of vascular endothelial cells and hematopoietic cells by blastocyst complementation. *Stem Cell Reports. in press*
8. Matsunari, H. *et al.* Blastocyst complementation generates exogenic pancreas in vivo in apancreatic cloned pigs. *PNAS* 110, 4557-4562 (2013).
9. Chen, Y. *et al.* Generation of Cynomolgus Monkey Chimeric Fetuses using Embryonic Stem Cells. *Cell Stem Cell* 17, 116-124 (2015).
10. Chen, Y. *et al.* Generation of Cynomolgus Monkey Chimeric Fetuses using Embryonic Stem Cells. *Cell Stem Cell* 17, 116-124 (2015).
11. Wu, J. *et al.* An alternative pluripotent state confers interspecies chimaeric competency. *Nature* 521, 316-321 (2015).
12. Yang, Y. *et al.* Derivation of Pluripotent Stem Cells with In Vivo Embryonic and Extraembryonic Potency. *Cell* 169, 243-257.e25 (2017).
13. Tachibana, M. *et al.* Generation of Chimeric Rhesus Monkeys. *Cell* 148, 285-295 (2012).
14. Masaki, H. *et al.* Interspecific in vitro assay for the chimera-forming ability of human pluripotent stem cells. *Development* 142, 3222-3230 (2015).
15. Masaki, H. *et al.* Inhibition of Apoptosis Overcomes Stage-Related Compatibility Barriers to Chimera Formation in Mouse Embryos. *Cell Stem Cell* 19, 587-592 (2016).
16. Wang, X. *et al.* Human embryonic stem cells contribute to embryonic and extraembryonic lineages in mouse embryos upon inhibition of apoptosis. *Cell Research* 28, 126-129 (2018).
17. Kobayashi, T., Kato-Itoh, M. & Nakauchi, H. Targeted Organ Generation Using Mixl1-Inducible Mouse Pluripotent Stem Cells in Blastocyst Complementation. *Stem Cells and Development* 24, 182-189 (2015).

(日動協ホームページ、LABIO21カラーの資料の欄を参照)

食物アレルギー病態モデルマウスを用いて新たに見出した葛根湯併用経口免疫療法の根本的治療法としての提案

富山大学 和漢医薬学総合研究所 消化管生理学分野
山本 武

はじめに

食物アレルギーは、食物の摂取により免疫学的な応答を介して様々な症状を発症する疾患であり、抗原特異的Th2型免疫応答と抗原特異的IgE抗体による即時型のI型アレルギー反応として特徴づけられている。原因食物摂取後に発疹などの皮膚症状を主として粘膜症状や消化器症状、さらに呼吸症状やアナフィラキシーなどの全身症状など多様な症状が誘発される。近年、先進国における食物アレルギー疾患の患者数は増加していると報告されている^{1,2}。日本でも、乳児の5～10%、小児の5%、学童の45%が食物アレルギーを発症しており、その患者数が増加傾向であると報告されている³。原因食物となる食物は多種多様であり、日本では有症者のうち鶏卵が占める割合が一番高く、牛乳、小麦と続いている³。現在、このような疫学的調査を含め様々な研究が行われているが、未だ食物アレルギーの発症機序や病態形成機序には不明な点が多く、治療法は原因食物の除去療法や、誤飲・誤食時に発症した症状に対応する対症療法に限られている^{3,4,5}。しかし、除去療法は、食物アレルギー

を誘発する食物に高栄養のものが多いために、患者の成長や発育に影響しQOLの低下に繋がっている。また、誤食によるアナフィラキシー等のショック症状による死亡事故の報告もあり、根本的治療に至る治療法や治療薬の開発が強く望まれている。

食物アレルギー病態モデルとその検討の推移

食物アレルギーの発症には腸管粘膜免疫系での免疫寛容の破綻が関与することが示唆されているが⁶、患者から腸管粘膜サンプルを採取できないために詳細な研究が進んでいなかった。従って、腸管粘膜の詳細な解析、さらに食物アレルギーの根本的治療に至る治療法・治療薬の確立のためにも、有用な病態モデルによる検討が必要である。しかし、1990年代までは、食物の経口摂取により症状を発症する病態モデルが確立されておらず、アレルギー症状を発症しない病態モデルを用いた病態解析などの研究がほとんどであった。2000年に、食物抗原の経口摂取によりアレルギー性消化器症状を発症する病態モデルが報告され⁷、以降この病態モデルを改変したアレル

ギー症状を発症する病態モデルを使用した詳細な病態解析の研究や治療法や治療薬の研究が報告されている。しかし、治療法や治療薬の研究では、症状発症を予防的に抑制するプロトコールで行われた研究がほとんどであり、臨床での治療の様にすでに症状発症が確立している状態の病態モデルを用いた報告はほとんどない。

食物アレルギーに対する経口免疫療法

近年、アレルギー患者に対する原因抗原をごく微量から増量しつつ投与し続ける免疫療法の有効性が明らかになってきた。舌下免疫療法を応用した舌下免疫療法薬としてスギ花粉症に対しては『シダトレン、シダキュア』が、ダニアレルギー性鼻炎に対しては『ミテイクシア』が認可されて一般診療として用いられている。食物アレルギーに対しても、一部の医療機関では専門の医師のもとで、経口免疫療法(OIT)や皮下免疫療法が行われ一定の効果が得られることが報告されている。しかし、食物アレルギーに対しては、原因抗原の投与によるアナフィラキシー等の重篤な副作用が発現する場合

があることや必ずしも耐性獲得が誘導できるわけではないこと、耐性の誘導に数年に渡る長期間の投与が必要であることなど患者への負担が多いため、未だ研究段階の治療法とされ一般診療として推奨されていない³。しかし、免疫療法が根本的治癒に至る治療法と考えられているため、OIT治療プロトコルの検討や、IgE中和抗体やプロバイオティクスや生薬混合エキスとOITの併用療法の検討などさまざまな研究が進められている。

実験的OITモデルの確立

そこで、我々は食物アレルギー治療のために、アレルギー症状を発症する食物アレルギー病態モデルマウスに対して臨床で行われているOITと同様のOITを行う実験的OITモデルを作製し、OITによる治療効果や治療機序の検討を行い、さらにOITの問題点を改善するために、漢方薬の葛根湯の併用療法の有効性を検討した。本稿では、この実験的OITモデルマウスに葛根湯を併用し治療効率が上がった結果を紹介する。

BALB/cマウスに卵白アルブミン(OVA)を水酸化アルミニウムゲルと混和し全身感作を行い、その後、粗精製OVA溶液の経口投与を繰り返し、アレルギー性消化器症状を誘発させた(図1)。この食物アレルギー病態モデルマウスを用いて病態解析を行い、腸管粘膜免疫系でのTh2型免疫応答が過剰に亢進すること、結腸の粘膜型マスト細胞の浸潤が増加することを明らかにしている⁸。また、

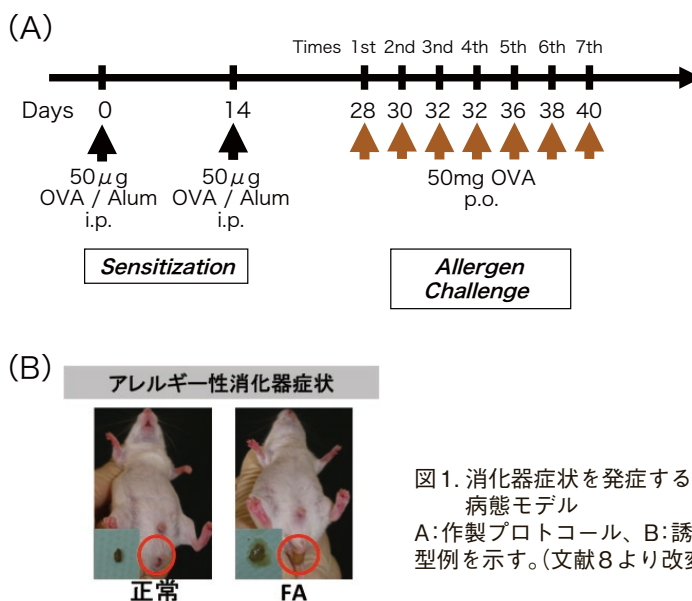


図1. 消化器症状を発症する食物アレルギー病態モデル
A: 作製プロトコル、B: 誘発した症状の典型例を示す。(文献8より改変して引用)

これらTh2型免疫応答の過剰な亢進や粘膜型マスト細胞の浸潤増加が、症状の発症に寄与していることも明らかにしている^{8,9}。このアレルギー性消化器症状を発症する食物アレルギー病態モデルマウスに対してOVA投与による経口負荷試験を行い、症状確認後に実験的OITとして、現在臨床で行われているOITと同様に食物抗原であるOVAを加熱処理し、0.5 mgから、1 mg、2 mg、4 mg、8 mg、12 mg、18 mg、20 mg (/日) と段階的に投与量を増やしながら8日間投与した。OIT後に再び経口負荷試験としてOVAを投与し、OITによる治療効果を検討した(図2A)。

漢方薬の有効性

多成分系の複合薬物である漢方薬は、複数の治療標的に作用することにより生体の病的なバランスの偏りを改善することを目的とした方剤が多く、免疫系のバランスの破綻が発症に関与するアレルギー疾患の治療に対しても使用されている。そこで、我々はアレルギー疾患のひとつである食物アレルギーに対しても漢方薬が有効であ

ると考え、食物アレルギー病態モデルマウスを用いた検討により、葛根湯が腸管にFoxp3⁺制御性T細胞を増加させ腸管粘膜免疫系で過剰に亢進したTh2型免疫応答を抑制し、アレルギー症状発症の予防に有効であることを明らかにした^{8,10}。そこで、OITの治療効率を上げることや副作用を抑制することに対しても葛根湯が有効ではないかと考え、葛根湯とOITの併用療法を検討した。

OITおよび葛根湯併用OITによる治療効果

消化器症状を発症する食物アレルギー病態モデルマウスに対し、加熱OVA投与によるOITは、OVA経口負荷試験による消化器症状の発症率を未治療群(FA群)と比較して有意に低下させ、食物アレルギーに対する治療効果を示した。OITと葛根湯の併用で発症率はさらに低下し、OITのみよりもさらに強力な治療効果を示した(図2B)。従って、葛根湯とOITの併用は有効であり、治療効率を上げることが明らかになった。

OITおよびOITと葛根湯の併用療法の治療機序の検討として、腸

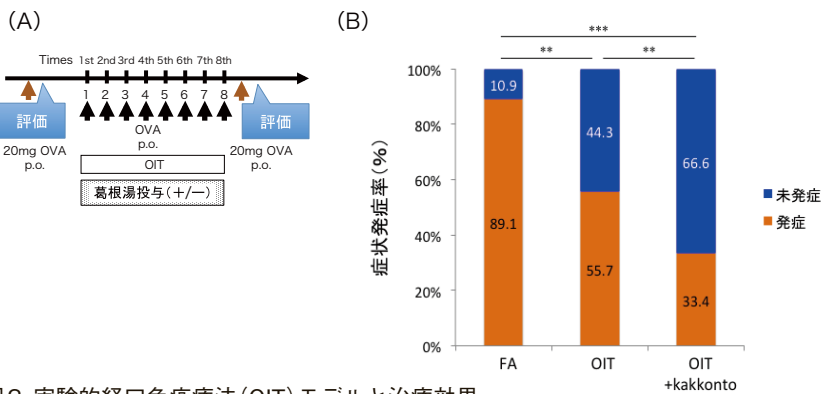


図2. 実験的経口免疫療法(OIT)モデルと治療効果
A: 作製プロトコール。食物アレルギー病態モデルマウスに対して実験的OITとして加熱OVAを漸増させながら投与した。また、併用療法として葛根湯を加熱OVA投与の1時間前に投与した。B: 治療後のOVAの経口負荷試験による症状発症率を示す。n=46-48, **P<0.01, ***P<0.001(文献13より改変して引用)

管粘膜免疫系に対する効果を明らかにするため、近位結腸におけるTh2型サイトカインIL-4のmRNA発現量をリアルタイムRT-PCRにより測定した。Normal群と比較して有意に増加したFA群のIL-4 mRNA発現量は、OIT群で低く、OIT+葛根湯群ではさらに低いことを明らかにした(図3A)。また、近位結腸から抽出したRNAを用いた網羅的遺伝子発現解析によっても、リアルタイムPCRの結果と同様に、Th2型応答関連遺伝子群の発現量はFA群では高く、OIT群では低く、OIT+葛根湯群ではさらに低いことを明らかにしている¹³。従って、OITおよびOITと葛根湯の併用療法により、結腸において過剰に亢進したTh2型応答が抑制されることを明らかにした。

次に、アレルギー性消化器症状の発症に関与する粘膜型マスト細胞について検討を行った。粘膜型マスト細胞に特異的に発現するマウスマスト細胞プロテアーゼ1 (mMCP-1) の血漿中濃度をELISAにより測定し、粘膜型マスト細胞の脱顆粒について評価した。OIT+葛根湯群におい

て、FA群とOIT群に対し血漿中mMCP-1濃度の有意な低下が認められた(図3B)。また、近位結腸のRNAを用いた網羅的遺伝子発現解析によっても、マスト細胞の脱顆粒関連遺伝子群の発現量がFA群では高く、OIT群で低く、OIT+葛根湯群でさらに低いことを明らかにしている¹³。従って、OITと葛根湯の併用療法により、マスト細胞の脱顆粒が抑制されることが示唆された。

制御性T細胞が免疫寛容の確立に重要な役割を担っていることや、経口免疫療法の機序のひとつとして考えられていること、また葛根湯による食物アレルギー発症

予防効果の機序のひとつとして制御性T細胞の増加を明らかにしていることから¹⁰、Foxp3⁺制御性T細胞の分布割合をフローサイトメーターにより測定した。結腸の粘膜固有層の細胞における制御性T細胞の割合はFA群に比較してOIT群で有意に増加し、OIT+葛根湯群でさらに有意に増加した(図3C)。腸間膜リンパ節の単離細胞および末梢血リンパ球中では、制御性T細胞の割合に有意な変化はなかったため、食物アレルギーの治療に対して結腸の制御性T細胞が重要な役割を担い、OITやOITと葛根湯の併用療法で制御性T細胞が増加することによって治療効果が示され、OITと葛根湯の併用療法ではより制御性T細胞が誘導されるため治療効果が高いと考えられた。これまでに、制御性T細胞によるTh2免疫応答の抑制などにより寛容を誘導すること¹¹や制御性T細胞がマスト細胞の脱顆粒を抑制すること¹²が報告されていることから、この腸管での制御性T細胞の誘導が重要な機序のひとつであり、制御性T細胞的作用によって腸管のTh2型応答の抑制やマスト細胞の脱顆粒の抑制が誘導されたと推測された。

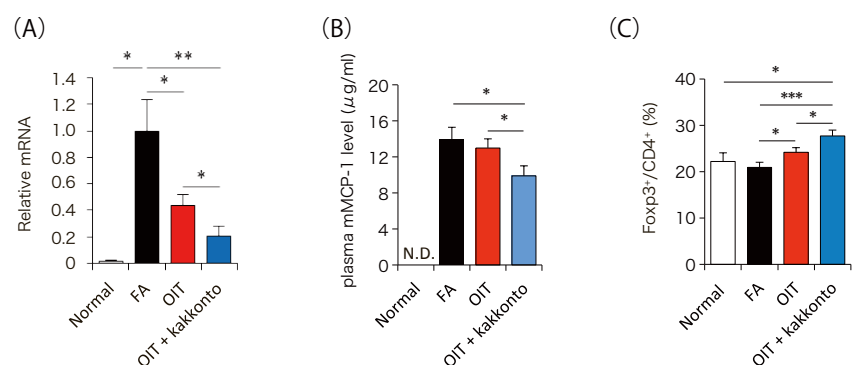


図3. OITおよびOITと葛根湯の併用療法による効果
A: 結腸におけるIL-4 mRNA発現量の変化。n=5-14, mean ± SE, *P<0.05, **P<0.01, B: 血漿中mMCP-1量の変化。n=5-20, mean ± SE, *P<0.05, C: 結腸における制御性T細胞(Foxp3⁺CD4⁺T cell)の割合変化。n=6-20, mean ± SE, *P<0.05, ***P<0.001。(文献13より改変して引用)

終わりに

本稿では、実験的な経口免疫療法病態モデルマウスを確立し、漢方薬の葛根湯を経口免疫療法に併用することにより治療効率が上がることを明らかにし、葛根湯を経口免疫療法と併用する有効性を示した。治療薬・治療法確立のためには、臨床での治療プロトコルを考慮した病態モデルでの検討が重要であり、それが臨床応用に繋がると考える。現在、これらの研究結果を基に、富山大学附属病院小児科と臨床共同研究として富山大学附属病院の倫理委員会の承認を得て併用療法の研究を進行中である。この併用療法の研究が、治療効率や副作用の発症の問題から

未だ一般診療として認められていない経口免疫療法の改良に繋がりを、食物アレルギーの根本的な治療に繋がることを期待する。

参考文献

1. Bauer et al. The future of biologics: applications for food allergy. *J Allergy Clin Immunol.* 135, 312-23. (2015)
2. Sicherer et al. Epidemiology, pathogenesis, diagnosis, and treatment. *J Allergy Clin Immunol.* 133, 291-307. (2014)
3. Ebisawa et al. Japanese guidelines for food allergy 2017. *Allergology International* 66, 248-264 (2017)
4. Nowak-Węgrzyn et al. Oral immunotherapy for food allergy: mechanisms and role in management. *Clin Exp Allergy.* 45: 368-83. (2015)
5. Wood RA. Food allergen immunotherapy: Current status and prospects for the future. *J Allergy Clin Immunol.* 137, 97-82. (2016)
6. Berin et al. Mucosal immunology of food allergy. *Curr Biol.* 23, R389-400. (2013)
7. Kweon et al. Systemically derived large intestinal CD4+ Th2 cells play a central role in STAT6-mediated allergic diarrhea. *J Clin Invest.* 106, 199-206. (2000)
8. Yamamoto et al. Therapeutic effect of kakkonto in a mouse model of food allergy with gastrointestinal symptoms. *Int Arch Allergy Immunol.* 148, 175-185. (2009)
9. Yamamoto et al. Anti-allergic role of cholinergic neuronal pathway via α 7 nicotinic ACh receptors on mucosal mast cells in a murine food allergy model. *PLoS One.* 9, e85888. (2014)
10. Yamamoto et al. Induction of regulatory T cells as a novel mechanism underlying the therapeutic action of kakkonto, a traditional Japanese herbal medicine, in a murine food allergy model. *Int Arch Allergy Immunol.* 169, 146-156. (2016)
11. Sakaguchi S, Yamaguchi T, Nomura T, et al. Regulatory T cells and immune tolerance. *Cell.* 133, 775-87. (2008)
12. Giorgia et al. CD4+CD25+ regulatory T cells suppress mast cell degranulation and allergic responses through OX40-OX40L interaction. *Immunity.* 29, 771-781. (2008)
13. Nagata et al. Improvement of therapeutic efficacy of oral immunotherapy in combination with regulatory T cell-inducer kakkonto in a murine food allergy model. *PLoS One.* 12, e0170577. (2017)

(日動協ホームページ、LABIO21カラーの資料の欄を参照)

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・エー・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・エー・シー 京都市中京区西ノ京西月光町40番地

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



遺伝的浮動 (genetic drift) と 動物実験の再現性

順天堂大学 国際教養学部
久原 孝俊

はじめに

今回は、遺伝的浮動 (genetic drift) に関する論文を読んでみた。本論文は、ジャクソン研究所およびチャールスリバー社の内部資料であるが、たまたま、日本チャールスリバー社から筆者 (久原) に提供されたものである。原著者は、ジャクソン研究所の Janine Low-Marchelli 博士である¹⁾。本稿を LABIO 21 に掲載するにあたって、日本チャールスリバー社および原著者 (Janine Low-Marchelli 博士) の許諾を得た。なお本稿は、上記原著論文の翻訳ではない。原著論文は、13 ページにわたる長大な論文であるので、本稿は、筆者が原著論文を読んで、自由にまとめたものである。

遺伝的浮動と動物実験の再現性

遺伝的浮動とは、生物集団における遺伝子頻度が偶然により変動することをいう。とくに、集団数が少ないときには、遺伝的浮動が起りやすい。遺伝的浮動は、すべてのマウス繁殖コロニーにおいて起こる可能性があり、実験の再現性と科学的結論に悪影響を及ぼす可能性がある。遺伝的浮動によって引き起こされる自然発生突然変異は、数年間にもわたって認識されない可能性があり、

たまたまそのような突然変異がかかわるような特定の研究が実施されてはじめて認識されることがある。遺伝的浮動を完全に阻止することはできないものの、コロニーの管理を注意深く実践することにより、遺伝的浮動ならびに実験結果に及ぼす影響を最小限にとどめることができる。それぞれのマウス繁殖コロニーは、その規模や管理方法が異なることがあるので、亜系統名を含む、完全に正確なマウス系統名を使用することが再現性のある動物実験にとって必須である。

マウスを用いて再現性のある動物実験を実施するためには、マウスのコロニーにおける遺伝的安定性を維持すること、すなわち遺伝的浮動をできるかぎり阻止することがきわめて重要である。研究用のマウスは、その生涯を通して変化する要素であり、そして重要なことは、その変化が世代を越えて伝わることもあるということである。野生においては、遺伝的に受け継がれる DNA シークエンスの変化は、種の多様性と進化の基盤になっている。一見、これらの変異は、個体の遺伝的構成において、重要ではない変動であるように見える。しかし、これらの一見重要ではないと思われる

変異が、実験の再現性のなさの原因になり得る場合がある。

マウスを使用する研究者は、ここで難問にぶつかる。それは、研究用のマウスを作製するためには繁殖が必要であり、繁殖には遺伝的多様性を増大させるという特有のリスクがあり、そのため、実験の多様性を増大させてしまうというリスクがあるということである。

論文や研究費申請書などにおいて、正式なマウスの系統名 (亜系統名を含む) を使用し、繁殖世代の情報を添付して注意深く報告することは、動物実験の再現性と責任ある動物の使用を推進するために研究者が簡単に実践できることの一部である。

親系統から分離して 20 世代 (約 5 ~ 6 年間) 継続して近親交配されて維持された系統は、もとの親系統にくらべ遺伝的差異を有することが疑われるので、亜系統であるとみなされる。

よく使われているマウスの近交系統 (たとえば、C57BL/6、DBA、C3H、BALB、CBA など) は、ほぼ 100 年前に確立された系統であり、今日まで継続的に論文で汎用されている。これらの系統は、200 回以上近交系間で継続して交配され、また世界中の複数の機関



がそれらを繁殖させている。そのため、時間の経過とともに、かなりの遺伝的浮動がこれらすべての系統に生成している。遺伝的浮動のため、既存の亜系統において観察されることは、それらの亜系統の祖先の近交系において観察されることとは異なる可能性がある。

ひとつだけ例を挙げておこう。C3H系統に由来する亜系統コロニーが、2名のジャクソン研究所の研究者によって2系統作出された。これらの2つの亜系統は、長年にわたって、異なる系統であるとはみなされていなかった。Walter Heston博士は、1930年代にこの亜系統を確立していた(現在のC3H/HeJ)。その後、Heston博士は、彼のマウスの一部をジャクソン研究所の研究者であるHenry Outzen博士に譲渡した(現在のC3H/HeO_uJ)。1960年代後半に、Hestonの系統はリポ多糖類(LPS)に抵抗性があり、一方Outzenの系統は、LPSに対する感受性をもったままだった。HestonのC3H亜系統(C3H/HeJ)がLPSで処置されることがなかったら、この亜系統における基礎免疫学の研究結果は、大きな物議をかもしものになった可能性がある。

C3H系統の例で上述したように、亜系統は、研究結果に影響を及ぼす自然突然変異を獲得している可能性がある。最適な亜系統が使用されなかった場合、実験の再現性に破滅的な結果をひき起こす可能性がある。研究者は、どのようにして自分たちの実験に

とって「最適」な亜系統を知ることができるのだろうか？残念ながら、この問いに対する簡単な回答はない。遺伝的背景が問題であるか否かを決定する最善の方法は、制御された併行実験をおこなって、比較することである。ある特定の実験結果を得るために、既存の亜系統すべてを調べることは不可能であるので、研究結果に遺伝的背景が及ぼす影響を理解するための次善の策は、査読のある論文において他の研究者が観察したことを参照し、そして同一の亜系統を使って得られた知識を土台として、実験を実施することである。

いくつかの論文において、C57BL/6JとC57BL/6N亜系統のあいだには、遺伝的浮動によって生じた遺伝性の表現型の違いがあることが示されている。特定の研究テーマによっては、ある亜系統が他の亜系統よりも適している可能性がある。いくつかの例を以下に記載する。

- ・C57BL/6Jマウスは、C57BL/6N亜系統と比較して、突然変異*Nnt*遺伝子を発現しており、この遺伝子はグルコース介在性のインスリン分泌に関与している。
- ・C57BL/6Jマウスは、アルコールに対する強い嗜好性を示し、一方C57BL/6NCrlには、そのような嗜好性は認められない。
- ・C57BL/6N亜系統は、網膜変性症対立遺伝子*Crb^{md8}*を保有し、一方C57BL/6J亜系統は、野生型対立遺伝子をもっている。
- ・C57BL/6J O₁a H_sdマ

ウスは、C57BL/6JおよびC57BL/6JRccHsd亜系統と比較して、低い骨密度を有している。

以上のように、遺伝的背景は、再現性と生物学的プロセスの一般化に影響を及ぼす可能性がある。困ったことに、C57BL/6を使用した論文の大半において、亜系統名が記載されていないのである。

遺伝的浮動を抑制するコロニー管理

すべての繁殖コロニーが遺伝的浮動の影響を受ける。しかし、遺伝的浮動を抑制すること、すなわち遺伝的浮動による、実験の再現性への影響を最小限にすることが可能な、コロニー管理戦略が存在する。これらの戦略には、適切な系統名の使用、よく考えられた繁殖の実施、凍結保存の利用などが含まれる。

完全に適切なマウス系統名を使うことによって、不確実性を取り除き、実験に使用する亜系統の正確な識別が可能になる。

最善の繁殖の実践に加えて、系統内において表現型の変化が起こっていないかを定期的に観察することが必要である。遺伝的浮動が懸念される場合、「表現型の変化」とは、観察可能な、または測定可能なものを意味する。たとえば、外観、行動、繁殖成績、または実験結果などを意味する。遺伝的浮動の識別は、コロニー維持者または研究者が、第一に表現型の変化に気づくこと、第二にそれについて何らかの行動をとることから始ま

る。コロニーについてのしっかりとした参照データがない場合、表現型が変化したか否かを確定することは困難な可能性がある。

5～10世代の近親交配の後、コロニー内の遺伝的浮動の蓄積を除くまたは予防するために、マウスコロニーを「リフレッシュする」ことが必要となる。遺伝的背景をリフレッシュするためのいくつかの方法がある。たとえば、遺伝子組換えマウス系統を維持する場合に、信頼できるマウス維持機関または販売業者から購入した適切な近交系または交雑マウス系統に戻し交配させたり、信頼のおけるマウス維持機関または販売業者から購入した新しい繁殖用マウスを用いてコロニーを再開したり、使用頻度の少ないユニークなマウス系統は、精子または胚として凍結保存したりする方法がある。凍結保存された精子や胚は、遺伝的浮動や繁殖の誤りを経験したコロニー、あるいは疾病や自然災害で失われたコロニーの回復に使うこともできる。

遺伝的背景を検証するために、ゲノムスキャンやSNPタイピングがおこなわれる。ゲノムスキャンやSNPタイピングによって、C57BL/6J対C57BL/6Nのような密接な類縁関係のある亜系統間の区別が可能になる。

マウス維持機関または販売業者においても、遺伝的浮動が起こる可能性があるものの、マウス維持機関や販売業者は、一般的に、きわめて大きな繁殖コロニーを維持しているので、一般的な研究室において維持している小さなコロニーよりも遺伝的浮動が起こる可能性は低い。

ジャクソン研究所においては、遺伝的浮動の蓄積を防ぐために、2つのプログラムが実践されている。2つのプログラムとは、遺伝的安定性(Genetic Stability Program:GSP)プログラムと遺伝的品質管理(Genetic Quality Control:GQC)プログラムである。

GSPプログラムおよびGQCプログラムの詳細については、ジャクソン研究所のウェブサイトを参照していただきたい。

GSP:<https://www.jax.org/jax-mice-and-services/find-and-order-jax-mice/why-jax-mice/patented-geneticstability-program>

GQC:<https://www.jax.org/jax-mice-and-services/findand-order-jax-mice/why-jax-mice/genetic-quality-controlprogram>

おわりに

一般的に、それぞれの研究室において、ジャクソン研究所が実践しているようなGSPプログラムやGQCプログラムを実践することは、かならずしも容易なことではないであろうし、また実際ではないかもしれない。動物実験の再現性を向上させるために研究者や実験動物技術者がさしあたって採用することができる簡便かつ確実な方策は、日常の実験や飼育管理ならびに論文や研究費申請書等において、亜系統名を含む正確な系統名を記載すること、そして繁殖に関する注意深い記録を保管することである。

筆者は、本誌第62号において、ARRIVEガイドラインについて紹介をした²⁾。ARRIVEガイドラインにおいても、動物を使用した論

文を書くにあたって、亜系統名を含む系統名を正確に記載すべきであることが明記されている³⁾。

本稿においては、おもにC57BL/6系統について記載したが、他の系統の亜系統においても、遺伝的浮動が起こっている可能性について注意しなければならない。

紙幅のつごうにより、詳しく記載することができなかった部分が多い。さらなる詳細については、原著¹⁾を参照していただきたい。

本稿の内容は、本年(2018年)5月16日、富山市において開催された第65回日本実験動物学会(久和茂大会長)の日本チャールスリバー社ランチョンセミナーでジャクソン研究所のAndy Schile博士によって紹介された。

本稿が、研究者や実験動物技術者にとって遺伝的浮動について再考するきっかけとなれば幸いである。

謝辞

本稿をLABIO 21に掲載することをご快諾なさった日本チャールスリバー社ならびにジャクソン研究所のJanine Low-Marchelli博士およびAndy Schile博士に感謝いたします。

引用文献

- 1) Janine Low-Marchelli: http://jackson.jax.org/rs/444-BUH-304/images/LT0142_GSP_Whitepaper.pdf
- 2) 久原孝俊、久和茂: ARRIVEガイドライン—動物実験の再現性向上のために—。LABIO 21, 62: 18-21, 2015.
- 3) C. Kilkenny *et al.*: *PLoS Biol* 8(6): e1000412. doi:10.1371/journal.pbio.1000412, 2010.

キーワード: 遺伝的浮動、動物実験、再現性

実験動物マウスリソース 事業の進捗

国立研究開発法人 理化学研究所
バイオリソース研究センター・実験動物開発室
吉木 淳

はじめに

2018年4月1日より国立研究開発法人理化学研究所(理研)は第四期中長期計画を開始しました。バイオリソースセンター(写真1)は、バイオリソース研究センター(BioResource Research Center: BRC)と改称し、世界最高水準のバイオリソースの収集・保存・品質管理・提供を行うとともに、バイオリソースの利活用に資する研究開発を推進します。バイオリソースは生物遺伝資源とも呼ばれ、生命科学の研究開発において必要不可欠な研究材料です。理研BRCは研究コミュニティの要望を受けて2001年に設立され、2002年度からは文部科学省(2015年度より文部科学省/国立研究開発法人日本医療研究開発機構:MEXT/AMED)のナショナルバイオリソースプロジェクト(National BioResource Project: NBRP)^[1]の中核機関として選定され中心的な役割を果たしています。理研BRCでは、バイオリソースの中で最も重要な実験動

物マウス、実験植物シロイヌナズナ、ヒトおよび動物由来の培養細胞株、遺伝子材料、微生物およびこれらのバイオリソースに付随する特性情報の整備を実施しています。本稿では、理研BRCで進めている実験動物マウスの整備計画やその進捗をご紹介します。

社会ニーズ・研究ニーズに応える品揃え

マウスは近交系、ゲノム情報、ゲノム改変技術の開発・整備ならびに疾患研究の膨大な知見の蓄積等、科学的な利点に加え、時間・コストの面でも優れた哺乳類モデル生物です。特に、脳・神経、発生・再生、免疫等の研究分野では、個体レベルの高次生命現象の理解が必要です。癌・認知症・生活習慣病等の疾患発症の分子機構の解明ならびに治療法の開発にもモデル動物が欠かせません。今日の超高齢社会や精密医療に向けた社会ニーズ・研究ニーズに応じて、高次生命現象の理解ならびに疾患克服の研究・開発に必

要な系統の拡充を目指し、最先端ゲノム編集や遺伝子発現制御技術を用いて開発されたマウス系統を収集しています。例えば、次世代型アルツハイマー病モデル^[2]、オートファジー関連系統^[3]、iPS細胞の樹立系統^[4]、細胞周期可視化Fucciマウス^[5]、ゲノム多様性の研究に有用なMSM/Msをはじめとする野生マウス由来系統^[6]等、世界トップレベルの研究によって開発された我が国独自の品揃えを進めています。中でも、西道隆臣博士および齋藤貴志博士ら(理研・脳科学総合研究センター)により開発されたC57BL/6-*App^{tm3 (NL-G-F) Tcs}*/*TcsRbrc* (RBRC06344)系統は、家族性アルツハイマー病の原因遺伝子の一つである*App*遺伝子に患者で発見されたSwedish変異(NL)、Iberian変異(F)およびArctic変異(G)をノックインした次世代型アルツハイマー病モデルマウスで、患者のアミロイド病理をよく再現し^[2]、アルツハイマー病の予防・治療研究の標準モデルとして世界中から多数のリクエストを受けています。

微生物学的品質管理

動物実験を含む研究開発では、実験結果の再現性の確保が最重



写真1

要課題となっています。そのためには、実験動物の厳格な品質管理が必要です。民間ブリーダーの供給するマウスの微生物学的品質はSpecific-Pathogen-Free (SPF)として高度に維持されています。国内研究機関から多数のマウス系統の寄託を受けて、保存・提供する理研BRCにおいても、利用者に提供するマウスの微生物学的品質については、実験再現性の確保のため厳格に管理し、検査実施項目と検査結果を公開しています。まず、大学や研究機関から寄託されたマウスは検疫施設で受入れ検査を実施し、帝王切開または胚移植により清浄化してバリア施設へ導入しています。自家検査によれば、寄託マウスの約50%が腸管内原虫や蟻虫に汚染しているため、清浄化操作は不可欠です。バリア施設では個別換気ケージによる飼育と囲マウス・汚れ床敷を用いた定期検査により病原微生物を監視しています。対象病原微生物によっては維持系統のマウスから直接試料を採取して囲検査を補完しています。

遺伝的品質管理

遺伝的品質管理については、系統の種類あるいは遺伝子変更の方法に応じて検査項目を設定しています。リソースセンターには、同じ蛍光蛋白遺伝子と異なるプロモータを連結した融合遺伝子を有する系統が多数保存されています。それらを識別可能なPCR検査が不可欠です。例えば、トランスジェニックマウスについては、トランスジーン特異的なPCRプライマーにより、プロ

モータとその制御下で発現する遺伝子を検出するPCR検査を行います。ノックアウトマウスについては、*neo*遺伝子や*lacZ*遺伝子などのマーカー遺伝子のみの検出では系統の識別が困難なため、標的遺伝子特異的なPCRプライマーを設計して検査します。さらに、すべての遺伝子改変マウスを対象としたKOサーベイ検査は、他の遺伝子組換えマウスとのコンタミがないことを確認するための検査です^[7]。異なる遺伝子組換えマウス同士を交配後の子孫で、意図しない遺伝子の残存を検出することもできます。さらに、コンディショナル系統として必要な構造を確認するloxP/FRT検査やマイクロサテライトマーカーまたはsingle nucleotide polymorphism (SNP)マーカーを用いたPCRによる遺伝背景検査も必要に応じて実施しています。今後もマウスリソースの国際ハブ機関として、世界最高水準の品質を目指し、実験再現性の確保に貢献します。

付加価値向上

多くの研究者は文献情報から特定の系統にアクセスしています。マウス系統の利用価値は文献情報が豊富なほど高く、また、ゲノム情報、遺伝子発現情報や表現型情報の充実により利用しやすくなります。利用が増えるとともに文献情報や付随情報が増えるというポジティブサイクルに繋がります。利用者の皆様には成果論文のフィードバックをお願いしていますが、利用者ご自身からのご連絡は残念ながら極めて

少ないのが現状です。そこで、理研BRCではGoogle Scholarのアラート機能などを利用してウェブ上に公開された論文中から理研BRCから提供したマウスを検索して利用者の成果の収集に努めています。これまでに800編超のハイ・インパクトな研究論文が発表されています。こうして収集した文献情報は理研BRCのウェブカタログに掲載しているほか、NBRPの情報センターが整備する論文成果のデータベースResearch Resource Circulation (RRC)からも公開されています。

理研BRCのマウス表現型解析開発チーム(田村勝チームリーダー)で整備している疾患表現型解析プラットフォーム^[8]も系統の特性情報の充実に大きな役割を果たしています。この表現型解析プラットフォームは国際マウス表現型解析コンソーシアム(International Mouse Phenotyping Consortium: IMPC)^[9]との連携により構築され、400項目に及ぶ健康・疾患に関わる検査項目が含まれています。国際連携により世界18機関で再現性の高い検査項目とプロトコルを確立して公開しています。個別研究では、実験操作の影響の評価は、研究者が専門とする特定の組織・臓器に限られます。それぞれの遺伝子は異なる組織・臓器において時空間特異的な働きをしているため、網羅的な解析プラットフォームにより個々の遺伝子の機能や薬効を総合的に評価することができます。

NBRPの各プログラムとの連携

実験動物マウスリソースの整

備はNBRPの中核的拠点整備プログラムの中核機関として実施しています。NBRPには、各中核機関が収集・保存・提供するバイオリソースについて、ゲノム情報を整備することにより、付加価値の向上をはかり、我が国のバイオリソースの独自性・先導性を高めることを目的として行う「ゲノム情報等整備プログラム」があります。今日、より精度の高いゲノム情報の整備は、正確なゲノム編集を行うためには必須の要件です。また、各バイオリソースの収集、増殖、品質管理、保存、提供等に係わる技術開発を行う「基盤技術整備プログラム」もあります。最近では下記のNBRPプログラムとの連携によりマウス系統の付加価値や品質管理技術の向上を進めています。

【ゲノム情報等整備プログラム】

- H28年度「1分子リアルタイムDNAシーケンサーによるMSM/Ms系統のリシーケンスと公開」課題管理者 高田 豊行 国立遺伝学研究所
- H27年度「1分子長鎖再解読に基づく標準マウスゲノム配列および構造決定と公開」課題管理者 権藤 洋一 理化学研究所

【基盤技術整備プログラム】

- H28年度「ゲノム編集による難治疾患モデル整備のための基盤技術開発」課題管理者 吉木 淳 理化学研究所
- H26年度「Cre-driverマウスリソースの質の向上を目指したCre-loxP遺伝子組換えアトラ

ス化」課題管理者 杉山 文博 筑波大学 生命科学動物資源センター

国際ハブ機能

マウスリソースの国際ハブ機関として、国際マウス系統データベース(International Mouse Strain Resource:IMSR)^[10]にわが国の研究者が開発したマウス系統を登録し、世界に発信しています。IMSRは世界のマウスリソースのウェブ・ワンストップショップです。遺伝子名で系統を検索すると世界中のマウス系統が一覧でき、保有機関のサイトへ飛んで注文できる仕組みです。理研BRCはこれまでに海外39ヶ国800機関にマウスを提供しています。研究者個人で海外のリクエストに応えることは大きな負担です。理研BRCにマウスを寄託すれば、海外からの問い合わせメールを転送するだけで、そうした負担から解放され、研究に専念できます。また、ほとんどの系統は凍結精子や凍結胚として保存されているため、理研BRCでは、海外の凍結リソースを個体化する技術支援を国内の研究者に提供しています。

また、IMPC^[9]に参画し、全蛋白質コード遺伝子のノックアウトマウス系統の作製・保存・表現型解析・提供の計画を分担しています。研究者にノックアウトマウスと世界標準の疾患表現型データを利用可能とすることで、遺伝子機能の総合的な理解に基づく疾患研究の基盤構築^[11, 12]と医療のイノベーションに貢献する計画です。これまでに、7,400超の遺伝

子のノックアウトマウスを作製・保存し、5,700遺伝子のノックアウトマウスの表現型解析が国際連携で実施され、6,100万データポイントに及ぶ多次元データセットがホームページから公開されています。

さらに、理研BRCと南京大学 Model Animal Research Center (MARC)は、アジアの若手研究者と技術者を主なターゲットに国際マウスワークショップを共同開催しています。第1回は2012年8月27日～29日に理研BRCがホストとなり、つくばで開催し、以後毎年、南京大学MARCと理研BRCが交互にホストをしています。2017年からは韓国ソウル国立大学が参加しています。今年7月には、第7回マウスワークショップ“Humanized Mouse Models”を南京大学MARCで開催しました(写真2)。南京大学の大学院生を中心に中国から69名が研修生として参加し、講師には、南京大学、蘇州大学、吉林大学、上海生化学及び細胞生物学研究所、広州生物医学研究所の教授陣と理研BRCから8名の講師が参加しています。次回は、2019年8月26日(月)から28日(水)、“Precision modeling of human diseases in mice and cell resources”をテーマに理研BRCで開催予定です。年明けには詳しい予定をホームページからご案内し、受講生を募集しますので、奮ってご応募ください。

ゲノム編集マウスへの対応

2013年に発表されたCRISPR/



写真2

Cas9を用いたゲノム編集技術^[13]によりノックアウトマウスの作製が簡便になり、この2～3年で寄託されるゲノム編集マウスが急速に増加しています。IMPCでも各遺伝子のノックアウトマウスの作製は、相同組換えES細胞を用いて開始していましたが、全遺伝子のノックアウトを目標とする大型プロジェクトの中では、ゲノム編集の簡便性とコスト優位性、作製期間短縮のメリットは圧倒的となりました。2014年からパイロット実験を重ね、現在では理研BRCを含めすべてのIMPC生産拠点でCRISPR/Cas9を用いたノックアウトマウス生産が行われています。一方、簡便性かつ迅速な作製法であるため、大量に作製され十分な品質管理が行われないまま研究コミュニティに溢れるのではないかと懸念もあり、2014年にはマウスリソース機関の国際会議がミュンヘンで開催され、マウスリソース機関が厳格な品質管理を行うことで一致しました^[14]。

理研BRCでもゲノム編集マウスの収集・保存にあたっては、初代ゲノム編集マウスのお大半がモザイク個体であり、実験再現性に

問題があるため、2世代目以降の系統化済みマウスを受入れること、編集部位のシーケンス情報は必須であること、チェックリストを用いて寄託者から正確な情報を収集すること、簡便な凍結精子保存を基本とすることなど、基本方針を定めています。最近では、当初問題視されていたオフターゲット編集は大きな問題にならないこと^[15]、ゲノム編集が正確に行われているか切断部位を中心に広範なゲノム領域の変異の有無の確認が必要であること^[16]など、遺伝品質に関する重要な報告がされています。

今後のマウスリソース整備について

ゲノム編集技術の進展が大きな鍵になると思われます。患者さんのゲノム情報の解読が先行し疾患の原因遺伝子の候補が多数あり、個体レベルの検証が求められています。理研BRCでは新規に次世代ヒト疾患モデル開発研究チーム(天野孝紀チームリーダー)が設置され活動を始めています。内外の疾患研究コミュニティとの連携を深めて新しいモデルの整備を行う計画です。IMPCでは、既に全蛋白コード遺

伝子のノックアウトが進行し、稀少疾患の研究コミュニティとの連携も進んでいます。さらに、非コード領域のゲノム機能の個体レベルでの解明についても議論されています。ゲノム編集技術の改良は急速に進んでいるため、より複雑なゲノム改変が自在にできる日も遠くないものと思われます。再現性あるリソースの整備を常に念頭に、技術の進歩を先取りして新たなニーズに常に応えられるマウスリソースの整備に努めてまいります。

謝辞

当事業をご支援いただいている研究コミュニティの利用者の皆様に深謝申し上げます。実験動物開発室の職員の皆様のご協力ならびに小幡裕一センター長のご助言・ご指導に感謝いたします。

参考文献とURL

1. <http://www.nbrp.jp/>
2. Saito T *et al.* Nature Neurosci 17, 661-663 (2014)
3. Mizushima N *et al.* Mol Biol Cell 15, 1101-1111 (2004)
4. Okita K *et al.* Nature 448, 313-317 (2007)
5. Sakaue-Sawano A *et al.* Cell 132, 487-498 (2008)
6. Takada T *et al.* Mamm Genome 26(7-8):331-337 (2015)
7. Nakata H *et al.* Exp Anim 58, 437-442 (2009)
8. http://ja.brc.riken.jp/lab/jmc/mouse_clinic/business/pipeline.html
9. <http://www.mousephenotype.org/>
10. <http://www.findmice.org/>
11. Dickinson ME *et al.* Nature 537, 508-514 (2016)
12. Meehan TF *et al.* Nat Genet 49, 1231-1238 (2017)
13. Wang H *et al.* Cell 153(4):910-918 (2013)
14. Nature 509, 399 (2014)
15. Nutter LMJ *et al.* Nat Methods 15(4):235-236, (2018)
16. Kosicki M *et al.* Nat Biotechnol 36(8):765-771 (2018)

スペイン 海外散歩



カタルーニャ訪問記

山田 章雄

LABIO21も本号で通算74号を数えることになった。小生が情報委員会委員長を仰せつかったのが25号であるから、相当の長きに亘ってLABIO21の編集に携わってきたことになる。私とLABIO21の出会いは更に古く18号にまで遡れる。2004年10月号の海外散歩が小生のLABIO21デビューであった。題目は「マドリッド超駆足訪問記」。遠いヨーロッパの地に、たった2.5日滞在した単独渡航記を掲載してもらったものだ。今読み返してみてもトンデモ旅だったとつくづく思う。その時のリベンジを狙ったわけではないが、14年の歳月が流れ、再び情熱の国スペイン

を訪れるチャンスが巡ってきたのである。

2014年5月、ドイツ北部に住む姪を訪ねた際、隣のオランダアムステルダムで1.5日バードウォッチングをすることになった。その時のガイドがロバートというオランダ人だったのだが、なかなか好感の持てる中年のガイドだった。彼が、暫くしたらスペインに移住し、そこでバードウォッチングガイドをするので、是非遊びに来いという。その言葉を真に受けスペイン訪問を決断したのがそもそもの始まりである。時期的には渡りがほぼ完了する5月下旬とし、2018年5月24日のANA便で発つこと

とした。乗り継ぎ地のブリュッセル空港には予定より30分ほど早く到着したものの、ブリュッセル航空機は落雷の影響で1時間余り遅れて離陸することになった。フライトを待つ間に、ベルギー産ビールを味わおうと思いバーに向かったが銘柄がわからず、一番安いやつを注文した。ここまでのフライトで4本の映画を立て続けに鑑賞し、疲れ切った頭には冷えたビールがたまらない。ワインもしこたま飲んだはずなのに。

1時間余り遅れて9時半を回ったころに到着したバルセロナ空港には、ガイドのロバートが迎えに来てくれていた。そのま





ま彼の車、三菱製のピックアップトラック、に荷物を積み込み、バルセロナ郊外のカステルデフェスにあるホテルに到着したのは22時半すぎだった。渡されたカードキーの調子が悪くフロントに持ち帰り、再び入力してもらったがやはりだめ。よくよく見たら磁気カードに亀裂が入っていた。カードそのものを交換してようやく部屋に入ることができた。夜更かしが大好きな流石のスペインでも、このホテルのレストランは22時までの営業だというので夕食はあきらめかけたが、ロバートが交渉してくれたおかげで夕食にありついた。実は道中食べ続けてきたので全く空腹感はなかったが、控えめに頼んだつもりピザも、その大半はやはり食べきれず。ベッドに入ったのは真夜中を過ぎていた。ほぼ24時間よく頑張りました。

翌日は列車と地下鉄を乗り継いでバルセロナ市街へ。フニクラ（登山電車）でモンジュイック公園へ。公園へ続く急坂のところどころにはエスカレーターが設置されていたが、結構な運動になった。市街観光なので鳥

撮影用のレンズはやめにし、80-135mmズームにしたのだが、ホシムクドリ、ムジホシムクドリ、キアシカモメ、ワカケホンセイインコ、オキナインコ、キバシリなどが出現し、後悔先に立たず。その後、ボケリア市場、グエル公園を訪れ、遂にサグラダファミリアへ。ロバートは入場せず私たち夫婦のみで教会内へ。日本語の解説用レシーバーを借りたものの、そもそも宗教心のかけらもないため、日本語であっても教会関連の専門用語を理解するのに時間を要し、教会内部を行ったり来たりし思いのほか時間をかけて楽しんでしまった。そろそろ出ようかと出口に近づいたところ、行列を発見。よく見ると塔内部に上がるエレベーターに並んでいるのである。私たちのチケットを見るとその料金も含まれているではないか。決して安くない入場料（30ユーロ）を払ったのだからと、ケチ根性に火が付き、内部探検に挑戦することにした。因みに入場料による収益は、この建築を完成させるために使われるそうだ。エレベーターから降りた後は、螺旋状の狭い階段を降り

るだけなのだが、高所恐怖症を患うわが身にとって、この場合は身の縮む、いや身の竦む場所であった。後悔先に立たず。教会内部は荘厳さと斬新さに満ちており、自然とのかかわりを重視したというガウディ建築は、これだけを見にバルセロナに出かける十分な価値を有していることを実感できた。

次の日からはカタルーニャ及び隣接するアラゴンでのバーディングが本格的に始まる。ロバートの運転するピックアップトラック（このトラックの後部荷台は彼の手製の木製カバーが雨除け兼埃除けになっている。我々の大型トランク2個の出し入れで結構苦勞しているようだったから、いずれ取り外すか、大幅な設計変更をするかもしれない）で、地中海に面した湿地や田んぼ、さらにはピレネー山脈へと鳥見の旅が続く。スペインではランチが最も重要な食事で2時間ほどかけてじっくり楽しむのだが、我々も大体14時ごろになってようやくランチにありつく日々だった。はじめの頃は、何でこんな時間にランチなんだと若干イラついたが、ディナー



が21時過ぎ、朝食が8時くらいと、全てがおよそ2時間遅れであることに気づき、自らを制することに成功した。夜明けも6時過ぎだし、日没も21時半を回することを考えればなんと合理的ではないか。しかもセットメニューには大抵グラスワインがついてくる。ある田舎町のレストランではグラスで頼んだつもりが、ボトルがデンと出され大いに驚かされた（喜びもつかの間、全て飲んでしまったらその日の仕事はそれで終わってしまうので、泣く泣くグラスに2杯までとする）。宿泊はB&Bのプチホテル（ここは教会に隣接するなかなか素敵なお店だったが、毎時鐘がなるたびに起こされて安眠できなかつたのが残念だ）、修道院を改装した豪華ホテル（部屋も食事もすべてよかったが、翌朝6時ごろ庭で鳥見をもくろむも、巨大な木製のドアががっちり閉められており、しかも従業員はどこにも見当たらず、結局8時



まで外に出ることはできずじまい。朝食前にほんの少しの散歩しか楽しめなかった。ただ出発前にもう一度辺りの探索をしたところ大きなモリフクロウの親子に出会うことができた。この出会いのおかげで一気に幸せな気分になった）、ピレネーでは「アルプスの少女ハイジ」にでも出てきそうな「エーデルワイス」（ここでは日本人のトレッキングツアーグループと出会った）などなかなか多様性に富んでいた。

フランス国境近くのピレネー山脈中腹あたりにまで来ると、雪を頂いた山々が、筆舌を尽くしきれぬほどの美しさで私たちが歓迎してくれた。そこら中に咲き誇る高山植物、時々顔をのぞかせるマーモットなど、ピレネーの自然にたっぷり浸ることができた。ピレネーを後にし、再び南へと向かう。途上、スペイン内戦で廃墟となった村を目

の当たりにした。フランコ政権が容赦のない空爆を本格化させたため、石を積み上げた建物などひとたまりもなかったのだろう。このあたりの村は大抵丘の上に展開されており、中心に教会が位置しているようだ。急な石畳沿いに住居がひしめいた感じに作られている。敵からの攻撃が仕掛けにくいようになっていたとの説明だったが、フランスやドイツ、イギリスではあまり見かけたことがなかったような気がする。カタルーニャだからなのだろうか。そういえば街や村のあちこちで黄色いリボンをよく見かけた。独立賛成派が掲げているのだそうだ。カタルーニャとアラゴンの境界にある小川に架かる橋の上には、大きなハサミの絵が描かれていた。国民投票の後描かれたそうだ。この地の独立に関してはいろいろな意見があるのだろうが、心配していたほどの混乱はなく、無事に旅を楽しむことができた。

スペインの鳥見計画はある意味で失敗だったかもしれない。というのは一年前モンゴルゴビ砂漠を訪問したが、生態に似ているところが多いせい、見られる鳥の多くが重複していたのである。例えばヒゲワシやクロハゲワシなどのハゲワシや、岩場を好むサバクヒタキの仲間などである。もう一点、近年地中海沿岸では鳥のハンティングが大掛かりに行われており、鳥たちが全般的に神経質になってしまっていることである。このた

めカメラを持って近づくのがかなり難しい。またしても後悔先に立たず、である。とはいうものの最終的には155種を数える種を観察できそのうち50種は初めての出会いだった。ガイドのロバートに感謝。

既に記したようにロバートとは4年前に一度会っただけの仲である。4年前の会話で彼の奥さんがUNICEFだったと思うが、国際機関に勤務しており、その時点ではマレーシアに在住しているということだった。我々が帰国した直後、マレーシア航空機がウクライナ上空で砲撃された事件が起きた。彼女の無事をメールで問い合わせたことや、その後フェイスブックを通して繋がるなどしたことで、妙に親近感を覚えていた。今回の旅の最後の3泊は彼の家泊まらせてもらった。ほかの村と同じように、石畳の急坂に面したドアを開け階段を降りると、内部は意外と広いことに気づく。崖に張り付くように建てられた建物で、内壁と床、天井とも全て石造りだった。ここを拠点に、地中海に面したエプロデルタでバーディングを堪能した。また、スペイン

語でフィンカという農園を整備中で、そのコテージには彼がアフリカから持ち帰った巨大な木の根で作ったテーブルがしつらえてあった。現在はニトリ小屋を建設中だとのこと。

彼はかなりリベラルな考えの持ち主だが、一方で結構気が短いところもあり、ドライブ中も時々無礼な輩に出会うと、大きな声で罵ったりしていた。しかも英語で。多分スペイン語だと喧嘩になるのを恐れてだろう。ある日ランチに入った店で、不運なことに30人は超えると思われる子供たちの団体に遭遇してしまった。外国の子供の躰はよいものと、誤解していた我々には驚きの騒々しさで、ロバートの堪忍袋がぶちぎれた。別のグループの女の子を仲間と勘違いし、英語で（またしても）まくしたて始めた。女の子は事情が理解できないようで、ただひたすら「なんだ、このキチガイじじいは」といった雰囲気の中で彼を睨みつけていた（彼の名誉のために付け加えるが、暫くして自らの勘違いに気づいた彼は、いかにも気まずそうにその娘に詫びを入れていた。もちろん英

語で)。この店はおそらくロバートのお気に入り、遠方からのゲストである私たちを美味しいものでもてなそうと思っていた矢先が、この喧嘩だったため怒りが爆発したのだと思う。それにしても凄まじいまでのやかましきさだったので、小生もフェイスブックでライブを発信してしまったくらいである。何となく性格も似ているところがあるようだななんて思っていたが、彼がギャングに遭遇した時の武勇伝を聞いて、彼の半端なさを知った。3人組の若造が銃をちらつかせながら、双眼鏡を覗かせると脅してきたところ、軍隊経験のある彼は奴らに蹴りを入れて追い返したのだそうだ。家に戻って暫く経った後で、足が痛むので見てみたらなんと撃たれていたのだそうだ。その時の銃弾は取り除けなくて、今でも足に残っているのだそうだ。こんな度胸というか無鉄砲なところは、小生は持ち合わせていない。ただ、自然を愛し、不正を嫌い、人と群れるのをあまり好まない偏屈なところは似ていなくもない。残りの人生で再び出会う機会はないかもしれないが、フェ



イスブックなどのおかげでお互い近況を知ることはできる。良い友人であり続けたい。

さて最終日の午前中は地中海沿岸のドライブと鳥見を楽しみながらバルセロナ空港方面へ向かう。ロバートおすすめのレストランでランチの予定が、現地に到着すると跡形もないではないか。どうやら海辺の再開発に巻き込まれ、営業をやめたようだ。別のレストランを見つけ出したところ、ここがなかなか良いところだった。残念ながらかみさんは昨晚から胃の調子が不良で、折角のランチもいまいち楽しめなかったようだ。風光明媚な海岸線をぶち壊すセメント工場に出入りする大型トラックの恐怖と闘いながら、ピックアップ

トラックは空港へと向かった。十分に時間の余裕をもって空港に到着。ロバートと別れ、フランクフルト行きにチェックイン。フランクフルトでの乗り継ぎ時間は1時間45分と結構タイトなのだが、当の飛行機はなかなか離陸しない。またしてもフランスおよびスイス上空で雷が発生しており、我々の機はまたもや1時間遅れで離陸することになった。途上機長がドイツ訛りの早口で状況を説明するも(各コネクティングフライトの航空会社には遅れを伝えてあるようなことを言っていた)、不安があったためアテンダントに確認しに行ったが、ただ表示に従えの一点張り、隣の男性アテンダントが現地に着いたら電話をON

にすればショートメールが航空会社からくるだろうという。電話番号登録してあれば、の話だが。1時間遅れでタッチダウン。フランクフルト空港はだだっ広い。パスポートコントロールを終え、かみさんと超速足で羽田行きのゲートに向かい、ようやく間に合うことができた。トランジットの時間が短くなったのは不幸中の幸いだった。帰りの機内ではさすがに4本もの映画を見る気にはならなかったが、ケチ根性は大了たものでしっかりと2本を鑑賞しながら長いフライトを乗り切ったのである。

(日動協ホームページ、LABIO21カラーの資料の欄を参照)

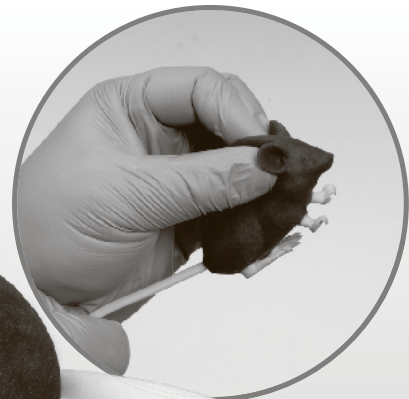
洗練された技術 理想への貢献

動物実験導入教育訓練用マウスシミュレータ

Mimicky Mouse

製品内容

ボディ：1体/尾1本
付属品：専用潤滑剤1本/ペーパーパウダー 1本



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_lab@sankeyolabo.co.jp

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

最新、
詳しい情報は
こちらで

www.sankyolabo.co.jp

私の研究

薬物依存になりやすいマウス

富山大学・大学院医学薬学研究部（薬学）・薬物治療学研究室
教授 新田 淳美

芸能人や元スポーツ選手、あるいは社会的地位のある政治家や医師が覚醒剤や大麻を使用する薬物事犯が頻繁に報道され、薬物乱用に対する国民からの注目度は非常に高い。我が国では、戦後から今世紀初頭までの約50年間にわたり、覚醒剤が反社会勢力団体の資金源であったことから、「覚醒剤・大麻＝悪＝さらに重要な犯罪につながる」と図式化され、国民も同様に受け止めていた。現在では、政府関係機関の力強い政策のおかげで、反社会的勢力の多くは一掃されたが、覚醒剤・大麻の乱用問題は引き続き残っている⁽¹⁾。

我が国では、覚醒剤や大麻の使用は犯罪であり、対象者は、法律で裁かれるべきであることは当然であるが、10年前までと比べて、その対象者の範囲が急激に変化している。今までは、『覚醒剤・大麻＝悪』で処理されてきた問題が、喫煙やアルコール依存と同様に、乱用薬物依存を疾病として捕らえ、予防・治療法の確立を目指すことが、我々、研究者の責務となることが近い将来に予想される。

しかしながら、原因が乱用薬物の摂取であることから、他の疾病とは区別して考えられ、治療法や治療薬の確立に繋がる基礎研究の実施が立ち遅れている。近年、精神疾患の診断基準に覚醒剤を

含む物質依存の項目が加わり、疾病としての認識が高まりつつあるものの、社会的な状況から、治療薬や治療法へ目が向き始めても、基礎研究が不十分で、依存形成メカニズムも解明されていず、モデル動物さえないのが現状である。

著者らは、覚醒剤依存の形成メカニズムを解明するために、DNAサブトラクション法を用いて、覚醒剤を連続投与したマウス脳側坐核で発現量が著しく増加している分子を見出した。Shati/Nat8l^(2,4)、Piccolo⁽⁵⁾およびTMEM168^(6,7)については、すでにマウスを用いた研究で薬物依存との関連を見出している。Shati/Nat8l^(2,3)とPiccolo⁽⁵⁾については、ドパミントランスポーターとの相互作用があること、TMEM168については、骨

基質タンパク質のオステオポンチンと相互作用があることが分かっており⁽⁶⁾、新たな薬物依存治療のターゲットを示す研究成果を得ている。本文では、これらの分子の中で、薬物依存についての研究が進んでいるShati/Nat8lについての解説を行い、Shati/Nat8lの遺伝子改変によるマウスについて紹介をする。

Shati/Nat8lは、私の所属する研究グループが名古屋にあったことから、金の鯨(しゃちほこ)にちなんでShatiと命名された⁽²⁾。後に、本分子には、N-acetyltransferase活性があり、aspartateとacetyl-CoAからN-acetylaspartate(NAA)を合成することが報告されたことから、Shati/Nat8lと表記することにした⁽⁸⁾(図1)。

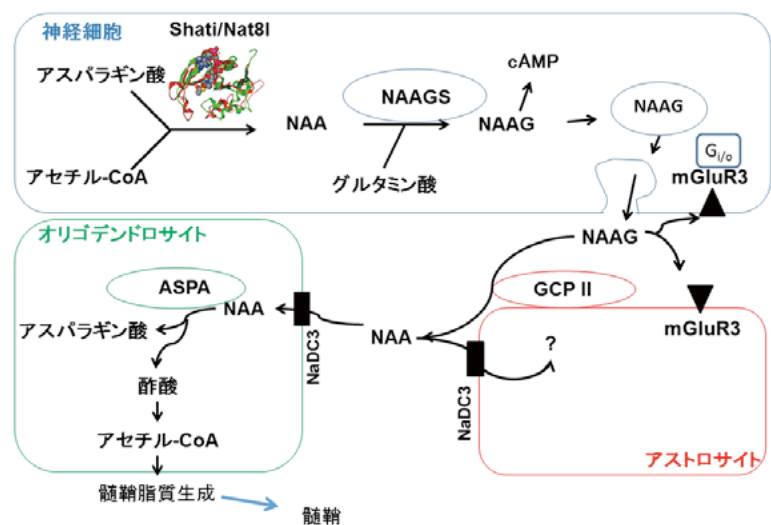


図1 Shati/Nat8lの脳細胞での生理機能のスキーム
NAA ; N -Acetylaspartate, NAAG ; N -Acetylaspartyl -glutamate
NAAGS ; NAAG 合成酵素, GCP II ; NAAG 分解酵素, ASPA NAA 分解酵素

本分子の機能を検討するために、Shati/Nat8lの遺伝子欠損マウスを作成した本マウスは末梢臓器では、糖代謝やエネルギー代謝に異常が見出され、肥満細胞の機能にも変化があるが⁽⁹⁾、通常に飼育している範囲では、体重の増加や寿命に差異は観察されなかった⁽¹⁰⁾。一連の行動薬理的な実験では、Shati/Nat8l遺伝子欠損マウスはワイルドタイプと比較して、社会性の低下が観察された⁽¹⁰⁾。また、本マウスでは、覚醒剤の1つであるメタンフェタミンへの嗜好性が高まっていることも分かった⁽¹¹⁾。覚醒剤に限らず乱用薬物の依存性を判断する簡便な方法として、条件付け場所嗜好性反応試験がある。これは、図2に示す黒白の2つのコンパートメントからなる箱へマウスを馴らした後、覚醒剤

を投与して白い箱に閉じ込める、翌日には、生理食塩水を投与して黒い箱に閉じ込めるという条件付けを3セット6日間繰り返す。覚醒剤と条件付けされた白い箱にマウスが滞在する時間が長くなることを利用し、嗜好性を観察するものである。Shati/Nat8l遺伝子欠損マウスでは、白い箱に滞在する時間がより一層長くなった⁽¹¹⁾。また、覚醒剤のような乱用薬物では、投与によってマウスの行動量が増加する。これに対しても、行動量の増加がShati/Nat8l遺伝子欠損マウスでは有意に大きくなった。また、これらの覚醒剤の作用は、ドパミン受容体D1の拮抗剤で抑制された⁽¹¹⁾。このようにShati/Nat8lは、覚醒剤依存になりやすいマウスといえる。

上述したShati/Nat8l遺伝子欠

損マウスは、全身で遺伝子欠損をしており、オリゴデンドロサイトの形成不全による髄鞘形成の遅延があり、成人期での衝動性の増大や社会性の障害もある⁽¹²⁾。このように、全欠損のマウスでは、発達期や脳内サーキットが変化している可能性、また、代償的に他の機能が亢進している可能性もある。そこで、我々は自治医科大学・神経内科学・村松慎一教授にアデノ随伴ウイルス(AAV)ベクターの作成をお願いし、薬物報酬系に最も重要と考えられている側坐核での発現調節を試みた。AAVベクターは、パーキンソン病の治療や遺伝性の希少疾患への治療に臨床的に用いられている安全性の高いものである。また、マウスの寿命である2年間にわたって、発現が安定して増強している。一般的な遺伝子導入では、細胞増殖能のない神経細胞への発現は難しいことが多いが、本ベクターのプロモーターを工夫することにて、神経細胞特異的に導入することが可能である。図3に示すように、マイクロシリッジを用いて、側坐核への注入を行った。3~4週間後から、行動実験に用いる。これは、AAVベクターによって誘導されるタンパク発現量が一定になるのに、最低3週間はかかることからである。本マウスで、覚醒剤メタンフェタミン投与による場所嗜好性試験や行動量の増加を調べたところ、メタンフェタミンの作用が弱まることが分かった⁽¹³⁾。これらのことから、Shati/Nat8lを全身で発現欠損させた「依存になりやす

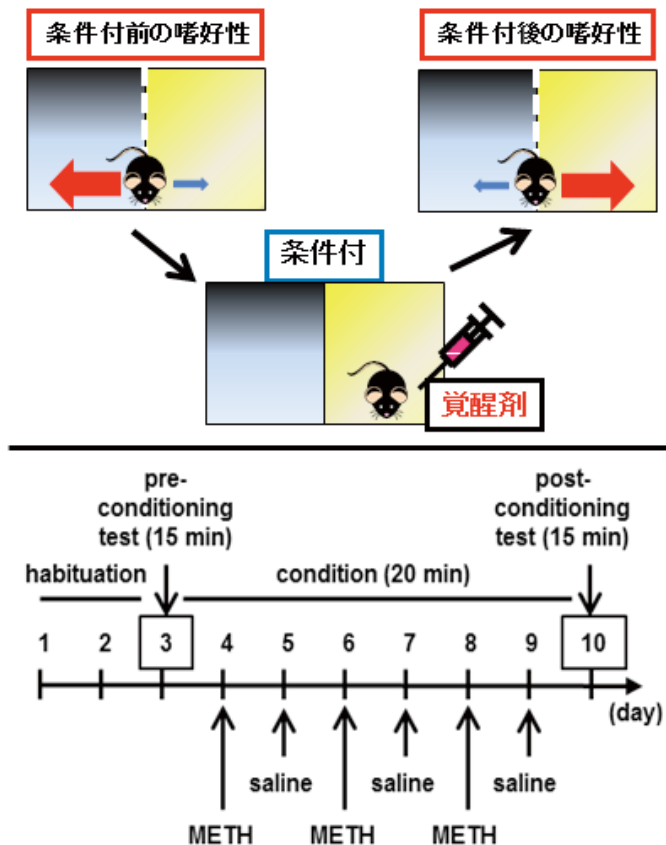


図2 場所嗜好性試験の装置と手順概略図

いマウス」は、側坐核での発現欠損が重要な役割を担っていることを示した。また、これらの、メタンフェタミンの作用の抑制には、図1でしめしたようにNAAがN-Acetylaspartyl-glutamate (NAAG)となり、これは、GluR3のアゴニストであることが分かっている。AAVによって、側坐核で Shati/Nat8l の発現量を増加させ、覚醒剤への嗜好性や運動量亢進の抑制を GluR3 のアゴニストである LY341495 を末梢投与することでキャンセルできることを示している⁽¹³⁾。

覚醒剤メタンフェタミンを連続投与したマウスの側坐核では、Shati/Nat8l の発現量が有意に増加するが、そのメカニズムには、プロモーター部位の CREB の活性化や遺伝子のメチル化が変化していることが含まれることも我々は明らかにしている^(14,15)。また、覚醒剤乱用患者でも同様のことがおこっていることを見出している(楠井ら 未公表データ)。

本稿で紹介をした Shati/Nat8l 遺伝子欠損マウスは、依存になりやすいマウスであり、今後、需要が高まる薬物依存治療薬や治療法確立に向けての研究に活用されることが期待される。

引用文献

- 1) 覚醒剤事犯の再犯率及び検挙人員の年齢別構成比 (平成17年~26年) <http://www.npa.go.jp/hakusyo/h27/honbun/excel/rfz00190.xls>
- 2) Niwa M, Nitta A, Cen X, Kitaichi K, Ozaki N, Yamada K, Nabeshima T. A novel molecule 'shati' increases dopamine uptake via the induction of tumor necrosis factor- α in pheochromocytoma-12 cells. *J Neurochem.* 2008;107(6):1697-1708.

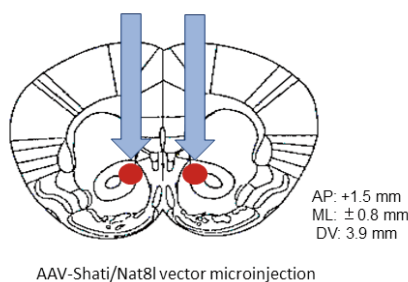


図3 AAVベクターの側坐核への注入概略図

- 3) Niwa M, Nitta A, Mizoguchi H, Ito Y, Noda Y, Nagai T, Nabeshima T. A novel molecule "shati" is involved in methamphetamine-induced hyperlocomotion, sensitization, and conditioned place preference. *J Neurosci.* 2007;27(28):7604-7615.
- 4) Miyamoto Y, Ishikawa Y, Iegaki N, Sumi K, Fu K, Sato K, Furukawa-Hibi Y, Muramatsu S, Nabeshima T, Uno K, Nitta A. Overexpression of Shati/Nat8l, an N-acetyltransferase, in the nucleus accumbens attenuates the response to methamphetamine via activation of group II mGluRs in mice. *Int J Neuropsychopharmacol.* 2014;17(8):1283-1294.
- 5) Cen X, Nitta A, Ibi D, Zhao Y, Niwa M, Taguchi K, Hamada M, Ito Y, Wang L, Nabeshima T. Identification of Piccolo as a regulator of behavioral plasticity and dopamine transporter internalization. *Mol Psychiatry.* 2008 ;349, 4514-4563.
- 6) Fu K, Miyamoto Y, Otake K, Sumi K, Saika E, Matsumura S, Sato N, Ueno Y, Seo S, Uno K, Muramatsu SI, Nitta A. Involvement of the accumbal osteopontin-interacting transmembrane protein 168 in methamphetamine-induced place preference and hyperlocomotion in mice. *Sci Rep.* 2017; 7(1):13084.
- 7) Fu K, Miyamoto Y, Sumi K, Saika E, Muramatsu SI, Uno K, Nitta A. Overexpression of transmembrane protein 168 in the mouse nucleus accumbens induces anxiety and sensorimotor gating deficit. *PLoS One.* 2017;12(12): e0189006.
- 8) Ariyannur PS, Moffett JR, Manickam P, Pattabiraman N, Arun P, Nitta A, Nabeshima T, Madhavarao CN, Nambodiri AM. Methamphetamine-induced neuronal protein NAT8L is the NAA biosynthetic enzyme: implications for specialized acetyl coenzyme A metabolism in the CNS. *Brain Res.* 2010;1335:1-13.
- 9) Pessentheiner AR, Pelzmann HJ, Walenta E, Schweiger M, Groschner LN, Graier WF, Kolb D, Uno K, Miyazaki T, Nitta A, Rieder D, Prokesch A, Bogner-Strauss JG. NAT8L (N-acetyltransferase 8-like) accelerates lipid turnover and increases energy expenditure in brown adipocytes. *J Biol Chem.* 2013;288(50):36040-36051.
- 10) Furukawa-Hibi Y, Nitta A, Fukumitsu H, Somiya H, Toriumi K, Furukawa S, Nabeshima T, Yamada K. Absence of SHATI/Nat8l reduces social interaction in mice. *Neurosci Lett.* 2012; 526(2):79-84.
- 11) Toriumi K, Kondo M, Nagai T, Hashimoto R, Ohi K, Song Z, Tanaka J, Mouri A, Koseki T, Yamamori H, Furukawa-Hibi Y, Mamiya T, Fukushima T, Takeda M, Nitta A, Yamada K, Nabeshima T. Deletion of SHATI/NAT8L increases dopamine D1 receptor on the cell surface in the nucleus accumbens, accelerating methamphetamine dependence. *Int J Neuropsychopharmacol.* 2014;17(3):443-453.
- 12) Sumi K, Uno K, Noike H, Tomohiro T, Hatanaka Y, Furukawa-Hibi Y, Nabeshima T, Miyamoto Y, Nitta A. Behavioral impairment in SHATI/NAT8L knockout mice via dysfunction of myelination development. *Sci Rep.* 2017;7(1):16872.
- 13) Miyamoto Y, Ishikawa Y, Iegaki N, Sumi K, Fu K, Sato K, Furukawa-Hibi Y, Muramatsu S, Nabeshima T, Uno K, Nitta A. Overexpression of Shati/Nat8l, an N-acetyltransferase, in the nucleus accumbens attenuates the response to methamphetamine via activation of group II mGluRs in mice. *Int J Neuropsychopharmacol.* 2014 ;17(8):1283-1294.
- 14) Uno K, Miyazaki T, Sodeyama K, Miyamoto Y, Nitta A. Methamphetamine induces Shati/Nat8l expression in the mouse nucleus accumbens via CREB- and dopamine D1 receptor-dependent mechanism. *PLoS One.* 2017;12(3): e0174196.
- 15) Uno K, Kikuchi Y, Iwata M, Uehara T, Matsuoka T, Sumiyoshi T, Okamoto Y, Jinno H, Takada T, Furukawa-Hibi Y, Nabeshima T, Miyamoto Y, Nitta A. Decreased DNA methylation in the Shati/Nat8l promoter in both patients with schizophrenia and a methamphetamine-induced murine model of schizophrenia-like phenotype. *PLoS One.* 2016;11(6): e0157959.

(日動協ホームページ、LABIO21カラーの資料の欄を参照)

実験動物用X線CT ラシータ LCT-200のご紹介

株式会社日立製作所 木村 真輔

1. はじめに

X線コンピュータ断層撮影法(X-ray Computed Tomography)に基づくX線CTは英国EMI社により1973年に初めて商品化されました。非破壊で内部を見る事ができるため、医用装置として急速に全世界に普及し、今では各種疾病診断に不可欠な装置として定着しています。また、医用以外にも産業用としても利用されています。産業用のX線CTには、エンジン内部をみる高い透過力を有する装置や、小型電子部品をみるナノサイズの画素分解能を有する装置があります。

本誌で紹介する実験動物用X線CT ラシータLCT-200(株式会社日立製作所:Latheta LCT-200)は、マウス、ラットなどの実験動物を対象にした装置です。フォーカスサイズの小さいX線管や高感度検出器を採用し、マルチスライス撮影や高分解能撮影を実現しました。低コントラスト組織や微細構造を描出することができます。また撮影したデータを用いた様々な解析ツールを有しています。

2. 利用研究分野

実験動物用である本装置は、研究支援を目的とした装置です。研究支援の装置は形態観察だけでなく、経時的な変化を定量的に示す必要があると考えています。本装置には骨計測、面積/体積計測、体脂肪計測などの計測機能が備わっています。実験動物の分野でX線CT装置を使用するメリットとして、非侵襲的な測定、同一固体の経過観察、動物購入費/管理費の低減、実験の省力化などが挙げられます。本装置の利用が期待される研究分野は広範囲にわたります。

※本装置は医療機器ではないので病院等での診断には使用できません。

【装置の利用が期待される研究分野】

薬理研究/薬剤開発/抗肥満薬/骨粗鬆症治療薬/糖尿病治療薬/血糖値降下薬/抗がん剤/抗リウマチ剤/動脈硬化/高血圧治療薬/骨折治療促進剤/変形性関節治療薬/骨再生薬/開胸治療促進剤/慢性腎不全治療薬/(糖尿病性)腎症治療薬/筋ジストロフィー治療薬/多発性筋炎治療薬/腎結石の有無判定/毒性試験/腎結石の有無判定/寄生虫の有無判定/肥満モデル動

物の作成/検証/骨粗鬆症モデル動物の作成/検証/ダイエット食品/各種サプリメント/カルシウム添加食品/飲料・乳製品、等。

3. 実験動物用X線CT ラシータ LCT-200の概要

ラシータ LCT-200は、コンパクトな装置です(図1)。

- 1) 検体に合わせて、4段階・5種類の固定具を有します(図2)。
- 2) 下記の計測機能を備えています。
 - ・骨密度計測機能(骨密度関連、形態計測関連、力学的指標関連)
 - ・距離計測機能・面積計測機能・体積計測機能・体脂肪率計測機能
 - ・内蔵脂肪/皮下脂肪弁別計測機能・脂肪肝計測機能・ヒストグラム計測機能
- 3) 撮影機能:呼吸同期撮影、心拍同期撮影、ダイナミックスキャン
- 4) 外形寸法:約74cm(幅)×約116cm(奥)×約116cm(高)
- 5) 電源・消費電力:AC100V、本体400VA以下
- 6) 重量:約220kg
- 7) 構成
装置本体、制御/解析装置、固定具:1式、ファントム:1式



図1：本体



図2：固定具

右下から
 摘出用固定具、マウス用固定具、ラット用固定具 肥満ラット用固定具
 ※オプションで小型ラビット用固定具があります。

4. 撮影方法

ラシータ LCT-200を用いた撮影の流れについて概説します。

1) 電源投入後に装置の校正を実施します。

2) 検体の準備

麻酔:動物の安静や体動抑制のため必須です。

造影剤:血管の撮影時に静脈投与します。

3) スカウト撮影(図3)

二次元X線透過画像(スカウト画像)を撮影します。この画像に基づいてX線CT撮影の開始/終了位置を決定します。

4) X線CT撮影の開始(図4)

リアルタイムで断層画像が表示されます。

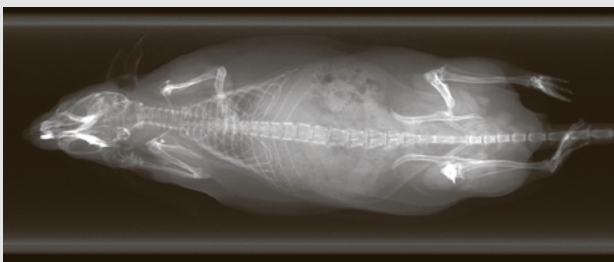


図3：スカウト画像

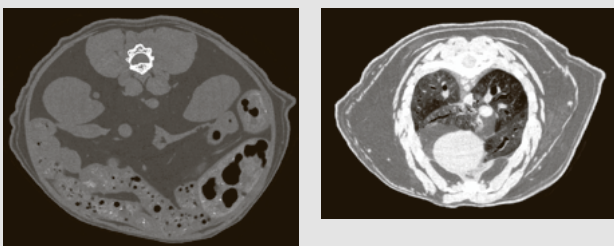


図4：断層画像

5. 解析方法

ラシータ LCT-200を用いた各種解析について概説します。

1) 骨密度計測機能(図5)

28のパラメータ(骨面積、骨体積、骨密度、骨塩量、骨幅、皮質骨厚、面積比率、最小断面2次モーメント、断面2次極モーメント等)を計測します。

付属の摘出骨アダプターを用いると1度に4本同時に撮影できます。断層撮影範囲数を変更すると最大60本まで撮影する事ができます。(図6)

2) 面積/体積解析/ヒストグラム解析

設定した任意のCT値範囲で面積、体積を計測します(図7)。また、解析結果からCT値と画素数の関係を示すヒストグラムデータで出力できます(図8)。肺や肝臓などの臓器の変性を数値化して解析します。

3) 体脂肪率計測機能(図9)

脂肪と筋肉を自動で分別し、筋肉量、脂肪量、平均CT値、脂肪率を計測します。

4) 内臓脂肪・皮下脂肪弁別計測機能(図10)

内臓脂肪、皮下脂肪、筋肉を自動で分別し、内臓脂肪量、皮下脂肪量、筋肉量、脂肪量、平均CT値、脂肪率を計測します。

5) 脂肪肝計測機能(図11)

脾臓(筋肉)、内臓脂肪(脂肪)、肝臓のCT値より、脂肪肝の進行を示すCT値比と肝臓内脂肪率を計測します。

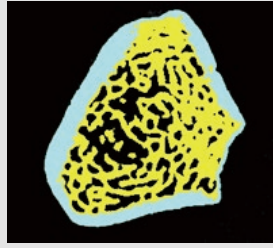
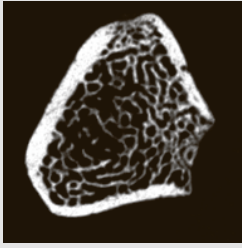


図5：骨密度計測例

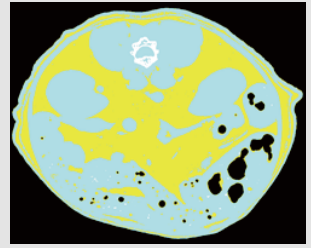
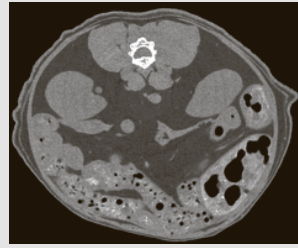


図9：体脂肪率計測例



図6：抽出骨用アダプター

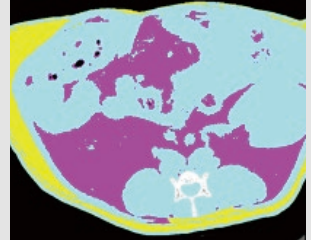
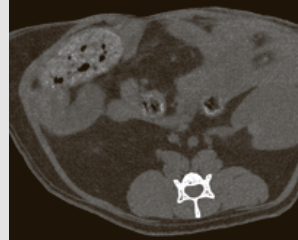


図10：内臓脂肪・皮下脂肪弁別計測例

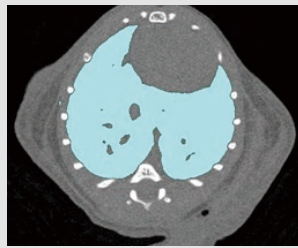
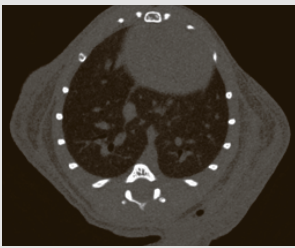


図7：肺部の体積解析例

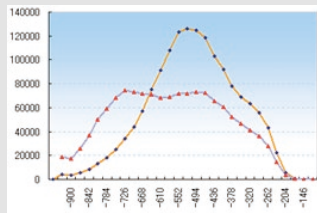


図8：ヒストグラム出力例

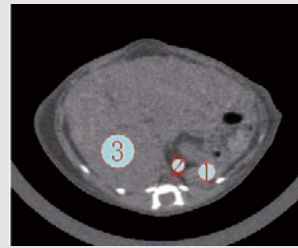
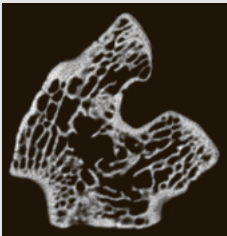
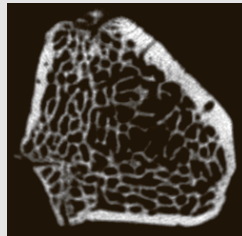
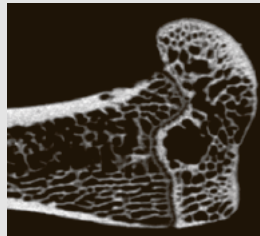
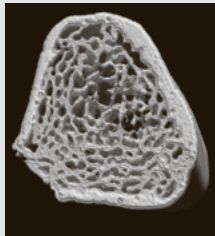


図11：脂肪肝計測例

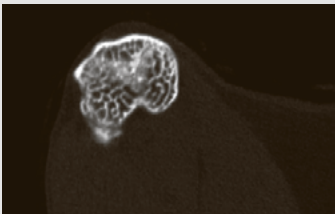
6. 撮影例



ラット抽出骨



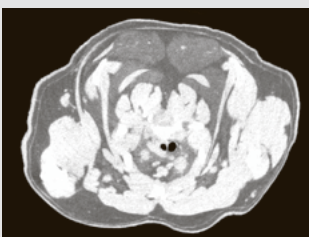
3D画像(オプション)



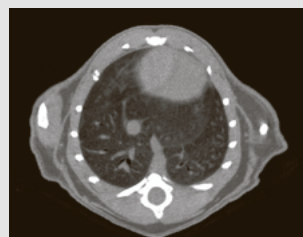
生体 下肢



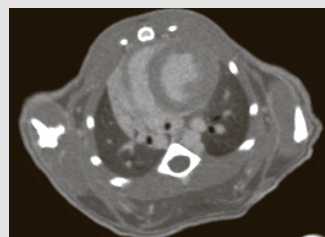
筋壊死 造影画像



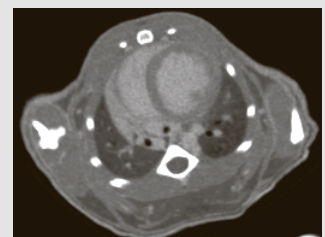
マウス褐色脂肪



マウス 肺



マウス 心臓(収縮期)



マウス心臓(拡張期)

※ラシータ、Lathetaは株式会社日立製作所の登録商標です。

(日動協ホームページ、LABIO21カラーの資料の欄を参照)

感染症診断・予防実技研修会（モニタリング研修会）では、総合討論の場において受講生から様々な質問を頂きます。今回は、平成29年度の研修会において頂いた質問とそれに対する回答を紹介します。

Q1：*Corynebacterium bovis*は、国内での感染はどの位確認されているのでしょうか？検査で使用する培地検査部位（ヌードの場合、有毛の場合）を教えてください。

A2：*Corynebacterium bovis*は、病原性別微生物カテゴリーDに属する日和見病原体です。nude、scidそしてNOG等の免疫不全マウス・ラットに、フケ（鱗屑）をともなった皮膚炎（俗称：粉吹き症）を起こすことが知られています。皮膚炎は発症後7～10日で治癒しますが、感染個体は長期間本菌を排泄します。国内の汚染率は、本菌の全国的な汚染調査がされていないことから不明ですが、前記の症状を示す個体からは高率に検出されます。検査は、有毛、無毛に関わらず被毛、皮膚の拭き取り材料を血液寒天培地に塗抹し、コロニー発育の有無を観察します。グラム陽性桿菌で、市販の同定キット（apiコリネ、ピオメリュー・ジャパン（株））で同定できます。またPCRでも検査可能です。本菌は、免疫正常動物の常在菌で有ることが多く、感染防御にはこれら動物との同居を避けることが重要です。また長期間クリンナップしていない動物室では、空中に浮遊している可能性があり、この様な部屋に免疫不全マウスを導入、飼育開始後発症したという経験があります。

参考資料：

- ①（公財）実験動物中央研究所ICLASモニタリングセンターHP
- ②「*Corynebacterium bovis*によるげっ歯類の皮膚炎について」実験動物ニュース、Vol.63, No.2, 2014

Q2：無菌動物の無菌試験の培地は何を使用していますか？

A2：無菌動物の無菌試験は、1972年に日本実験動物研究会（現在の日本実験動物学会）の「無菌試験の基準に関する委員会」が提案した方法を元に現在も行われています。使用培地は、好嫌気性菌検出のために臨床用チオグリコレート培地（TG）と真菌検出用にポテトデキストロース寒天培地（PD）が使われています。検査材料は、糞便、使用床敷そしてビニールアイソレータ内拭き取り綿棒です。糞便と床敷をそれぞれTG（37℃、2週間培養）とPD（25℃、2週間培養）にそして拭き取り綿棒はPD（25℃、2週間培養）に摂取し菌の発育の有無を観察します。また同時に、糞便のグラム染色標本を作成、鏡検し、生菌の有無を観察します。

参考資料：「無菌動物の無菌試験法について」実験動物、21（1）、1972



『小さき生きものたちの国で』

中村 桂子 著者

青土社 1,800円+税

20世紀後半の高度成長の最中に生まれ育ったものにとって、本書を自分史と並べて読むことで、自分たちの過去の行動に対する素朴な疑問と今も求められている責務が何か、そして意識の変革に心を動かされる内容でした。

これまでの自分が歩んできた生き方について、生命の本質を研究してきた著者が現代の地球を取り巻く社会環境を振り返り、我々に問いかけるもので、現代を作り上げたその歴史背景を知るものに対して、今何を考えなければならないのか。現代が抱える問題点を著者の「人間はいきものであり、自然の一部である」という視点に立って鋭く突きつけるものがあります。

おこがましい話ですが実験動物と一緒に時間を過ごした自分の歴史を振り返るきっかけを与えてくれました。そして、これまでを振り返り、今、若い世代の人たちの言動や行動を受けて、彼らに未来への希望をどの様に持てと言えるのか。また、将来への不安を抱くのではなく、科学の進歩や技術開発の発展を信じると言えるのか。この疑問に

対する答えは、「我々が二十一世紀の世界について思い描いているのか」という投げかけることであると著者自身の自分史と社会背景を踏まえて綴っている。そして、その結論が「科学の進歩、発展を夢見て描いてきた現代文明が地球という器に対して、あまりの過剰を求める文化になっていた」と切実な課題として取り上げている。しかし、著者はこれまでの科学技術の発展がもたらした功績は認め、否定はしていませんが、研究者や社会が全て同じ方向に進むことは問題であるとしています。子供こそ未来であり、いきものは機械ではなく“自然と生き続ける”（持続可能性 sustainability）ことが生命体としての特徴であるからこそ、自分が生き物であるという実感を持ちながら生きることが必要であり、これまでの進歩と発展の陰で失われたものがあることに気づき、いきものこのことをもっと知りたいという思いをめぐらすことを求めています。

我々は、グローバルについて、自分たちは世界の趨勢がこれだ

と見据えながら異口同音に唱え、成長こそが現代社会であり、これからの将来についても必要であると、選択と集中に徹し、目の前の利益を追求してきた。しかし、著者は「そこは新しい技術の発展により利便性とお金に価値を置く社会になっている。」と警鐘している。

生命の起源、歴史を知り、「地球を意識」し、これからの地球の未来を考える事が必要であり、地球に最後に登場した人間だからこそその生き方を考えて行かなければならない事が示されています。行き過ぎたこれまでの生き方を考え直し、これからの二十一世紀での生き方について、小さいいきものである一個の人間ですが、地球を意識して考えることで、自分史を見直し、科学技術の発展の陰で消えていったものについて想像すること、そして、そのためには時間をかけることが重要であると思います。

〔選・評 森村 栄一〕

東北動物実験研究会

東北動物実験研究会
会長 三好 一郎

東北動物実験研究会は、研究者と技術者が相互に実験動物及び動物実験に関する知識、技術、その他有力な情報を交換する事により、東北地方における実験動物学の発展、並びに適正な動物実験の啓蒙に寄与することを目的として設立されました。地方の実験動物関係の集まりとしては比較的新しく、当時の東北大学医学部教授・信永利馬先生を中心として、平成4年4月同医学部長陵会館で東北地区動物実験施設懇談会として第1回、さらに同年11月奥羽大学歯学部（郡山市）で行われた第2回の開催を経て東北動物実験研究会（以下、研究会）へと名称を変更し現在に至っています。

本研究会は、現在東北6県を中心に47名の会員、並びにご協賛頂いている14社の賛助会員の皆様と支えられて活動しております。主な活動は、研究会の運営を担う幹事（役員）を中心に毎年開催している講演会で、今年で29回を迎えました。研究会では、動物実験並びに実験動物に関するテーマを軸に幅広い話題を取り上げ、研究・教育あるいは事業に携わる者が業種の枠を超えて相互の情報共有を図り、知識・技術の向上を通して医学生命科学の発展に貢献することを念頭に、特別講演、及び一般講演、意見交換（懇親）会を企画します。主に幹事の所属する機関で開催されることから、各々の研究の特徴を生かした講演に加えて、東北各地の特色を反映した意見交換会が催されており研究会の魅力・求心力を高めています。また、本研究会は、日本実験動物技術

者協会（以下、実技協）奥羽・東北支部の皆様との交流に重きを置いており、平成6年に福島県立医科大学にて開催された第5回研究会以降は講演会を共催しています。さらに、平成11年からは、研究会の翌日に実技協奥羽・東北支部合同勉強会（現在は、実験動物技術研究交流大会）を開催することを恒例とし、連携をより深めて今日に至ります。

平成23年3月、東北地方は東日本大震災による大きな被害を受けました。しかし、既に11月には、実技協奥羽・東北支部との共催により「動物実験フォーラム2011 in 福島」と銘打った第22回研究会が福島県立医科大学にて大々的に開催され、会員の高い資質能力や向上心、結束力に加えて復興に向けた強固な意思が示されました。また、第25回研究会は、恒例の東北実験動物技術交流大会のみならず日本実験動物学会が主催する第3回 実験動物科学シンポジウムと併せて「先端研究と動物実験-適正技術と動物実験倫理-」を総合テーマとした大規模な記念大会として山形で開催され、研究会設立時より中心的に牽引下さった諸先生方から、次世代に課せられるべく質の高いメッセージが発信されました。

本年1月、設立時より監査・役員として本研究会の発展にご尽力下さって下さいました東北医科薬科大学教授・安藤隆一郎副会長がご逝去されました。本稿を閉めるにあたり、これまで賜りました温かいご指導に感謝するとともに、謹んでご冥福をお祈りいたします。



第29回東北動物実験研究会（平成30年7月福島県立医科大学）

岡山実験動物研究会の紹介

岡山実験動物研究会
会長 国枝 哲夫

岡山実験動物研究会は1982年に設立されてから今年で36年間の歴史を持ちます。設立当初より岡山大学、川崎医科大学、ノートルダム清心女子大学、林原生物科学研究所、重井医学研究所などの県下の大学、研究機関の方々が中心となって本研究会は運営され、岡山県およびその周辺の実験動物に関わる多くの研究者や技術者が参加してきました。会員数は現在では80名にのぼり、上記の当初からの大学、研究機関以外にも、岡山理科大学、就実大学、倉敷芸術科学大学、岡山県立大学、(株)クラレ、(株)エイチ・エス・ピーなど県下の多くの大学、研究機関、企業等の方が会員となられており、ほぼ全県を網羅する体制となっています。

研究会の活動の中心は毎年2回される研究会例会であり、現在に至るまでに計75回が開催されています。例会では毎回、記念講演、特別講演が企画され、実験動物学や関連分野で活躍されている方を招いて講演いただいています。特に、これらの講演では直接実験動物学に関連した分野にとどまらず、広く生物学に関連した様々な分野の方からの講演をいただいています。これまでに、たとえばモンゴルにおける恐竜化石の発掘調査や、アユモドキという岡山固有の淡水魚の保護など、多彩な分野の研究や活動の紹介をいただいています。これは岡山実験動物学研究会の活動の特徴の一つであり、広く他分野の方々と交流を深めることで、会員の今後の研究の発展に役に立てようという趣旨によるものです。一般講演は主に会員からの研究発表が中心であり、研究者だけでなく、実験動物技術者あるいは学生や大学院生が研究成果を発表する場となっています。また、2014年には岡山大学の頭脳循環プログラムとの共催により米国ジャクソン研究所の研究者を招いての国際シンポジウムを開催し、2015年には日本実験動物学会との共催により第4

回実験動物科学シンポジウムを開催するなど、関連した団体等との共同企画も積極的に行っています。

研究会例会の開催とともに、研究会報の発行も研究会の活動にとって重要な位置を占めています。毎年発行される「岡山実験動物研究会報」は現在までに35号を発行するにいたっています。研究会報では毎号、会員から投稿された研究論文などに加えて、全国の動物実験施設の紹介記事や、各地域の研究会活動の紹介の記事を掲載しています。また、会報では賛助会員による広告も無料で掲載していますが、これらは単に商品の広告に留まらず、賛助会員と一般会員の間をつなぐ場として活用されています。さらに、研究会報に掲載された論文等はオンライン上で公開され、研究会のホームページからも閲覧することができますが、これらは会員の研究成果を広く普及する上でも貢献していると考えています。

最後に、中国・四国地方には国立大学の動物実験施設を中心に、数多くの実験動物に関連する研究機関がありますが、残念なことに岡山実験動物研究会以外には実験動物に関する地域の研究会はないのが現状です。動物実験に対する社会の目がますます厳しくなる中で、動物実験の適正な実施のためには動物実験に関わる者のあいだでの日常的なきめ細かい情報交換が必要と思われ、岡山実験動物研究会では、今後も広く近隣県の実験動物に関連される方々とも情報交換に努めていきたいと考えています。



創立30周年記念 第64回岡山実験動物研究会例会における記念講演演者と会員の集合写真(2012(平成24)年11月30日 於:ピュアリティまきび)

日本実験動物学会の動き

平成30年度(公社)日本実験動物学会 維持会員懇談会

日 時：2018年11月16日(金)11:00～(展示会)、13:00～(講演会)

場 所：中央大学 駿河台記念館
〒101-8324 東京都千代田区神田駿河台3-11-5

内 容：講演会「医薬品開発の成功確率を上げるために」
話題提供「Zebrafishの品質管理」

参加費：講演会・展示会(無料)、意見交換会(5,000円/人)

第11回実験動物管理者等研修会の開催

日 時：平成31年2月12日(火)～13日(水)

場 所：東京大学農学部3号館4階会議室
〒113-8657 東京都文京区弥生1-1-1

参加費：4000円(会員)、5000円(非会員である維持会員団体職員)、6000円(非会員)

定 員：120名

その他：受講者には資料を配布、受講修了証を発行

主 催：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

プログラムや参加方法等の案内は本学会ホームページ(<https://www.jalas.jp/>)に掲載します。

第66回日本実験動物学会総会の開催

テーマ：「Beyond Diversity ～多様性を超えて～」

日 時：2019年5月15日(水)～17日(金)

会 場：福岡国際会議場
〒812-0032 福岡県福岡市博多区石城町2-1

大会長：小野悦郎(九州大学大学院医学研究院実験動物分野)

内 容：特別講演、シンポジウム、一般演題(口演・ポスター)
LASセミナー、市民公開講座、器材展示、情報交換会等

事務局：第66回日本実験動物学会総会事務局
〒810-0072 福岡市中央区長浜1-1-35 新KBCビル4階

(株)JTBコミュニケーションデザイン

ミーティング&コンベンション事業部内

TEL：092-751-3244 FAX：092-751-3250

E-mail：jalas66@jtbcom.co.jp

開催案内は大会URL(<https://jalas66.org>)をご参照ください

日本実験動物技術者協会の動き

関東支部

講習会等	期 日	場 所	テーマ
中動物部会： イヌの取り扱いと 実験手技基礎	10/19～10/20(金～土)	慶應義塾大学(新宿区)	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
中動物部会： 第34回サル講演会	2019/1/26(土)	慶應義塾大学(新宿区)	実験用サル類に携わる技術者へ、有益な情報を企画中
実験動物福祉部会： 講演会等	2019/2/9(土)	東京都健康長寿医療センター(板橋区)	動物看護学から観る実験動物福祉
第44回懇話会	2019/3/16(土)	日本科学未来館(江東区)	懇話会テーマ：技術者の研究に対する意識を深め、熱意を引出す内容のシンポジウムを企画。他、一般演題、ランチョンセミナー等 懇話会会長：野田義博(東京都健康長寿医療センター)

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
実験動物実技講習会	11月10日(土)	中部大学(愛知県春日井市)	2級試験対策を中心とした講習会
技術交流会	平成31年1月下旬頃	藤田保健衛生大学(愛知県豊明市)	特殊手技やそれに伴う機器のデモンストレーション

詳細は東海北陸支部ホームページ(<http://www.jaeat-tokehokuriku.org/>)を参照ください。

関西支部

講習会等	期 日	場 所	テーマ
平成30年度ウサギ・ モルモット上級技術講習会	10月20(土)～21日(日)	大阪府立大学りんくう キャンパス(大阪府 泉佐野市)	実験動物一級技術者レベルのウサギ、モルモット実技講習
平成30年度実験用ブタの取り 扱い手技(入門)講習会	平成31年1月26日(土) ～27日(日)	岡山大学自然生命科学研 究支援センター動物資源 部門(岡山市)	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現場での実践で役立つ技術を学ぶ。

詳細は、(一般)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。

平成30年度認定 実験動物技術指導員及び準指導員

技術指導員認定（準指導員から指導員に認定） 4名

菊池 勇	第一三共（株）
三澤 英徳	北山ラベス（株）

清水 悠創	オリエンタル酵母工業（株）
高木 優一	大塚製薬（株）

技術指導員認定 10名

浅野 雅秀	京都大学医学研究科附属動物実験施設
成瀬 智恵	京都大学医学研究科附属動物実験施設
倉岡 睦季	日本獣医生命科学大学
堀井 渉	日生研（株）
俣野 真帆	京都大学ウイルス・再生医科学研究所

山田 鉄矢	（株）日本バイオリサーチセンター
玉井 邦明	（株）エーテック
堀越 円	（株）アニマルケア
村上 純太	（株）ヤクルト本社中央研究所
花輪 俊宏	湘央生命科学技術専門学校

技術準指導員認定 9名

小倉 智幸	（公財）実験動物中央研究所
何 裕遙	（公財）実験動物中央研究所
水澤 卓馬	（公財）実験動物中央研究所
長澤 翼	（株）アニマルケア
草野 かおり	Axcelead Drug Discovery Partners（株）

池田 元太	シミックファーマサイエンス（株）
関口 路子	（一財）ふくしま医療機器産業推進機構
田中 大介	（株）ケー・エー・シー
半田 圭佑	（株）LSIメディエンス熊本安全性研究部

Göttingen Minipigs™



- ◆ Global Standard
- ◆ 大人しい、賢い、緩やかな体重曲線
- ◆ ヒトへの外挿性が高い
- ◆ 厳密な遺伝管理
- ◆ Technical & Scientific support



- ・飼育用器材、ハンドリング用器材
- ・実験動物用飼料
- ・生体試料
- ・受託飼育
- ・トレーニングサービス
- ・受託試験

お気軽にお問い合わせください



オリエンタル酵母工業株式会社

バイオ事業本部ライフサイエンス部
〒174-8505 東京都板橋区小豆沢三丁目6番10号
TEL：03-3968-1192 FAX：03-3968-4863

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1回教育・認定委員会	30.7.3	研修会の計画等について他
試験問題作成小委員会	30.7.7	1級、2級技術者学科試験問題の作成
微生物モニタリング技術研修会	30.7.13～14	(公財)実験動物中央研究所
第2回モニタリング技術委員会	30.7.25	衛生管理に不可欠な消毒薬に関する情報収集と今後のまとめ方について他
実験動物2級技術者学科試験	30.8.5	全国14か所
通信教育スクーリング(東京、京都)	30.8.25～26	日本獣医生命科学大学、京都大学
実験動物基本実技研修会(2級及び1級水準)	30.8.25～26	日本獣医生命科学大学
第1回実験動物福祉委員会	30.9.3	日動協の「実験動物の福祉に関する指針並びに運用の手引き」の見直し他
第1回試験採点・合否判定小委員会	30.9.4	実験動物2級技術者学科試験及びスクーリング修了試験の判定
実験動物高度技術者研修会(白河研修会)	30.9.10～14	(独)家畜改良センター中央畜産研修施設
実験動物1級技術者学科試験	30.9.15	全国7か所
第1回生産対策委員会	30.9.21	実験動物生産に係る意見交換他

2. 行事予定

行事	開催日	備考
サル類実技研修会	30.10.27	日本獣医生命科学大学
ウサギ及びブタ実技研修会	30.10.27～28	日本獣医生命科学大学
実験動物2級技術者実技試験	30.11.24	日本獣医生命科学大学、京都大学
実験動物1級技術者実技試験	30.11.25	日本獣医生命科学大学、京都大学
教育セミナーフォーラム2019(東京)	31.2.23	東京大学弥生講堂
実験動物技術指導員研修会	31.2.24	日本獣医生命科学大学
教育セミナーフォーラム2019(京都)	31.3.9	京都府立医科大学

(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52回日本実験動物技術者協会総会

日時：2018年10月4日(木)～6日(土)
 場所：熊本市市民会館、熊本市国際交流会館
 大会長：野口和浩
 詳細：<http://www.c-linkage.co.jp/jaeat2018/index.html>

◆ NPO法人動物実験関係者連絡協議会

第7回シンポジウム

日時：平成30年12月1日(土) 13:00～17:00
 会場：中島董一郎記念ホール(Nakashima Hall)
 東京大学大学院農生命科学研究フードサイエンス棟 2階(東京都文京区)
 詳細：<http://www.renkyo.or.jp/>

◆ 第6回日本先進医工学ブタ研究会

日時：2018年10月19日(金)13時～20日(土)12時
 場所：東レ総合研修センター(静岡県三島市)
 当番世話人：長嶋比呂志(明治大学)

◆ 第31回日本動物実験代替法学会

日時：2018年11月23日（金）～25日（日）
会場：崇城大学（熊本市）
大会長：松下琢（崇城大学生物生命学部）
詳細：<http://jsaae31.umin.jp/index.html>

◆ 第66回日本実験動物学会総会

日時：2019年5月15日（水）～17日（金）
場所：福岡国際会議場（福岡市）
大会長：小野悦郎（九州大学大学院医学研究院実験動物学分野教授）
詳細：<https://jalas66.org/index.html>

4. 海外行事

◆ 第69回 AALAS National Meeting

日時：2018年10月28日～11月1日
場所：Baltimore, MD
詳細：<https://www.aalas.org/national-meeting>

◆ 第8回 AFLAS Congress

日時：2018年11月28日～12月1日
場所：Bangalore, India.
詳細：<http://lasaindia.in/aflas2018/>



今年も夏の甲子園が始まった。第100回という記念大会であるため、従来の北海道・東京に加え、埼玉、千葉、神奈川、愛知、大阪、兵庫、福岡からも2校が出場し、史上最多の56代表校が出場している。今年は全国的に記録的な猛暑（酷暑）に見舞われ、高校球児にも、スタンドの応援団にとっても厳しい夏となっているが、毎日熱戦が繰り広げている。プロ野球選手とほぼ変わらない体格、140キロを超える速球と多彩な変化球を投げるピッチャー、その球をラッキーゾーンがなくなった甲子園のスタンドに軽々打ち込むバッターを見ていると、日本の野球もしばらくは安泰であるように思われる。個々の選手の比較は難しいが、平均的な能力は私が高校生の時にリアルタイムで見ていた同世代の高校球児に比べ、格段に上がっているように思える。しかしながらその一方で、小中学生の野球人口は、少子化では説明できないくらい急速に減少しており、子供達の野球離れが深刻化している。

わが国では若い世代が減り続けているため、どの業界でも世代交代と若手の育成は喫緊の課題となっている。若い世代にとって魅力的な業界であり続けるためにはどのようにしたらいいのか？ とある甲子園優勝監督の「今の子供達に昔のやり方は通用しない」という言葉どおり、まずは指導する立場にある人達が新しい発想を取り入れ、新しい風を吹かせる必要があるのかもしれない。

〔岡村 匡史〕

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	大和田一雄	KAZUO OHWADA
〃	岡村 匡史	TADASHI OKAMURA
〃	木藤 実	MINORU KITO
〃	久原 孝俊	TAKATOSHI KUHARA
〃	三枝 順三	JUNZO SAEGUSA
〃	新関 治男	HARUO NIIZEKI
〃	森村 栄一	EIICHI MORIMURA
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

新しい発見を 変わらない品質で



私たち日本クレアは、生命のあらゆる可能性を探求し発展させる基盤として、
動物愛護のグローバルな視点に立った世界最高品質の実験動物を提供して参ります。



CLEA Japan, Inc.

～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