

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

【連載特集】

実験動物としてのゴールデンハムスターの有用性(Ⅱ)

厚生労働省所管機関における動物実験

—厚生労働科学特別研究事業の実施報告—(Ⅱ)

実験動物を支える飼料の役割(Ⅰ)

【私の研究】

フリーズドライ精子保存法





ジャクソン・ラボラトリー・ジャパン株式会社

The Jackson Laboratory Japan, Inc.

2021年10月13日をもちまして、日本チャールス・リバーは米国に拠点を置く非営利の生物医学研究機関であるジャクソン研究所（JAX）の100%子会社として、社名を新たにし、事業を継続して参ります。
これからも、引き続きお引き立てのほどどうぞよろしくお願い申し上げます。

社員一同

- ・ 国内生産実験動物
- ・ 輸入実験動物
- ・ 生体試料
- ・ 手術動物
- ・ 微生物モニタリングサービス
- ・ 遺伝子改変モデルサービス
- ・ 受託試験サービス
- ・ 実験動物関連機材



目 次



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 年頭のご挨拶 (吉川泰弘) | 4 |
| 連載特集 実験動物としてのゴールデンハムスターの有用性 (Ⅱ) 冬眠モデル哺乳類としてのゴールデンハムスター (中川哲、山口良文) | 5 |
| 連載特集 厚生労働省所管機関における動物実験 —厚生労働科学特別研究事業の実施報告— (Ⅱ) 動物実験の実施状況に関するアンケート (牛山明) | 9 |
| 自己点検、自己評価を促すツールの開発 (岡村匡史、津村秀樹) | 13 |
| 連載特集 実験動物を支える飼料の役割 (Ⅰ) うつ病モデルのストレス感受性と給与飼料の関係性 (豊田淳) | 17 |
| 私の研究 フリーズドライ精子保存法 (金子武人) | 21 |
| ラボテック 技術紹介 RFID技術を用いた集団飼育環境下全自動マウス行動解析システム IntelliCage (遠藤俊裕) | 25 |
| マイクロ超音波イメージング～実験小動物における精密で多彩な超音波エコー検査～ (水流功春) | 31 |
| 動物実験手技訓練用モデル NATSUME RAT のリニューアルについて (山岸義尚、佐々木貴大) | 34 |
| 連載コラム「会員からの情報」(4) マウスの飼育用アイソレータに用いる自動給水システムの開発について (加藤昌洋) | 38 |
| 連載コラム「実験動物技術者紹介」(1) (赤荻誠一郎) | 40 |
| 日本実験動物学会の動き / 日本実験動物技術者協会の動き | 41 |
| 令和3年度実験動物技術者資格認定試験結果 | 42 |
| 教育セミナーフォーラム2022のご案内 | 43 |
| 協会だより | 44 |
| KAZE | 46 |



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処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。

Kuzuu Vector Science Inc.
~Sicuis imperium transportation of ago bestia pro medical~
有限会社葛生運送 メディカルバイオ・アニマル輸送部

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



年頭のご挨拶

公益社団法人日本実験動物協会

副会長 吉川 泰弘

(岡山理科大学獣医学部長)

明けましておめでとうございます。COVID-19、新型コロナウイルスのパンデミックが始まって、ついに3年目に入ってしまった。武漢株、 α 株、 δ 株、今回のオミクロン株と次々に変異株の拡散が続き、まだ先行きは不透明です。昔から、石の上にも3年と言うくらいだから、今年こそ、このトンネルから抜け出したものだと思います。

振り返れば、ワクチンも治療薬もなく、約10%の致死率で世界を震撼させたSARS（重症急性呼吸器症候群）パンデミックが、ほぼ半年で終息した例がありました。SARSの2番煎じ（SARSCov-2）、ウイルス受容体も同じ、SARSよりも軽そうな今回のCOVID-19は、当初、連休前、遅くとも2020年の夏ころまでには終息するだろうと高を括っていたのですが、大きな間違いでした。

COVID-19パンデミックは、我々に多くの知見を残しつつあります。まとめると、以下の3つになると思います。1, mRNAワクチンという、分子生物学の最先端技術の傑作品の安全性と有効性が確認された。ノーベル賞を受賞すると思います。2, 差別化（不顕性感染が多く、高齢者とハンディを負った人のみが重症化する）感染を起こし、かつ感染力が高い流行株は非常に統御しにくい。3,

フェーズ6に至るパンデミックは感染症統御（自然科学）と経済活動維持（社会科学）のリスクのトレードオフを起こす、ということです。これは、自然科学だけでは回答を出せないという、トランスサイエンス問題でもあります。

COVID-19については、授業で繰り返し取り上げました。最初は、型どおり基本再生産数 R_0 は、病原体の感染力（ β ）と感受性群の個体密度（ C ）、感染者の病原体排出期間（ D ）の掛け算であることから始めました。 $R_0 = \beta \times C \times D$ で、武漢株は $R_0 = 2.5 \times 1 \times 1$ としました。そして R_0 が1より大きいと感染拡大、1より小さいと感染減少として、東京、大阪などの R_0 の推移を計算し、対策の有効性を評価しました。第1波から第5波までの R_0 の変動を計算するうちに、統御対策の効果、リスクのトレードオフ、ワクチン接種などの影響を反映しないと R_0 の説明がつかないことになり、対策の有効性、流行の予測を知るには、変動する実効再生産数 R' の方が現実的であることに気が付きました。

新しい R' は、学生さんの提案で分子がウイルスの拡散に有利な因子、分母が不利な因子ということになりました。分子には β （ α は武漢の1.4倍、 δ は α の1.5倍） $\times D$ （武漢は1、変異株はウイルス排出が速くなるので、武漢の

1.1としました）。他に経済活動の活性化（go to eat, go to travelなど、EA：economic acceleration）をいれました。分母は行政対応（CM, crisis management：ロックダウン、イベント中止、学校閉鎖、営業規制など）と個人防衛（PPA：personal protective action、マスク・手洗い・うがい、3密防止、ホームステイ、ソーシャルディスタンスなど）。ワクチン効果は全体に $1 - \text{接種率}$ （ $1 - W$ ）を掛けます。 $R' = ((\beta \times D \times EA) / (CM \times PPA)) \times (1 - W)$ になりました。 R_0' の変動には、経済活性化（EA）と個人防衛の遵守（PPA）、ワクチン接種（ $1 - W$ ）が大きく寄与する傾向があることが分かりました。パンデミックの対応には自然科学と社会科学の分野を超えたクロストークが必要です。

最後に、COVID19に関する動物実験でなるほどと思ったものは、長寿科学研究のために、つくば霊長類センターで維持していた老齢カニクイザルと若いサルにおける新型コロナウイルスの病態解析研究でした。センター長をしていた時に創設した老齢サルコロニーが、歴代のセンター長のもとで無事に維持されており、今回の研究に役立ったことをうれしく思いました。

実験動物としてのゴールデンハム
スターの有用性（Ⅱ）冬眠モデル哺乳類としての
ゴールデンハムスター中川 哲^{1,2}、山口 良文^{1,2}

1：北海道大学・低温科学研究所・冬眠代謝生理発達分野

2：北海道大学・大学院環境科学院・生物圏科学専攻・分子生物学コース

1. はじめに

生命は、変遷する環境への適応を常に迫られる。恒温動物である鳥類や哺乳類は、食料由来のエネルギーを用いて体熱産生を行うことで高い体温を維持するため、厳しい寒さと飢餓に見舞われる冬季をいかに生き抜くかは大きな課題である。そのような環境に適応する能力を彼らは進化させてきた。例えば鳥類の中には、冬季により温暖で食糧の豊富な環境へと長距離移動する渡りを行うものがある。一方、鳥類のように大規模移動が困難な哺乳類の一部は、異なる戦略を採用した。すなわち上述の体熱産生を減弱させ、結果として体温を環境温度付近まで低下させ、エネルギーの消費を抑制した低代謝状態で越冬する、冬眠である。

哺乳類の冬眠は、基礎生物学的興味を呼び覚ますだけでなく、医療や暮らしへの応用展開も想起される、興味深い現象である。ヒトなどの冬眠しない哺乳類（以後、非冬眠動物と呼ぶ）は、極端な低体温（15℃以下）になると心

停止や臓器損傷が起こり死に至る。一方、冬眠を行う哺乳類（以後、冬眠動物と呼ぶ）は、冬眠の際には体温が10℃以下に低下するにもかかわらず、顕著な障害無しに生存することができる。冬眠動物はこうした低温耐性だけでなく、筋萎縮耐性機構や効率的な脂肪燃焼機構、さらにヒトの冬眠の名残とも言われ冬眠との関連が示唆される季節性情動障害（冬季うつ病）など、ヒトの医療という観点から見ても興味深い性質を数多く備えている。したがって、こうした冬眠にまつわる現象とその機構の解明を目指す冬

眠研究は、将来的に医療技術の発達や、暮らしの充実にもつながると期待される。本稿ではそのような魅力あふれる冬眠研究において、非常に重要な実験動物であるゴールデンハムスターの特性について、冬眠研究分野の背景知識と合わせ紹介する。

2. ゴールデンハムスターの冬眠
生活環

ゴールデンハムスターは光条件と温度条件の変化に応じて冬眠を行うことができる。ゴールデンハムスターを短日・寒冷条件で飼育すると、数ヶ月の前冬眠期

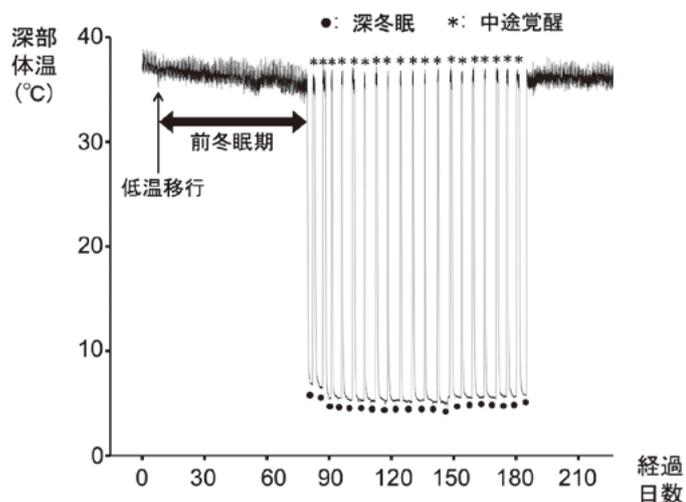


図1

ののち、外気温近くまで体温が低下した、「深冬眠」と呼ばれる状態となる(図1)。深冬眠は数日間続くが、その後自発的に37℃付近まで体温が復温する「中途覚醒」を生じる。この高体温状態は半日から一日程度継続したのち、再び深冬眠状態となる。このような深冬眠-中途覚醒サイクルが、冬眠期間にわたって何度も繰り返される。このサイクルは、短日・寒冷条件下で飼育され続けた場合でも、数ヶ月の冬眠期ののち自発的に停止し、冬眠は終了する。深冬眠-中途覚醒サイクルや冬眠期の自発的終了は大変興味深い現象だが、その分子制御機構はいまだ不明である。

3. 冬眠モデル動物としてのゴールデンハムスター

生物学研究では適切な実験動物の選択が重要である。ゴールデンハムスターは、哺乳類の冬眠の分子制御機構解明のために優れた性質を有するモデル冬眠動物である。冬眠動物は、その冬眠様式から、外界環境依存的に冬眠を行う条件の冬眠動物(日和見的冬眠動物とも呼ぶ)と、内因性の概年リズム依存的に1年周期で特定のタイミングでのみ冬眠を行う、義務的冬眠動物(季節強依存性冬眠動物とも呼ばれる)に分けられる。前者にはゴールデンハムスターやヨーロッパアンハムスターなどのハムスター類が主に該当する。後者には、ヒグマ、アメリカクロクマなどのクマ類、シマリ

ス、ジュウサンセンジリス、ホッキョクジリスなどのリス類、メガネヤマネなどのヤマネ類等が含まれる。義務的冬眠動物は、その繁殖も内因性の概年リズムに依存したパターン、すなわち年に一度の繁殖期を示す。従って、実験に必要な個体数を安定的に確保するためには非常に多くの個体を維持する必要がある。実際、ジュウサンセンジリスやシマリスを用いた冬眠研究の多くは、野生から定期的に個体を導入している。そのため、遺伝的背景や飼育環境を均質にするのはなかなか困難である。一方、条件の冬眠動物であるハムスター類は、その繁殖も外界環境、具体的には光環境、に依存的に切り替わることが古くから知られている。ゴールデンハムスターの場合、明期が1日14時間以上の長日条件に置かれると生殖腺が発達し繁殖可能となる。対して、明期の長さが1日12時間を下回る短日条件に置かれた場合、生殖腺が大幅に萎縮し繁殖能力が大幅に低下する⁽¹⁾。さらにこの条件下で寒冷刺激が継続的に入ると、先述したように冬眠を発動する。こうしたゴールデンハムスターの、環境依存的に繁殖期と冬眠期を切り替えることができる性質は、飼育環境下で光・温度環境を変化させることにより、一年を通して繁殖や冬眠の実験を行うことを可能とさせる。実際、ゴールデンハムスターは、野生由来の個体群に比べれば遥かに遺伝的均質性の高い、飼育

業者のアウトブリードコロニーから安定的に個体供給される、ほぼ唯一の冬眠動物である。従って、ゴールデンハムスターは、冬眠に対して遺伝的要因と環境的要因が与える影響を検討することも、リス類など他の冬眠動物と比較して、比較的容易と考えられる。

4. 冬眠と概日時計

小型冬眠動物の冬眠では、一定の時間間隔で深冬眠-中途覚醒のサイクルがくり返される。このサイクルがいかなる生理機構の支配下にあるのかは未だほとんど不明である。冬眠と概日リズムとの関わりは、冬眠研究の古くからのトピックの一つである。非冬眠動物のマウスは、実験動物として最も高頻度に用いられる哺乳類である。実はこのマウスも、飢餓状態に陥った際、自身の代謝と体温を低下させ、エネルギー消費を抑制することが知られる⁽²⁾。この現象は飢餓誘導性の「日内休眠」と呼ばれ、冬眠と類似したその性質から、冬眠とよく比較される。マウスの日内休眠が生じるタイミングは、概日周期で回る体内時計の影響を受けるとされ^(3,4)、冬眠動物の冬眠においても、体内時計が重要な役割を持つと考える研究者もいる。ひとつの仮説として、冬眠の際には、温度補償性が知られる時計遺伝子による概日時計とは異なり、いまだ実体未知の体内時計の周期が低体温により延長し、深冬眠-中途覚醒の

サイクルを制御するとの仮説が提唱されている⁽⁵⁾。

ゴールデンハムスターは、個体間で体内時計周期の分散が非常に小さいため⁽⁶⁾、マウスの遺伝子破壊個体作成技術が開発され世を席卷する以前に、時間生物学の分野で最も頻繁に用いられた実験動物の一種である⁽⁷⁾。これまでに、野生型で24時間前後である概日時計の周期が、約20時間に短縮する自然発生突然変異体tau変異ゴールデンハムスターが知られている⁽⁸⁾。しかし、tau変異ゴールデンハムスターの冬眠そのものには影響が見られない⁽⁹⁾。このように、概日時計と冬眠との関連は未だ不明である。

5. 夏のからだと冬のからだの変換モデルとしてのゴールデンハムスター

冬眠動物のからだは、春から夏の間は冬眠しにくい「冬眠不能状態」にあり、夏の終わりから秋の間に冬眠を行うポテンシャルを有した「冬眠可能状態」へとリモデリングされると考えられる。この考えは、繁殖と冬眠が季節特異的に見られるという生理現象だけからでなく、近年の次世代シーケンサー等を用いた網羅的遺伝子発現解析からも支持される⁽¹⁰⁾。ジリスやクマなどの義務的冬眠が夏の終わりから秋にかけて示す「前冬眠期リモデリング」では、冬眠に備えた大幅な過食と体重増加が見られる。この過食と体重増加ののち、動物は食欲の減

退期を経て、冬眠を開始する。こうした一連の体の変化は、義務的冬眠動物では前述した内因性の概年リズムにより駆動されると考えられる。

一方、内因性の概年リズムを有しないとされる、条件的冬眠動物のゴールデンハムスターは短日・寒冷環境に置かれれば、季節が夏でも冬眠を開始する。このことから、ゴールデンハムスターは前冬眠期リモデリングを行わず、常時冬眠可能状態であるとする見方もある。しかしゴールデンハムスターは短日・寒冷条件下に置かれても、すぐに冬眠を開始するわけではない。通常、1~3ヶ月程度の期間を要する。実際、この期間にゴールデンハムスターのからだでは、明暗周期依存的な生殖腺の萎縮だけではなく、基礎体温の低下や体重の減少といった変化が生じる⁽¹¹⁾。さらにわたしたちの研究室で行った鼠蹊部白色脂肪組織の網羅的遺伝子発現比較解析から、冬眠期（深冬眠と中途覚醒）に、温暖長日条件下の非冬眠期と比較し、脂質の異化と同化に関わる遺伝子群の発現が同時亢進することが明らかになった⁽¹²⁾。具体的には、脂質分解および脂肪酸 β 酸化に関わる酵素群の遺伝子発現上昇とともに、脂肪酸合成、グリセロール生合成、および脂質モデリングに関わる酵素群の遺伝子発現上昇が認められた。このうち脂質異化に関わる遺伝子群の発現亢進は、冬眠期に貯蔵脂肪をエネルギー源として

利用する、冬眠動物の特性の分子的基盤と考えられる。これと同時に見られる脂質同化に関わる遺伝子群の発現亢進は、ゴールデンハムスターは脂質の異化能だけでなく、中途覚醒中に摂取した餌から、脂質を合成する能力も増強させ、冬眠に利用していることを示唆している。こうした事実からも、条件的冬眠動物ゴールデンハムスターも義務的冬眠動物と同様、夏の冬眠不能のからだから、冬眠可能の冬からだへの変換を行うことが示唆される。

6. ゴールデンハムスターの低温耐性

先に述べたように小型冬眠動物は冬眠のあいだ、深冬眠-中途覚醒サイクルを数ヶ月間にわたって繰り返す。深冬眠中の長時間の低体温やそこからの急激な復温は、ヒトやマウスやラットなどの冬眠しない哺乳類では活性酸素の産生を介した組織障害や個体死につながる。このような低温・復温ストレスに対し、小型冬眠動物は耐性を有する。この耐性は、これらの動物から単離した細胞・組織レベルで認められる。たとえば、ジュウサンセンジリス由来のiPS細胞から誘導した神経細胞は低温耐性を有する⁽¹³⁾。一方、非冬眠動物であるヒトやラット由来の神経細胞では低温耐性は見られない。ゴールデンハムスターについては知見が少ないが、癌細胞株で細胞レベルでの低温耐性が報告されている⁽¹⁴⁾。最近

わたしたちの研究室では、ゴールデンハムスターの肝細胞は食餌由来のビタミンEの一種 α -トコフェロールを効率的に蓄積することで、低温で誘導される細胞死フェロトーシスを回避することを見出した⁽¹⁵⁾。 α -トコフェロールは、脂質ラジカルを消去することで過酸化脂質の発生を抑制する。 α -トコフェロールが豊富に含まれる餌を与えたゴールデンハムスターから調整した肝細胞は低温耐性を示すのに対し、 α -トコフェロールが少ない餌で飼育されたゴールデンハムスターから調整した肝細胞では、低温耐性が消失した。興味深いことに、ゴールデンハムスターに低温耐性を付与した α -トコフェロールを多く含む餌で飼育したマウスの肝細胞は、低温耐性を示さなかった。このとき、低温耐性の発現と肝細胞中の α -トコフェロール量には正の相関が認められた。すなわち、ゴールデンハムスターはマウスに比べて、餌由来の α -トコフェロールを肝細胞に高濃度に保つことで、低温下で生じる過酸化脂質の抑制に活用する能力に優れていることが明らかになった。

7. おわりに

ゴールデンハムスターは、冬眠研究分野での歴史があるだけでなく、生殖生物学、腫瘍生物学、脂質生物学、時間生物学などの分野で古くから実験に用いられてきた。近年では次世代シーケン

サー技術の発達により、ゴールデンハムスターのゲノム配列の解読も進み、網羅的遺伝子発現解析が従来と比較し容易となった。また、長年困難であった遺伝子改変動物の作出も、ゲノム編集技術と発生工学的手法の進展により可能となった。(本特集・塩見、小倉の稿参照) こうした利点を生かして現在筆者らは、遺伝子破壊ゴールデンハムスターを作出しその冬眠への影響を調べるといふ、冬眠現象と遺伝子機能との因果関係の解明を進めている(未発表)。このようにゴールデンハムスターは、冬眠を可能とする分子基盤や冬眠を制御するメカニズムの解明を可能とする特性を備えた、現時点では唯一のモデル冬眠動物といえよう。今後のさらなる分野発展と研究進展が期待される。

1. L. Janský, G. Haddad, Z. Kahlerová, J. Nedoma. Effect of external factors on hibernation of golden hamsters. *Journal of Comparative Physiology B*. 154(4), 427-433 (1984), doi: 10.1007/Bf00684450.
2. F. Geiser, Metabolic rate and body temperature reduction during hibernation and daily torpor. *Annual Review of Physiology*. 66(1), 239-274 (2004), doi: 10.1146/annurev.physiol.66.032102.115105.
3. D. A. Bechtold, A. Sidibe, B. R. C. Saer, J. Li, L. E. Hand, E. A. Ivanova, V. M. Darras, J. Dam, R. Jockers, S. M. Luckman, A. S. I. Loudon. A role for the melatonin-related receptor GPR50 in leptin signaling, adaptive thermogenesis, and torpor. *Current Biology*. 22(1), 70-77 (2012), doi:10.1016/j.cub.2011.11.043.
4. V. van der Vinne, M. J. Bingaman, D. R. Weaver, S. J. Swoap. Clocks and meals keep mice from being cool. *Journal of Experimental Biology*. 221(15), jeb179812 (2018), doi:10.1242/jeb.179812.
5. A. Malan. Is the torpor-arousal cycle of hibernation controlled by a non-temperature-compensated circadian clock? *Journal of Biological Rhythms*. 25(3), 166-175 (2010), doi: 10.1177/0748730410368621.
6. S. Daan, M. Oklejewicz. The precision of circadian clocks: assessment and analysis in Syrian hamsters. *Chronobiology International*. 20(2), 209-221 (2003), doi:10.1081/CBI-120019309.
7. D. Weinert, D. Weinert, P. Fritzsche, R. Gattermann. Activity rhythms of wild and laboratory golden hamsters (*Mesocricetus auratus*) under entrained and free-running conditions. *Chronobiology International*. 18(6), 921-932 (2001), doi:10.1081/CBI-100107968.
8. M. R. Ralph, M. Menaker. A mutation of the circadian system in golden hamsters. *Science*. 241(4870), 1225-1227 (1988), doi: 10.1126/science.3413487.
9. M. Oklejewicz, S. Daan, A. M. Strijkstra. Temporal organisation of hibernation in wild-type and tau mutant Syrian hamsters. *Journal of Comparative Physiology B*. 171(5), 431-439 (2001), doi: 10.1007/s003600100193.
10. M. T. Andrews. Molecular interactions underpinning the phenotype of hibernation in mammals. *Journal of Experimental Biology*. 222(2), jeb160606 (2019), doi: 10.1242/jeb.160606.
11. Y. Chayama, L. Ando, Y. Tamura, M. Miura, Y. Yamaguchi. Decreases in body temperature and body mass constitute pre-hibernation remodeling in the Syrian golden hamster, a facultative mammalian hibernator. *Royal Society Open Science*. 3(4), 160002(2016), doi:10.1098/rsos.160002.
12. Y. Chayama, L. Ando, Y. Sato, S. Shigenobu, D. Anegawa, T. Fujimoto, H. Taii, Y. Tamura, M. Miura, Y. Yamaguchi. Molecular basis of white adipose tissue remodeling that precedes and coincides with hibernation in the Syrian hamster, a food-storing hibernator. *Frontiers in Physiology*. 9, 1973 (2019), doi:10.3389/fphys.2018.01973.
13. J. Ou, J. M. Ball, Y. Luan, T. Zhao, K. J. Miyagishima, Y. Xu, H. Zhou, J. Chen, D. K. Merriman, Z. Xie, B. S. Mallon, W. Li. iPSCs from a hibernator provide a platform for studying cold adaptation and its potential medical applications. *Cell*. 173, 851-863.e16 (2018), doi: 10.1016/j.cell.2018.03.010.
14. K. D. W. Hendriks, E. Lupi, M. C. Hardenberg, F. Hoogstra-Berends, L. E. Deelman, R. H. Henning. Differences in mitochondrial function and morphology during cooling and rewarming between hibernator and non-hibernator derived kidney epithelial cells. *Scientific Reports*. 7, 15482 (2017), doi: 10.1038/s41598-017-15606-z.
15. D. Anegawa, Y. Sugiura, Y. Matsuoka, M. Sone, M. Shichiri, R. Otsuka, N. Ishida, K. I. Yamada, M. Suematsu, M. Miura, Y. Yamaguchi. Hepatic resistance to cold ferroptosis in a mammalian hibernator Syrian hamster depends on effective storage of diet-derived α -tocopherol. *Communications biology*. 4, 796 (2021), doi: 10.1038/s42003-021-02297-6.

厚生労働省所管機関における動物実験 — 厚生労働科学特別研究事業の実施報告 — (II)

動物実験の実施状況に関するアンケート

■牛山 明

国立保健医療科学院
生活環境研究部

研究目的

厚生労働省（以下、厚労省）は平成18年に「厚労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」（以下、基本指針）を作成している。該当する機関においては基本指針および飼養基準や関連ガイドライン等を遵守し動物愛護及び管理について十分な配慮のもと動物実験が実施されることが期待されるが、動物実験を実施している機関の機関管理に委ねているため、その実態が十分把握しきれていない。我々は平成28年度厚生労働科学特別研究（以下、前回研究）において、上記基本指針の対象となる事業法人、及び準じる機関（地方衛生研究所、市場検査所、自治体立病院）を対象に調査を行い実態を報告した。本研究では前回調査から4年経過後の基本指針の準拠の状況を調べる目的で、前回調査と同じ対象者に対して前回調査と同様の質問を行い、その変化を明らかにした。また、本調査においては、動物の愛護及び管理に関する法律（動愛

法）で定められている「代替法」、「使用動物数の削減」の2点について各調査対象におけるこれらの取り組みについてあらたに質問を行った。

B. 方法

調査は令和2年10月1日現在の状況を同年11月～12月に調査票により実施した。なお調査においては前回調査の対象者の同一性を担保するため、日本製薬団体連合会（日薬連）、安全性試験受託研究機関協議会（安研協）、日本化粧品工業連合会（粧工連）、日本医療機器産業連合会（医機連）を介して、それぞれの連合会の中の会員企業のうち研究開発型企業かつ動物実験を実施している可能性のある企業に対して、それぞれの連合会の判断でアンケートを送付した。「地方公共団体の設置する試験検査研究施設」についても、前回調査と同様に、地方衛生研究所全国協議会（地衛研協議会）、全国市場食品衛生検査所協議会（市場協議会）、全国自治体病院協議会（全自病協）の協力のもと、それぞれの会員施設を対象に調査を行った。令和2年度においては、厚労省の施設等機関、厚労省が所管する独立行政

法人も調査対象とした。なお、回答は調査票を受け取った各機関の任意回答としていることから、全ての動物実験実施機関が回答しているわけではない。また匿名回答としているため平成28年度の回答と機関単位で回答を突合することは不可能である。

C. 結果

1. 動物実験の実施状況

全回答数598機関（民間472、公的機関104、厚労省関係施設22）のうち、動物実験施設を有しており現在実験を行っているのは200機関（民間135、公的機関44、厚労省関係21）であった。厚労省関係施設以外に限ると、前回調査では203施設（民間154、公的機関49）であったが今回調査で179機関となり減少が認められた（表1）。一方で、特に民間機関においては、外部委託をしている例が増加しており、自社における動物実験を外部委託に置き換える事例が増えていることが伺えた（表2、表3）。

2. 機関内規程の設置状況

動物実験に関する機関内規程について、実験を行っている全200機関のうち187機関（93.5%）が「機

表1 「動物実験施設を有しており、実施している」機関数(実数)

| | H28年 | R2年 | 増減 |
|------|------|-----|--------|
| 民間機関 | 154 | 135 | 19 機関減 |
| 公的機関 | 49 | 44 | 5 機関減 |

表2 「国内の外部委託により実施している」機関数(実数)

| | H28年 | R2年 | 増減 |
|------|------|-----|--------|
| 民間機関 | 178 | 230 | 52 機関増 |
| 公的機関 | 6 | 5 | 1 機関減 |

表3 「海外の外部委託により実施している」機関数(実数)

| | H28年 | R2年 | 増減 |
|------|------|-----|--------|
| 民間機関 | 71 | 82 | 11 機関増 |
| 公的機関 | 0 | 0 | |

関内規程が整備されている」、8機関(4.0%)が「策定を予定」しており、「定める予定はない」と回答したのは5機関(2.5%)であった(図1)。前回調査では、「規程が定められている」が85.3%、「策定予定」が6.9%、「定める予定はない」が7.8%であったことと比べると、規程の整備が進んでいることが確認できた(表4)。今後は規程を定める予定がないとした一部の機関が定めるために厚労省等から業界団体を通じて周知が必要と考えられる。

3. 機関内規程の根拠指針

多くの機関で「厚労省の基本指針」並びに「学会会議の動物実験の適正な実施に向けたガイドライン」を採用しているのがわかった。一方で、文部科学省や農林水産省の基本指針を根拠としている例も見られた。また、その他として、環境省が定めた基準や指針、「米国 実験動物研究会ガイド“ILAR Guide”」、「実験動物の管理と使用に関する指針第8版(Guide for the Care and Use of Laboratory Animals 8th edition(National

Research Council))」等の回答があり、根拠としている指針に多様性が見られた。厚労省指針を根拠としている機関については、前回調査では144/203機関(70.9%)であるのに対して今回調査では166/200機関(83.0%)(厚労省関係を除いても146/179機関(81.6%))であり、厚労省指針の採用が増加していることが明らかとなった。

4. 動物実験委員会の設置と構成メンバー

厚労省基本指針では「①動物実験等に関して優れた識見を有する者」、「②実験動物に関して優れた識見を有する者」、「③その他学識経験を有する者」から構成される必要がある。多くの施設でこれらの者が委員会構成メンバーになっていることがわかった。なお、前回調査と今回調査での変化を示すと、動物実験有識者を構成メンバーに入れている機関はH28: 71.9%→R2: 82.0%、同じく実験動物有識者はH28: 62.1%→R2: 76.0%、学識経験者はH28: 65.5%→R2: 74.5%であり、概ね10ポイント以上の増加が見られ、厚労省指針が遵守される傾向が見られた。一方で、動物実験委員会未設置と回答した機関が今回調査でも25機関(民間10、公的機関15)あり、これらについては委員会を設置することを早急に検討していただく必要がある。

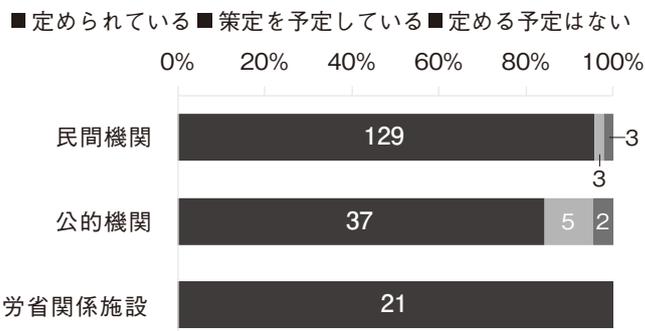


図1 動物実験実施機関における機関内規程の整備状況(数字は実数)

表4 「定められている」と回答した機関の割合とその変化

| | H28年 | R2年 | 変化 |
|------|-------|-------|------------|
| 民間機関 | 90.9% | 95.6% | 4.7 ポイント増 |
| 公的機関 | 67.3% | 84.0% | 16.7 ポイント増 |

5. 動物実験計画の承認(却下)の状況

厚労省指針では実施機関の長による動物実験計画の承認または却

下を求めているが、「長による承認（却下）を実施している」と回答した機関がH28：72.9%→R2：86.5%と大きく増加している。しかしながら、今回調査においても一部の機関で「長以外の者による承認が行われている」(2.0%)、「実施する予定はない」(5.5%)との回答があり、引き続き改善すべき点もある。

6. 動物実験終了後の報告・改善措置

基本指針では動物実験等の終了の後、実施機関の長が動物実験計画の実施結果の報告を受け、報告後に必要に応じ、改善措置を講ずることになっているが、多くの機関でその仕組みが確立していることがわかる。今回の調査と前回の調査を比較すると、「措置を講じている」がH28：73.4%→R2：85.0%と10ポイント以上増えた一方で、「措置を講じることを予定」はH28：9.9%→R2：7.5%、「講じる予定はない」はH28：16.7%→R2：7.5%と減少しており、この点からも厚労省指針が浸透していることが明らかとなった。

7. 教育訓練の実施状況

基本指針に基づいて従事者の教育訓練を「実施している」と回答したのは前回調査では全体で75.4%であったのに対して、今回調査では85.5%と増加した。厚労省関係施設を除いても83.8%（150/179施設）となっており、民間機関、公的機関ともにこの4年間で改善が見られた。しかしながら民間機関、公的機関の一部に置いては今回の調査でも「実施する

予定はない」と回答しており、これらに対するアプローチが今後の課題である。

8. 自己点検及び評価の実施状況

自己点検及び評価に関して、今回調査では全体で78.5%（民間110、公的機関26、厚労省関係21）で自己点検及び評価をすでに実施していた。前回調査では63.4%であったので15ポイント以上改善されている。大きな変化として、「自己点検を実施する予定はない」と答えた機関が前回調査では19.3%もあったのに対して、今回調査では10.0%に大きく減少しており、自己点検及び評価の必要性が一定程度理解された結果ではないかと考えられる。今後も引き続き改善を期待したい。

9. 外部検証の実施状況

第三者による外部検証（認証）を実施していたのは、今回調査において全体で53.5%（民間79、公的機関10、厚労省関係18、厚労省関係を除外しても49.7%）であり、前

回調査の結果（36.5%）と比べても10ポイント以上も改善が見られた（図3、表5）。検証（認証）を受けている機関で最も多いのは、公益財団法人ヒューマンサイエンス振興財団（現在は一般財団法人医薬情報センター）の外部評価検証事業を利用したものであり、以下、AAALAC International（国際実験動物ケア評価認証協会）等の認証を取得している機関もあることがわかった。

10. 動物実験に関する情報公開の状況

基本指針に基づく動物実験の情報の公表状況について今回調査では、全体で57.6%の機関が「公表している」と回答しており、「公表の予定はない」と回答したのは22.2%であった。これらの数字は前回調査ではそれぞれ41.9%、36.0%であったため、公表に対する意識に大きく改善が見られた。しかしながら「情報公開請求があったときのみ公表する」と答えた割合が、前回調査で11.8%であっ

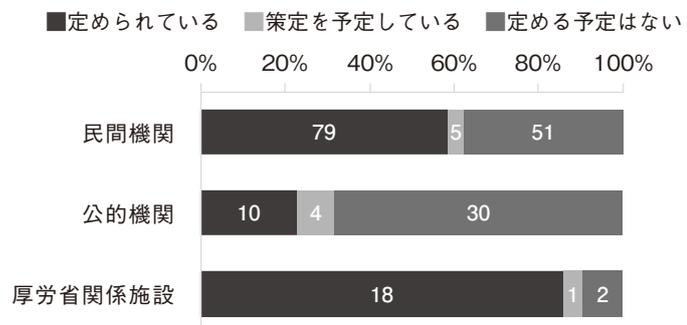


図2 外部の機関等による検証（認証）の実施状況（数字は実数）

表5 「実施している」と回答した機関の割合とその変化

| | H28年 | R2年 | |
|------|-------|-------|------------|
| 民間機関 | 43.8% | 58.5% | 14.7 ポイント増 |
| 公的機関 | 11.1% | 22.7% | 11.6 ポイント増 |

たのに対して、今回調査で14.1%に増大した。特に民間機関においては、件数でも18件→23件と増大しており、特に民間企業においては研究開発に関連する機微な情報・経営上の情報も含まれることから、情報公開は容易でないことも垣間見られた。

また公表している場合の情報の内容について、前回調査と大きく変化が見られたのは、機関内規程 (H28: 25機関→R2: 45機関)、自己点検 (H28: 29機関→R2: 54機関)、外部検証 (H28: 46機関→R2: 66機関)、飼育匹数 ((H28: 9機関→R2: 20機関)であった。いずれも大きな増加となっており、情報公開に前向きに取り組んでいる状況が明らかとなった。自由記載の回答からは企業としては情報の公表に多少の抵抗を感じていることが推測できる。

情報公開の方法については、ウェブサイト (ホームページ) での公開がもっとも多く、その傾向は前回調査と大きな変化はなかった。

11. 災害対応計画の状況

災害発生等、緊急時の対応計画の有無について災害対応計画を作成しているのは、前回調査で51.0%であったのに対して、今回調査では69.5%であった。近年、全国各地で自然災害が相次いで起きており、これらに対する対応計画の重要性が認知されてきていることが考えられる。引き続き、計画の策定率の向上を期待したい。

12. 代替法に関する状況

本研究では、代替法に関して質

問を行った。実験計画書等に「代替法を利用できない理由欄がある」と答えたのは全体の81.9% (民間86.6%、公的機関62.7%、厚労省関係90.9%) であり、多くの機関で理由欄が設けられていた。また「従事者の教育訓練において代替法の利用についての内容が含まれているかの質問については「含まれている」が全体の71.0% (民間74.0%、公的機関51.2%、厚労省関係90.9%) であった。これらより、民間機関及び厚労省関係機関では代替法について公的機関よりも意識が高い傾向が見られたが、公的機関で行っている主な動物実験が公定法による神経毒の検査であり、代替法がないという点で、検討の必要性がないことを反映している可能性もある。

13. 使用数の削減に関する状況

使用数の削減に関連して「計画書等において積算根拠を示す欄があるか」については、「含まれている」が全体で69.8% (民間74.0%、公的機関46.5%、厚労省関係90.5%) であった。また、「教育訓練に含まれているか」については「含まれている」が、全体で76.4% (民間80.7%、公的機関53.5%、厚労省関係95.2%) であった。代替法と同様に民間機関及び厚労省関係機関では数の削減について公的機関よりも対応状況が高い傾向が見られたが、公的機関での主な動物実験が公定法検査であることも影響している可能性がある。

D. まとめ

本調査では、厚労省の基本指針

が対象としている機関等に指針の遵守に関して調査を行い、平成28年に実施した調査との比較を行った。その結果から各機関において動物実験に関する厚労省指針の遵守の意識の向上並びにそれに伴う実践がなされていることが明らかとなった。多くの機関で意識の向上や実践が前回調査より改善した理由は明確ではないが、前回の調査以降、社会情勢が動物実験に対してよりしっかりとした管理を求めるようになったことや、厚労省が主催した動物実験管理者研修会を通じて遵守の徹底意識が向上した影響があるものと思われる。多くの機関で前向きに取り組んだ点は高く評価できる。しかしながら、一部の機関においては、対応が遅れている実態もあり、改善のためにはそれらの機関への具体的なアプローチが課題である。その解決のためには本研究班で作成した自己点検・評価シートの活用を促すなど、さらなる啓発を行い全施設での実現を目指す必要がある。

なお、紙面の都合上、本稿では調査結果の一部のみの紹介となった。詳細については報告書を参照していただきたい。報告書は、「厚生労働科学研究成果データベース (<https://mhlw-grants.niph.go.jp/>)」から全文ダウンロードが可能である。

謝辞

本調査にご協力いただいた各機関の皆様がこの場を借りて御礼申し上げます。

■岡村 匡史

国立国際医療研究センター研究所

■津村 秀樹

国立成育医療研究センター研究所

はじめに

「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」(以下、厚労省基本指針)の前文には、「動物実験等により得られる成果は、人及び動物の健康の保持増進等に多大な貢献をもたらしてきた」とある一方で、「動物実験等は、動物の生命又は身体の犠牲を強いる手段であり、動物実験等を実施する者はこのことを念頭におき、適正な動物実験等の実施に努める必要がある」と明記されている。平成24年の「動物の愛護及び管理に関する法律」改正の衆参両院付帯決議には、「関係府省による実態把握の取り組みを踏まえつつ、(中略)、3Rの実効性の強化等により、実験動物の福祉の現実に努めること」とあり、国民に広く理解してもらうためには、厚生労働省が所管する機関の動物実験実施に関する実態把握と、透明性確保のための情報公開および外部検証の確実な実施が急務である。環境省が定めた「実験動物の飼養及び保管並びに苦痛の軽減に関する

基準」(以下、飼養保管基準)の改正に伴い、平成27年2月に厚労省基本指針も改正され外部検証に関する部分が追加された。各機関において自己点検自己評価を行うことで、基本指針の遵守が促進され、外部検証(認証)を受ける機関が増加することが期待される。

1. 研究目的

我が国では、厚生労働省、文部科学省、農林水産省より、各所管機関あるいは各所管事業の実施機関に対して動物実験基本指針が示され、科学的な観点に加え動物福祉の観点からも適正な動物実験の実施が求められている。いずれの基本指針においても、定期的に基本指針への適合性について、自ら点検及び評価を行うと共に、当該点検及び評価結果について、当該研究機関等以外の者による外部検証を実施することに努めることが明記されている。つまり、各機関が実施している機関管理により、動物実験が適正に管理されていることを、社会に対して説明するためには、自己点検自己評価はもとより、より客観性や公平性が確保された外部検証を受けることが望ましい。厚生労働省関係研究機関動物実験施設協議会(以下、厚労働協)のホームペー

ジでは、平成28年度厚生労働科学特別研究の成果である自己点検自己評価表を対象となる機関に提供している。各機関での自己点検内容にばらつきがないようにするために点検項目を設定し、アンケート問答形式のシンプルな構成で、直接記入する形式となっているが、さらなる普及拡大に向けては、簡易的な作業による自己点検自己評価表の作成が必要である。本分担研究では、自己点検シートの各項目を再度見直し、自己点検・評価の容易性と効率性、そして操作性を高めた自己点検・評価シートを作成することを目的とした。

2. 研究方法

自己点検自己評価の項目は、平成28年度厚生労働科学特別研究の成果である自己点検自己評価表をベースにし、外部認証を受けやすいよう、ヒューマンサイエンス財団*の動物実験の外部評価・検証事業で使用されている自己点検自己評価表に平仄を合わせた。さらに、ILAR Guide, 8th Edition等を参考にし、国際動向に配慮した項目の追加を行った。自己点検・評価ツールの開発では、使う側サイドの観点から確実性及び容易さに考慮し、Windows

* 公益財団ヒューマンサイエンス振興財団については令和3年3月31日に解散し、現在は一般財団法人日本医薬情報センターが外部認証を実施

用表計算ソフトのデファクトスタンダードとして普及したエクセルを基盤とすることを前提とした。ツールの開発は共同開発の請負先であるウェブマンボウと行った。

3. 研究結果

(1) 自己点検自己評価項目の見直し

自己点検自己評価を継続的に行う目的は、各機関の機関管理を向上させ、将来的には客観的で透明性が確保された他の外部検証(認証)を利用し、より適切に動物実験が実施される体制を整えることである(図1)。そのため、厚労省基本指針への適合性を認証する唯一の機構であるヒューマンサイエンス振興財団*で公開している自己点検自己評価表と同様の順番に各項目を並び替え、平成28年度厚生労働科学特別研究の成果である自己点検自己評価表にさらに18項目追加した。結果的に、12のカテゴリーからなる51項目の自己点検自己評価表を作成し、各項目には、根拠となるガイドラインを明記した。

(2) 自己点検・評価シートの作成

平成28年度厚生労働科学特別研究の成果である自己点検自己評価表は、アンケート問答形式のシンプルな構成であるが、校閲・成形といった部分において改善の余地があった。従来の自己点検

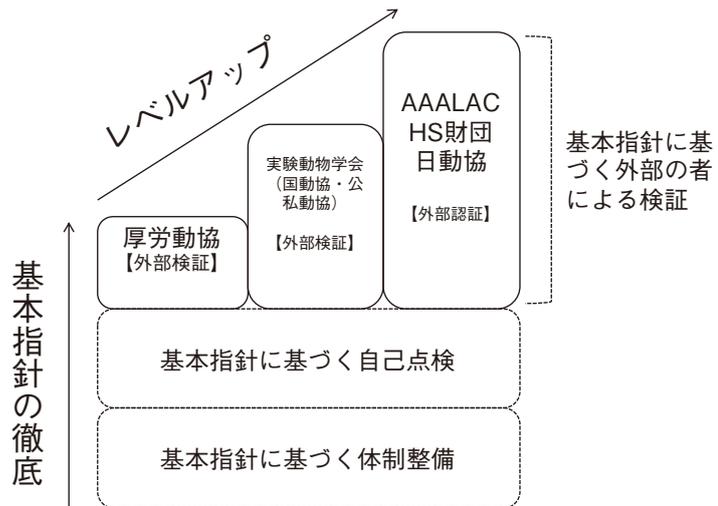


図1. 厚生労働省動物実験等基本指針対象施設のレベルアップ

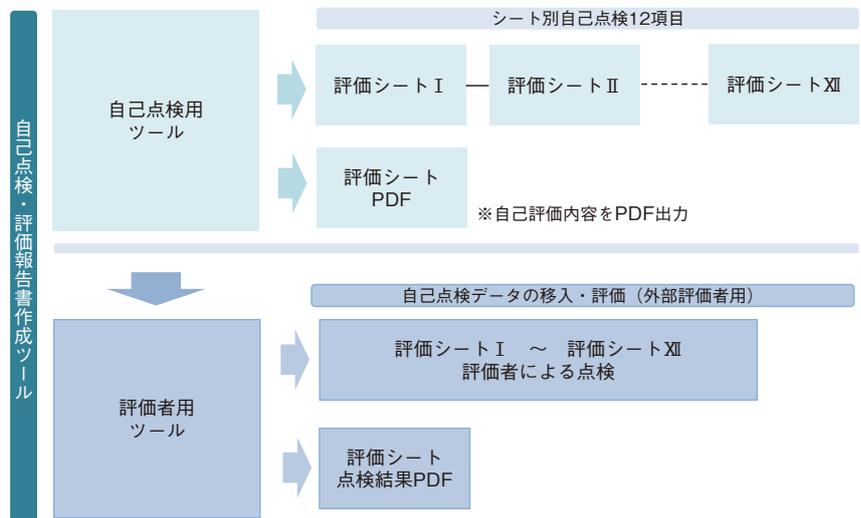


図2. 自己点検自己評価シートのシステム構成図

本ツールは、自己点検にかかる入力作業の手間を軽減し、各機関の自己点検自己評価を促すことを目的としたもので、自己点検はもとより、客観性や公平性が確保された外部検証を受けることを前提に設計した。また、本ツールの開発と併せて、基礎となる自己点検の重点項目など内容を見直し、従来の自己点検項目10カテゴリーから12カテゴリーに充実を図った。

項目の直接記入形式から、フォーム入力形式に変更し、入力の効率アップを図るほか、メニュー構成はわかりやすく、各カテゴリー間を自由に往来できるようにした(図2および図3)。自己点検は、1. 組織体制の整備から12. 外部委託までの評価項目をカテゴリー毎チェックシートとしてまとめ、

チェックシート全体を管理するトップメニューを含め、チェックシート間往来可能なGUI(graphic user interface)デザインとした。操作的には、自己点検を流れ作業的に進められるように点検項目を整備し、評価結果シートのPDF化など簡易的な操作で取り組める仕組みとなっている。ま

た、自己点検用ツールで作成したチェックシートは、外部検証機能を有した評価者用ツールにおいて、そのまま外部評価を受けられる仕組みとなっている。評価者用ツールは、自己点検データの連携機能、外部評価の点検機能を具備し、点検機能を充足したものとなっている。

汎用性を考えエクセルの表計算機能とVBA (Visual Basic for Application) を活用したシンプルな構造で開発し、Excel for Windows 2010、2013、2016、2019、office365 (デスクトップ版) およびExcel for Mac 2016、2019で動作することを確認した。さらに、実施率を高めるために、起動方法および操作方法を詳細に記載した操作マニュアルを作成した。自己点検自己評価シート及び操作マニュアルは、厚生労働科学特別研究事業の成果として厚労働協のホームページ (https://www.niph.go.jp/soshiki/09seikatsu/EMA/public_html/morality.html) からダウンロード可能である。

4. 考察

平成28年に実施したアンケート調査において、動物実験施設を有している法人および自治体の各機関における自己点検自己評価の実施率は、それぞれ69.2%および43.3%であった。今回の調査において、それぞれ81.5%および

59.1% (厚労省関係施設は100%)と、実施率は増加したものの、自己点検及び評価は、本来すべての動物実験実施機関の長により定期的に行われるべきものである。

自己点検シートは国立大学動物実験施設協議会などの関係団体より雛形が示されている他、厚労働協でも自己点検評価表として示している。しかし、その記入にはかなりの労力を必要とする。また、外部の者による外部検証の際にはその外部評価専用の自己点検シートを準備しなくてはならず事務作業は膨大である。本研究の自己点検用ツールの開発目的は、自己点検シートへの入力手間を軽減し、外部検証の基本資料として活用できるツールの開発である。

自己点検シートツールはエク

セルファイルで構成されており、その環境を整えていればハードウェアに左右されなく容易に作業を開始できる。トップ画面は目次で構成されており各項目への移動がスムーズである (図3)。その項目の中には飼育スペースの推奨値や環境エンリッチメントの項目を追加したことで、国際基準への橋渡しができる。入力形式はフォーム入形式であるため、入力作業の効率アップが十分図られている。具体的には選択式項目への入力は従来のワードファイルと比べラジオボタンになっているために容易に選択が可能である。このツールはまとめの段階で簡単にPDF化でき、また次回の自己点検検証にも十分参考に出来るようになっている。さらにこの自己点検シートツールは外部

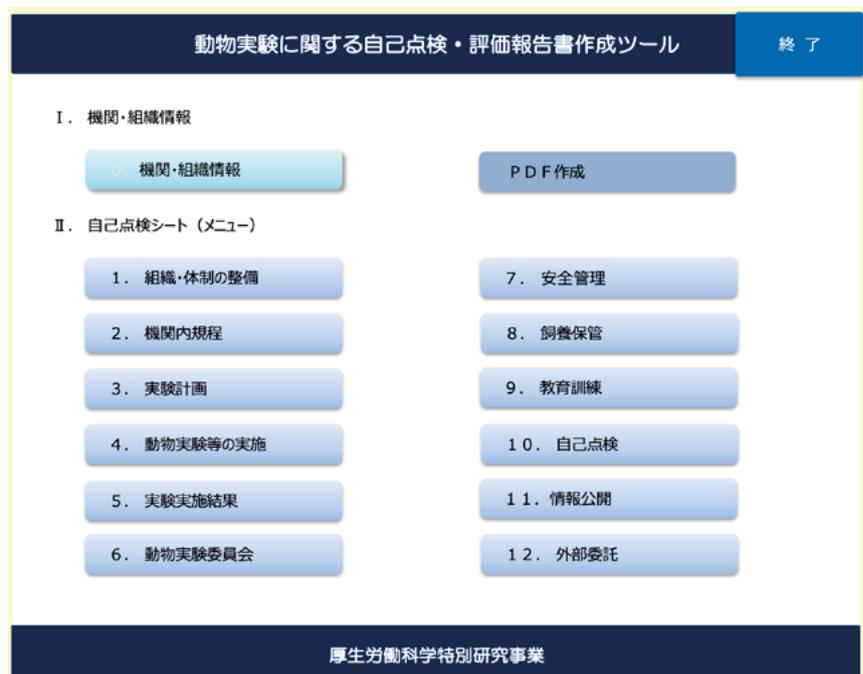


図3. 自己点検自己評価シートのトップ画面

検証の準備資料にも利用できる機能を備えている。評価者用ツールは自己点検シートツールで作成されたファイルを読み込むことによって外部評価者による検証事項をさらに追加記入できる仕様になっている(図2)。これにより自己点検から外部の者による外部検証へと続く事務作業が大幅に軽減でき、外部検証の実施率の上昇が期待できるかもしれない。厚労働協の外部検証事業では2021年11月まで7件の検証を行ったが、今後はこのツールを利用して外部検証事業を運用して行きたいと考える。さらにヒューマンサイエンス振興財団の項目

に沿って項目が編成されており、事業の移管先である日本医薬情報センターでの外部認証にも容易に移行することができる。

おわりに

厚労省基本指針において、動物実験を行う機関は定期的に自己点検及び評価を行わなければならない。本研究において、各項目の直接記入形式からフォーム入力形式に変更し、入力作業の効率アップを図ったツールを開発した。このことにより、各機関における自己点検及び自己評価実施率が増加することが期待される。一方、貝毒の検査等、食品衛生法や厚生労働

省の通知などで定められた検査のみを行っている検査機関においては、本研究で作成した項目に合致しない点も多い。そのような研究機関では、必要な項目を抽出するなどして利用して頂きたい。また、短期間ですべての項目を充足することが難しい場合は、複数年かけて項目を増やしていくなど、より適切に動物実験が実施できる体制を整えることに活用して頂ければ幸いである。

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

実験動物を支える飼料の役割 (I)

うつ病モデルのストレス感受性と
給与飼料の関係性

茨城大学 農学部食生命科学科
東京農工大学大学院 連合農学研究科
豊田 淳

はじめに

近年の日本では精神疾患の患者数が増加しているが、なかでもうつ病や不安障害を抱える患者が多いと言われている。また、新型コロナウイルス感染症の拡大が人々の心身に影響をおよぼしていると考えられており、2020年の自殺者数は2019年と比較して4%弱も増加している。うつ病の治療には抗うつ薬が用いられるが、既存の治療法が奏功しない患者が3割程度はいると言われている。私共の研究グループでは生活習慣、特に食事介入でうつ病を予防することを目標に研究をしているが、そのための基礎研究として、うつ病モデルの行動生理や栄養代謝を解析している。私共はうつ病モデルとして心理社会的ストレスをマウスに暴露した社会的敗北ストレスモデルを作製し実験に用いているが、このモデル作製時に使用する飼料の検討結

果から、飼料の重要性についての知見を得ることができた。この稿では、社会的敗北ストレスモデルマウスの研究で得た知見を中心に紹介したい。

1. うつ病モデル動物

うつ病の基礎研究や創薬研究では動物モデル、すなわちうつ病モデル動物が使用されている。うつ病モデルとしては、マウスやラットに強制水泳ストレスなどを負荷した急性ストレスモデルが広く使われている¹⁾。一方、ヒトの疾患モデルは、3つの妥当性、すなわちFace validity (表面妥当性)、Construct validity (構成概念妥当性)、Predictive validity (予測妥当性) をクリアするものが良いとされるため、モデルの選択には注意が必要であり、研究目的に沿ったモデルを使わないといけない²⁾。うつ病については、患者にしばしば見られる希死念慮

などを動物モデルで再現することは困難である。故にうつ病モデルの妥当性については様々な「限界」があり、その「限界」を理解して研究する必要がある。うつ病モデルのなかで比較的妥当なモデルとして使われているのが、心理社会的ストレスをマウスやラットに暴露した社会的敗北ストレスモデルであり、行動、脳の遺伝子発現など網羅的に調べられてきている³⁾。このモデルは様々な系統のマウス、ラットで作製されるが、最近ではC57BL/6オスマウス (B6) が最も頻繁に使われており、各種解析データの蓄積が進んでいる。このモデルは、スクリーニングにより選抜された攻撃性の高いICRオスマウス (ICR) による身体的・精神的ストレスをB6に反復して暴露することによって作出される。B6はICRとの闘争に敗北し、その敗北を繰り返し経験することで、不安様行動や

連載特集「実験動物を支える飼料の役割」は、第68回日本実験動物学会総会のシンポジウム「実験動物を支える飼料の役割とは」(座長：小山公成先生(アステラス製薬(株)、豊田淳先生(茨城大学))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、複数回に分けて掲載する予定です。

社会的忌避行動などのうつ様行動を示すようになる。私共はICRとの闘争時に生じるB6の咬傷を抑制するため、闘争時間を標準的な方法⁴⁾よりも短縮した方法を開発し、その方法で作出されるモデルを亜慢性社会的敗北ストレスモデルとした(図1)⁵⁾⁶⁾。

2. 飼料が心理社会的ストレスへの感受性に与える影響

私共は亜慢性社会的敗北ストレスモデルの開発当初には、市販の非精製飼料(MF、オリエンタル酵母)を給与していた。一方、本モデルを用いて消化管内容物や血液の代謝物の網羅解析(メタボローム解析)や、食品の機能性成分や微生物資材などの介入試験を実施するケースが増えたため、固形や粉末の半精製飼料(AIN-93G)を用いる頻度が増えた。その結果、非精製飼料と半精製飼料の違いがマウスの摂食量や飲水量だけでなく、行動にも影響する可能性に気が付いた。そこで、MFおよびAIN-93Gの固形飼料をそれぞれB6に給与し、亜慢性社会的敗北ストレスモデルを作製し、両者の行動を比較した⁷⁾。社会的敗北ストレスモデルマウスの行動評価法として、ICRに対する接近行動を評価するテスト(Social interactionテスト)が良く用いられているが、ICRに接近するB6をストレス耐性あり(レジリエント)、接近しないB6をストレス耐性なし(脆弱)と評

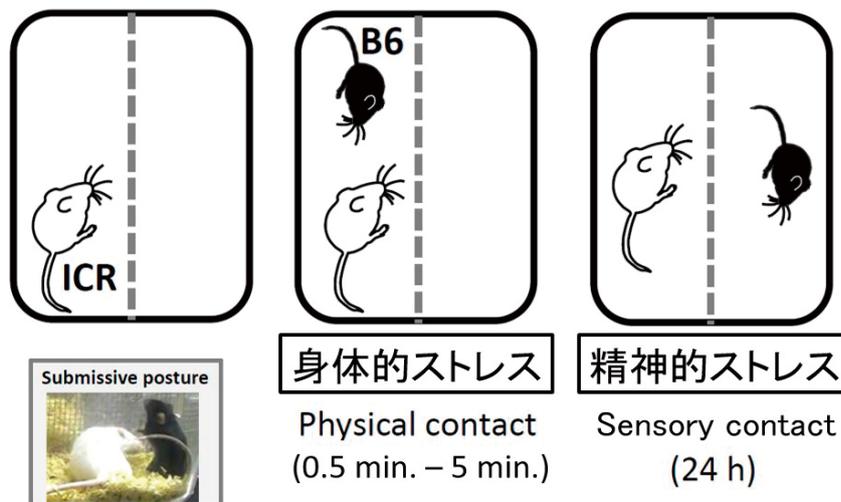


図1. 亜慢性社会的敗北ストレスモデルマウスの作製法

ICRオスマウスの飼育エリアにB6オスマウスを導入し、ICRに闘争行動を起こさせる。通常、B6がICRに敗北する(身体的ストレス)。B6は左下写真のような服従姿勢を取ることがある。敗北したB6を穴の開いた透明アクリル板で仕切られたICRの隣のエリアで24時間飼育する(精神的ストレス)。翌日、また別のICRによる身体的ストレスをB6に暴露し、同様に精神的ストレスを暴露する。これを10日間繰り返す。

価する⁴⁾。この脆弱なB6はうつ病と似た症状を示し、うつ病発症に関与する可能性のある分子も複数同定されてきた⁸⁾。しかしながら、これらの成果を公表した論文にはマウスに給与した飼料についての記載が無いものも多いが、ほとんどの研究で固形の非精製飼料を用いたと思われる。またエンリッチメントなどについても論文に記載されていないことが多いが、この状況ではその論文が示すデータの再現性を第三者がチェックすることが難しくなり、公正な科学研究を遂行する上で懸念される問題と思われる。前述の私共の研究では、AIN-93Gを給与されたB6はMFを給与されたB6よりも心理社会的ストレスに対して脆弱だった(図2)⁷⁾。非精製飼料中の成分にレジリエンス

を向上させる効果があると思われるが、他の行動、例えば記憶・学習行動などへの飼料の影響も同様に考えられるため、実験者は飼料の選択に注意を要する。特に非精製飼料の場合は、飼料に使われる原材料の「ロット差」なども懸念材料になると思われる。

3. 飼料が亜慢性社会的敗北ストレスモデルの代謝物へ与える影響

では、それぞれの飼料がこのモデルの代謝物に与える影響はどうであろうか?私共はメタボローム解析を用いてこの問題を解くことにした。この研究では、AIN-93GおよびMFの固形飼料をそれぞれB6に給与し、ICRによる亜慢性社会的敗北ストレスを暴露後、血漿、肝臓、消化管内容物の代謝

物をガスクロマトグラフ質量分析器によりメタボローム解析した。その結果、亜慢性社会的敗北ストレスよりも飼料の違いにより影響を受ける代謝物が多いことが明らかとなった⁹⁾。興味深いことに、血漿と肝臓の4-ヒドロキシプロリンはどちらの飼料給与条件下でもストレス暴露で増加した。一方、ストレスモデルの血漿中コハク酸などの分子はMFとAIN-93Gで逆の方向に変動した(図3)。通常、栄養代謝に関する研究をする場合は飼料の選択には注意を払うが、行動や生理の研究をする場合でも、給与飼料による代謝物プロファイルの違いが行動・生理に影響する可能性を想定しておくべきであろう。

4. 飼料がB6マウスの行動および腸内細菌叢に与える影響

次に、健全なB6オスマウスにMFとAIN-93Gの固形飼料をそれぞれ給与し、各種行動と腸内細菌叢を解析した。その結果、ホームケージとオープンフィールドでの活動量、血漿中コルチコステロンは両群で有意差がなかったものの、腸内細菌叢が両群で異なっていた(表1)¹⁰⁾。このことは給与される飼料の種類によってマウスの腸内細菌叢や腸内細菌由来の代謝物は異なっており、行動や生理など様々なデータに影響する可能性を示唆している。実際に、自閉症様モデ

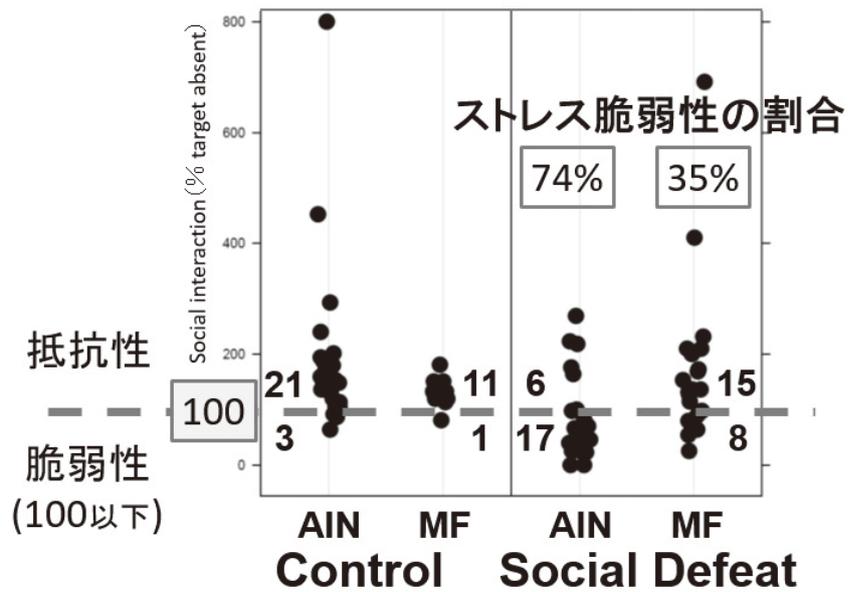


図2. 給与飼料が亜慢性社会的敗北ストレスモデルマウスのストレス感受性に与える影響
各マウスのストレス感受性を社会行動テストで評価した。Social interactionスコア100%以上はICRに接近するストレス抵抗性個体(耐性あり)、100%未満はICRを忌避するストレス脆弱性個体(耐性なし)である。AINはAIN93G給与群、MFはMF飼料給与群。



図3. 給与飼料が亜慢性社会的敗北ストレスモデルマウスの代謝物に与える影響
ストレスと飼料で交互作用のあった代謝物をリストした。

表1. 給与飼料がB6オスマウスの腸内細菌叢(属レベル)に与える影響

| 属 | MF | | AIN-93G | | P値 |
|------------------------|---------|---------|---------|---------|-----------|
| | 平均 | 標準誤差 | 平均 | 標準誤差 | |
| <i>Adlercreutzia</i> | 0.78023 | 0.14684 | 0.16475 | 0.02136 | 0.00603** |
| <i>Parabacteroides</i> | 0.24653 | 0.04456 | 0.09267 | 0.02654 | 0.02507* |
| <i>Ruminococcus</i> | 1.9469 | 0.13575 | 0.92168 | 0.26567 | 0.01386* |
| <i>Dorea</i> | 0.11682 | 0.03701 | 0.00997 | 0.00199 | 0.02796* |
| <i>Allobaculum</i> | 3.78764 | 2.88293 | 43.3899 | 8.37789 | 0.00424** |
| <i>Bifidobacterium</i> | 0.04314 | 0.01358 | 0.00566 | 0.00099 | 0.03321* |
| <i>Desulfovibrio</i> | 2.25272 | 0.78526 | 0.08036 | 0.08036 | 0.0332* |

**p < 0.01, *p < 0.05.

ルマウスを用いた研究では、腸内細菌由来の尿毒症物質である4-ethylphenylsulfateが血液脳関門を通過して脳に入り、行動失調発症の原因となり、この症状はプロバイオティクスの介入で抑制できることが明らかにされている¹¹⁾。近年、腸内細菌—代謝物—脳—行動の関係に関する研究は盛んに行われているが、腸内細菌叢解析までの研究が多く、給与飼料についてまで踏み込んで言及されるケースは少ない。

今後の展望

適切な飼料を使用して動物実験をすることは、その実験で得たデータの信頼性や再現性を担保するために重要である。通常、栄養科学に関する研究を実施するにあたっては、給与飼料は充分配慮して選択されているはずだが、他の研究分野ではどうであろうか? Nature、Cell、Scienceなどの著名なジャーナルに掲載されている論文にも、動物実験で給与した飼料についての記載が一切ないことが多い。これは医学・生命科学における実験動物飼料の「立ち位置」を如実に物語っているとと言える。研究者は再現性のあるデータを得るため、使用する実験動物の種や系統、性などには留意して実験するはずであるが、実験動物飼料の選択も上述の通り重要である。給与飼料の情報を漏れなく論文に記載して公表す

べきであろう。論文の査読者もその点に注意を払って、給与飼料についての情報開示が充分でない場合はその点を著者に指摘すべきである。また、飼料を生産・販売する側にも課題があると言え、例えば、非精製飼料に使われている原材料(種類、産地など)の情報開示が進んでいるとは言えない。半精製飼料に配合されるカゼインにはその処理過程で乳酸菌体が混入するが、このことを把握していない研究者は多いのではないだろうか。動物へのプロバイオティクスやプレバイオティクス介入試験で、カゼイン由来の乳酸菌体がデータに影響を与えたりはしないだろうか? 飼料メーカー側は、今まで以上に研究者に対しての情報開示やコンサルトを行うべきであろう。このような細かい「取り組み」が動物実験の健全性を向上させるには大切であろう。一方で最近、AIN-93給与による様々な問題点、例えば腸内細菌叢や脂質代謝異常が指摘されてきており、AIN-93の組成を見直そうという動きがある¹²⁾。今後、AIN飼料の改良・改変が進む可能性が高いが、実験動物を使用するすべての研究者は実験動物飼料に関する最新動向に敏感であるべきだと考える。メーカー側もより積極的に最新情報の発信をすべきであろう。

謝辞

この一連の研究は、当研究室に所属していた後藤達彦博士(現在、帯広畜産大学)を中心に実施したものです。また、京都大学大学院農学研究科の友永省三博士、東京農工大学大学院農学研究院の永岡謙太郎博士にご協力いただきました。本稿執筆の機会を作っていただきました小山公成博士(アステラス製薬)にも感謝いたします。なお本研究は、文部科学省特別経費、内閣府戦略的イノベーション創造プログラム、日本学術振興会科学研究費補助金を受けて実施しました。

引用文献

- (1) Krishnan V, Nestler EJ. *Nature* 2008 455:894-902.
- (2) Nestler EJ, Hyman SE. *Nat Neurosci* 2010 13:1161-9.
- (3) Russo SJ, Nestler EJ. *Nat Rev Neurosci* 2013 14:609-25.
- (4) Golden SA, Covington HE 3rd, Berton O, Russo SJ. *Nat Protoc* 2011 6:1183-91.
- (5) Goto T, et al. *Behav Brain Res* 2014 270:339-48.
- (6) Goto T, Toyoda A. *J Vis Exp* 2015 105:52973.
- (7) Goto T, Kubota Y, Toyoda A. *Nutr Neurosci* 2016 19:284-9.
- (8) Krishnan V, et al. *Cell* 2007 131:391-404.
- (9) Goto T, Tomonaga S, Toyoda A. *J Proteome Res* 2017 16:1857-1867.
- (10) Toyoda A, et al. *Neurosci Lett* 2018 670:36-40.
- (11) Hsiao EY, et al. *Cell* 2013 155:1451-63.
- (12) Klurfeld DM, Gregory JF, Fiorotto ML. *J Nutr* 2021 151:1380-1382.

私の研究

フリーズドライ精子保存法

岩手大学大学院 理工学研究科
岩手大学 理工学部 化学・生命理工学科
金子 武人

はじめに

フリーズドライ（凍結乾燥）という言葉は、多くの方が一度は耳にしたことがあると思う。新型コロナウイルス（COVID-19）のパンデミックにより再流行しているアウトドアでの料理や災害時の非常食などにも利用されている技術である。私も職場でフリーズドライされたインスタントコーヒーやスープをよく利用している。

「インスタントコーヒーのように手軽に精子を保存したい」このような発想から研究を開始したフリーズドライ精子保存法は、これまでにマウス、ラット、ウサギ、ハムスター、ブタ、サルなど多くの実験動物で盛んに研究が行われている^{1,2}。我々も、マウスやラットを中心に長期保存可能なフリーズドライ精子保存法の開発に成功^{3,4}し、その技術はすでに実用化され、近年では野生動物保全にも応用展開している⁵。フリーズドライ精子の最大のメリットは、従来の凍結保存法では不可欠な液体窒素を必要としない「簡易、安全、低コスト」の長期保存が可能であるということである。

本稿では、この究極の遺伝資源保存法を確立するために、我々がこれまで行ってきた研究成果からフリーズドライ精子保存法のメリットと現状、そして将来の可能性についてお話させていただきたいと思う。

フリーズドライ法とは

フリーズドライ法は、栄養成分や風味の劣化が少なく長期保存が可能であることから食品や医薬品に汎用されている技術である。フリーズドライの原理は、水分を含んだサンプルを急速凍結した後、真空状態にすることでサンプル中の水分を固体から気体へと昇華させながら乾燥状態にしたものである。水分が極端に少ないため軽く輸送しやすいことから非常食や携行食、そして国際宇宙ステーション（ISS）に滞在する宇宙飛行士の食料にも応用されている。フリーズドライ後のサンプルは、除去された「水」を添加するだけで元の状態に戻ることができる。この技術を精子に応用した場合も製造工程は同じであり、卵子と受精させるときは同様に水を用いて精子を元に戻



図1：フリーズドライ精子アンプル、アンプルの底に粉状になった精子が確認できる

した後、受精させ産子を得ることが可能である（図1）。

フリーズドライ精子保存法のメリット

精子保存法は、一般的に液体窒素を用いた凍結保存法がよく用いられている。今回紹介するフリーズドライ保存法を、凍結保存法と比較すると多くのメリットが挙げられる（表1）。最大のメリットは前述したとおり「液体窒素での保存が必要ない」ということである。現在、フリーズドライ

精子は冷蔵庫（4℃）での長期保存が可能であることが示されている^{3,4}。これにより、従来の凍結保存法で不可欠な専用の液体窒素専用容器の購入や設備の構築、そして定期的な液体窒素の補充も不要となる。研究機関や個々の研究室で精子を保存・管理する場合、液体窒素の補充はかなりの手間である。フリーズドライ保存法を用いることで、液体窒素の定期補充の手間や補充し忘れによるサンプル消失のリスクから解放されることになる。

近年、ゲノム編集技術を用いた高度な遺伝子改変技術の開発により、多くの系統が短期間に作製されている。精子や受精卵を利用した遺伝資源保存は、生体での系統保存による個体数・系統数の増加、飼育中の感染症や遺伝子汚染、輸送時の死亡・逃亡・感染症の拡大などのリスク軽減に大きく貢献してきた。しかしながら、液体窒素での精子・受精卵の保存や輸送は、保存系統数の増加に伴う設備の増設、液体窒素使用量の増加、定期的な設備メンテナンスにかかる費用を考えると決して安価ではない。また、液体窒素は1日5～10リットル気化していくため、大規模災害による液体窒素供給システムの停止、生産工場被災や道路の寸断により液体窒素供給が途絶えることは致命的である。実際に2011年3月の東日本大震災では、多くの貴重な研究用サンプルが失われた。遺伝資源保存を液体窒素だけに頼ること

は決して安全で安価な方法ではないといえる。遺伝資源を保存するということは、確立した形質を安全に次世代に受け継がなければならない。人為的なミスによるサンプル消失に加え、災害や維持費用の問題によるサンプル消失の対策も検討する必要がある。

フリーズドライ精子は、常温での長期保存も研究中であるが、短期間であれば3ヶ月間常温で保存することが可能である⁶。このため、急な電源喪失においても凍結精子の輸送で必要とされていた液体窒素専用輸送容器（ドライシッパー）もフリーズドライ精子には必要なく常温で安全な場所へ運び出すことが可能である。また、遺伝資源の授受の際でも、封筒に入れて国際間も含めた常温輸送が可能である。

フリーズドライ精子保存法の実際

では、実際にフリーズドライした精子の遺伝資源としての活用の可能性について我々の研究成果を中心に考察してみたいと思う。

1. マウス

マウスは、最も研究に利用されている実験動物の一つである。これまでのトランスジェニック、

ロックアウト、ロックイン系統に加えて、近年のゲノム編集の応用により、さらに多くの遺伝子改変系統が作製されており精子・受精卵で保存することの重要性は極めて高い。このため、国内外においてこれらの遺伝資源を集中的に保存・管理し、広く研究者に提供を行うバイオリソース事業も確立されている。

フリーズドライ精子保存法の開発に関する研究は古く、1950年代頃からすでに行われている¹。フリーズドライ精子は、顕微授精技術（ICSI）⁷を用いて卵子と受精させる。ICSIとは、微細なガラス管を用いて精子を卵子内に直接注入することで受精させる技術であり、現在では動物だけでなくヒトの不妊症治療の主力技術として利用されている。ICSIによりフリーズドライ精子からマウスの作製が可能となったが、当時は4℃で3ヶ月間の保存が可能であることが示されていた⁸。フリーズドライ精子からの産子作製が可能であることが明らかとなったことで、我々はこの技術を遺伝資源保存に応用するための保存期間の延長および効率向上を目的として実用化に向けた研究に従事することになる。これ

表1：フリーズドライ保存法と凍結保存法の比較

| | フリーズドライ保存法 | 凍結保存法 |
|------------|-------------|----------------|
| 保存方法 | 冷蔵庫（4℃） | 液体窒素専用容器・設備 |
| 保存液 | トリス-EDTA保存液 | 各種凍結保護物質 |
| 輸送方法 | 室温・封筒 | 液体窒素・ドライシッパー |
| 緊急時保存可能期間* | 3ヶ月（常温） | 2週間（5～10L/日蒸発） |
| バックアップ方法 | 不要 | 液体窒素専用容器・設備 |

*液体窒素や電気などの供給が途絶した状況でサンプルを保存できる期間

まで行ってきた研究成果から、1) 保存液のpHは8.0が最適であること⁹、2) トリス溶液にEDTAなどの金属キレート剤を添加した保存液 (TEバッファー) が精子のフリーズドライに適していること^{10,11}、3) 常温 (25°C) で3ヶ月間の保存が可能であること⁶、4) 常温国際輸送した精子から産子が得られること¹²、5) 精巢上体尾部精子はフリーズドライに対する耐性が高く、精巢内精子は耐性が低い化学物質で処理をすることで精巢上体尾部精子と同等に保存できること¹³、6) 汎用系統のC57BL/6マウスにおいてもフリーズドライ精子保存法が応用可能であること⁴、7) 4°Cで長期保存したフリーズドライ精子から正常な繁殖能力を持つ産子の作製に成功 (図2)^{3,4}などを明らかにし、フリーズドライ精子保存法を实用化レベルにまで到達させることができた。

精子や受精卵の凍結保存では、多くの凍結保護物質の中から最適な物質を選定し濃度や添加方法などを十分に検討した上で保存作業を行っている。我々は、フリーズドライ保存においても同様に細胞へのダメージを少なくする保存液の開発が必要と考えていたが、驚くことにフリーズドライ保存法では、分子生物学でのDNAの保存に一般的に用いられている単純な組成のTEバッファーで精子を長期保存できてしまうことが明らかとなった。これらの研究成果から、現在のフ

リーズドライ精子保存法は、保存液にTEバッファー (pH8.0) を用いることで、4°C保存での長期保存および常温輸送が可能であり、現在この方法で多くの系統のフリーズドライ精子が冷蔵庫で長期保存され授受されている³。

2. ラット

我々は、ラットのフリーズドライ精子保存法の開発についても精力的に行っている。近年のゲノム編集技術のラットへの応用により、これまでの突然変異、コンジェニック、トランスジェニック系統に加え、作製が困難であったノックアウト、ノックイン、コンディショナルノックアウト系統など高度な遺伝子改変系統の作製も可能になった。また我々は、ゲノム編集による遺伝子改変をさらに容易に行うために、エレクトロポレーション法を用いた受精卵の核酸導入法 (テイク法) の開発にも成功し、現在広く利用されている¹⁴⁻¹⁸。このことから、ラットの新規系統数は急速に増加しており、フリーズドライ精子保存法の必要性も向上している。これまでの研究成果から、先に開発したマウスでのTEバッファーを

用いたフリーズドライ保存法は、ラット精子にも応用可能であるということであるということが明らかとなり、産子作出にも成功した^{19,20}。ラット精子は、物理的な刺激に極端に弱く、凍結保存後の運動性を十分に維持することが困難である²¹。このことから、フリーズドライによる精子保存は有効な手段である。また、動物種ごとに複雑なプロトコルを習得することなく、共通のプロトコルで保存作業ができることは効率的なルーチンワークとしての利用が期待できる。これまでに、4°Cで長期保存したフリーズドライ精子から産子を作製することに成功し、現在も長期保存試験は継続しているため新たな知見も今後明らかになってくるであろう (図2)⁴。

遺伝子改変系統の保存は、系統として確立された個体の精子を保存しなければならないと考えがちであるが、フリーズドライした後の精子を用いて遺伝子改変することも可能である。我々は、フリーズドライ精子を卵子と受精させ、この受精卵にテイク法を用いてゲノム編集することで遺伝子改変個体を作製することに

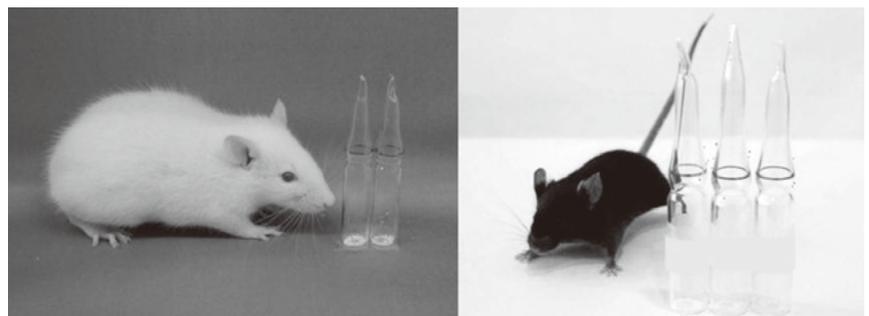


図2: 4°Cで長期保存したフリーズドライ精子から得られたマウス (右) とラット (左)

成功している²²。つまり、すでに保存している系統をさらに遺伝子改変することで新しい系統を作製し研究に利用することも可能なのである。

フリーズドライ遺伝資源保存法の将来

これまで述べてきたように、フリーズドライ精子保存法はマウス・ラットだけでなく多くの動物種において開発が行われている。すでに一部の動物種では実用化されており、4℃での長期保存^{3,4}や常温国際輸送¹²、さらには宇宙空間への移送実験に成功している²³。我々は現在、これまで開発してきたフリーズドライ精子保存法を絶滅危惧種の遺伝資源保存および人工繁殖に応用する取り組みを行っている⁵。近い将来には、多くの動物種で常温での長期保存、さらには卵子や受精卵のフリーズドライ保存も可能となるであろう。フリーズドライ保存法を究極の遺伝資源保存法として確立するために、これからも研究・開発を進めていきたいと思う。

おわりに

フリーズドライ精子保存法の研究は、2001年にハワイ大学への留学をきっかけに開始し、現在では実用化されるまでに至った。今年で20年の月日が経ったが、課題はまだ残されており現在も我々は改良を続けている。このような仕事は、すぐに結果が得られるのではなく地道なデータの蓄積

により技術が確立し、利用者からの信頼が得られるという多くの時間と労力を要する仕事であると実感している。これからも着実にデータを積み重ね、科学研究に貢献できる技術に改良するだけでなく、さらに新たな技術へと進化させるべく研究を続けていきたいと思う。

参考文献

1. Kaneko T. Sperm freeze-drying and micro-insemination for biobanking and maintenance of genetic diversity in mammals. *Reprod Fertil Dev.* 28, 1079-1087, 2016.
2. Kaneko T. Simple gamete preservation and artificial reproduction of mammals using micro-insemination techniques. *Reprod Med Biol.* 14, 99-105, 2014.
3. Kaneko T, Serikawa T. Long-term preservation of freeze-dried mouse spermatozoa. *Cryobiology* 64, 211-214, 2012.
4. Kaneko T, Serikawa T. Successful long-term preservation of rat sperm by freeze-drying. *PLOS ONE* 7, e35043, 2012.
5. Kaneko T, Ito H, Sakamoto H, Onuma M, Inoue-Murayama M. Sperm preservation by freeze-drying for the conservation of wild animals. *PLOS ONE*. 9, e113381, 2014.
6. Kaneko T, Nakagata N. Relation between storage temperature and fertilizing ability of freeze-dried mouse spermatozoa. *Comp Med.* 55, 140-144, 2005.
7. Kimura Y, Yanagimachi R. Intracytoplasmic sperm injection in the mouse. *Biol Reprod.* 52, 709-720, 1995.
8. Wakayama T, Yanagimachi R. Development of normal mice from oocytes injected with freeze-dried spermatozoa. *Nat Biotechnol.* 16, 639-641, 1998.
9. Kaneko T, Whittingham DG, Yanagimachi R. Effect of pH value of freeze-drying solution on the chromosome integrity and developmental ability of mouse spermatozoa. *Biol Reprod.* 68, 136-139, 2003.
10. Ward MA, Kaneko T, Kusakabe H, Biggers JD, Whittingham DG, Yanagimachi R. Long-term preservation of mouse spermatozoa after freeze-drying and freezing without cryoprotection. *Biol Reprod.* 69, 2100-2108, 2003.
11. Kaneko T, Nakagata N. Improvement in the long-term stability of freeze-dried mouse spermatozoa by adding of a chelating agent. *Cryobiology* 53, 279-282, 2006.
12. Kaneko T. Simple sperm preservation by freeze-drying for conserving animal strains. *Methods Mol Biol.* 1239, 317-329, 2015.
13. Kaneko T, Whittingham DG, Overstreet JW, Yanagimachi R. Tolerance of the mouse sperm nuclei to freeze-drying depends on their disulfide status. *Biol Reprod.* 69, 1859-1862, 2003.
14. Kaneko T, Sakuma T, Yamamoto T, Mashimo T. Simple knockout by electroporation of engineered endonucleases into intact rat embryos. *Sci Rep.* 4, 6382, 2014.
15. Kaneko T, Mashimo T. Simple genome editing of rodent intact embryos by electroporation. *PIOS ONE* 10, e0142755, 2015.
16. Kaneko T. Genome editing in mouse and rat by electroporation. *Methods Mol Biol.* 1630, 81-89, 2017.
17. Wake Y, Kaneko T. Production of genome-edited mice by visualization of nucleases introduced into the embryos using electroporation. *J Reprod Dev.* 66, 469-473, 2020.
18. Kaneko T, Nakagawa Y. Genome editing of rodents by electroporation of CRISPR/Cas9 into frozen-warmed pronuclear-stage embryos. *Cryobiology* 92, 231-234, 2020.
19. Kaneko T, Kimura S, Nakagata N. Importance of primary culture conditions for the development of rat ICSI embryos and long-term preservation of freeze-dried sperm. *Cryobiology* 58, 293-297, 2009.
20. Kaneko T, Kimura S, Nakagata N. Offspring derived from oocytes injected with rat sperm, frozen or freeze-dried without cryoprotection. *Theriogenology* 68, 1017-1021, 2007.
21. Si W, Benson JD, Men H, Critser JK. Osmotic tolerance limits and effects of cryoprotectants on the motility, plasma membrane integrity and acrosomal integrity of rat sperm. *Cryobiology* 53, 336-348, 2006.
22. Nakagawa Y, Kaneko T. Rapid and efficient production of genome-edited animals by electroporation into oocytes injected with frozen or freeze-dried sperm. *Cryobiology* 90, 71-74, 2019.
23. Wakayama S, Ito D, Kamada Y, Shimazu T, Suzuki T, Nagamatsu A, Araki R, Ishikawa T, Kamimura S, Hirose N, Kazama K, Yang L, Inoue R, Kikuchi Y, Hayashi E, Emura R, Watanabe R, Nagatomo H, Suzuki H, Yamamori T, Tada MN, Osada I, Umehara M, Sano H, Kasahara H, Higashibata A, Yano S, Abe M, Kishigami S, Kohda T, Ooga M, Wakayama T. Evaluating the long-term effect of space radiation on the reproductive normality of mammalian sperm preserved on the International Space Station. *Sci Adv.* 7, eabg5554, 2021.

RFID技術を用いた 集団飼育環境下全自動マウス 行動解析システム IntelliCage

フェノバンス合同会社 代表 遠藤 俊裕

1. はじめに

脳や心の研究は、超高解像度の構造/機能的イメージングや、光遺伝学、ゲノム編集技術など、ノーベル賞級の輝かしい先端科学技術を駆使して日々進められています。しかしながら、脳や心の状態がより包括的・直接的に可視化される「行動」の解析手法については、他の解析分野のような技術革新が遅れ、長らく効率性や精度の面で問題視されてきました。

本稿では、近年、マウスの次世代型行動解析システムとして登場し、急速に普及しているIntelliCage（インテリケージ）システムについて、その仕組みや強み、弊社における運用例や関連サービスなどについて紹介いたします。

2. IntelliCageシステム 5つの特徴と強み

伝統的なマウス行動試験法の多くは半世紀ほど前に確立し、現在に至っても未だ標準的な手法とされています。典型的には、実験者がマウスを飼育ケージから1匹ずつ手で取り出し、特殊な試験装置に移し、そこで数分から数十分程度観察します。しかし、マウスはそのような環境変化やヒトとの接触等に慣れることが難しく、特に後者には強いストレス反応を示

し、活動量・体温・血中ストレスホルモン量等が1時間以上上昇する、といった知見が蓄積しています。2000年頃からは、そのような要因がマウス行動試験の再現性や解釈の一般化可能性を大きく損なっていると繰り返し指摘されてきました。

チューリッヒ大学のHans-Peter Lipp教授（当時）らのグループは、実験用マウスの行動を、ヒトとの接触のない普段の集団生活環境下において、“準自然的”な状態としてそのまま記録・解析するための方法として、RFID（非接触個体識別）技術をベースとしたIntelliCageシステムを開発しました。その主な機能的特徴と強み、外観を図1にまとめました。

以下では、その詳細と、世界的な普及状況、応用分野、弊社での運用例、関連サービスの内容などについて順に紹介いたします。

実験に用いるマウスには、まず、麻酔下で頸部周辺に円筒型のRFIDトランスポンダ、いわゆるマイクロチップ（ISO11784/11785準拠 FDX-B規格）（図2a）を専用のインジェクタで埋め込みます。IntelliCageの四隅には各々小さな部屋（「コーナー」と呼ばれています）があり、マウスはその中に一匹ずつ入ることができます（図

- IntelliCageシステム 5つの特徴と強み
- ①ヒトとの接触に伴うマウスへのストレスを最小化
 - ②ホームケージ環境下での“準自然的”な行動の記録
 - ③RFIDによる確実な個体識別と社会的環境下での試験
 - ④研究の目的に応じた多様な行動試験プログラムの作成
 - ⑤実験の大規模化、行動指標の多様化、ビッグデータ化

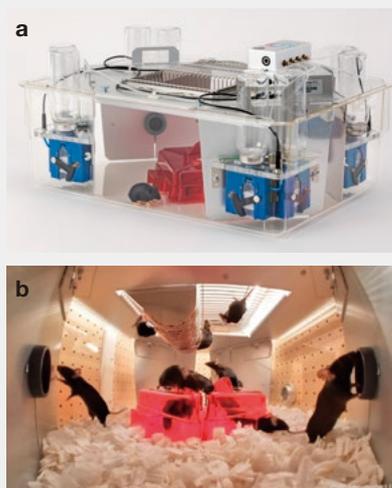


図1. (a) IntelliCageシステム外観、(b) IntelliCage内において飼育・実験中のマウス

2b)。コーナーの入り口には、マウスのマイクロチップに記録された個体識別番号を読み取るアンテナがついています（図2c）。コーナーの中には、左右にひとつずつ穴があり、マウスが穴に鼻を近づける（ノーズポークする）と、センサーがそれを検知します（図2d）。ノーズポークをした穴の奥には上下に開閉するドアがあり、さらに、開

いたドアの奥には給水ビンのノズルの先端があり、マウスはそこから水を飲むことができます。この時、給水ノズルの先端もセンサーとして機能しており、マウスがどの程度ノズルの先端を舐めたかも自動で記録されます。

このような飲水機会は、行動試験中において「報酬」として呈示されます。反対に、マウスの行動に対し、「罰」としてコーナーの天井部から圧縮空気を吹き付けることもできます。

ユーザーは、マウスの自発的な行動の特性や認知機能を調べる目的で、付属の試験課題作成ソフト(Designer)を使い、目的に応じた最適な試験内容をプログラムすることができます。具体的には、マウスが、いつ、どこで、何をしたときに、報酬または罰を与えるかなどを自在に設定します。作成したプログラムは、IntelliCageに接続した制御用PCから実行することができます(図3)。

IntelliCage内部の床面積は、4つのコーナー部分を除いておよそ1612cm²で、ILARやEU等の国際的なガイドラインに従うと、1つのIntelliCageにつき最大16匹まで収容し実験をすることができます。さらに、1つの制御PCから同時に複数台のケージを連結して制御することができるため、同時に100匹以上のマウスの自動行動解析を行うことも可能です。

得られるデータは、一般的な表計算ソフトで開いてみると、一日に数十万行以上になることもあります。その膨大なデータの中から、遺伝子型や環境型の影響、化合物の薬効や副作用などの詳細を探索していくことができます。

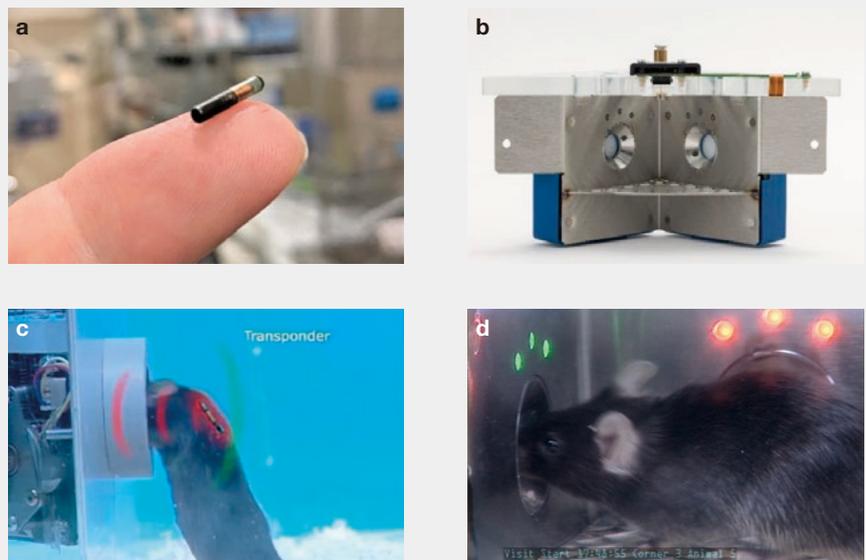


図2. (a) マウスの皮下に埋め込むRFID個体識別用マイクロチップ、(b) コーナー内部、(c) コーナー入口でのID読取アンテナ、(d) ノーズポーク行動

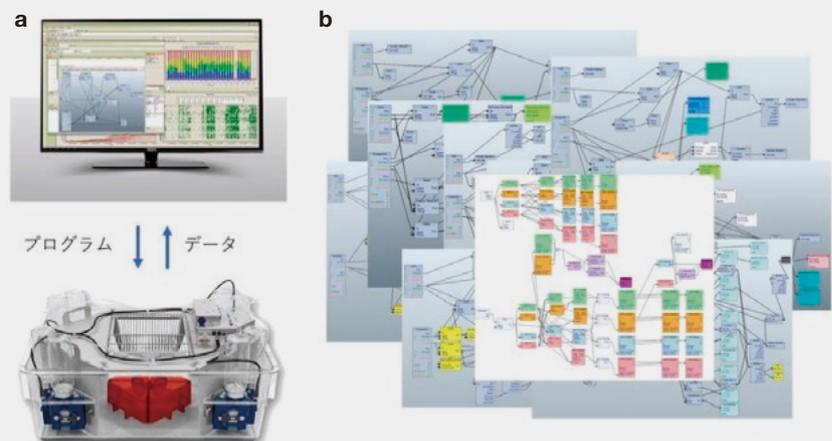


図3. (a) 実験中のイメージ、(b) ユーザーは付属のDesignerソフトウェアを用いて、自由に行動試験プログラムを作成できる

3. IntelliCageの普及状況

(1) 販売台数

IntelliCageシステムの現・販売元であるTSE Systems社より提供いただいた2020年末時点での資料によれば、これまで少なくとも欧州で172台、アジアで64台、北米で51台のIntelliCageシステムが販売されています。

特に神経科学分野、精神神経疾患分野の研究において世界をリードするドイツ(57台)、アメリカ(49台)、そして近年科学技術分野において著しい躍進をみせる中

国(31台)などで積極的に導入されており、疾患・創薬研究などに活用されています。国内でも特にこの2~3年で10台ほどが新たに企業・大学・その他研究機関に導入され、世界では中国に次ぐ合計30台ほどが導入されています。

(2) 学術論文数

学術文献上でのIntelliCageシステムの初出はGalsworthyらによる2005年の論文(Behav. Brain Res., 2005)です。その後欧州を中心に世界的に普及し、2020年末時点では少なくとも200を超える学術論文が発表されています(図4, 特許

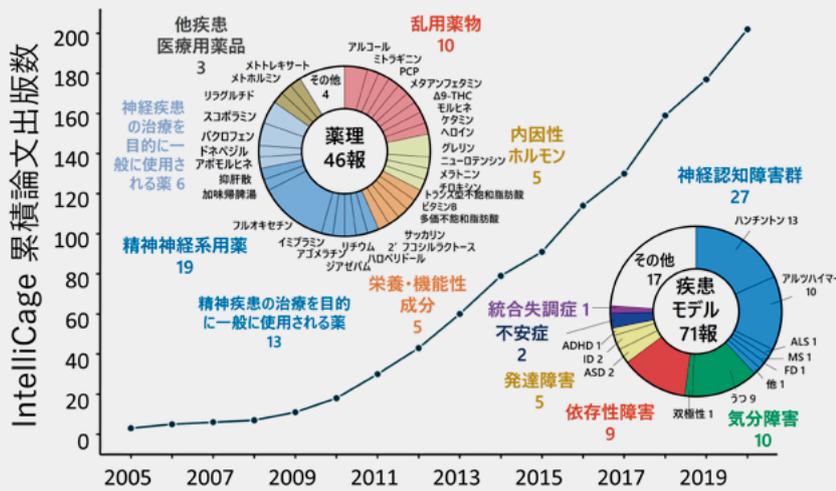


図4. IntelliCageが使用されている研究の累積学術論文数 (折れ線グラフ) および使用用途や方法の詳細 (円グラフ)

文献は含まず)。IntelliCageの開発の経緯やこれまで出版された文献についての詳しい総括は、Kirykらによる2020年のレビュー論文 (Behav. Brain Res., 2020) が参考になります。

(3) 研究用途

IntelliCageシステムは、これまで、疾患モデル動物の表現型解析 (71報) や、薬効薬理試験や栄養・機能性成分効果の探索 (46報)、化合物や環境化学物質の安全性評価/毒性評価など、主に医学・薬学・健康科学領域の研究に多く利用されています。疾患モデルとしては、気分障害、依存性障害、自閉スペクトラム症等の精神疾患/発達障害モデル、アルツハイマー型認知症やパーキンソン病等の神経変性疾患モデル、コストロ症候群やコフィン・ローリー症候群等の希少疾患モデル等を用いた試験が発表されています。薬理的研究としては、各種抗うつ薬、抗不安薬、ハロペリドール、リチウム、ドネペジル、加味帰脾湯といった既存の薬剤の評価や、新規化合物の評価、乱用薬物等を用いた研究が広く行われています。マウスの系統としては少なくとも12系統以上が

用いられており、さらには野外で捕獲されたモリアカネズミ (wood mouse) やヨーロッパヤチネズミ (bank vole) 等の行動解析にも使用されています。

4. フェノバンス合同会社におけるIntelliCage関連サービス

弊社は、IntelliCageシステムの開発者であるHans-Peter Lipp博士にScientific Advisorとしてご協力いただき、同じく同システムに深く精通した共同研究者チームによって設立されました。IntelliCageに関連する事業としては、①IntelliCage受託試験サービス (表現型解析、薬効薬理試験等)、②IntelliCageシステムの輸入・販売、③ユーザーサポートを行っています。以下では、弊社におけるIntelliCageシステムの実際の運用状況、および上記①の受託試験サービスについて詳しく紹介させていただきます。

(1) 環境条件

弊社では、IntelliCageシステムを最適な環境で運用するため、IntelliCage試験とその前後の期間での短期的な飼育のみを行う専用の実験施設を備えています。その

中で、個々のIntelliCageは、専用の「アイソレーションボックス」(弊社製 PRT-IC0033) 内で使用しています (図5)。このアイソレーションボックスは、IntelliCage周囲の環境条件の標準化を図るとともに、不必要な騒音や実験者の気配等の軽減、ボックスごとの環境条件の調節 (明暗周期条件の変更など)、詳細な実験環境モニタリング (温度・湿度・騒音・照度・二酸化炭素濃度等の測定、異常値の検出、監視カメラでの画像的記録など) を行えるようにしています。実験施設間での環境条件の違いや同一施設内での環境条件のばらつきは、行動試験の結果を大きく左右し得るため、このような環境条件の統制や監視体制は重要であると考えています。

(2) 行動試験ライブラリ

IntelliCageシステムの最大の利点の1つは、ユーザーが自由に、研究の目的に応じた多様な行動試験プログラムを作成・実施できる点にあります。しかし、実際のところ、適切に行動試験をデザインし、得られたデータを見ながらさらに詳細なパラメータ調整をしていく過程には、マウス行動学とIntelliCageシステムの両面における深い理解と熟練を要します。過去の文献を見ると、ほとんどのグループがこの利点をほとんど活用できておらず、システムの購入時にサンプルとして付属するごく簡単なプログラムをそのまま使用して2~3種類の実験が行われているという事例も多いようです。



図5. 専用の「アイソレーションボックス」を利用したIntelliCageシステム専用実験環境

弊社では、同システムを10年以上にわたり運用し実施してきた様々なモデルマウスの解析を通じ、その有用性が確認された70種類以上の行動試験プログラムを揃え、これを独自の「行動試験ライブラリ」と名付けて活用しています(図6)。この行動試験ライブラ

りでは、評価カテゴリーとして、探索的行動、場所学習、行動系列学習/作業記憶、行動柔軟性、各種オペラントスケジュール、注意と衝動抑制、恐怖条件付け、うつ病の症状としての快感消失(アンヘドニア)/モチベーション、感覚過敏/鈍麻(視覚・味覚・嗅覚刺激に対する反応)、不安と順応、社会性、リズム/ストレス、視覚的弁別学習、長期記憶(報酬/罰ベース)の全14カテゴリーがあり、それぞれについて複数のバリエーションプロトコルがあります。これにより、研究の目的に応じて必要な試験プログラムを組み合わせ、最適な試験スケジュールを組むことができます。(詳しくは2021年3月に日本チャールス・リバー(現・ジャクソン・ラボラトリー・ジャパン)のウェビナーでお話しさせていただきましたので、オンデマンド配信をご覧ください)²。

(3) データ・プログラム例

弊社がこれまでIntelliCageシステムを用いて解析したデータの一例として、基底活動の多変量解析の例(7系統比較試験および加齢影響評価試験より)と弊社の行動試験ライブラリより課題の一例を紹介いたします。

まず、図7にある解析では、特別

な行動試験プログラムは用いていません。マウス達がケージ内で自由に活動している期間の基底活動データから、遺伝子型(系統)や加齢による基底活動への影響を探索した例です。いずれも重判別分析(MDA)と呼ばれる手法により、系統ごと、週齢ごとの行動の特徴を二次元平面状で分類することができました。ここから、さらに具体的にどのような行動指標がそれぞれの群の行動を特徴づけているかを知ることもできます。例えば、C57BL/6Jマウスでは、加齢が進むにつれて「常同的行動」が増加しているということがわかり、行動レベルにおける新しい老化マーカーを得ることができました。

次に、先述の弊社の行動試験ライブラリから、SP-FLEX(self-paced behavioral flexibility test)と名付けた課題を紹介いたします(図8)。

この課題では、マウスは報酬を効率よく得るために、4つのコーナーを特定のルールに従って順に訪れなければいけません。例えば、あるマウスは対角線上に位置する2つの離れたコーナーを交互に行き来することで効率的に報酬を得られることを学習します(行動系列の学習)。個々のマウスの学習成績はシステムによって常に監視されており、SPRTと呼ばれる統計学的検定法により一定の正答率を超えたと判断されると、そのマウスには自動的に別のルールの課題が与えられます。つまり、そのマウスはその時点までに学習した行動習慣から脱し、あらたなルールに即した行動を学習しなければなりません。このSP-FLEXは、日々刻々と変化する状況にどれほど柔軟に適応できるか(=行動柔軟性)

IntelliCage 行動試験ライブラリ (2021年度)

| C1: 探索行動 | C2: 場所学習 | C3: 行動系列学習/作業記憶 | C4: 行動柔軟性 | C5: オペラントスケジュール | C6: 注意と衝動抑制 | C7: 恐怖条件付け |
|----------|----------|-----------------|------------------|-----------------|-------------|------------|
| EX-IC | PL-Np | BST-2Cnr | FLEX-CS-CX | OP-FRX-Np | TL-Np-H/W | FC-C |
| EX-SA | PL-Np-S | BST-3Cnr | FLEX-CS-FR2 | OP-VRX-Np | TL-Np-DRL | FC-AC |
| EX-BC | PL-Cnr | BST-4Cnr | FLEX-CS-CV | OP-PRX-Np | TL-Np-DRLH | FCC-C |
| EX-Rand | PL-Cnr-S | BST-WM | FLEX-CS-UI | OP-FRX-Cnr | TL-Cnr-DRL | FCC-AC |
| EX-NpAd | | | FLEX-PS-CV | OP-VRX-Cnr | TL-Cnr-DRLH | FCC-C-SA |
| | | | FLEX-PS-CX | OP-PRX-Cnr | TL-IRP | |
| | | | FLEX-CS-PS-CX | OP-FRX-Cnr-S | TL-IRP-P | |
| | | | FLEX-CS-Pr-CX | | TL-IRP-S | |
| | | | FLEX-CS-PS-Pr-CX | | TL-IRP-P-S | |
| | | | FLEX-3Cnr-CX | | | |

| C8: アンヘドニア | C9: 感覚過敏/鈍麻 | C10: 不安と順応 | C11: 社会性 | C12: リズム/ストレス | C13: 視覚的弁別学習 | C14: 長期記憶 |
|-------------|-------------|----------------|-----------------|---------------|--------------|-----------|
| TASTE-CX | ODOR-Soc-SS | AXAD-Snd-LX | SOC-Comp-CLX | RS-JL-Adv | VDL | LTM-R |
| TASTE-CV | ODOR-Soc-OS | AXAD-Snd-LV | SOC-Comp-CLV | RS-JL-Dly | VDL-S | LTM-P |
| TASTE-PR-CX | ODOR-NSoc | AXAD-Lit-BX | SOC-Comp-SA-CLX | RS-JL-Chr | | |
| | ODOR-F | AXAD-Lit-BV | SOC-LF-CX | RS-L | | |
| | ODOR-SA | AXAD-Lit-SA-BX | SOC-LF-SR-CX | RS-DD | | |
| | TASTE-V | AXAD-Ap | SOC-LF-SR-CX-S | RS-N | | |
| | LED-V | AXAD-Ap-Rep | SOC-3CS-SA | RS-L | | |
| | | | SOC-3CSR-SA | | | |
| | | | SOC-ColSAd | | | |

図6. 弊社が保有するIntelliCageで実施可能な行動試験リスト

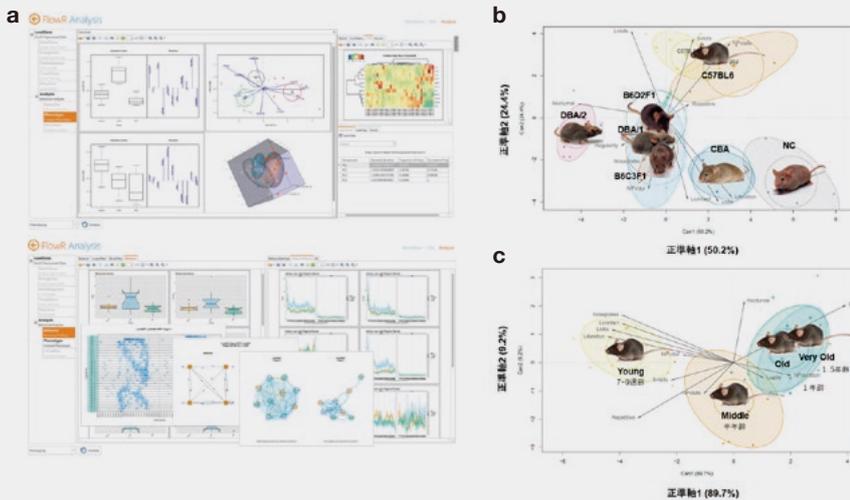


図7. (a)2週間の基底活動データを用いて行う、活動量、活動リズム、常同行動、個体間行動相関等の解析例。(b)7系統のマウスの基底活動パターンを重判別分析(MDA)を用いて分類した例。(c)様々な週齢のC57BL/6J系統マウスを用いて、異なる週齢群ごとの基底活動パターンを同じくMDAを用いて分類した例。

という、高度な認知能力を評価するための試験です。浸透圧ポンプを用いてSP-FLEX中にスコポラミンやアトロピンといった認知機能障害を引き起こす薬剤を投与すると、これらの行動系列学習や行動柔軟性が著しく阻害されることが確認できました(論文投稿準備中)。この課題がASDモデルマウスの表現型解析において用いられた例では、ASDの中核的症

状である「ルールの変化に対する適応の困難さ」がマウスにおいても繰り返し再現されることが確認されました(Shabeesh et al., 2021, Mol. Psy.)。

(4) 受託試験サービスと実験スケジュール例

弊社では、ジャクソン・ラボラトリー・ジャパン株式会社より再委託を受け、上記の実験設備と行動試験ライブラリを用いた「IntelliCageマウス行動表現型解析サービス」を行っています(詳細はウェブサイト¹をご覧ください)。このサービスでは、既に決まった試験を機械的に実施するのではなく、事前ヒアリングから最適な試験計画の提案、試験の実施、詳細なレポート、フォローアップミーティングによる試験結果の解説や質疑応答までをひとまとめにしたサービスです(図9)。そのため、IntelliCageシステムや、マウスの行動解析そのものに関する知識や経験がなくても全く問題ありません。

同サービスでも用いている典型的な実験スケジュールの例を

紹介いたします(図9下段)。まず、実験に使用するマウスを受け取り、施設馴化、マイクロチップの埋め込み、事前集団飼育馴化を順に行います。この段階で大きな体重の減少、極端な脱毛、深刻なケガ等が発生していないかを確認し、問題がなければそのコホートをIntelliCageに移します。マウスがIntelliCageに入った直後の数時間、数日間の行動データは「新奇環境における探索行動」の解析対象とします。続いて、そのままIntelliCage内で2週間飼育を行い、「基底活動」の解析を行うためのデータを収集します。このデータからは、活動量、活動リズム(ピリオドグラム、コサイナー法など)、常同行動、個体間活動相関性、多変量解析(主成分分析、重判別分析)などの解析を行います。その後、研究の目的に応じて選定した認知課題、例えば、「行動系列の学習」、「行動柔軟性」、「注意と衝動性」、「アンヘドニア/モチベーション」、「不安と順応」の 카테고リーに属する行動試験プログラムを順に実施していきます。それぞれの行動試験プログラムは、それぞれ平均的には数日から1週間ほど実施します。マウスの表現型解析に関しては、この2か月程度のスケジュールで幅広い項目を検査することができます。

5. さいごに

学会やセミナー等でIntelliCageシステムの紹介をさせていただくと、「非常に画期的なシステム

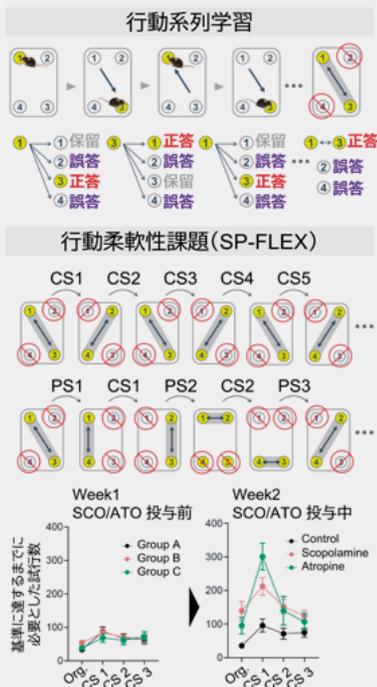


図8. SP-FLEX課題とスコポラミン、アトロピンを用いた実験例

だが、その分導入のハードルが高そう」、「試験プログラムの作成に不安がある」、「膨大なデータが得られても、それを解析するのが難しそう」といった声がよく聞かれます。私たちは、そのような不安や疑問を少しでも解消し、IntelliCageシステムの強みを広く知っていただくことを目標としています。本稿をお読みにになり、少しでもご興味を持たれた方は、ぜひお気軽にオンライン/オンサイトでの口頭での追加説明や、サポートのご依頼をいただければ幸いです。ウェビナーの録画資料²もぜひご活用下さい。

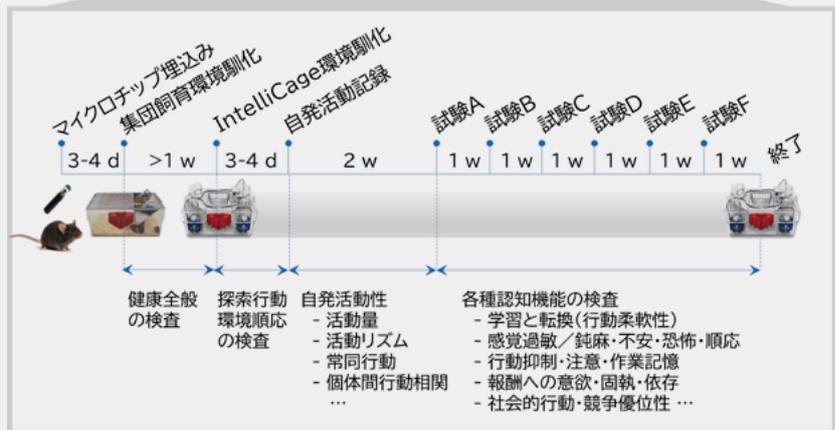
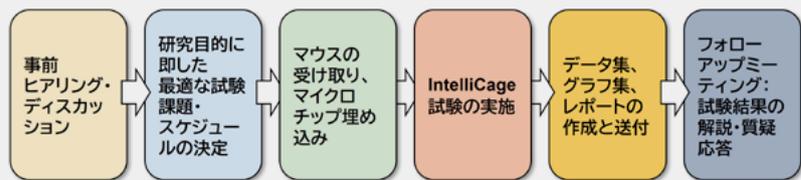


図9. IntelliCageシステムを用いた受託試験サービスの流れ

参考資料

1 「IntelliCageマウス行動表現型解析サービス」ウェブサイト (ジャクソン・ラボラトリー・ジャパン) <https://www.crj.co.jp/service/gems/intellicage>

2 Charles Riverウェビナー「精神神経疾患モデルマウス行動解析の”翻訳の失敗”にどう立ち向かうか -IntelliCageを例とした“AHEAD”アプローチ-」 <https://www.crj.co.jp/event/detail/7> (バーチャル展示会より視聴可)

(日動協ホームページ、LABIO21カラーの資料の欄を参照)

マイクロ超音波イメージング～ 実験小動物における精密で 多彩な超音波エコー検査～

プライムテック株式会社 研究支援部 水流 功春

1 はじめに

臨床診断において広くベッドサイドで用いられている超音波エコー検査技術は、生体内を無侵襲、リアルタイム、そして簡便に可視化することが可能であり、生理学検査に必須の技術となっています。一方、マウスやラット、マーモセットといった実験小動物においては、その微小な生体サイズにより臨床検査装置を適用することは困難でした。1983年頃より実験小動物のサイズに合わせてデザインされた超音波エコー検査装置の開発が開始され、現在では中心周波数30～70 MHzの高周波プローブを利用するマイクロ超音波イメージング技術が実用化されています。

本稿では、実験小動物用の装置デザインとリニアアレイプローブ方式によるマイクロ超音波イメージングが可能となったFUJIFILM Visualsonics社製Vevo[®]イメージングシステム（以下Vevo[®]システム）を中心に、実験小動物における超音波エコー検査の幅広い適用分野と最新技術をご紹介します。

2 実験小動物用超音波エコー検査装置に求められる要件

ヒトと異なり検査時体位や不動が難しい実験小動物においては、維持麻酔下もしくは保定覚醒下での超音波エコー検査が実施されています。特に実験小動物の微小な臓器を安定して描出するためには、維持麻酔下において被験動物および高周波プローブをそれぞれ専用マニピュレーターに固定して精密操作する方法が有用です。また、維持麻酔により不動化された動物は、バイタルサインモニターにより適切な麻酔深度を維持することが適切な超音波エコー検査および3Rsの観点からも推奨されます。

続いて重要な点は、超音波エコー検査装置の基本性能です。実験小動物、特に疾患モデルや遺伝子改変モデルなど多様な研究用途に用いられる実験用マウスにおいては、例えば心臓サイズは短軸径5 mm程度であり、心拍数500 BPM以上で拍動しています。高速で運動する微小構造を超音波エコー装置で可視化するためには、マイクロ超音波イメージング技術を用いた高空間分解能、高

時間分解能、そして適切な信号処理を伴う撮像モードが装置性能として必要です。Vevo[®]システムでは最大30 μ mの高空間分解能、リアルタイム時250 frames/sec以上、画像再構成時10,000 frames/sec以上の超高時間分解能、そして心エコー、腹部エコー、そして最新の光音響（光超音波）イメージングなど最先端の超音波エコー検査を実験小動物において可能とする多彩な撮像モードが利用可能です。

最後に課題となるのが適切な読影技術です。実験小動物の解剖学的構造および生理学的特徴をより良く理解した上で、評価対象の生体内挙動を適切に測定および評価する必要があります。一般的に超音波エコー検査にはある程度の練度が必要であるため、超音波検査に慣れ親しんだ臨床医だけではなく、ライフサイエンス研究者が汎用の生理学検査ツールとして超音波エコーを利用可能となるよう、様々な工夫がなされています。例えば、ニューラルネットワークを利用した機械学習AIによる画像診断サポートや、オンライン学習を目的としたナ

レジデータベース構築が進んでいます。

3 幅広い対象臓器と適用分野

3.1 心血管を対象とした循環器研究領域

前臨床研究においては、ヒトの病態を再現する心不全モデルマウスが多く開発され用いられています。Vevo[®]システムは高い心拍数を有するマウス心臓においても重要な心周期イベントを明確に画像化し、心機能を適切に評価するためにデザインされています。一般的にマウス心機能評価に用いられる収縮能指標（駆出率：Ejection Fraction, 短縮率：Fractional Shorteningなど）に加えて、心不全病態として昨今着目されている収縮能が維持された拡張不全（HFpEF）評価に用いられる拡張能指標（E/A, E/a', Tei indexなど）、心筋壁や動脈血管壁の僅かな伸縮性変化を評価し得るストレイン解析機能、機械学習AIによるB-modeおよびM-mode画像の自動解析機能、拍動する三次元心臓エコー画像（4Dエコー）に基づいた心室容積変化および駆出率の演算機能といった最新の計測技術が活用されています。

3.2 腹部臓器を対象とした疾患モデル研究領域

遺伝性、生活習慣、そして昨今注目のトピックである感染症に伴う腹部臓器とくに肝臓と腎臓の異常は互いに疾患進行に密接に関連し、ときに心疾患など重篤な合併症を誘発します。疾患

の治療や緩和を目指した基礎研究においては、様々な肝疾患モデル（非アルコール性脂肪肝炎（NASH）、肝線維症、肝がん、感染性肝疾患など）や腎疾患モデル（多発性嚢胞腎、腎がん、感染性腎疾患、水腎症、および腎奇形）が作製されており、Vevo[®]システムを用いて臓器性状の観察、臓器容積、臓器内血流の可視化と定量、後述する光音響イメージングによる生体内臓器の組織酸素飽和度や集積する標的性蛍光試薬、金属ナノ粒子の可視化と定量など多くの研究事例が報告されています。

3.3 担がん動物を対象としたがん研究領域

がん研究において免疫不全動物にヒトがん細胞を同所性もしくは異所性に移植し、その生育性と治療効果を評価する担がんモデル（Xenograft, PDXなど）が広く活用されています。移植されたがん細胞の生育性と治療効果を生体内において経時的に評価する方法には、伝統的にはノギスによる腫瘍外寸の計測が実施されてきました。しかしながら、同所性移植モデルには適用できない点や、治療効果と腫瘍サイズの変化に相関がない場合には適用が難しい点が大きな課題でした。

Vevo[®]システムは担がんモデル動物の生体内腫瘍を長期的、非侵襲的に2Dおよび3D画像として描出することで、同所性腫瘍においてもその正確なサイズと腫瘍内環境の可視化が可能です。腹部

臓器を対象とした研究事例と同様に、生体内がん腫瘍の組織性状の詳細な研究事例が多くの施設で実施されています。加えて、抗がん剤や抗腫瘍治療による心毒性評価も、前述の通り精密に実施可能です。

4 光音響（光超音波）イメージングへの拡張性

光音響イメージング技術は、生体透過性の高い波長領域（生体窓）を有する励起パルスレーザーを撮像対象に照射し、瞬間的に発生する熱膨張により生じる超音波を受信し、画像化する技術です。光音響イメージングの撮像対象は、生体における内因性物質（ヘモグロビン、メラニンなど）と外因性物質（各種色素、ナノ粒子など）に分類されます。内因性物質を利用することで非侵襲的な組織酸素飽和度計測や、外因性物質として光音響造影剤を用いた分子イメージングを可能にします。

Vevo[®]システムは生体窓の励起波長域 680–970 nmに加えて、1200–2000 nmといった長波長域を利用できる点が特徴です。これにより、造影対象となる内因性物質として脂肪と水が追加され、生体組織内の脂肪量、水分量を非侵襲的に定量することや、がん研究においては腫瘍組織の良性・悪性診断への活用が期待されています。

5 今後の展望

今回ご紹介した対象臓器と適

用分野以外にも、発生生物学、神経科学、泌尿器、筋骨格など幅広い研究分野においてVevo[®]システムが活用された成果事例が報告されています。また、最新の科学技術を適用した自動解析機能の拡張や、光音響イメージングの適用拡大、そしてよりトランスレーショナルな研究成果を実験

小動物において得るための新たな製品デザインおよび撮像モードの開発が進行しています。弊社プライムテック(株)はVevo[®]システムの日本総代理店として、FUJIFILM Visualsonics社と共にマイクロ超音波イメージング技術の発展と日本の研究分野への貢献に寄与していきます。

(日動協ホームページ、LABIO21カラーの資料の欄を参照)

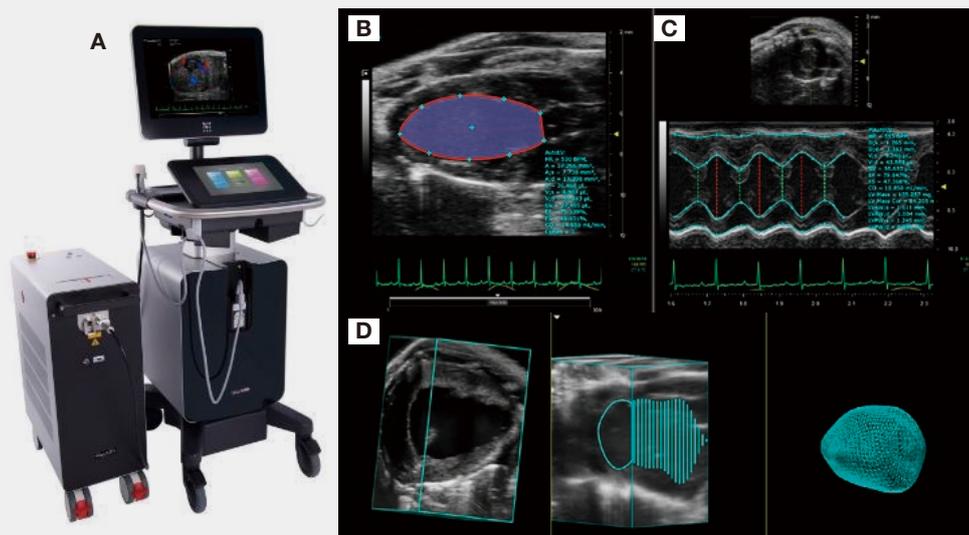


図1. FUJIFILM Visualsonics社製Vevo[®]イメージングシステム(光音響オプション)の外観とマウス心臓画像
(A) Vevo[®]システム外観、左下のユニットは光音響オプションで利用するレーザー出力ユニット (B) マウス左心室長軸像B-mode
(C) マウス左心室短軸像M-mode (D) マウス心臓4Dエコーデータ、左から解析前4D心臓、左心室内腔トレース、左心室内腔トレースのポリゴン表示 ※いずれの画像も東京大学農学部内プライムテックライフサイエンス研究室にて著者が撮影

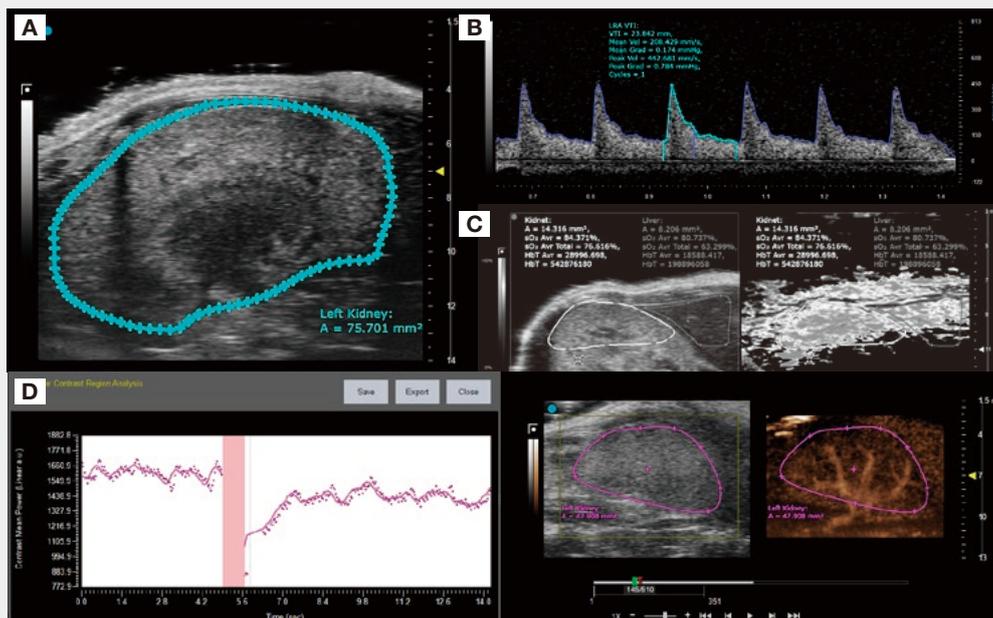


図2. 生体内臓器を対象として多角的なマイクロ超音波イメージング
(A) マウス左腎臓の矢状断画像(中心周波数40 MHz) (B) マウス左腎動脈のドップラー血流波形 (C) マウス左腎皮質および肝葉領域の非侵襲的組織酸素飽和度カラーマップ (D) マウス左腎臓矢状断におけるマイクロバブル灌流評価、左がマイクロバブル破碎再灌流による流入曲線、右がマイクロバブル血管造影像
※いずれの画像も東京大学農学部内プライムテックライフサイエンス研究室にて著者が撮影

動物実験手技訓練用モデル NATSUME RATの リニューアルについて

株式会社夏目製作所 営業部
山岸 義尚、佐々木 貴大

1. はじめに

動物実験を行う際に、3Rsの原則を遵守すべきであることは昨今の研究では当然のことと認知されている。動物に対しての苦痛の軽減については特に配慮すべき事項であり、実際に手技を行う際に必要な技術を養うための実験者の事前の手技訓練は大変重要である。手技を取得する以前に動物に直接触れることは、動物に余分なストレスを与えるだけでなく、訓練を行う実験者にとっても、精神的な不安や、咬傷等の怪我のリスクに繋がる。それらを回避するため、特に実験初学者が動物の取り扱いについて実際の生体ではなく道具を事前に利用することは大変有用である。

実験動物の中で利用匹数が多いのはマウス・ラットであるが、その中でも実験初学者がハンドリングを行う際のリスクが大きいのがラットである。株式会社夏目製作所では、1990年代に開発された塩ビ製手技訓練用モデルであるコーケンラットを精力的

に販売することで手技訓練の精度向上、訓練に利用される動物のストレスの低減、実際に訓練に利用される動物のReductionに貢献してきた。その後、コーケンラットが諸事情により製造中止となってからも、2012年に新たに一から開発に取り組み、KN-590 NATSUME RATとしてシリコン製手技訓練モデルの製造販売を行ってきた。その開発の経緯などは2013年10月発刊のLABIO21内のラボテック技術紹介の中で紹介している通りである。現行のNATSUME RATの販売開始から、来年2022年5月には10年を迎えるが、今回新たに製造方法の見直しを行っている。品質（技術）の向上と安定的な供給を考えて、主要素材をシリコン樹脂からウレタン樹脂に変更を試みた。ウレタン樹脂の特性を活かし、よりラットの外皮の感触に近づけマイナーチェンジを施したりリニューアル製品:New NATSUME RAT（仮）として開発を進めている。

2. 製造過程について

現行の動物実験手技訓練用モデルNATSUME RATの主材料はシリコンである。これは、手技訓練モデルとして必要な手触りや経年劣化の低減、また挿針をした際の耐久性等を鑑み、選択された素材である。シリコンの特性上、同素材同士の接着が技術的に困難であること、また細かな加工や繊細な技術を用いて求める仕様とする目的で、これまでは技術に優れている人間の手作業を主として製造を行っていた。しかし、いわゆる職人技によって製造されていた故に、仕上がりを均一にすることが困難であり、また製造に時間がかかることなどのデメリットも少なからずあった。New NATSUME RATの製造は手作業でなく、均一した精度を保つことができるように最新の技術を取り入れて製作を検討した結果、今日まで多くの臓器モデルを製作されている株式会社クロスメディカルに製造協力をすることになった。

株式会社クロスメディカルは、開発・試作業界で培った樹脂加工技術をもとに医療分野に特化したものづくりを行っている会社である。心臓をはじめとする精密な臓器モデルの製作のほか、医療機器のデザインや実験機器の試作、CT撮影、メディカルイラストの作成など、医療分野における幅広いものづくりのニーズに応えている。企画・デザインからものづくりまで対応できる社内一貫体制を敷くことで、スピーディかつ高品質な製品を提供できることを強みとしている。(図1)



図1 心臓モデル『Cardio Model E.V.』

New NATSUME RATの開発は、現行モデルの3Dデータ化から着手した。Carl Zeiss社製の工業用高精度X線CT装置METROTOM800を用いて、モデルを分解・破壊することなく、食道や胃などの内臓を含めた全パーツの3Dデータを高い寸法精度で取得した。その後、3D CADを用いて、マスターデータ(モデルの元となるデータ)を作成した。モデルを3Dデータ化することにより、形状を定量的に調整することができるだけでなく、各パーツを成形する際に使用する

治具を容易に製作することも可能にした。(図2)

特に再現性に技術を要したのは、ラットを背部より掴んだ際の感触である。その決め手となるのが、腹部パーツの軟らかさと、表皮と内臓パーツとの空間であった。腹部パーツ用に新たな軟質の樹脂を採用した上で、目に見えない内部空間の形状をCTスキャンにより3Dデータに反映させることで、求めていた感触を再現した。(図3)

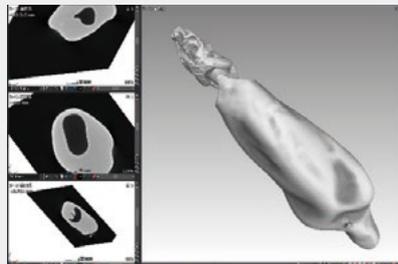


図2 現行モデルのCT撮影画像

New NATSUME RATを継続的に販売するには、コストを抑えつつ、一定以上の個数を製作するため、成形には真空注型という工法を採用している。真空注型とは、真空の状態シリコン製の型に樹脂を流し込み、モデルを複製する技術である。ひとつの型で約20個のモデルを成形することができる。シリコン型は量産で用いられる金型よりも製作時間やコストを抑えることが可能であることから、近年、真空注型は小ロットの樹脂製品を複製する技術として需要が高まっている。このように株式会社クロスメディカルの技術力をこのNew

NATSUME RATには存分に施している。

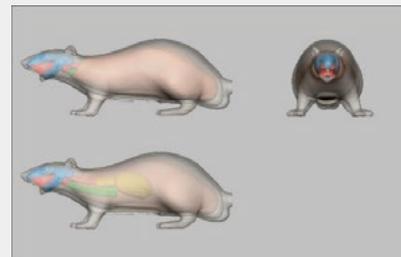


図3 作成した3Dデータ

3. 手技内容

New NATSUME RATで行うことができる手技内容は、大きくは現行のNATSUME RATと変わらない、以下の4つである。それぞれの手技訓練がより精度高く行えるように、細かな点を改良している。

a. 保定

動物に与えるストレスを最小限に抑え、実験者が咬まれないようにするため、生体を扱う前に正しい保定方法を習得する必要がある。親指と人差し指でラットの耳根部もしくは、顎のつけ根を大きくつまみ、残りの三指で肩甲部から背中中の皮膚をたくし込むように大きくつまむ。経口投与を行う場合は、口の先端から咽喉を経て食道、胃まで直線になるようにラットの頸部や胸をそらすようにして保定を行う。

New NATSUME RATではより本物のラットの皮膚感触に近づけるように製作をしている。(図4)



図4 保定

b. 経口投与

経口投与針にシリンジを付けて投与法の練習ができる。

口腔、咽喉、食道、胃の構造を持つため、実際に経口投与針を挿入する練習が可能である。練習の効率を上げるため、気管、食道、胃の一部は外から見えるように腹部は透明の仕様である。そのため、誤った投与法の場合、気管に経口投与針が入るのを目視で確認できる構造である。New NATSUME RATでは経口投与の技術の習得をよりリアルに感じられるように口腔内の構造を改善している。(図5)



図5 経口投与

c. 尾静脈投与と採血

尾の構造は、尾外皮と血管チューブを尾の両側にループ状に埋没した尾本体、模擬血液注入口からなる。

実際に尾内に埋没した尾静脈を模した血管チューブに注射針を刺入することができる。また、尾静脈投与と採血の操作は、模擬血液（オプションとして購入可能）を使用する。New NATSUME RATでは手技内容の中でも特に練習頻度が高い尾静脈投与と採血を、より多く実施できるように1体につき尾が2本付属する。(図6)



図6 尾静脈投与と採血

d. 気管内挿管

口腔内にラット用の喉頭鏡を挿入し、目視下で気管チューブを気管内へ挿入する。

無理に力を入れないよう、入り難い場合は挿管台上のラットの姿勢が真っ直ぐであることを確認し、喉頭鏡先端の方向を少しずつ変えながら、気管内へ静かに挿入することが重要である。

New NATSUME RATでは喉頭鏡の挿入の仕方、気管チューブの挿管方法等のコツをより理解できるよう、口腔内の大きさ、前歯の長さの統一にこだわり、製作精度を向上させている。(図7)



図7 気管内挿管

4. まとめ

New NATSUME RATは、生体を使わずとも手技訓練が可能な製品であり、3Rsの原則であるReplacement（代替）、Reduction（削減）、Refinement（改善）を全て兼ね備え得る製品である。

実験動物に対する手技訓練をNATSUME RATへ代替でき、正確な取り扱い方法をNATSUME RATを使用して習熟した上で実際の生体の操作を行うことで、実験動物に与える苦痛を最小限に抑えることができる。その結果、実験に必要な動物数削減への貢献に繋がり得ると当社は考えている。またNATSUME RATの利点として、生体に対して、正しい操作だけでなく、行うべきではない操作も実験初学者に実際に見せながら教えることができることも挙げられる。実験者にとっても、手技を理解したうえで安心して動物に触れられるという利点もあり、労働安全衛生などにもつながる。

5. 今後の展望

ライフサイエンスの分野において、in vitro, in silicoへの実験の推移のスピードは近年更に加速を見せているが、現段階ではライフサイエンスの発展には動物実験は不可欠である。3Rsの原則の具体的な実践のためにも、また数を多くこなすのではなく、確実な成果の出る精度の高い実験を実現していくためにも、1匹1匹の動物を大切に考え、扱っていくことが必要となる。

NATSUME RATは、あくまでも実験初学者のための訓練用樹脂製モデルであり、動物と同じようには動かないし、手触りも当然

本物とは異なり、全ての訓練をこのモデルだけで代替することは不可能である。今後、用途に合わせた様々なシミュレーターの需要が高まり、開発が進むことで、より多くの訓練や実験想定が生体を使わずに行えるようになっていくと予想する。当社としても、入手性の良さや適度な精度を実験者の皆様にお教えいただきながら、新たに3Rsに貢献する製品づくりを行い、次なる100周年に向け、人と動物に優しいものづくりを心掛け、ライフサイエンスの未来と共に歩んでいきたいと考えている。



(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

動物実験総合支援事業・
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 : <https://www.kacnet.co.jp/>

マウスの飼育用アイソレータに用いる自動給水システムの開発について

ジャクソン・ラボラトリー・ジャパン株式会社 加藤 昌洋

ジャクソン・ラボラトリー・ジャパン株式会社 筑波飼育センターでは、約150台のビニールアイソレータを用いて、重度免疫不全動物を中心に5系統のマウスを飼育管理しています。アイソレータによる飼育管理においても基本となる床敷交換、飼料補充、給水瓶の水を交換する給水作業などの各作業があり、作業従事者は決められた手順にてこれらの作業を行っております。この度、これら作業の一つである給水作業について従来から行われている給水瓶による給水方法(写真1)から自動的に飲水を供給できる仕組みの検討を進め、マウスの飼育用アイソレータに用いる自動給水システム(写真2)の開発に成功しました。

今回は開発に至る経緯や実践導入された状況について少し詳しく紹介させていただきます。これまでの動物飼育管理方法ではアイソレータ内部に飼育用架台および器材が設置されていることから、飼育従事者はグローブを装着した状態で給水瓶内の飲水を交換するために、多くの労働力と時間を掛けておりました。その飼育

従事者への負担軽減を目的として、マウスを飼育している状況においても配管の交換等のメンテナンス、部品の滅菌、および配管内の水の置換が可能となるよう、給水源をアイソレータ内部に配置した自動給水システムを作製しました。この自動給水システムと、従来から行われている給水瓶を用いた給水方法との間で、マウスの成長度合いの比較を行った結果についてもご説明いたします。

初めに開発の基本的なコンセプトとして弊社筑波飼育センターのアイソレータ内の構造は、各段10ケージ×4段、合計40ケージ載置可能なことを前提とし、尚且つその最上部に飲水を充填した交換可能なビニールパック(以下Waterbag)を給水源として取付け、水自体の重力で各ケージまで水が行き届くような仕組みを目指しました。ここで述

べておりますWaterbagは、従来の給水作業に用いているもので、Waterbagへ充填する水は、水道水を30 μ m、5 μ m、0.5 μ mの順に3種類のフィルターを通し、UV照射後、塩素を添加して最後に0.2 μ mのフィルターを経ており、必ず製造ロットごとに水の無菌試験を行い使用しております。そしてこれらの開発を進める上で特に次の3項目、①配管がオートクレーブ(湿熱蒸気)滅菌可能、②マウス飼育中の配管が交換可能、③配管内の水の置換が可能、に重点を置きました。これらは、Biosecurity上のリスクを最小限にするため、水源をアイソレータの外に設けて密閉されたビニールアイソレータに穴を開ける方法ではなく、自動給水の仕組みがアイソレータ内で完結できることに拘ったためです。そしてこの仕組みを実現させるため、新たな



写真1 給水瓶を用いた給水方法



写真2 自動給水システム



写真3 自動給水用飼育架台



写真4 最上部に載置されたWaterbag

飼育用架台の開発が不可欠となり、試行錯誤の末、40ケージ載置可能で最上部に給水源として飲水を充填したWaterbagを載せることの出来る飼育架台(写真3,4)の完成に至りました。

また、同時に最上部より水自体の重力で動物に対して十分な飲水量を送ることが出来る給水バルブの検討を行いました。アイソレータ内の限られた空間で水源から配管まで十分な落差が取れない状況において水の出しの良い飲水バルブを採用する必要がありましたが、弊社バリア飼育施設で使用しているFFV-60(小原医科産業社製、写真5)を試したところ、架台上段から4段目までの全ての飲水バルブより十分な水量が確認できました。これにより、FFV-60の採用が決まり、システム全体の仕様が固まったことで次に実際の動物を使用し、本当に動物が飼育できるのかを検証する運びとなりました。

ここからは従来の給水瓶による給水と自動給水システムとの



写真5 小原医科産業社製FFV-60

| | |
|------|--|
| ・温度 | : 20-25℃ |
| ・湿度 | : 40-70% |
| ・換気 | : オールフレッシュ10回以上 |
| ・照明 | : 明6:00~18:00、暗18:00~6:00 |
| ・騒音 | : 60デシベル以下 |
| ・空気 | : 1次(プレフィルター、中性能フィルター)2次(HEPAフィルター)により除菌 |
| ・飼料 | : CRF-1(オリエンタル酵母工業株式会社製) |
| ・床敷 | : ホワイトフレック(日本チャールス・リバー株式会社製) |
| ・飲水 | : フィルター除菌、紫外線殺菌、次亜塩素酸ナトリウム添加 |
| ・ケージ | : プラスチック製(外寸:W150×D343×H137mm) |
| ・収容 | : 4匹/ケージ |

表1 筑波飼育センターの環境および飼育条件

比較検証についてご説明します。検証試験は実際にアイソレータで動物を飼育している弊社筑波飼育センターにて実施しました。(表1)

給水方法によるマウスの成長度合いを比較するため、64匹の3週齢雄性CB17/Icr-Prkdcscid/CrlCrljマウスを、給水瓶によって給水を行う群(給水瓶群、4匹/ケージ、n=32)または自動給水システムによって給水を行う群(自動給水システム群、4匹/ケージ、n=32)の2群に分け、4段ある架台(各段10ケージ載置可)の各段に給水瓶群、自動給水システム群を各1ケージずつ隣合わせの状態(写真6)にして2か所ずつ計8か所に配置し、7週間に渡って日々の動物観察と床敷の汚れ具合や漏水の跡を確認しながら1回/週の床敷交換および体重測定はコンパクトスケール HL-200i(株式会社 エー・アンド・デイ社製)を用いて毎週同じ曜日の同じ時間を実施したところ、給水瓶群と自動給水システム群との間で、各週齢の平均体重に有意差が認めら



写真6 成長比較試験の様子

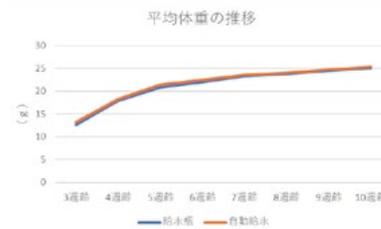


図1 成長比較データ

れず、体重の推移は同じ傾向となりました。(図1)

上記の結果から、自動給水システムは導入可能と判断しました。これにより、アイソレータ1台あたり平均で25分程度を要していた飲水の充填作業が10分程度のWaterbagの交換作業へと変わり、業務の効率化に繋がりました。

現在この自動給水システムの導入から1年が経過し、50台程度のアイソレータで自動給水システムが稼働しておりますが、漏水や摂水量低下による死亡もしくは成長不良は観察されず、動物に影響がないことも確認出来ております。今後、更に自動給水システムを導入する計画を進めており、引き続き安全でより使い易いシステムを目指し、飼育器材の改善を継続すると共に、短縮された時間を動物のケアに置き換えることで高品質な動物の生産維持に寄与したいと考えております。

(日動協ホームページ、LABIO21カラーの資料の欄を参照)

実験動物技術者紹介

ハムリー株式会社 赤萩 誠一郎

小さい時から数字が好きな子供であった。今ではほとんど見られなくなったそろばん塾に小学4年から通い始め、小学6年時に1級を取得した。今なお「そろばん塾」をたまに見かけるとなんだか懐かしい気分になる自分がある。近所の友達と野球、サッカー、缶蹴り等、外遊びに夢中になりつつも、この習い事の時間には足しげく通っていた。時を経て大学進学時に経済学部を選択したのも、小学生時代のこの習い事が影響していることに疑う余地はなく、現在では数字が好きな大人（おじさん）になっている。

自身のように経済学部からこの業界にお世話になっている方は、もしかしたらあまり多くはないかもしれない。実験動物技術者という業務と何も関係ないようにも見えるが、これがどうして、ところがどっこい、である。例えば、体重測定、血液学的検査、血液生化学的検査等々、これらは数字のオンパレード。お見積りの作成、損益等、こういったデスクワークも同様である。また、被験物質調製、この計算も数字が大いに関係してくる。あげるとキリがないが、意外にも数字とかかわることが多いこの業界と経済（数字）は繋がりがあり、実験動物技術者にとって少なくとも不要なものではなかったのではないかと

と感じている。

平成13年に弊社入社後、こうした経歴（変わり種）であるわたくしは、当然ほぼゼロからのスタートであった。まずは飼育管理業務で実験動物の基礎を学び、その後試験研究部門に配属となったが、とにかく毎日我武者羅に目の前の業務に従事することで精一杯、毎日が勉強勉強の日々に追われ、視野を広げる余裕など微塵もなかった。動物種はマウスからサル、ブタに至るまで、魚類とトリ類を除けばほぼ全ての実験動物に関わってはきたが、その中でもサル類の捕獲、保定、投与、採血操作にはほぼ毎日従事していた。サル類も今ではあまり見られなくなった7 kgや8 kgの個体はざらで、時には10 kgを超える個体を取り扱うことも珍しくはなかった。当時の薬物動態試験時ではモンキーチェアーを使用していたため、朝一の業務はまずそういった大型個体の捕獲、保定、モンキーチェアーへの取り付けからスタート、というのが日課であった。頭数も10頭、20頭、時には30頭という例数だったこともあり、情けないことに自身の体力では全身全霊を注がなければ対応しきれないレベルであった。当時は朝のこのモンキーチェアー取り付けまでの一連の流れが終了すると、既に1日の業務が終了

したかのような満足感があったのは正直なところである。本来の動物実験はそこからスタートであるにもかかわらず、である。これが今から約20年前の話になる。

それから現在まで3Rsの精神のもとに、より動物福祉に配慮した動物実験を行っていく中で、自身が数多く経験してきたサル類の投与、採血操作もホームケージ内で無拘束に近い状態で行えないか、ということを考えるようになり、そのトレーニングに尽力してきた。やがてこのトレーニングは成果を上げ、現在ではモンキーチェアーを使用する実験はほとんどなくなった。これによりサル類に対するストレスを軽減し動物福祉へ繋げることができたのは一番大きな喜びであり、技術員にとってもサル類の取り扱い、実験が安全かつ容易に行えるという労働安全衛生の向上に繋がったものと自負している。

実験動物技術指導員の認定を頂いた今、こうした自身の経験、知識を後進へ伝えていくと共に、これまで以上にサル類の気持ちを読み取った適切な飼育管理や試験操作方法の確立、すなわち、更なる動物福祉に繋がる方法をこれからもコツコツと模索し続けていきたい。

LABI21のNo.75から連載コラムとして「特例認定校出身の実験動物技術者紹介」のコーナーを掲載してきましたが、本号よりその対象を広くして各方面で活躍されている実験動物技術者を紹介するコーナーとします。今回は、実験動物技術指導員認定小委員会からの推薦で、異分野・異業種出身の技術者として赤萩誠一郎指導員を紹介します。なお、身近にこのコーナーで紹介したい実験動物技術者がいらっしゃいましたら日動協事務局までご連絡ください。

日本実験動物学会の動き

動物実験の外部検証説明会・個別相談会

テーマ：令和4年度の実施準備に向けた事前説明会

日時：2022年1月28日（金）13時～17時

会場：お茶の水ソラシティカンファレンスセンター1F ルームB

〒101-0062 東京都千代田区神田駿河台4-6

アクセス <https://solacity.jp/access/>

※会場に来られない方にはリアルタイムでWEB配信も実施します

参加費：無料

参加方法やプログラムは学会HP (<http://jalas.jp/index.html>) に掲載します。

第16回実験動物管理者等研修会

日時：2022年2月4日（金）～28日（月）

開催：オンデマンド配信

会費：日本実験動物学会会員 4000円、非会員 6000円

参加方法やプログラムは学会HP (<http://jalas.jp/index.html>) に掲載します。

第69回日本実験動物学会総会の開催

テーマ：「動物実験を支え、育み、生命に尽くす」

大会長：三好一郎（東北大学）

日時：2022年5月18日（水）～20日（金）

会場：仙台国際センター

〒980-0856 宮城県仙台市青葉区青葉山無番地

アクセス <http://www.aobayama.jp/access/>

内容：特別講演、シンポジウム、ワークショップ、LASセミナー、ポスターセッション、器材展示、ランチョンセミナー、情報交換会等

参加方法等の詳細は第69回総会HP (<https://jalas69.jp/>) に掲載します。

日本実験動物技術者協会の動き

北海道支部

| 講習会等 | 期日 | 場所 | テーマ |
|------------|---------|----|-----------------------------|
| 第51回勉強会 | 2022年2月 | 未定 | 専門性のある情報交流（講師を招待）を企画中 |
| 座談会 | 2022年2月 | 未定 | 日常業務のちょっとしたアレコレを相談できる情報交流の場 |
| 第47回支部通常総会 | 2022年6月 | 未定 | |
| 特別講演会 | 2022年6月 | 未定 | |

詳細は、北海道支部事務局 (longevans@sapmed.ac.jp) までご連絡下さい。

関東支部

| 講習会等 | 期日 | 場所 | テーマ |
|--------------------|--------------------|--|--|
| 中動物部会 第35回サル講演会 | 2022年1月22日 開催予定 | Zoomによるオンライン 開催 | 食のFreedom to Express Normal Behaviorを考える |
| 関東支部 総会・懇話会 | 2022年2月26日 開催予定 | 川崎市産業振興会館 (川崎市) ※同時にZoomにてオンラインで配信 | 技術者のスキルアップ |

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17回技術交流会 | 2022年2月 | Web開催予定(Zoom) | 企画中 |
| 東海北陸支部第8回支部総会 および春期大会 | 2022年4月開催予定 | Web開催予定(Zoom) | 春期大会：企画中 |

詳細は東海北陸支部ホームページ (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 |
|----------------------------|---|----------------------|-----------------------|
| 2021年度マウス・ラット 上級技術講習会 | 未定 | オンライン | オンライン形式での開催を準備中 |
| 2021年度ウサギ・モルモット 上級技術講習会 | 未定 | 未定 | 企画中 |
| 2021年度春季大会・支部総会 | 2022年3月開催予定(開催時期が大きく変更される可能性がありますのでご留意ください) | 京阪神地区(予定)あるいはオンライン開催 | 対面もしくはオンライン形式での開催を計画中 |

詳細は関西支部ホームページ (<http://www.jaeat-kansai.org/>) を参照ください。

九州支部

| 講習会等 | 期日 | 場所 | テーマ |
|---------------|-------------|----|------|
| 九州支部春季大会(仮名称) | 2022年4月開催予定 | 未定 | 内容未定 |

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。

令和3年度（第37回）実験動物技術者資格認定試験結果

令和3年度（第37回）実験動物技術者資格認定試験は、2級学科試験を8月14日（土）、1級学科試験を9月14日（土）に実施し、また、実技試験は2級を10月30日（土）、1級を10月31日（日）に実施しました。その結果が判明したので報告します。なお、実技試験は、2級及び1級とも会場等の都合により、生体を用いず多肢選択式、記述式に変更して実施しました。

1. 2級技術者試験（欠席者を除く）

| 区分 | 高校 | 専門学校 | 大学（一般扱） | 一般 | 合計 |
|----------|-----|------|---------|-----|-----|
| 学科受験者 | 113 | 56 | 74 | 239 | 482 |
| 学科合格者 | 58 | 47 | 68 | 221 | 394 |
| 学科合格率（%） | 51 | 84 | 92 | 92 | 82 |

| | | | | | |
|----------|----|----|----|-----|-----|
| 実技受験者 | 55 | 46 | 72 | 210 | 383 |
| 実技合格者 | 52 | 44 | 71 | 198 | 365 |
| 実技合格率（%） | 95 | 96 | 99 | 94 | 95 |

備考：その他、過年度学科又は実技合格者、通信教育スクーリング修了試験合格者を含め、総合合格者数は391名である。

2. 1級技術者試験（欠席者を除く）

| 区分 | 白河研修生 | 一般 | 大学・専門 | 学科免除者* | 合計 |
|----------|-------|----|-------|--------|-----|
| 学科受験者 | — | 80 | 101 | — | 181 |
| 学科合格者 | — | 66 | 78 | — | 144 |
| 学科合格率（%） | — | 83 | 77 | — | 80 |

| | | | | | |
|----------|---|----|----|-----|-----|
| 実技受験者 | — | 66 | 70 | 133 | 269 |
| 実技合格者 | — | 44 | 35 | 94 | 173 |
| 実技合格率（%） | — | 67 | 50 | 71 | 64 |

*：令和2年度の1級実技試験は中止となったため、今年度の1級実技試験受験者は令和2年度学科試験合格者を含む過年度（過去3年）学科試験合格者の合計である。

1級・2級実験動物技術者試験の優秀者について

令和3年度の実験動物技術者試験で優秀な成績を取めた方を表彰いたします。
成績優秀者は次のとおりです（学科試験および実技試験の総合評価に基づく）。

1. 実験動物2級技術者試験優秀者（高校）

| 名前 | 高等学校名 |
|----------|--------------|
| 1 大村 優空 | 愛知県立安城農林高等学校 |
| 2 坂本 晃陽 | 千葉県立大網高等学校 |
| 3 山下 ひより | 愛知県立安城農林高等学校 |
| 4 岩田 麻衣 | 岐阜県立岐阜農林高等学校 |
| 5 中村 妃捺 | 埼玉県立熊谷農業高等学校 |

2. 実験動物2級技術者試験優秀者（専門学校）

| 名前 | 専門学校名 |
|----------|-----------------|
| 1 吉野 あかね | 湘央生命科学技術専門学校 |
| 2 桐ヶ谷 大樹 | 東京バイオテクノロジー専門学校 |
| 3 辻 くるみ | 湘央生命科学技術専門学校 |
| 4 山田 滯奈 | 湘央生命科学技術専門学校 |
| 5 出口 裕 | 東京医薬専門学校 |

3. 実験動物2級技術者試験優秀者（一般）

| 名前 | 所属 |
|---------|---------------|
| 1 小野 恵美 | (株)アニマルケア |
| 1 山本 理恵 | 国立大学法人 山口大学 |
| 3 望月 香里 | オリエンタル酵母工業(株) |
| 4 太田 智子 | (株)三和化学研究所 |
| 5 村山 友美 | (株)浜松ファーマリサーチ |
| 5 笛木 茜 | 神戸大学 |

| 名前 | 所属 |
|----------|-------------|
| 7 佐野 愛 | (株)ケー・エー・シー |
| 8 大塚 梨恵子 | 興和(株) |
| 9 長嶋 真優 | ハムリー(株) |
| 9 関根 愛衣子 | 興和(株) |
| 9 馬場 智子 | 神戸大学 |
| 9 村岡 沙貴 | (株)微生物化学研究所 |

4. 実験動物1級技術者試験優秀者（大学）

| 名前 | 大学名 |
|-----------|--------|
| 1 世ノ一 さくら | 神戸大学 |
| 2 入江 杏輔 | 京都産業大学 |
| 2 中西 百合香 | 京都産業大学 |
| 2 石野 葉月 | 岡山理科大学 |

5. 実験動物1級技術者試験優秀者（一般）

| 名前 | 専門学校名 |
|----------|--------------|
| 1 志田 萌美 | (株)ジェー・エー・シー |
| 2 水溜 真美 | (株)スターラボ |
| 3 石田 恵 | 九動(株) |
| 3 千田 裕一郎 | 丸石製薬(株) |

日動協：教育セミナーフォーラム2022のご案内

(公社)日本実験動物協会では、今年度の教育セミナーフォーラムを、下記の内容でWEB形式(ビデオ・オン・デマンド配信)にて開催いたします。

記

■テーマ：「実験動物における行動評価について」

■WEB(オンデマンド)配信日程：令和4年3月14日(月)正午～3月20日(日)正午

■受講申込み方法：日動協ホームページ(<http://www.nichidokyo.or.jp>)をご確認のうえ、掲載されている申込用紙を用いて、受講者ごとに手続き願います。

演題1 「実験動物における行動管理の必要性—米国の事例を中心として—」

小山 公成(株式会社ケー・エー・シー)

演題2 「動物行動学の基礎」

加隈 良枝(帝京科学大学)

演題3 「動物の社会と痛み」

菊水 健史(麻布大学)

演題4 「社会的飼育がマウスの社会性に与える影響およびその評価方法」

遠藤 のぞみ(奈良県立医科大学)

演題5 「動物の表情を用いた疼痛評価」

宮部 貴子(京都大学霊長類研究所)

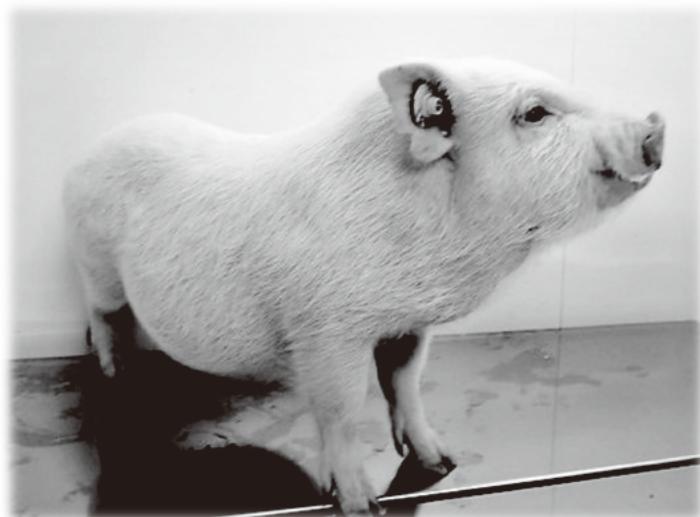
演題6 「畜産動物における動物福祉及びその行動評価」

佐藤 衆介(八ヶ岳中央農業実践大学校)

・講演時間：計約4時間

・詳細は<http://www.nichidokyo.or.jp>でご確認ください。

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

| 行事 | 開催日 | 備考 |
|-------------------|------------|--------------------------------------|
| 第1回試験採点・合否判定委員会 | 9.7 | 実験動物2級技術者学科試験の判定 |
| 第2回モニタリング技術委員会 | 9.22 | 動物実験施設における人獣共通感染症対応マニュアル(仮題)の編集について他 |
| 第2回実験動物福祉調査・評価委員会 | 10.4 | 福祉調査報告と調査概要書内容の検討 |
| 第2回試験採点・合否判定委員会 | 10.5 | 通信教育スクーリング修了試験及び実験動物1級技術者学科試験の判定他 |
| 第2回教育・認定委員会 | 10.5 | 教育セミナーフォーラムの企画等について |
| 微生物モニタリング技術研修会 | 10.15 - 16 | (公財)実験動物中央研究所 |
| 実験動物2級技術者実技試験 | 10.30 | 東京、名古屋、大阪、熊本 |
| 実験動物1級技術者実技試験 | 10.31 | 東京、名古屋、大阪、岡山、熊本 |
| 第2回総務会 | 11.4 | 令和4年度予算作成方針の検討他 |
| 第1回業務執行会議 | 11.16 | 令和4年度予算作成の方針の協議他 |
| 第1回実験動物福祉委員会 | 12.8 | 動愛法見直しへの対応他 |
| 第3回試験採点・合否判定小委員会 | 12.14 | 実験動物技術者実技試験の判定他 |
| 第3回教育・認定委員会 | 12.14 | 教育セミナーフォーラムの企画等について他 |
| 第3回情報委員会 | 12.20 | LABIO21 No.86の企画 |
| 第1回通信教育小委員会 | 12.21 | 令和4年度の通信教育の取り組みについて |

2. 行事予定

| 行事 | 開催日 | 備考 |
|------------------|--------------|----------------|
| 第17回実験動物技術指導員研修会 | R4.3.5 | web |
| 教育セミナーフォーラム2022 | R4.3.14 - 20 | web(オンデマンド)で開催 |

3. 令和4年度の実験動物技術者資格認定試験日程(予定)

令和4年度の実験動物技術者資格認定試験は以下の日程で予定しております。

| | | |
|------------|------|---------------|
| 実験動物2級技術者： | 学科試験 | 令和4年8月7日(日) |
| | 実技試験 | 令和4年11月26日(土) |
| 実験動物1級技術者： | 学科試験 | 令和4年9月17日(土) |
| | 実技試験 | 令和4年11月27日(日) |

4. 日動協の通信教育と各種研修会一覧(令和4年度)

令和4年度に日動協が主催する通信教育と各種研修会の一覧を次頁に示します。最終確定は3月末になりますが、来年度の研修計画作成の参考にしていただきたく掲載いたしました。

新型コロナウイルスの感染状況によっては、開催の中止あるいは開催期日、申込締切日等の変更の可能性がありますので、必ず協会のHPでご確認ください。

令和4年度 研修会予定一覧

| 名称 | 目的 | 内容 | 受講対象者 | 特典 | 開催期日(予定) | 申込締切 | 開催場所 | 定員(名) | 受講料(消費税込み) |
|----------------------|-------------------------------|-----------------------------------|--------------------|-----------------------------|------------------|----------|--------------------|-------|---------------------------------------|
| 通信教育 | 2級学科試験準備 | 学科試験に即した問題の添削 | 制限なし | — | 2月～7月 | 未定 | — | 100 | 30,800円 |
| 通信教育スクーリング | 2級実技試験準備 | マウス、ラット等の動物実験基本実技の実習(2級水準)、実技修了試験 | 通信教育受講者 | 2級実技試験免除*実技修了試験合格が条件 | 8月27日(土)～28日(日) | 対象者に直接連絡 | 日本獣医生命科学大学 京都大学 | 100 | 16,500円 |
| 日常の管理研修会 | 初心者入門 | マウス、ラットの取扱い実技の実習 | 制限なし | — | 6月18日(土) | 未定 | 日本獣医生命科学大学 | 50 | 22,000円(正会員)～ 33,000円(一般) |
| 微生物モニタリング技術研修会 | モニタリング検査技術の向上 | 材料採取～検査、判定までの実技実習 | 制限なし | — | 7月8(金)～9(土) | 未定 | 実験動物中央研究所 | 20 | 33,000円(正会員)～ 44,000円(一般) |
| 実験動物基本実技研修会(2級水準) | 2級実技試験準備 | マウス、ラット等の動物実験基本実技の実習(2級水準) | 制限なし | — | 8月27日(土)～28日(日) | 未定 | 日本獣医生命科学大学 | 20 | 22,000円(正会員)～ 33,000円(一般) |
| 実験動物基本実技研修会(1級水準) | 1級実技試験(必須科目)準備及び白河研修の修了実技試験準備 | マウスの動物実験基本実技の実習(1級水準) | 制限なし(白河研修受講者優先) | — | 8月27日(土)～28日(日) | 未定 | 日本獣医生命科学大学 | 20 | 22,000円(正会員)～ 33,000円(一般) |
| 実験動物高度技術者養成研修会(白河研修) | 1級実技試験準備* | マウス、ラットを中心とした実技試験の実習修了実技試験(必須科目) | 1級試験受験者(認定大学等学生も可) | 1級実技試験(必須科目)の免除*修了実技試験合格が条件 | 9月14日(水)～16(金) | 未定 | 家畜改良センター中央畜産研修施設 | 20 | 57,000円(正会員)～ 68,000円(一般) |
| ウサギ実技研修会 | 2級、1級実技試験(選択科目)準備 | ウサギの動物実験基本実技の実習(2級、1級水準) | 2級、1級実技試験受験者 | | 10月29日(土)～30日(日) | 対象者に直接連絡 | 日本獣医生命科学大学 | 20 | 22,000円 |
| ブタ実技研修会 | 2級、1級実技試験(選択科目)準備 | ブタの動物実験基本実技の実習(2級、1級水準) | 制限なし | | 10月29日(土)～30日(日) | 未定 | 日本獣医生命科学大学 | 12 | 22,000円(2級、1級受験者、正会員)～ 33,000円(一般) |

*：白河研修で例年行っていた1級学科試験に向けた総論を中心とした座学講義は、行わない予定です。

5. 関連団体行事

◆ 第69回日本実験動物学会総会

日時：2022年5月18日（水）～20日（土）
場所：仙台国際センター（仙台市）
大会長：三好一郎（東北大学大学院医学系研究科附属動物実験施設）
詳細：<https://jalas69.jp/>

◆ 第56回日本実験動物技術者協会総会

日時：2022年10月13日（木）～15日（土）
場所：キッセイ文化ホール（松本市）
大会長：江藤智生
詳細：<http://jaeat-kanto.jp/56zenkoku.html>

KAZE

巷にも師走の風が感じられるようになってきた。老若男女問わず、会話の中にコロナウイルスが登場してくるような事態が訪れるとは誰が想像したのだろうか。大学院時代にマウス肝炎ウイルスが研究テーマだったが、それから数十年、ウイルス学会ではコロナウイルスはたいてい最終日の、しかも最終のセッションと決まっておき、観客もまばらだった。こんな時代をだれが予測したのだろうか。SARS-CoV2によってかけがいのない命が多数失われてしまった。世界経済も甚大な影響を受け、その損失は計り知れない。新興感染症の出現は何十年にもわたって警鐘が鳴らされてきたにも関わらずだ。新興感染症の出現を予測するといつて、巨額の予算がつき込まれ、ウイルスハンターたちが密林で野生動物を捕獲し、次から次に新規ウイルスを発見してきた。しかしながら誰も今度の事態を予知することさえできなかったのは何故なのだろうか。地球温暖化が直接新興感染症の出現頻度を高める証拠はないが、根っこはつながっていると思われる。温暖化を増悪する、人々の経済活動そのものが、次の、また次の新興感染症の出現を促していることは間違いない。神風が吹いてウイルスを消滅させてくれればいいが、神頼みだけでは今後起こりうる事態からは免れられない。今一度、何が必要か、真剣に考える時だと思われる。

〔山田 章雄〕

STAFF

情報委員会

| | | |
|------|-------|-----------------|
| 担当理事 | 武石 悟郎 | GORO TAKEISHI |
| 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 |
| 〃 | 三枝 順三 | JUNZO SAEGUSA |
| 〃 | 新関 治男 | HARUO NIIZEKI |
| 〃 | 森村 栄一 | EIICHI MORIMURA |
| 事務局 | 工藤 慈晃 | NARIAKI KUDO |
| 〃 | 畔上 二郎 | JIRO AZEGAMI |
| 〃 | 瀧澤 芳夫 | YOSHIO TAKIZAWA |

制作 株式会社 ティ・ティ・アイ TTI

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。



日本エス エル シー株式会社
— <http://www.jslc.co.jp> —

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.