

実験動物 ニュース

The Japanese Association for Laboratory Animal Science



目 次

特集：ヒト化動物の最新研究

序文：ヒト化動物の最新研究.....	166
ヒト化動物を用いた薬物代謝・動態研究への応用.....	167
免疫不全マウスを基盤としたヒト化肝臓マウスの開発と医学・創薬研究への活用	173
ヒト化マウス技術を用いた抗腫瘍免疫反応の誘導.....	178
完全ヒト抗体産生動物の解析と抗体医薬品開発への応用	184

実験動物感染症の現状

免疫不全マウスにおける <i>Corynebacterium mastitidis</i> 感染症	191
---	-----

研究室・施設便り

岡山理科大学 理学部 動物学科 動物資源学研究室	198
--------------------------------	-----

維持会員便り

革新的な技術と自動化でライフサイエンスに貢献する，ミウラ	203
------------------------------------	-----

会員便り

研究者として歩み始めたきっかけ—若手研究者目線—.....	208
マウスおよびラット生殖工学技術の研究開発	212
学位取得から 10 年目を控えて…	217

日本実験動物学会からのお知らせ

令和 5 年度維持会員懇談会の開催	221
2024 ～ 25 年度理事候補者選挙について（告示）.....	222
第 71 回日本実験動物学会総会の開催	222

Experimental Animals 72(4) 収載論文和文要約集	223
--	-----

維持会員名簿	i
--------------	---

編集後記	iii
------------	-----

序文：ヒト化動物の最新研究

末水洋志¹久郷裕之²¹ 実験動物中央研究所² 鳥取大学

マウスやラットを用いた様々な実験系が創薬研究で役立てられている。多くの場合、実験動物で得られた結果から「ヒトでの結果を予測したい」のである。しかし、そこには“動物種差”という避けては通れない大きな障壁があることを誰しもが知っている。研究者は勇気を持って立ち向かい、知恵を振り絞って様々な動物実験モデルを開発してきた。その一つに、観察したいヒト組織やヒト細胞、ヒトにおける生体反応を実験動物の体内で再現したのが“ヒト化動物”である。遺伝子改変技術の発展により、特に最近ではゲノム編集技術が身近になったことにより、“手を替え品を替え”ではないが様々な動物種を宿主として、様々なヒト細胞やヒトにおける生体反応が観察できるモデルが現れてきた。ヒトにおける生体反応の一部を正確に再現する“ヒト化動物”のうち、すぐにでも創薬研究の加速化と成功確率の向上につながりそうなげっ歯類のヒト化動物を取り上げ、私の他、3名の演者の先生に講演をお願いした。また、本研究領域の取り組みの重要性を理解し、興味を持ってもらうことで将来、この研究領域を牽引するリーダーの輩出のつながりになることを期待し、会場となった鳥取大学医学部キャンパスで研究者を目指し学んでいる医科学専攻課程の大学院生、および、生命科学科の学部生にも参加していただいた。

本特集では、薬物代謝・動態研究ヒト化モデルと抗体医薬の開発に係るヒト化モデルを取り上げ、演者の先生方にそれぞれのモデル紹介という形で寄稿いただいた。小林カオル先生（明治薬科大学）からは、「ヒト化動物を用いた薬物代謝・動態研究への応用」のタイトルで、人工染色体技術でヒト薬物代謝・動態関連遺伝子を導入し、対応するマウス遺伝子をノックアウトしたトランスクロモソミックマウス・ラットを用いた薬物間相互作用予測について記載いただいた。末水洋志（実験動物中央研究所）は、「免疫不全マウスを基盤としたヒト化肝臓マウスの開発と医学・創薬研究への活用」のタイトルで、超免疫不全NOGマウスを基盤としたヒト化肝臓マウスの開発と本モデルの限界克服に挑んだ次世代型ヒト化肝臓マウスについて執筆した。高橋武司先生（実験動物中央研究所）には、「ヒト化マウス技術を用いた抗腫瘍免疫反応の誘導」のタイトルで、抗体薬の評価に有用な次世代型免疫ヒト化マウスの開発と本モデルを用いた抗PD-1抗体などの免疫チェックポイント阻害剤の薬効評価の現状について書いていただいた。また、里深博幸先生（鳥取大学）には、「完全ヒト抗体産生動物の解析と抗体医薬品開発への応用」のタイトルで、ヒト抗体を産生するトランスクロモソミックマウス・ラットの作製と新型コロナウイルスに対する治療用抗体の作製など応用研究の成果を紹介いただいた。

この特集を通して読者の皆様方には、ヒト化動物の開発と限界へのチャレンジについて少しでもご理解をいただければ幸いである。また、この場を借りて、お忙しい中執筆いただいた3名の先生方に御礼を申し上げたい。

特 集：ヒト化動物の最新研究

ヒト化動物を用いた薬物代謝・動態研究への応用

小林カオル¹香月康宏²¹ 明治薬科大学 薬剤学研究室² 鳥取大学 医学部生命科学科 染色体医工学講座／染色体工学研究センター

要 約

染色体工学技術を用いて作成された薬物動態関連因子に関するヒト化マウスについて、導入されたヒト遺伝子の発現と機能を解析し、薬物動態予測モデルとしての有用性を検討した。ヒト化マウスの組織において、導入されたヒト遺伝子はヒトと同様の組織に発現する特徴を有していた。また、併用薬による薬物間相互作用予測モデルとして、酵素阻害、酵素誘導、薬物トランスポーター阻害の予測に有用であることが示された。ヒト化マウスは、*in vitro* 実験では解析困難な組織内の薬物濃度や薬効への影響に加え、薬物反復投与による影響や毒性予測など広範な研究への応用が期待される。

薬物代謝に関しては、極めて大きな種差や系統差が存在することが知られている。そのため、ヒトにおける薬物代謝研究には、ヒト組織由来試料あるいはヒト遺伝子導入細胞が広く使用されている。これらを用いた *in vitro* 実験で得られる結果は、ヒトにおける薬物代謝を予測する上で有用である。しかし、*in vitro* 実験だけでは、血中薬物濃度、二次代謝物の生成、長期投与による代謝物生成、組織内の代謝物濃度、代謝による薬効・毒性への影響などの予測が困難である。これらの問題を解決するため、ヒト化動物が *in vivo* 実験に利用可能な薬物代謝、動態解析ツールとして期待されている。本稿では、薬物動態関連因子をヒト化したマウスを用いた薬物間相互作用予測と遺伝子多型による薬物動態への影響解析への活用例を述べる。なお、本稿で紹介するヒト化動物の開発は、全て香月康宏教授（鳥取大学）との共同研究によるものであり、作成方法の詳細については、ここでは割愛する。

1) CYP3A ヒト化マウスを用いた

小腸薬物代謝阻害評価

Cytochrome P450 (CYP) は、薬物などの異物代謝（主に解毒）やステロイドホルモン合成、胆汁酸合成、ビタミン代謝などの生体内物質代謝に関与するヘムタンパク質である。CYP は多くの分子種から構成されるスーパーファミリーであり、特に CYP1, CYP2, CYP3 ファミリーに属する CYP 分子種は多くの薬物代謝に関与している。このうち、ヒト CYP3 ファミリーは CYP3A4, CYP3A5, CYP3A7 および CYP3A43 の

4 分子種からなり、これら遺伝子はヒト 7 番染色体上にクラスターとして存在している。CYP3A4 は肝細胞および小腸上皮細胞に多く発現しており、経口投与された薬物の体内曝露量の制御に大きな役割を担っている。すなわち、小腸上皮細胞の CYP3A4 による薬物代謝は門脈中へ移行する薬物量を低下させ、肝臓の CYP3A4 による薬物代謝は全身血へ移行する薬物量を低下させる。染色体工学技術により、ヒト CYP3A 遺伝子クラスター（4 遺伝子およびそれらの遺伝子発現制御領域とイントロンを含む）をマウスに導入し、マウス内在性 *Cyp3a* 遺伝子を全欠損させた CYP3A ヒト化マウスでは、生理的発現制御によりヒト CYP3A4 が機能的なタンパクとして肝臓と小腸に発現している [1]。トリアゾラムは、ヒト CYP3A4 によって 1' 位水酸化体と 4 位水酸化体代謝される代表的な基質であるが、CYP3A4 のオーソログであるマウス *Cyp3a* によっても代謝される。図 1 に示したように、トリアゾラムを野生型 (WT) マウス小腸ミクロソームとインキュベートすると、上述した 2 種の代謝物を生成する。その生成は *Cyp3a* 遺伝子欠損マウスでは認められず、CYP3A ヒト化マウスでは認められる。ヒト CYP3A4 とマウス *Cyp3a* は、どちらもトリアゾラムを代謝するが、抗生物質であるクラリスロマイシン (CM) あるいはエリスロマイシン (EM) 添加による代謝阻害に差異がある [2]。実際、CYP3A ヒト化マウス小腸ミクロソームを用いた場合のみ CM あるいは EM によるトリアゾラム代謝の阻害が認められ、WT マウス小腸ミクロソームでは認められない。そこで、ヒト CYP3A4

に特有な代謝阻害がCYP3A ヒト化マウスを用いた *in vivo* 実験で再現できるかを検討した。CM, EM あるいは溶媒 (vehicle) を1日2回, 5日間反復経口投与し, その後トリアゾラムを経口投与したところ, トリアゾラムの血中濃度がCMあるいはEM投与群では溶媒投与群に比較して高く (図2), トリアゾラムと代謝物の血中濃度曲線下面積比 (代謝物/トリアゾラム) が低下した。このことから, CM および EM によるトリアゾラム代謝阻害は, CYP3A ヒト化マウスにおいて再現できることが明らかとなった。また, トリアゾラム投与直後に, 門脈血を採取したところ, CYP3A ヒト化マウスへのCM投与によりトリアゾラムと代謝物の血中濃度比 (代謝物/トリアゾラム) が低下した。これらの結果より, CM が小腸上皮細胞におけるトリアゾラム代謝を阻害することが明らかとなり, ヒトでは実施困難な門脈血の解析をCYP3A ヒト化マウスで実施することの意義が示された [3]。

2) マウス内因性 Cyp2c ノックアウトの有用性

WT マウスにトリアゾラムを経口投与すると, マウス Cyp3a によって生成する 1' 位水酸化体が高レベルで血中に検出される。マウス Cyp3a 遺伝子欠損マウスでは, 1' 位水酸化体の血中濃度は低下するものの, 完全には消失しない。この原因として, Cyp3a 遺伝子欠損により肝臓におけるマウス内在性 Cyp2c 遺伝子の発現が増加し, 補完的にトリアゾラム代謝を触媒することが示唆されている [4]。そのため, CYP3A ヒト化マウスにトリアゾラムを経口投与した時の 1' 位水酸化体の血中濃度は Cyp3a 遺伝子欠損マウスと同程度であり, ヒト CYP3A 遺伝子の導入効果

が明確でない (図3A)。そこで, マウス Cyp3a とマウス Cyp2c を共に欠損させたところ, 1' 位水酸化体の生成はほぼ完全に消失し, ヒト CYP3A 遺伝子の導入効果が明確となった (図3B)。

抗てんかん薬クロバザムは, CYP3A4 によって活性体である脱メチルクロバザムに代謝され, さらに CYP2C19 によって不活性体に代謝される。CYP2C19 は遺伝子多型を示す酵素であり, 日本人の約 20% を占める CYP2C19 の欠損者では, クロバザム投与後に脱メチルクロバザムが蓄積する。Cyp3a 遺伝子を欠損しヒト CYP3A 遺伝子を導入した CYP3A ヒト化マウスと Cyp3a と Cyp2c をダブル欠損しヒト CYP3A 遺伝子を導入した CYP3A ヒト化マウスにクロバザムを経口投与し, クロバザムと脱メチルクロバザムの血中濃度推移を解析したところ, Cyp3a と Cyp2c をダブル欠損し, ヒト CYP3A 遺伝子を導入した CYP3A ヒト化マウスでは, 脱メチルクロバザムの消失が著しく遅延することが示された (図4)。この結果から, Cyp3a と Cyp2c をダブル欠損し, ヒト CYP3A 遺伝子を導入した CYP3A ヒト化マウスは CYP2C19 欠損者に相当し, これら二つのマウスを比較することは CYP2C19 遺伝子多型モデルとして有用であることが示唆された [5]。

3) 核内受容体 PXR と CYP3A のダブルヒト化マウスを用いた CYP3A4 誘導評価

ヒト CYP3A4 の発現量はリファンピシンやセントジョーンズワートにより増加 (酵素誘導) するため, CYP3A4 で代謝される薬物とリファンピシンなどの誘導薬との併用は薬物間相互作用を引き起こす。リファンピシンによる CYP3A4 遺伝子の誘導メカニズ

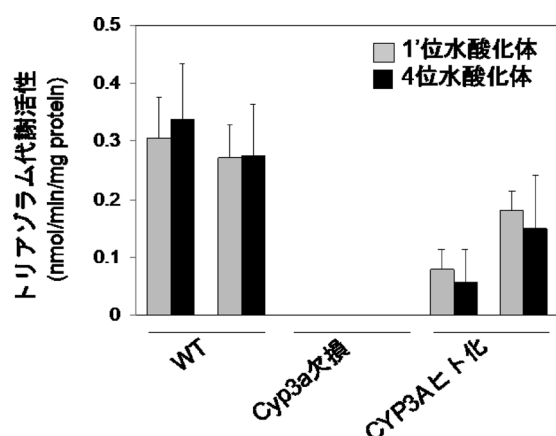


図1 野生型 (WT), Cyp3a 欠損および CYP3A ヒト化マウス小腸ミクロソームにおけるトリアゾラム代謝活性

各群2匹からそれぞれ調製したミクロソームを用いて3回活性測定を行い, 結果は平均値と標準偏差で示した。

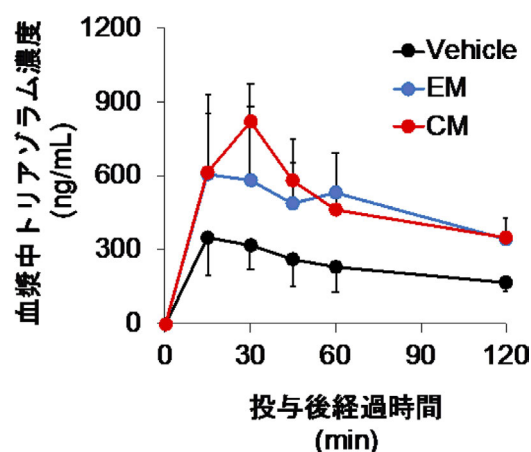


図2 エリスロマイシン (EM), クラリスロマイシン (CM) あるいは溶媒 (vehicle) を前投与した後にトリアゾラム (1 mg/kg) を単回経口投与した際の血漿中トリアゾラム濃度推移 (各群5-6匹) 結果は平均値と標準偏差で示した。

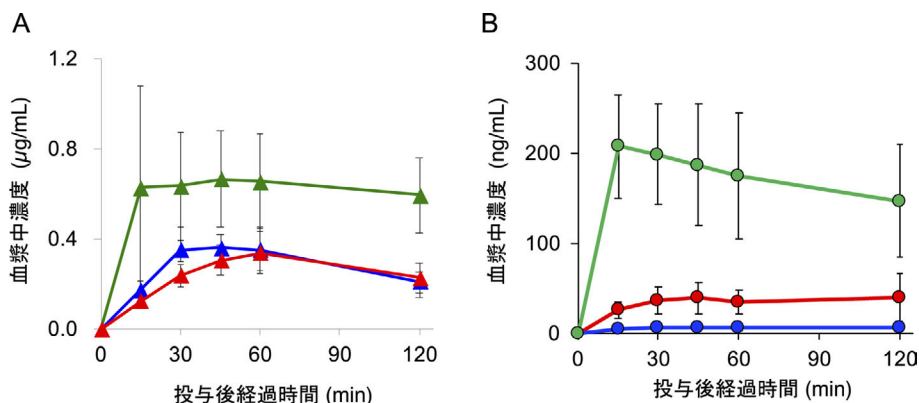


図3 トリアゾラム単回経口投与後の1'位水酸化体の血漿中濃度推移

A) トリアゾラム 2 mg/kg を WT (緑三角), Cyp3a 欠損マウス (青三角), Cyp2c をノックアウトしていない CYP3A ヒト化マウス (赤三角) に経口投与した (各群 5 匹), B) トリアゾラム 1 mg/kg を WT (緑丸), Cyp3a と Cyp2c をダブルノックアウトしたマウス (青丸), Cyp2c をノックアウトした CYP3A ヒト化マウス (赤丸) に経口投与した (各群 4 匹)。結果は平均値と標準偏差で示した。

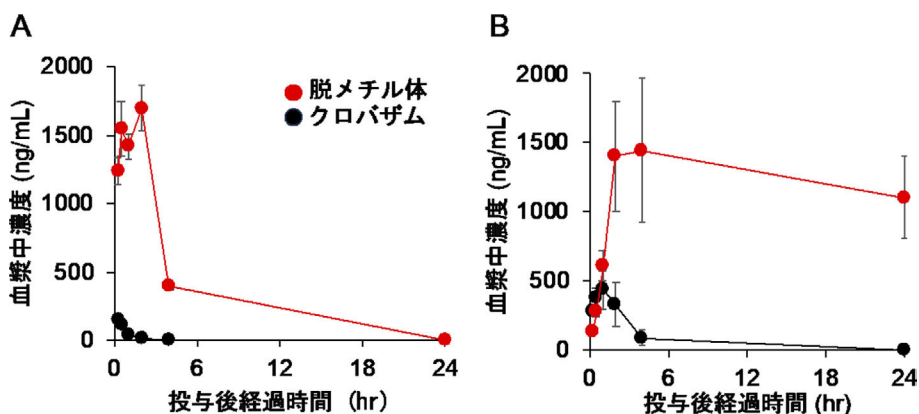


図4 クロバザム (10 mg/kg) 経口投与後のクロバザム (黒丸) 及び脱メチルクロバザム (赤丸) の血漿中濃度推移
A) Cyp2c をノックアウトしていない CYP3A ヒト化マウス (4 匹), B) Cyp2c をノックアウトした CYP3A ヒト化マウス (4 匹)。結果は平均値と標準偏差で示した。

ムは、核内受容体 Pregnane X Receptor (PXR) の活性化による CYP3A4 遺伝子の転写促進による。一方、PXR のリガンド依存的な活性化には種差があり、リファンピシンはヒト PXR を強く活性化するが、マウス PXR の活性化作用は非常に弱い。このため、ヒト CYP3A4 の誘導予測には、CYP3A だけでなく PXR をヒト化することが必要である。そこで、CYP3A をヒト化したマウスと PXR と CYP3A をダブルヒト化したマウスにリファンピシンあるいは溶媒 (vehicle) を前投与し、その後トリアゾラムを経口投与し、トリアゾラムと 1' 位水酸化体の血中濃度を解析した。図 5 に示したように、PXR をヒト化したマウスではリファンピシン前投与により血中トリアゾラム濃度が顕著に低下した。一方、PXR をヒト化していないマウスではリファンピシンによる血中トリアゾラム

濃度の変化は認められなかった。また、PXR をヒト化したマウスでは、トリアゾラム投与後の早期における血中 1' 位水酸化体濃度がリファンピシン前投与群で高く、リファンピシンによるトリアゾラムから 1' 位水酸化体への代謝促進作用が示唆された。さらに、1' 位水酸化体の消失が速やかであったことから、1' 位水酸化体のさらなる代謝あるいは排泄にリファンピシンによって誘導される酵素あるいはトランスポーターが関与していると考えられた。PXR をヒト化していないマウスでは、リファンピシンによる血中 1' 位水酸化体濃度への影響も認められなかった。これらの結果から、PXR と CYP3A をダブルヒト化したマウスは、PXR の活性化を介した CYP3A4 の誘導に関する *in vivo* 評価モデルとして有用であることが示された [6]。

4) P-gp ヒト化マウスを用いた薬物中枢移行評価

P-glycoprotein (P-gp, MDR1 (Multiple drug resistance 1) あるいは ABCB1 (ATP-binding cassette Sub-family B Member) と呼ばれる) は、脳毛細血管内皮細胞の内腔側に発現し、薬物の中枢移行を抑制する薬物トランスポーターの一つである。ヒト P-gp は一つの遺伝子にコードされているが、マウスでは二つの遺伝子 (Mdr1a と Mdr1b) にコードされており、中枢には主に Mdr1a が発現している。このため、マウス内因性 Mdr1a/Mdr1b をノックアウトすると P-gp 基質が脳内に蓄積する。ヒト MDR1 遺伝子は、29 エキソンからなる巨大な遺伝子であり、機能的な P-gp を発現したヒト化動物の作成は従来の方法では困難であった。そこで、染色体工学技術により、ヒト MDR1 遺伝子全長を導入した P-gp ヒト化マウスを作成した。そのマウスの脳毛細血管には、マウス Mdr1a と Mdr1b は発現しておらず、ヒト MDR1 が発

現していた。P-gp 基質であるバクリタキセルを尾静脈投与し、4 時間後の血漿中および脳組織内濃度を測定したところ、WT マウスに比較してノックアウトマウスでは薬物濃度比 (脳/血漿) が高く、P-gp ヒト化マウスではノックアウトマウスに比較して低い値であった (図 6)。さらに、P-gp 阻害薬であるエラクリダルを P-gp ヒト化マウスに前処置すると、バクリタキセルの薬物濃度比が上昇した。これらの結果より、P-gp ヒト化マウスの脳毛細血管には機能的な P-gp が発現しており、P-gp 基質の中枢移行を抑制していることが示された [7]。

ヒト MDR1 遺伝子には、複数の SNPs が報告されている。このうち、2677G>T 変異はアミノ酸置換を伴う変異であり、発現量に影響を与える可能性が示唆されている。一方、ヒトにおける薬物の中枢移行と 2677G>T 変異に関する明確な知見はない。そこで、P-gp ヒト化マウスに変異を導入し、脳毛細血管にお

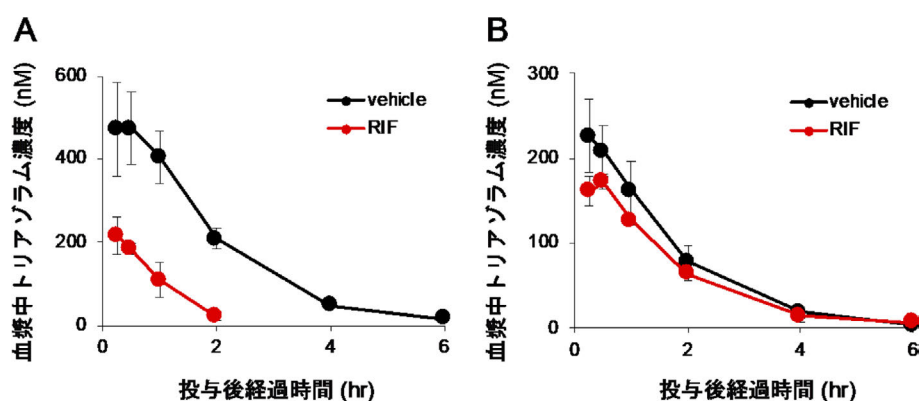


図5 リファンピシム (RIF) あるいは溶媒 (vehicle) を前投与した後にトリアゾラム (1 mg/kg) を単回経口投与した際の血漿中トリアゾラム濃度推移

A) PXR と CYP3A のダブルヒト化マウス (各群 3 匹), B) PXR をヒト化していない CYP3A ヒト化マウス (各群 4 匹)。結果は平均値と標準偏差で示した。

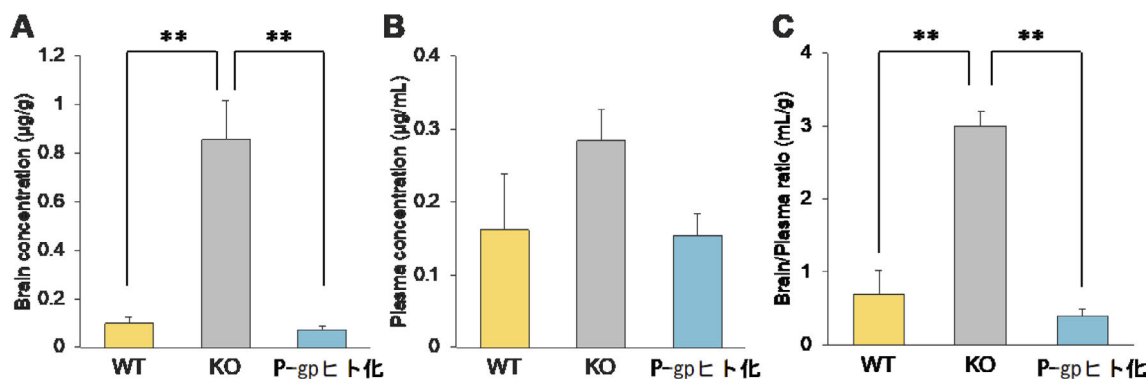


図6 野生型 (WT), Mdr1a/Mdr1b ノックアウト (KO) および P-gp ヒト化マウス (各群 4 匹) におけるバクリタキセル (10 mg/kg) 静脈内投与 4 時間後におけるバクリタキセル濃度

A) 脳内濃度, B) 血漿中濃度, C) 脳/血漿中濃度比。結果は全て平均値と標準偏差で示した。**p<0.01

ける発現量と P-gp 基質であるベラパミルの中枢移行性を検討した。2677G>T 変異の導入は、脳毛細血管における P-gp タンパク質の発現量を変化させず、中枢移行性をわずかに増加させた。このことより、2677G>T 変異は P-gp タンパク質発現量に影響を与えずに、薬物輸送能を低下させる可能性が示された [8]。

5) P-gp ヒト化マウスを用いた薬物消化管吸収評価

P-gp は中枢だけでなく、消化管にも発現しており、経口投与された薬物の吸収を抑制的に制御している。すなわち、消化管粘膜に取り込まれた薬物を消化管管腔側に排泄する働きを有する。したがって、P-gp 基質と P-gp 阻害薬を併用すると、P-gp 基質の生体内への吸収量が増加し、血中薬物濃度の上昇につながる。そのため、消化管 P-gp の阻害に起因する薬物間相互作用の予測モデルが必要とされている。そこで、*in vivo* 予測モデルとしての P-gp ヒト化マウスの有用性を検討した。具体的には、6 種の P-gp 基質を P-gp ヒト化マウス、WT マウス及び Mdr1a/Mdr1b ノックアウトマウスに経口投与した時の血中濃度時間曲線下面積 (AUC) を求め、ヒトにおいて報告されている薬物間相互作用との関連性を解析した。まず、ヒトにおける阻害剤による影響 ($AUCR_{human}$) は、(式 1) により数値化した。

$$\begin{aligned} AUCR_{human} &= \text{阻害剤併用時の AUC} / \text{阻害剤非併用時の AUC} \\ &= 1 + \text{阻害剤による AUC 変化率} \% / 100 \quad (\text{式 1}) \end{aligned}$$

次に、ノックアウトマウスにおける AUC を阻害剤併用時の AUC とみなし、ヒト化マウスにおける阻害剤による影響 ($AUCR_{hMDR1-MAC}$) と WT マウスにおける阻害剤による影響 ($AUCR_{wild-tyoe}$) を、(式 2) と (式 3) により求めた。

$$\begin{aligned} AUCR_{hMDR1-MAC} &= \text{ノックアウトマウスにおける AUC} / \\ &\quad \text{ヒト化マウスにおける AUC} \quad (\text{式 2}) \end{aligned}$$

$$\begin{aligned} AUCR_{wild-tyoe} &= \text{ノックアウトマウスにおける AUC} / \\ &\quad \text{WT マウスにおける AUC} \quad (\text{式 3}) \end{aligned}$$

ヒトにおける阻害剤による影響は、ヒト化マウスにおける阻害剤による影響と高い相関性 ($R^2=0.88$) を示したのに対し、WT マウスにおける阻害剤による影響とは有意な相関が認められなかった ($R^2=0.25$)。この結果より、ヒトにおける消化管 P-gp の阻害による薬物吸収への影響は、P-gp ヒト化マウスとノックアウトマウスを用いることにより精度良く予測できることが示唆された [9]。

まとめ

薬物動態関連因子をヒト化したマウスは、薬物間相互作用の予測や遺伝子多型による影響解析に有用な動物モデルであることが示唆された。今後、さらに多くの因子をヒト化するとともに、ヒトを予測するモデルとしての検証を進めていきたい。また、本手法により作成したモデルでは、遺伝子の生理的発現が期待できることから、各種臓器でのヒト薬物動態関連因子の役割や毒性解析への応用が期待される。

文 献

1. Kazuki Y, Kobayashi K, Aueviriyavit A, Oshima T, Kuroiwa Y, Tsukazaki Y, Senda N, Kawakami H, Ohtsuki S, Abe S, Takiguchi M, Hoshiya H, Kajitani N, Takehara S, Kubo K, Terasaki T, Chiba K, Tomizuka K, Oshimura M. Trans-chromosomal mice containing a human CYP3A cluster for prediction of xenobiotic metabolism in humans. *Hum. Mol. Genet.* 22: 578–592 (2013)
2. Aueviriyavit S, Kobayashi K, Chiba K. Species differences in mechanism-based inactivation of CYP3A in humans, rats and mice. *Drug Metab. Pharmacokinet.* 25: 93–100 (2010)
3. Minegishi G, Kazuki Y, Nitta S, Miyajima A, Akita H, Kobayashi K. In vivo evaluation of intestinal human CYP3A inhibition by macrolide antibiotics in CYP3A-humanized mice. *Xenobiotica* 51: 764–770 (2021)
4. Minegishi G, Kazuki Y, Yamasaki Y, Okuya F, Akita H, Oshimura M, Kobayashi K. Comparison of the hepatic metabolism of triazolam in wild-type and Cyp3a-knockout mice for understanding CYP3A-mediated metabolism in CYP3A-humanized mice in vivo. *Xenobiotica* 49: 1303–1310 (2019)
5. Kobayashi K, Minegishi G, Kuriyama N, Miyajima A, Abe S, Kazuki K, Kazuki Y. Metabolic disposition of triazolam and clobazam in humanized CYP3A mice with a double knockout background of mouse Cyp2c and Cyp3a genes. *Drug Metab. Dispos.* 51: 174–182 (2023)
6. Kobayashi K, Kuze J, Abe S, Takehara S, Minegishi G, Igarashi K, Kitajima S, Kanno J, Yamamoto T, Oshimura M, Kazuki Y. CYP3A4 induction in the liver and intestine of pregnane X receptor/CYP3A-humanized mice: approaches by mass spectrometry imaging and portal blood analysis. *Mol. Pharmacol.* 96: 600–608 (2019)
7. Yamasaki Y, Kobayashi K, Okuya F, Kajitani N, Kazuki K, Abe S, Takehara S, Ito S, Ogata S, Uemura T, Ohtsuki S, Minegishi G, Akita H, Chiba K, Oshimura M, Kazuki Y. Characterization of P-glycoprotein humanized mice generated by chromosome

- engineering technology:its utility for prediction of drug distribution to the brain in humans. *Drug Metab. Dispos.* 46: 1756–1766 (2018)
8. Yamasaki Y, Moriwaki T, Ogata S, Ito S, Ohtsuki S, Minegishi G, Abe S, Ohta Y, Kazuki K, Kobayashi K, Kazuki Y. Influence of MDR1 gene polymorphism (2677G>T) on expression and function of P-glycoprotein at the blood-brain barrier: utilizing novel P-glycoprotein humanized mice with mutation. *Pharmacogenetics and Genomics* 32: 288–292 (2022)
9. Miyake T, Tsutsui H, Haraya K, Tachibana T, Morimoto K, Takehara S, Ayabe M, Kobayashi K, Kazuki Y. Quantitative prediction of P-glycoprotein-mediated drug–drug interactions and intestinal absorption using humanized mice. *Br. J. Pharmacol.* 178: 4335–4351 (2021)

特集：ヒト化動物の最新研究

免疫不全マウスを基盤としたヒト化肝臓マウスの開発と 医学・創薬研究への活用

末水洋志

公益財団法人実験動物中央研究所

要 約

ヒト肝細胞で再構築された肝臓（ヒト化肝臓）を有するヒト化肝臓マウスは、ヒトの薬物代謝予測を可能にするユニークな実験動物である。しかし、ヒト化肝臓内にはマウスの肝細胞が残存するため、時としてヒトの肝薬物代謝をうまく再現できないことがある。そこで、残存するマウス肝細胞の影響を排除するため、マウスの肝臓でシトクロム P450 酸化還元酵素（POR）が欠損するヒト化肝臓マウスを開発した。POR conditional KO（cKO）マウスの肝臓には POR 発現細胞がほとんど認められず、肝ミクロソームにおける NADPH-シトクロム c 還元酵素活性、シトクロム P450 を介した薬物酸化活性が僅かに検出される程度にまで低下した。このマウスにヒト肝細胞を移植して POR cKO ヒト化肝臓マウスを作製し、S-ワルファリンの代謝を従来のヒト化肝臓マウスと比較した。従来型ヒト化肝臓マウスではヒト肝細胞置換率が 95% であってもマウス主要代謝物 S-4'-水酸化ワルファリンが尿中に約 20% も含まれるのに対し、POR cKO ヒト化肝臓マウスではマウス主要代謝物は約 2% にまで減少した。更に POR cKO ヒト化肝臓マウスではヒト主要代謝物 S-7-水酸化ワルファリンの尿中排泄量が従来型ヒト化肝臓マウスに比べ大幅に増加した。残存マウス肝細胞のシトクロム P450 活性による干渉が低減した POR cKO ヒト化肝臓マウスは、ヒト薬物代謝の予測に有用な新しい *in vivo* モデルになることが期待される。

実験動物中央研究所（実中研）では 1973 年ヌードマウスの導入以来、1985 年 SCID マウス、1995 年 Rag2 ノックアウトマウス、1997 年 IL-2 受容体 γ 鎖ノックアウトマウスを次々に導入して免疫不全マウスの開発改良を継続し、2002 年超免疫不全 NOG マウスを完成させた [1]。NOG マウスにヒト造血幹細胞を移植すると成熟したヒト T 細胞や B 細胞、NK 細胞が血液中出现し、ヒト免疫不全症ウイルス（HIV-1）やエプスタイン・バー・ウイルス（EB）の感染が成立するなど、ヒト化マウスの有用性が示された [2, 3]。また、ヒトの卵巣や子宮内膜など細胞や組織片を生着させると部分的だがヒトの組織・器官の機能を観察することもできるようになった。

医薬品開発において実験動物を用いた前臨床安全性評価は候補化合物とその代謝物の毒性を予測するために不可欠であるが、ヒトと実験動物の薬物代謝における種差がヒト予測を難しくしている。そのため、薬物代謝の主要臓器である肝臓の細胞や S9 画分、ミクロソームなどのヒト生体由来材料が予備的評価に広く用いられているが、代謝速度が緩やかな薬物や多段階反応を伴う薬物については十分な予測が行えないことが多い。新薬開発の初期段階でより正確にヒト薬物代謝の情報を集めるためには、より優

れた前臨床モデルが必要であり、ヒト肝細胞を保有するキメラマウスは肝薬物代謝の種差を克服できる魅力的なモデル動物である。現在、3 系統のヒト肝細胞キメラマウスが広く使用されている。フマリルアセトアセターゼ欠損（*Fah* KO）マウス、および、ウロキナーゼタイププラスミノゲンアクチベータトランスジェニック（*Alb-uPA* Tg）マウス、これら 2 系統はいずれも重度肝傷害モデルであり、免疫不全化することにより異種肝細胞の生着を可能にしたものである [4, 5]。一方、実中研では前述の通り、異種細胞の生着性が極めて高い超免疫不全 NOG マウスが基盤であり、適切な肝傷害誘導法と組み合わせることでヒト肝細胞の生着を可能にした。最終的に単純ヘルペスウイルス 1 型チミジンキナーゼ（*HSVtk*）／ガンシクロビルによる薬剤誘導型肝傷害システムが超免疫不全 NOG マウスに組み入れられ *Alb-HSVtk* トランスジェニック NOG（TK-NOG）マウスが誕生した。TK-NOG マウスの脾臓からヒト肝細胞を移植すると多くの細胞が肝臓内に留まり増殖を開始し、10～12 週経過すると肝臓の大部分がヒト肝細胞で置換された「ヒト化肝臓」ができあがる。ヒト化肝臓ではヒトの第 1 相、および、第 2 相薬物代謝酵素の他、トランスポーターの発現も認められる [6]。

また、ヒト肝細胞により代謝された薬物が胆汁中に排泄されていることから、再構築された肝臓は正常な構造と機能を有すると考えられる [7]。これまでの研究でデスロラタジンのヒト特異的な 3-水酸化とそれに続く O-グルクロン酸化 [8]、トルブタミドのメチル-ヒドロキシ化とそれに続く酸化によるカルボン酸生成 [9]、UDP-グルクロン酸転移酵素 1A4 を介した N2-グルクロン酸化 [10] などが報告され、ヒトにおける薬物代謝予測に有用であることが多数報告されている。しかし、マウス肝ミクロソームによるクリアランスがヒト肝ミクロソームによるそれより高い薬物も存在することから、たとえヒト肝細胞置換率が 90% 以上であってもマウス肝細胞が残存する限り薬物代謝プロファイルに影響が現れる可能性がある [11]。残存するマウス肝細胞を完全に除去することは困難なこと、薬物代謝に関わるシトクロム P450 遺伝子には多数のファミリーおよびサブファミリーが存在するためその全てをノックアウトするのは困難なこと、P450 酵素の触媒作用に必要な電子の供給を遮断して全ての P450 酵素の抑制を目論み、シトクロム P450 酸化還元酵素 (POR) 欠損ヒト化肝臓マウスを開発した [12]。

POR コンディショナルノックアウト (POR cKO) マウスの特徴

NOG-ES 細胞を用いた 2 段階の相同組換えにより *Flpo* リコンビナーゼ遺伝子、およびその認識配列 (*Flox*) を導入し、生殖細胞系列伝達を示すキメラマウスを取得した。両対立遺伝子とも *Floxed Por* 遺伝子 (Δ/Δ) のマウスと片側の対立遺伝子が完全欠損 (*wt/null*) したマウスを作製し交配に用いた (図 1)。POR コンディショナルノックアウトマウス (POR cKO, *null/null*)、および、野生型マウス (*Wildtype*, *wt/wt*) の肝臓を抗 POR 抗体で染色したところ、*Wildtype* マウスでは肝小葉全体に染色性が認められ、特に中心静脈周辺で強い染色性が認められた。一方、POR cKO マウスでは小葉全体の染色性が低下し、陽性細胞は中心静脈周辺に僅かに残存するのみであった (図 1 POR 抗体染色)。これらの個体の肝臓からミクロソーム分画を調製し、POR タンパクの発現をイムノブロット法にて解析したところ、POR cKO マウスでは POR タンパクの発現が認められなかった (図 1 イムノブロット)。また、POR 酵素活性も大幅に減弱していることが確認できた。これらの肝ミクロソームを用いてエトキシレゾルフィン O-脱エチル化、ペントキシレゾルフィン O-脱ペンチル化、ブフラロール 1'-水酸化、ミダゾラム 1'-水酸化、テストステロン 6 β -水酸化を測定したところ、POR cKO マウスの肝ミクロソームでは測定したすべての薬物代謝酵素活性が *Wildtype* マウスに比し大幅に減弱していた (図 1 酵素活性)。

POR cKO ヒト化肝臓マウスの特徴

POR cKO マウスと TK-NOG マウスの両方の組換え遺伝子を有する TK-NOG-Por cKO マウスを作出し、ガンシクロビル投与により肝傷害を誘導した。市販の凍結ヒト肝細胞を脾臓/門脈経路で肝臓に移植し、ヒト肝細胞の生着と増殖を血中コリンエステラーゼ (ChE) 活性の上昇により確認した。移植から 10 週間が経過し、血中 ChE 活性が 250 U/L を越えた個体について肝組織切片を作製し病理学的解析を行った (図 2)。H&E 染色で肝小葉の構造を確認すると門脈、肝動脈、肝内胆管からなる門脈三つ組構造がきれいに保たれていることが確認できる。POR cKO ヒト化肝臓マウスの肝細胞はこれまでの報告通り、マウス肝細胞 (矢印でマウス肝細胞コロニーを示す) よりも明るい染色性を示した。これはヒト肝細胞の細胞質内には多くのグリコーゲン顆粒が蓄積しているためである。抗ヒトミトコンドリア抗体染色では肝臓内のほとんどの細胞が陽性を示し、その領域は H&E 染色で明るい染色性を示した領域と一致した。これら POR cKO ヒト化肝臓におけるヒト薬物代謝酵素の発現および分布をヒト P450 に対する特異抗体を用いて解析した。CYP2C9 タンパク質は肝小葉全体に分布していたのに対し、CYP1A2 と CYP3A4 タンパク質は中心静脈周囲に局在していた。これら免疫染色の結果は、以前報告したヒト成人肝臓の結果と一致していた [13]。POR cKO ヒト化肝臓に残存するマウス細胞では POR 抗体による染色性が確認されないことから P450 酵素活性が低下していると思われる。

POR cKO ヒト化肝臓マウスの優位性

ヒト化肝臓マウスに残存する僅かなマウス肝細胞が時として本来のヒト薬物代謝特性を歪めてしまうことを懸念する研究者も多い。S-ワルファリンは動物種により水酸化の位置が異なることが知られる薬剤である。野生型マウスの肝ミクロソームでは S-4' 位の水酸化が優先的に触媒されるがヒト肝ミクロソームでは S-7 位の水酸化が主要代謝物として生成されることが知られている (図 2 S-ワルファリン代謝構造式)。そこで *Wildtype* マウス、従来型ヒト化肝臓マウス、POR cKO ヒト化肝臓マウスに S-ワルファリンを単回静脈内投与し、尿中に排泄された代謝物 (S-4'-6-/7-/8-/10-水酸化ワルファリン) の分析を行った (図 2 S-ワルファリン代謝)。Wildtype マウスにおけるヒト主要代謝物 S-7 水酸化ワルファリンの生成比率が約 26% であるのに対し、ヒト肝細胞を持つ従来型ヒト化肝臓マウスではヒト主要代謝物の生成比率が 45% に上昇した。一方、野生型マウスで優先的に生成される S-4' 水酸化ワルファリンの生成比率は *Wildtype* マウスの約 41% から従来型ヒト化肝臓マウスで 26% に低下した。しかし、S-4' 水酸化ワルファリンは本来ヒトでは生成されない代謝物 [14]

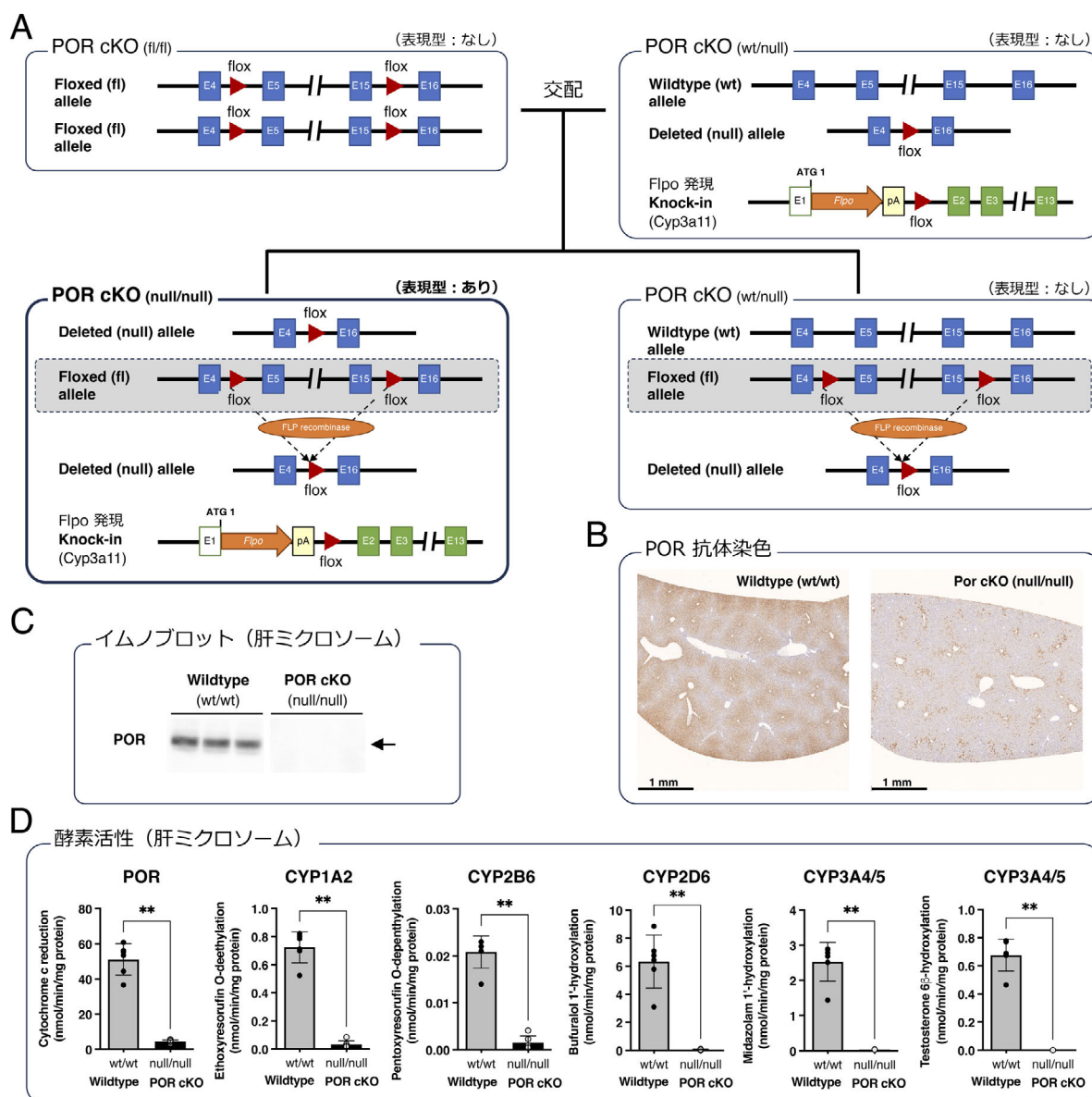


図 1 POR cKO マウスの作製

(A) POR コンディショナルノックアウト (POR cKO) マウス作出のための交配方法。(B) 免疫組織化学染色による POR タンパク発現細胞の検出。(C) 肝ミクロソームを用いた POR タンパクのイムノブロット解析。(D) 肝ミクロソームにおける薬物代謝活性。使用した基質と濃度はエトキシレゾルフィン (2 μ M), ペントキシレゾルフィン (10 μ M), プフラロール (100 μ M), ミダゾラム (100 μ M), テストステロン (100 μ M)。Wildtype (wt/wt) と POR cKO (null/null) マウスを比較した場合, 統計学的に有意な差; ** $p < 0.01$ 。

なので, 残存したマウス肝細胞の薬物代謝酵素活性がヒト薬物代謝特性に大きな影響を与えていることが伺える。このような残存マウス細胞による「薬物代謝のノイズ」をキャンセルするために開発した POR cKO ヒト化肝臓マウスでは, ヒト主要代謝物 S-7 水酸化ワルファリンの生成比率が約 70%に達し, 一方, マウスの主要代謝物 S-4' 水酸化ワルファリンの生成

比率はヒト肝細胞置換率 95%のマウスでは 1.2%にまで低下した。驚くべきことに置換率 75%のマウスであってもその生成比率は僅か 2.5%にまで低下し, POR cKO ヒト化肝臓マウスでは残存マウス肝細胞による影響が大幅に軽減されることが明らかとなった。

最後に

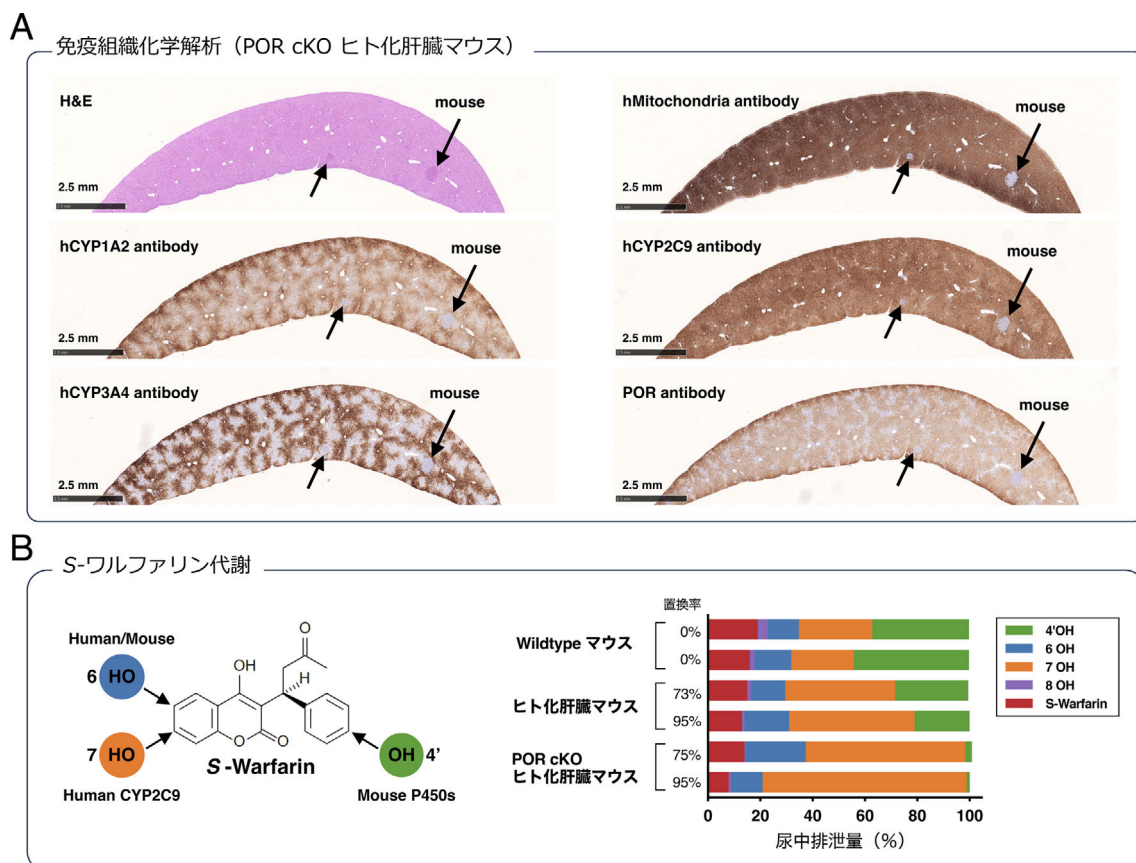


図2 POR cKO ヒト化肝臓マウスの特徴

(A) POR cKO ヒト化肝臓マウス肝臓組織の免疫組織化学染色。矢印は残存するマウス肝細胞コロニーを示す。スケールバー, 2.5 mm。(B) S-ワルファリンの構造と修飾部位。S-ワルファリン (4.0 mg/kg) 単回静脈内投与後の代謝物の尿中排泄量測定。

このモデルの利点は単にヒトにおける主要代謝物の検出だけではなく、残存マウス肝細胞に由来するマウス代謝活性を排除することで、より精緻にヒト薬物代謝を予測できることである。POR cKO ヒト化肝臓マウスはヒト薬物代謝予測において残存するマウス肝細胞の代謝活性が懸念される場合に特に有効な *in vivo* モデルになると考えられ、そのためにはさらに多くの化合物を用いた検証試験が必要である。また、POR cKO ヒト化肝臓マウスを効率良く作製するため、雄性不妊を回避した次世代型 TK マウス系統 [13] に変更するなどの改良も進められており、近い将来、ヒトの薬物代謝、および、薬物動態の研究に適したプラットフォームになることが期待される。

文献

1. M. Ito et al., NOD/SCID/gamma(c)(null) mouse: an excellent recipient mouse model for engraftment of human cells. *Blood* 100, 3175–3182 (2002).
2. Y. Koyanagi, Y. Tanaka, M. Ito, N. Yamamoto, Hu-

manized mice for human retrovirus infection. *Curr Top Microbiol Immunol* 324, 133–148 (2008).

3. M. Yajima et al., A new humanized mouse model of Epstein-Barr virus infection that reproduces persistent infection, lymphoproliferative disorder, and cell-mediated and humoral immune responses. *J Infect Dis* 198, 673–682 (2008).
4. H. Azuma et al., Robust expansion of human hepatocytes in *Fah^{-/-}/Rag2^{-/-}/Il2rg^{-/-}* mice. *Nat Biotechnol* 25, 903–910 (2007).
5. C. Tateno et al., Near completely humanized liver in mice shows human-type metabolic responses to drugs. *Am J Pathol* 165, 901–912 (2004).
6. M. Hasegawa et al., The reconstituted ‘humanized liver’ in TK-NOG mice is mature and functional. *Biochem Biophys Res Commun* 405, 405–410 (2011).
7. H. Kamimura et al., Formation of the accumulative human metabolite and human-specific glutathione conjugate of diclofenac in TK-NOG chimeric mice with humanized livers. *Drug Metab Dispos* 43, 309–

- 316 (2015).
8. S. Uehara, N. Yoneda, Y. Higuchi, H. Yamazaki, H. Suemizu, Metabolism of desloratadine by chimeric TK-NOG mice transplanted with human hepatocytes. *Xenobiotica* 50, 733–740 (2020).
9. S. Uehara, N. Yoneda, Y. Higuchi, H. Yamazaki, H. Suemizu, Methyl-hydroxylation and subsequent oxidation to produce carboxylic acid is the major metabolic pathway of tolbutamide in chimeric TK-NOG mice transplanted with human hepatocytes. *Xenobiotica* 51, 1–8 (2021).
10. S. Uehara, Y. Higuchi, N. Yoneda, H. Yamazaki, H. Suemizu, UDP-glucuronosyltransferase 1A4-mediated N2-glucuronidation is the major metabolic pathway of lamotrigine in chimeric NOG-TKm30 mice with humanised-livers. *Xenobiotica* 51, 1146–1154 (2021).
11. H. Kamimura et al., Assessment of chimeric mice with humanized liver as a tool for predicting circulating human metabolites. *Drug Metab Pharmacokinet* 25, 223–235 (2010).
12. S. Uehara et al., Humanized liver TK-NOG mice with functional deletion of hepatic murine cytochrome P450s as a model for studying human drug metabolism. *Sci Rep* 12, 14907 (2022).
13. S. Uehara et al., An improved TK-NOG mouse as a novel platform for humanized liver that overcomes limitations in both male and female animals. *Drug Metab Pharmacokinet* 42, 100410 (2022).
14. L. D. Heimark, M. Gibaldi, W. F. Trager, R. A. O'Reilly, D. A. Goulart, The mechanism of the warfarin-rifampin drug interaction in humans. *Clin Pharmacol Ther* 42, 388–394 (1987).

特 集：ヒト化動物の最新研究

ヒト化マウス技術を用いた抗腫瘍免疫反応の誘導

高橋武司

実験動物中央研究所

要 約

ヒト悪性腫瘍の治療のための新薬，中でも抗体治療薬はその高い抗原特異性のために有効性が高いと考えられること，抗 CTLA-4, PD-1 抗体などの免疫チェックポイント阻害剤の臨床治療薬として成功したことから，強力に開発が進められている。また抗体治療薬のみならず，免疫チェックポイント阻害剤との併用薬の開発も新薬開発の主要な標的となっている。これらの新薬の薬効を適切に評価するために免疫不全マウスにヒト腫瘍とヒト血液細胞を共生着させたヒト化マウスが使用される頻度が高まっている。筆者の属する実験動物中央研究所でも NOG マウスを基盤としたヒト化マウスを作製し，様々な実験系で抗体治療薬の抗腫瘍効果を検討している。しかし，NOG マウスへの抗体治療薬の投与はマウス自然免疫系の活性化を招き，予期せぬ結果を得ることがある。このような抗体投与後のマウス自然免疫系の関与を排除するためにマウス IgG 受容体 (FcγR) 遺伝子を破壊した NOG-FcγR KO マウスを開発した。NOG-FcγR KO マウスでは抗体依存性のマウス自然免疫系によるヒト細胞への干渉を防ぐことが可能であった。さらに NOG-FcγR KO マウスでは NOG はマウスでは誘導できないヒト治療用抗 PD-1 抗体による抗腫瘍効果が一部のヒト腫瘍株で認められた。これらの結果は NOG-FcγR KO マウスが抗体治療薬の薬効を評価するための適切な生体モデル系となることを示唆する。

免疫不全マウスにヒトの生体組織を生着させるヒト化マウス技術の開発が急速に進展している。このような試みがなされた当初（1980 年代初頭）はヌードマウスや重症免疫不全症 (scid) マウスにヒトのがん細胞株を生着させ，抗がん剤の試験などに用いることが主体であった。やがて scid あるいは NOD/scid マウスにヒト末梢血由来単核球細胞やヒト造血幹細胞を移植してヒト血液系細胞の再構築が試みられたが，これらはヒト T リンパ球への HIV 感染など一部の研究用途に限られた特殊なマウスモデルであった [1, 2]。2000 年前後に scid 変異 (pkrdc 遺伝子の変異) と IL-2 受容体 β 鎖 (IL-2R β あるいは common γ) 欠損を持つ NOG [3] あるいは NSG [4] といった新しい免疫不全マウス系統が開発され，ヒト化マウス技術はブレイクスルーの転機を迎えた。これらの新しい免疫不全系統では生体マウスに X 線を照射しヒト造血幹細胞を尾静脈から移植するといった比較的簡便な実験操作により，ヒト B, T リンパ球を含む広範なヒト血液細胞系譜がマウス体内に分化発生し，ヒト血液・免疫系が疑似的に再構築可能となった。さらに免疫不全度の亢進に伴い，がん患者由来の初代がん組織の生着 (PDX) の樹立も容易となり，かつ継代後においても患者組織の病理像が維持されるなどの特性が明らかにされた。現在，これらのマウス系統に遺伝子操作（ヒトサイトカイン遺伝子の

導入）をさらに加え，多様なマウス系統の開発が進められている。例として，特定のヒト血液系譜の分化の誘導を可能にする [5-8]，あるいはヒト正常肝臓細胞の移植によりマウス肝臓をヒト肝臓と置換することを可能にするマウスなどが挙げられる [9]。

一方，免疫学の研究では 1950 年代にバーネットにより「免疫学的監視 (immune surveillance)」と呼ばれる免疫細胞による自己がん細胞の排除機構の存在が提唱され，腫瘍免疫と呼ばれる学問体系が構築されてきた。しかし，腫瘍免疫の存在を実証する実験結果は必ずしも明確なものではなかった。このような状況を一変させたのがいわゆる「免疫チェックポイント」分子である。T リンパ球の異物認識・活性制御機構に関連する研究から CTLA-4 あるいは PD-1 遺伝子を欠失したマウスでは自己免疫病の自然発症と共に自己腫瘍の拒絶が誘導できること，またこれらの分子に対する抗体投与により同系統 (シンジェニック) マウス由来の腫瘍が自己 T 細胞により拒絶できることが実験的に示された。最終的にはヒト抗体治療薬 (ヤーボイ (抗 CTLA-4 抗体)，ニボルマブ (抗 PD-1 抗体) など) の開発によりヒト臨床で悪性黒色腫をはじめとする様々な“ヒトのがん”を免疫細胞の活性化により治療 (完全拒絶，寛解導入) できることが報告された [10-13]。これらの結果は，免疫細胞の人為的な制御によるがん治療の可能性を

強く示唆している。現在、様々な免疫チェックポイント分子に対する阻害抗体が開発され、その標的細胞はT細胞のみならずNK細胞などの細胞傷害性細胞にも及び、さらには改変キメラ型受容体 (CAR) を発現するように遺伝子操作された CAR-T 細胞や CAR-NK 細胞などもがんの免疫治療の有力な手法と考えられるに至っている [14, 15]。

これらの新しいヒト臨床の治療薬・治療用細胞の抗腫瘍効果を検討するための新しい手法の開発は急務である。これらの治療薬の開発を後押しするための“橋渡し”技術として上述のヒト化マウス技術が利用され得る。従来のマウスモデルでは得られた結果が直接ヒト臨床をかならずしも反映しないとの指摘があり、生きたヒト組織をもつヒト化マウスであれば治療薬への応答の性質がよりヒトに近いのではないかと期待されている。本稿では、筆者らが開発した NOG-FcγR KO マウスを中心にヒトがんと血液・免疫細胞が併存するヒト化マウス技術の研究開発について紹介する。

I : NOG-FcγR KO マウスの開発

筆者らは抗体によるヒトがん治療の主要なメカニズムの一つである抗体依存性細胞傷害 (ADCC) をヒト化マウスで実現するためにヒト IL-15 (hIL-15) を発現する NOG-hIL-15Tg マウスを作製してきた [7]。IL-15 はナチュラルキラー (NK) 細胞の発生分化、生存、活性化に必須の分子であるため、このマウスではヒト造血幹細胞移植により大量のヒト NK 細胞を誘導ができ、またヒト末梢血から単離したヒ

ト成熟 NK 細胞を移植すると長期にわたり維持が可能である。この特性を利用してヒト腫瘍とヒト成熟 NK 細胞を移植し、更に治療抗体を投与することによりヒト腫瘍の成長を抑制することが可能であることを報告してきた (図 1)。一方、その開発過程において NOG-hIL-15Tg あるいは NOG マウスに腫瘍を移植し、治療抗体を投与するとヒトの NK 細胞を移植しないマウス群においてもヒト固形腫瘍の成長が強く抑制されることを見出した (図 2 左) [16]。この結果はマウス自然免疫系が抗体依存性にヒト腫瘍を傷害していることを示唆しており、また通常の NOG あるいは NOG-IL-15Tg マウスを用いたのではヒト NK 細胞と治療抗体の組み合わせによる抗腫瘍効果を適切に評価できないことが明らかとなった。

マウス自然免疫系のメカニズムとして補体経路の関与と IgG 受容体 (FcγR) の関与が考えられたため、筆者らはまず FcγR の欠損マウスを作製した。マウス FcγR は FcγRI, FcγRIIb, FcγRIIIA, FcγRIV の 4 つの異なる分子から構成され、FcγRI, FcγRIII, FcγRIV は共通のサブユニットとして FcγRIg を使用する二量体であり、FcγRIIb のみ単量体である。これらの分子構造から FcγR のすべての発現は FcγRIg と FcγR2b の 2 つの遺伝子を壊すことで喪失させることが可能である。筆者らは理研 BRC から NOG.Cg-FcγRIg^{tm1Rav}/FcγR2b^{tm1Tik} (RBRC02330) を導入し、NOG との交配により NOG-FcγR KO マウスを樹立した。このような NOG-FcγR KO マウスで上記の腫瘍移植と抗体投与を行ったところ、腫瘍の退縮は誘導されなかったため (図 2 右)、NOG で誘導された腫瘍の退縮は

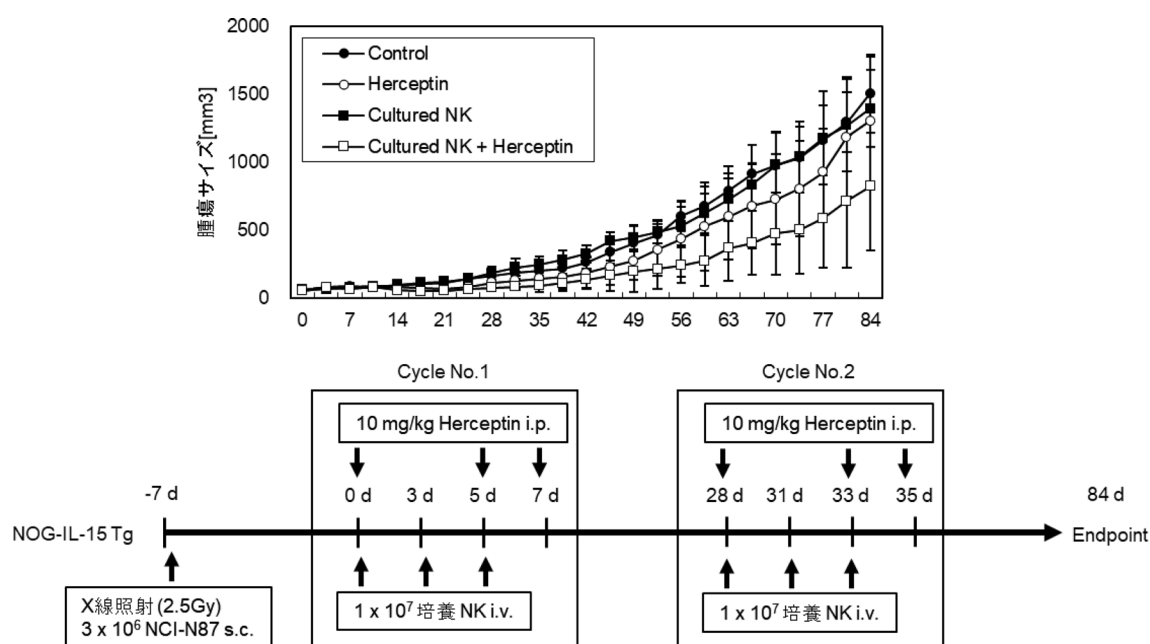


図 1 NOG-hIL-15Tg マウスを用いたヒト NK 細胞による抗体依存性抗腫瘍活性

FcγR を発現するマウス自然免疫細胞（主としてマクロファージ，好中球など）によって引き起こされる反応であることが示唆された [16]。

II：NOG-FcγR KO/hIL-15Tg マウスの開発とその応用

NOG-FcγR KO マウスにおいてマウス内在性の抗体依存性細胞障害活性が喪失することが確認できたため，上述の NOG-hIL-15Tg マウスとの交配により NOG-FcγR KO/hIL-15Tg マウスを樹立し，ヒト白血病細胞を移植し，そのうえでヒト NK 細胞と抗体治療薬を投与した [16]。ヒト白血病細胞としては Daudi ヒトバークリットリンパ腫由来細胞株を用い，抗体治療薬として抗 CD20 抗体（リツキシマブ）を使用した。Daudi は尾静脈から注射するとマウス腎臓で腫瘍を形成し腎臓の腫脹を引き起こし，またマウス骨髄を破壊する。図 3 には腎臓断面を免疫染色して集積した Daudi が形成する腫瘍を検出した結果を示す。このモデルでは腫瘍の退縮はヒト NK 細胞

と抗体を組み合わせたマウス群でのみ惹起され，ヒト NK 細胞投与のみ，抗体投与のみのマウス群では腫瘍の退縮は誘導されなかった。この結果はリツキシマブにより惹起されたヒト NK 細胞の ADCC 活性が腫瘍退縮のメカニズムであったと示唆される。同様の結果は腎臓の重量，骨髄破壊の抑制においても得られており，これらの結果は合わせると NOG-FcγR KO/hIL-15Tg マウス系統が ADCC をメカニズムとする抗体治療薬開発に適したモデルであることを示唆している。

III：NOG-FcγR KO マウスを用いた抗 PD-1 抗体の抗腫瘍効果の検討

上述の通り NOG マウスにヒト造血幹細胞を移植すると，ヒトリンパ球である B 細胞，T 細胞がマウス体内で発生分化し，骨髄系細胞は一部の細胞は低率ではあるものの発生分化する。このような血液系ヒト化マウス（以下 huNOG と記す），ではヒト免疫

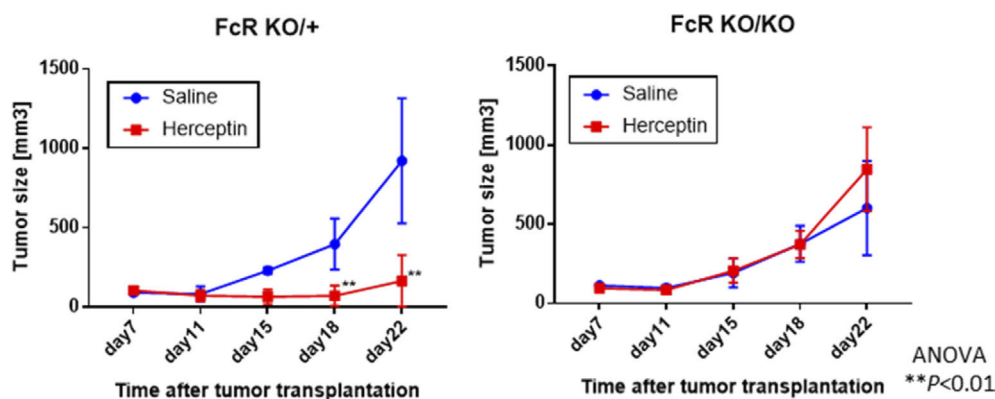


図 2 NOG マウス細胞による抗体依存性抗腫瘍活性と FcRKO マウスでのその消失

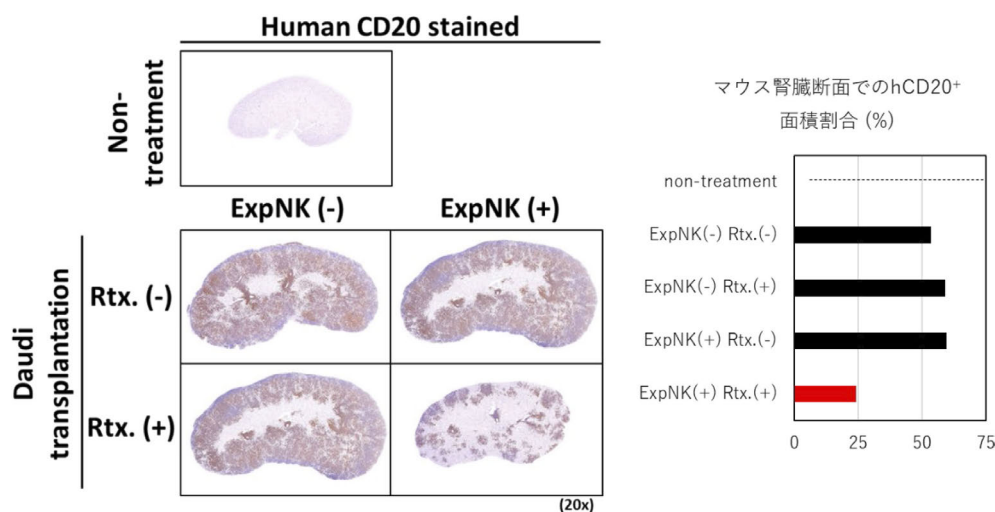


図 3 NOG-FcRKO/hIL-15Tg マウスを用いたヒト NK 細胞による抗体依存性抗腫瘍活性の特異的検出

系の機能的な免疫反応は限定的ではあるものの誘導することが可能である。また、同時にヒトがん細胞の移植・生着が可能であることから、このような担癌 huNOG マウスはヒトの抗腫瘍免疫反応を研究するためのモデルとなると考えられる (図 4)。実際に血液系ヒトマウス (huNSG など) にヒト腫瘍株を移植・担癌後に抗ヒト PD-1 抗体 (キートルーダ) を投与して腫瘍の成長が有意に抑制されたとの報告がなされている。筆者らも huNOG を用いて 10 種類程度のヒト腫瘍細胞株を移植し、抗 PD-1 抗体 (ニボルマブ) を投与する実験を行ってきた。しかしながら、いずれの腫瘍も成長を抑制できなかった (図 5) [17]。この結果にはいくつかの解釈の可能性が考えられる。(1) ヒト化マウス内で発生する T 細胞は不十分な細胞傷害活性しか持たない、(2) ヒト化マウス内のヒト T 細胞はマウスの主要組織適合抗原 (MHC) に拘束されており、ドナー造血幹細胞の HLA とも、腫瘍の HLA の型とも異なる HLA-MHC の不適合のため T 細胞が十分に活性化されない、(3) ヒト化マウスのヒト T 細胞は異種移植に対する拒絶反応を起こす活性を持っているが、腫瘍微小環境の持つ免疫抑制性

のために活性化されない、(4) ヒト臨床においても抗 PD-1 抗体の奏効率 30% 程度であり、ヒト化マウスにおいても抗 PD-1 抗体の効果が検出できないことはヒト臨床を反映した結果である、などが可能性として挙げられる。

筆者らは移植腫瘍株としてヒト頭頸部がん由来の細胞株 HSC4 (扁平上皮がん) を用いて、抗 PD-1 抗体による抗腫瘍実験をしていた際に、抗体を投与した huNOG マウスにおいてヒト T 細胞数が顕著に減少する現象を見出した [17]。抗 PD-1 抗体は IgG4 であるためマウス FcγR と結合してもマウス自然免疫細胞の活性化は誘導されないと考えられたが、一方でヒト IgG4 抗体はマウス体内で FcγR 受容体と結合し生物活性を持つとの報告もなされている。そこで上述の NOG-FcγR KO マウスにヒト造血幹細胞を移植し huNOG-FcγR KO マウスを作製し、HSC4 担癌後に抗 PD-1 抗体を投与した。huNOG-FcγR KO マウスでも HSC4 の腫瘍成長は huNOG と変わらなかったが、抗 PD-1 抗体投与マウスでは腫瘍成長は著しく抑制され、一部のマウスでは完全な拒絶反応が誘導され、有効な抗腫瘍効果が得られた (図 5)。免疫組織化学による解析は抗 PD-1 抗体を投与した huNOG-FcγR KO マウスでは腫瘍内に対してヒト T 細胞が強く浸潤することを示しており (図 6)、このようなヒト T 細胞の浸潤は huNOG では認められなかった。huNOG-FcγR KO マウスでの抗 PD-1 抗体による抗腫瘍効果は他の腫瘍株 (肺がん細胞株 NCI-H1975, HCC827) でも同様に得られたが、すべての腫瘍株で確認できるわけではなく、例えば大腸がん由来の細胞株である RKO では腫瘍成長は全く影響を受けず、腫瘍内へのヒト CD8+ T 細胞の浸潤も誘導できなかった。興味深いことに NCI-H1975, HCC827 を huNOG マウスに移植した実験では抗 PD-1 抗体によるヒト T 細胞数の減少は検出できなかった。このことは

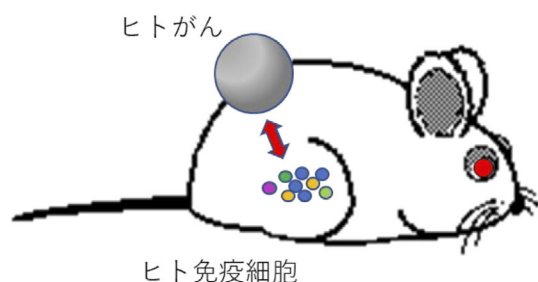


図 4 ヒト免疫細胞とヒトがん細胞の相互作用を生体内で検証できるモデル

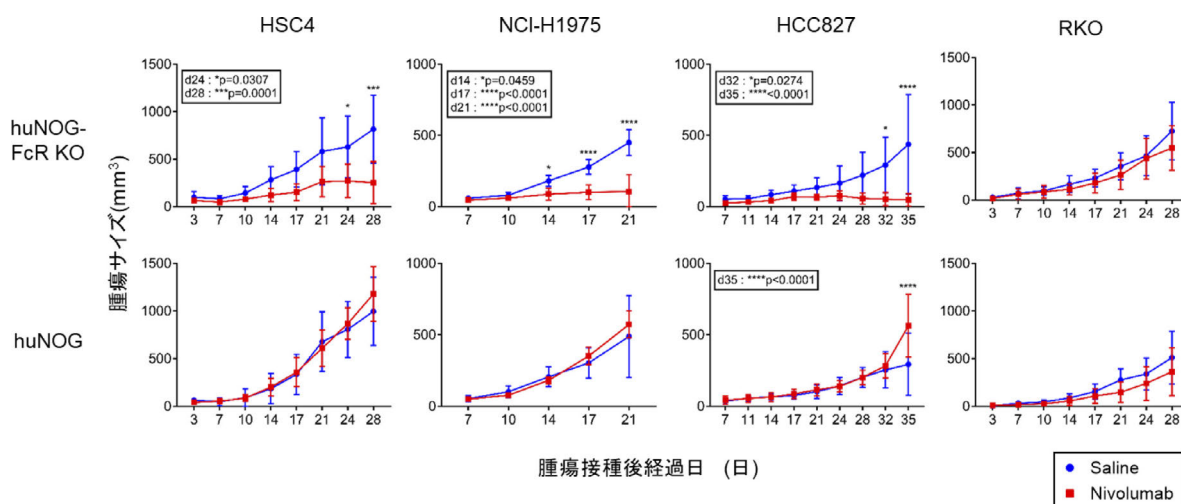


図 5 ヒト化マウスを用いた抗 PD-1 抗体による抗腫瘍免疫の誘導

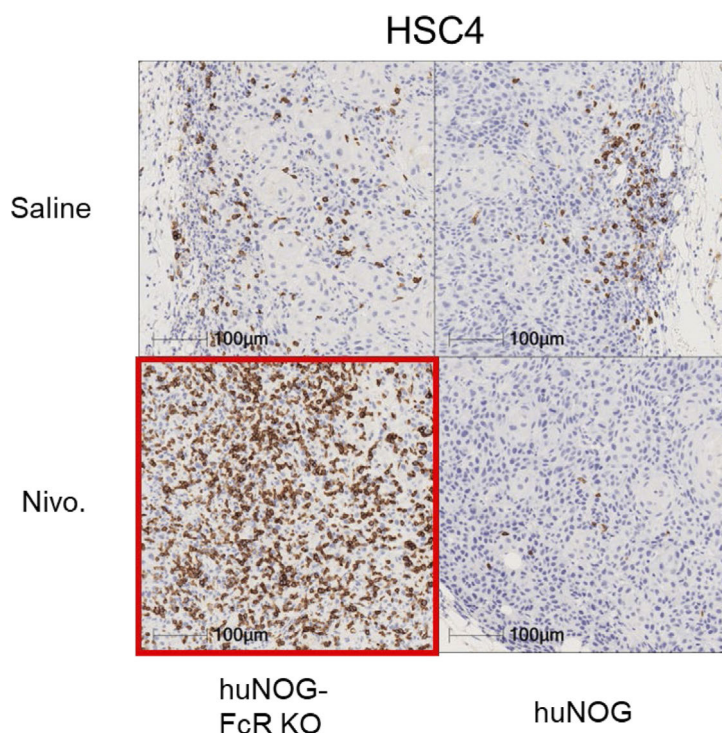


図6 腫瘍内へのヒト CD8+ T 細胞の浸潤 (抗ヒト CD8 での免疫組織化学)
(赤枠 担がんヒト化 NOG-FcRKO マウスへのニボルマブ投与)

huNOG においてヒト T 細胞が抗 PD-1 抗体に対して反応できない理由として異なる複数のメカニズムが関与する可能性を示している。

IV：まとめ

ヒト化マウスを用いて抗体治療薬の評価をする機会は増加しつつある。特に抗腫瘍薬の開発現場においては抗 PD-1 抗体と共役して抗腫瘍効果を亢進させる新薬の開発が積極的に進められている。NOG-FcγR KO マウスはこれらの開発を促進することができると考えられる。また NOG マウスと比較して NOG-FcγR KO マウスがなぜ抗 PD-1 抗体によって有効な抗腫瘍効果を示すのか、なぜ抗 PD-1 抗体により抗腫瘍免疫が誘導できる腫瘍株と誘導できない腫瘍株があるのか、これらの点については今後の研究により明らかにする必要がある。またこれらの研究を通して得られた知見がヒト腫瘍免疫研究・ヒト腫瘍治療へ還元できると考えている。

参考文献

1. Munz, C. Humanized mouse models for Epstein Barr virus infection. *Curr Opin Virol* 25, 113–118, doi:10.1016/j.coviro.2017.07.026 (2017).
2. Garcia, J. V. In vivo platforms for analysis of HIV persistence and eradication. *J Clin Invest* 126, 424–431, doi:10.1172/JCI80562 (2016).
3. Ito, M. et al. NOD/SCID/gamma(c)(null) mouse: an excellent recipient mouse model for engraftment of human cells. *Blood* 100, 3175–3182, doi:10.1182/blood-2001-12-0207 (2002).
4. Ishikawa, F. et al. Development of functional human blood and immune systems in NOD/SCID/IL2 receptor {gamma} chain(null) mice. *Blood* 106, 1565–1573, doi:10.1182/blood-2005-02-0516 (2005).
5. Ito, R. et al. Establishment of a human allergy model using human IL-3/GM-CSF-transgenic NOG mice. *J Immunol* 191, 2890–2899, doi:10.4049/jimmunol.1203543 (2013).
6. Hanazawa, A. et al. Generation of Human Immunosuppressive Myeloid Cell Populations in Human Interleukin-6 Transgenic NOG Mice. *Front Immunol* 9, 152, doi:10.3389/fimmu.2018.00152 (2018).
7. Katano, I. et al. Long-term maintenance of peripheral blood derived human NK cells in a novel human IL-15- transgenic NOG mouse. *Sci Rep* 7, 17230, doi:10.1038/s41598-017-17442-7 (2017).
8. Rongvaux, A. et al. Development and function of human innate immune cells in a humanized mouse model. *Nat Biotechnol* 32, 364–372, doi:10.1038/nbt.2858 (2014).
9. Hasegawa, M. et al. The reconstituted ‘humanized liver’ in TK-NOG mice is mature and functional.

- Biochem Biophys Res Commun 405, 405–410, doi:10.1016/j.bbrc.2011.01.042 (2011).
10. Hodi, F. S. et al. Improved survival with ipilimumab in patients with metastatic melanoma. *N Engl J Med* 363, 711–723, doi:10.1056/NEJMoa1003466 (2010).
 11. Hamid, O. et al. Safety and tumor responses with lambrolizumab (anti-PD-1) in melanoma. *N Engl J Med* 369, 134–144, doi:10.1056/NEJMoa1305133 (2013).
 12. Robert, C. et al. Anti-programmed-death-receptor-1 treatment with pembrolizumab in ipilimumab-refractory advanced melanoma: a randomised dose-comparison cohort of a phase 1 trial. *Lancet* 384, 1109–1117, doi:10.1016/S0140-6736(14)60958-2 (2014).
 13. Weber, J. S. et al. Nivolumab versus chemotherapy in patients with advanced melanoma who progressed after anti-CTLA-4 treatment (CheckMate 037): a randomised, controlled, open-label, phase 3 trial. *Lancet Oncol* 16, 375–384, doi:10.1016/S1470-2045(15)70076-8 (2015).
 14. Sterner, R. C. & Sterner, R. M. CAR-T cell therapy: current limitations and potential strategies. *Blood Cancer J* 11, 69, doi:10.1038/s41408-021-00459-7 (2021).
 15. Xie, G. et al. CAR-NK cells: A promising cellular immunotherapy for cancer. *EBioMedicine* 59, 102975, doi:10.1016/j.ebiom.2020.102975 (2020).
 16. Katano, I., Ito, R., Kawai, K. & Takahashi, T. Improved Detection of in vivo Human NK Cell-Mediated Antibody-Dependent Cellular Cytotoxicity Using a Novel NOG-FcγR-Deficient Human IL-15 Transgenic Mouse. *Front Immunol* 11, 532684, doi:10.3389/fimmu.2020.532684 (2020).
 17. Katano, I. et al. Development of a novel humanized mouse model for improved evaluation of in vivo anti-cancer effects of anti-PD-1 antibody. *Sci Rep* 11, 21087, doi:10.1038/s41598-021-00641-8 (2021).

完全ヒト抗体産生動物の解析と抗体医薬品開発への応用

里深博幸

香月康宏

鳥取大学 染色体工学研究センター

要約

ヒトは多種多様な病原体に対して、多種類の抗体を生み出して対抗している。この多様性は抗体遺伝子の V(D)J 組換と体細胞突然変異という仕組みで生じるが、ヒト体内で起きるこの複雑な現象を再現するにはモデル動物の利用が必要である。しかし、ヒト抗体遺伝子（重鎖 *IGH*: 1.7 Mb, 軽鎖 *IGK*: 1.8 Mb, *IGλ*: 1.1 Mb）は制御領域を含めて巨大な遺伝子であるために、従来のトランスジェニック技術では抗体的可変領域を部分的にしか導入できず、ヒトで作られる抗体の多様性を十分に再現できないという課題があった。この課題を克服するため、我々はげっ歯類で安定して自立複製・分配が可能なマウス人工染色体（mouse artificial chromosome: MAC）を利用し、ヒト抗体遺伝子全長を導入した *IGHK-NAC* を構築したのちに、内在性の抗体遺伝子を破壊した動物へ導入することで、ヒト抗体遺伝子全長を持つトランスクロモソミック（Trans-chromosomal: TC）マウス・ラット（TC-mAb マウス・ラット）の作製に成功した。この動物のヒト抗体産生能について詳細な解析を進めている。

これまで TC-mAb マウスでは、マウスの中でヒト抗体の V(D)J 組換が忠実に再現される、すなわちヒト V(D)J 組換を再現するにはヒト抗体遺伝子の染色体構造が必要・十分であることを明らかにした [1]。さらに、様々な抗原を用いたヒト抗体の作製を行う過程で、野生型よりも効率よくモノクローナル抗体が得られることを明らかにした。この特性を生かして、新型コロナウイルスに対する治療用抗体の作製を国立感染症研究所を中心として共同研究を行い、SARS と SARS-CoV-2 の両方に使用できる治療用モノクローナル抗体の開発に成功した [2]。

2022 年 10 月 28 日に行われた第 10 回動物実験科学シンポジウムでは、TC-mAb マウスの免疫応答、抗体レパトア解析、B 細胞分化などに関して野生型マウスと対比した解析結果を報告した。本稿では、ヒト抗体の産生がモデルマウス内でどの程度再現されているのかを紹介したい。また、モノクローナル抗体作製の実例を挙げて TC-mAb マウスの有用性と最新のモノクローナル抗体の作製技術についても紹介したい。続いて、TC-mAb マウスへ導入した人工染色体（*IGHK-NAC*）をラットへ導入した TC-mAb ラットについても解析を進めており、最新の情報を紹介したい。

1. 抗体医薬品の開発とヒト抗体産生動物

生物に由来する医薬品（バイオ医薬品）の中で、抗体医薬品は様々な疾患に対して優れた薬効を示すため、広く利用されている。抗体医薬品開発の歴史を紐解けば、1984 年にノーベル医学・生理学賞を受賞した Kohler と Milstein らによるハイブリドーマ細胞法によるモノクローナル抗体作製技術の開発に始まり、マウスなどから得られた抗体のヒトキメラ化（マウス定常領域をヒト定常領域に変更）、あるいはヒト化 [3]（可変領域もヒトに置換）など多くの革新的な技術開発を経て、実用的な抗体医薬品が作りだされるようになった。また、これら抗体配列の改変技術と並行して、ヒト抗体遺伝子ライブラリからディスプレイ技術を用いて有用な抗体を分離、進化させる方法（ファージディスプレイ技術等）も開発されている。その一方で、ヒト抗体そのものを体内

で作ridす遺伝子組み換え動物（マウスやラット）の開発も盛んに進められてきた。

遺伝子組み換え技術の発展に伴い、実験動物（マウスやラット）の内在性の遺伝子をヒトに置き換えることによって、ヒトタンパク質を発現する動物の作製が可能であるが、抗体遺伝子の場合にはそれほど単純ではない。抗体タンパク質、例えば IgG タンパク質であれば、重鎖と軽鎖という 2 種類のタンパク質が 2 分子ずつ結合した構造を取っているため（図 1）、両方をコードする遺伝子を導入する必要がある。さらに、抗体は 1 つの抗体遺伝子座から V(D)J 組換や体細胞突然変異などを経て、多種類の抗体（ $10^6 \sim 10^{13}$ 種類）が産生されると言われていることから、実験動物内でヒト抗体を作り出すためには、ヒト抗体遺伝子で起きる遺伝子の改変も再現する必要がある。

ヒト抗体遺伝子は、14番染色体上の重鎖（1.3 MB）と2番染色体上の軽鎖（ κ 鎖：1.4 MB）にコードされる巨大な遺伝子から作りだされる（図1）。例えば重鎖であれば、その可変領域にはV（variable）、D（Diversity）、J（Joining）とよばれる3つの遺伝子セグメントが存在し、Vセグメントでは41種類以上、Dセグメントでは27種類以上、Jセグメントでは6種類の抗体として利用される配列がコードされている（図2）。これらV、D、J遺伝子セグメントの中から1種類ずつ選ばれて組換えを起こして、1つの抗体配列が作りだされる（V(D)J組換え）。このように抗体遺伝子のV(D)J組換え機構を持たせたままモデル動物（例えばマウス）でヒト抗体を作り出すには、巨大な遺伝子を導入する必要がある、ヒト抗体を作る動物の作製は容易ではなかった。1990年代中盤から部分的

な可変領域の導入が報告され、V、D、J遺伝子セグメントを可能な限り多く導入することを目標とした開発が進められて、最終的に2000年に冨塚らによって重鎖と軽鎖（ κ 鎖）の全長が導入されたDouble Tc miceが報告された[4]。

2. Trans chromosomic (Tc) 動物

Double Tc miceを作製する際に、ヒト抗体遺伝子全長を導入する際に利用された技術はmicrocell mediated chromosome transfer（MMCT）である。この方法は、巨大な染色体断片をそのまま別の細胞へ移すことが可能な技術である。Tc動物の作製に関する技術や有用性に関しては、詳しく記載された論文を参照されたい[5]。

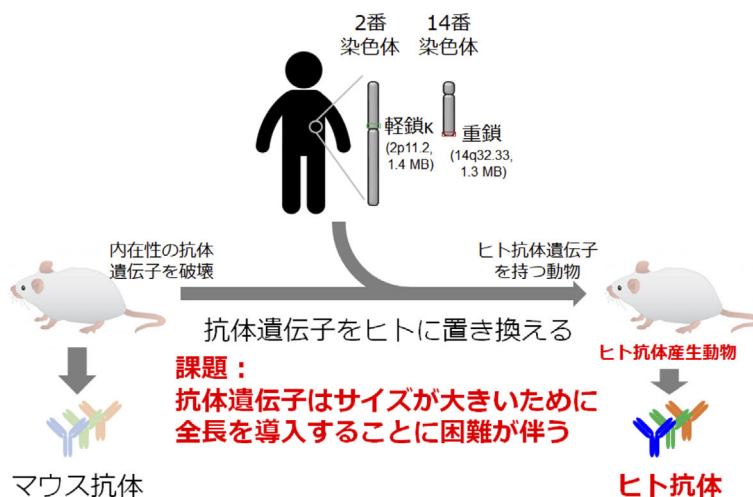


図1 ヒト抗体産生動物の作製

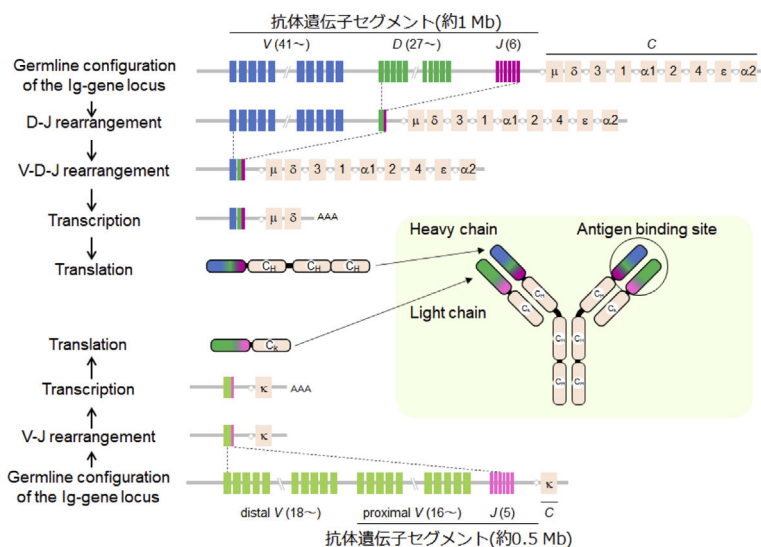


図2 ヒト抗体遺伝子のV(D)J組換えの概要

Double Tc mice は、重鎖（SC20）並びに軽鎖（W23）を有するヒト染色体断片を持つマウスであり、野生型マウスの染色体に加え、新たに導入したヒト染色体断片を2本余分に持つマウス（Trans chromosomic (Tc) マウス）である（図3）。このマウスからは、定常領域を含む完全なヒト抗体が作りだされ、アメリカ食品医薬品局（FDA）によって承認された抗体医薬品も複数存在する。しかしながら Double Tc mice は、抗体遺伝子を含む染色体断片を利用しているために、セントロメア配列がヒト染色体のものであり、マウス個体内、特に分裂が頻繁に起きるリンパ球系の細胞ではヒト染色体断片が脱落しやすいという課題が残されていた。そこで今回、我々はマウスのセントロメアを持つマウス人工染色体ベクターを用い [5], 1本の染色体にヒト抗体遺伝子の重鎖、軽鎖（ κ 鎖）の全長遺伝子を導入した新たな人工染色体（IGKH-NAC）を作製し、Tc マウスを作製して評価を行った（図3）。

3. TC-mAb mice の抗体レパトア解析

前述のように TC-mAb マウスは、ヒト抗体遺伝子全長（重鎖 1.3 MB, 軽鎖（ κ 鎖）1.4 MB）を搭載したマウス人工染色体を有する Tc マウスである。内在性のマウス抗体遺伝子が破壊されているため、可変領域と定常領域の両方がヒトの抗体、すなわち完全なヒト抗体を産生する完全ヒト抗体産生マウスである。まず、抗体遺伝子全長を持つことから、V(D)J 組換えがどのように起きているかについて次世代シーケンサを用いた解析（抗体のレパトア解析）を行った。その結果、導入したヒト抗体遺伝子セグメント全てが使用され、ヒト末梢血単球細胞（hPBMCs）で見られる使用頻度と類似していることが示された（図4）。さらに、V-D-J の組み合わせ頻度に関しても解析したところ、組み合わせの頻度に関しても類似していることが示された。この表現型は、既存の報告にあるヒト抗体遺伝子を持つ動物では見られない。

例えば、ヒト抗体可変領域全長とマウス抗体定常領域を発現する *genetically chimeric mice* [1] と呼ばれる動物では、3つの重鎖 V 遺伝子セグメントが作りだされる抗体の約 45% を占める場合も報告されており [6], 可変領域遺伝子を全て導入してもヒトのレパトアが再現できていないと推測される。すなわち本研究の解析から、ヒトの V-D-J 組換えをマウスで再現するには、可変領域以外の部分（定常領域および下流の制御領域）が必要であることが示された。この他にも、ヒト抗体の特徴である長い重鎖相補性決定（CDR3H）領域が TC-mAb マウスと hPBMCs で類似しているという結果を得ており、TC-mAb マウスはこれまでに報告されているヒト抗体産生マウスの中で最もヒトに近い抗体群を生体内で作りだすことが出来るモデル動物であることが示唆された。

4. TC-mAb mice からのヒト抗体作製

TC-mAb マウスのヒト抗体レパトアの多様性がヒトと類似していることが示されたことから、続いて実際にヒト抗体が効率よく作製できるかを解析した。ヒト固形がんでの発現上昇が広く知られる *epithelial cell adhesion molecule* (EpCAM) をモデルタンパク質として TC-mAb マウスを免疫したところ、抗原の投与に伴って、抗原特異的なヒト抗体が誘導されることが示された（図5）。そこで、汎用的なハイブリドーマ法でモノクローナル抗体を作製したところ、 1×10^8 cells の脾臓細胞から 349 種類という想定外に多くの抗体産生ハイブリドーマ細胞を得た（表1）。野生型マウス（Balb/c マウス）で、同様の実験を行った場合には 51 種類のハイブリドーマ細胞数であったことから、TC-mAb マウスでは B 細胞の分化に何らかの変化が生じて標的分子に対する抗体が多く作られる可能性が示唆された。

得られた抗ヒト EpCAM モノクローナル抗体を詳細に解析した結果、細胞表面に存在する EpCAM 分子、すなわち native な構造の EpCAM を認識する抗

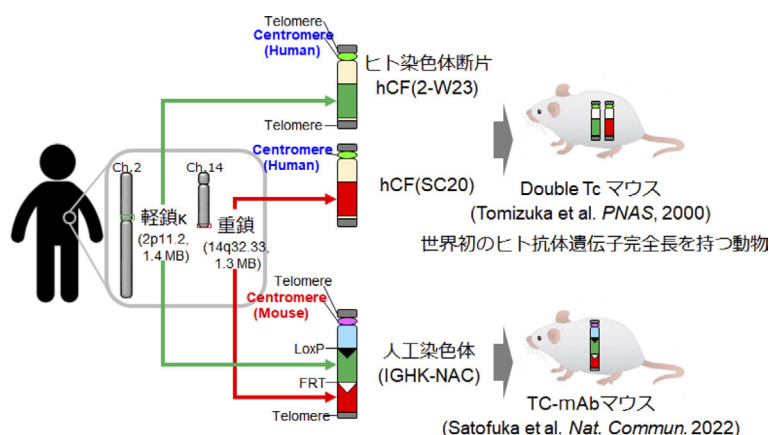
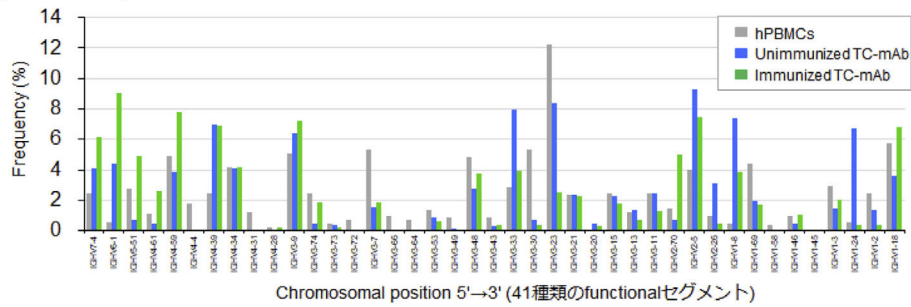


図3 抗体遺伝子を導入した Trans chromosomic (Tc) マウス

V (variable)セグメントの使用頻度



V(D)Jセグメントの組み合わせ

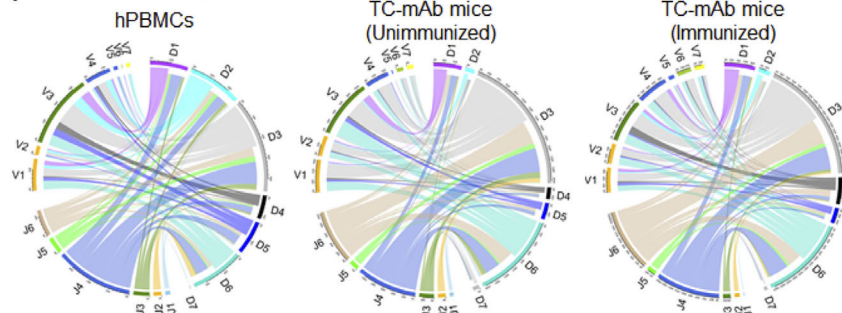


図4 TC-mAbマウスの抗体遺伝子レパトア解析(参考論文1より改変)

抗血清の免疫応答(ELISA) (抗ヒト抗体を用いて検出)

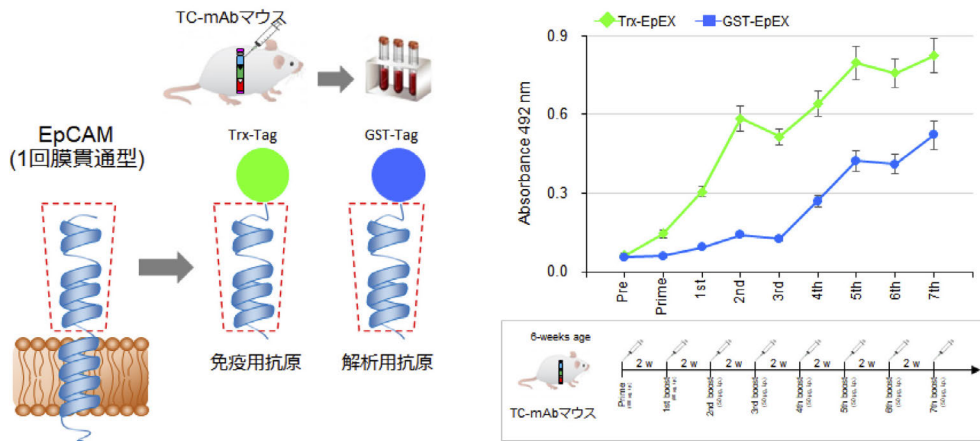


図5 TC-mAb マウスにおけるヒト EpCAM に対するヒト抗体の誘導(参考論文1より改変)

体が 72 種類得られ、EpCAM の様々な領域に反応する抗体が作りだされていることが明らかになった[7]。すなわち、TC-mAb マウスは抗原に対して様々なモノクローナル抗体を作りだすことが出来ることを示した。さらに我々は、EpCAM 抗体の中から抗体薬物複合体に利用できるクローンを高感度でスクリーニングできる新たな手法も開発して報告している [7]。

5. TC-mAb mice の B 細胞分化

抗ヒト EpCAM 抗体の例のように、TC-mAb マウスを抗原で免疫した場合には野生型マウスよりも効率よくモノクローナル抗体が得られる場合がある。この原因を解析するために、B 細胞分化の詳細な解析を行った。特に顕著な表現型として示されたのが、脾臓細胞における形質芽細胞/形質細胞 (PB/PC) (リンパ球分画中の $CD138^{+}TACI^{+}$ 分画) の割合の顕著な

増加が挙げられる（図6）。詳細な分子機構は不明であるものの、ヒト定常領域と抗体受容体（FcγR 群）との相互作用が原因である可能性が考えられる。いずれにしても、PB/PC は抗体産生に特化した成熟したB細胞であるため、この高いPB/PC 割合が効率よく抗原特異的なハイブリドーマ細胞が得られる原因になっていると考えている。

6. TC-mAb mice からの抗体医薬品開発

実際に TC-mAb マウスから抗体医薬品を迅速に開発できるかを実証するために、新型コロナウイルスの感染予防・治療できるような抗体開発を、国立感染症研究所と共同して行った。新型コロナウイルス（SARS-CoV-2）は重症急性呼吸器症候群（SARS）に

分類され、2002～2003年に中国南部広東省を起源とする SARS-CoV と同じウイルスグループに分類される。そこで我々は、SARS-CoV と SARS-CoV-2 等を抗原として組み合わせて免疫することで、SARS-CoV と SARS-CoV-2 との両方に反応するモノクローナル抗体の取得を試みた。このようなクローンは継続して生み出される SARS-CoV 変異型ウイルスに幅広く反応する可能性がある。抗体作製を実施した結果、複数の抗体を取得し、その中でも NT-193 と命名したクローンは SARS-CoV 及び SARS-CoV-2 の両方が細胞に感染するのを阻害する高い活性を持つことを明らかにした。また、感染予防・治療効果があることをハムスターを用いた感染実験により明らかにした [2]。この抗体は、恐らく日本国内で最初に動

表1 野生型マウスと TC-mAb マウスとのモノクローナル抗体作製効率の対比（参考論文1より改変）

抗原:EpEX	TC-mAb	Balb/c
免疫回数	初回+7追加+Final	初回+5追加+Final
リンパ球数/匹	2.4×10 ⁸ cells	1.9×10 ⁸ cells
細胞融合に用いた数	0.9×10 ⁸ cells	1.4×10 ⁸ cells
HAT ELISA 1st screening	428 well	220 well
2nd screening	349 clones	51 clones
Intact ICC陽性 (Nativeな抗原)	52 clones	8 clones
限界希釈によるcloning	50 clones (96%)	8 clones (100%)

B細胞の分化

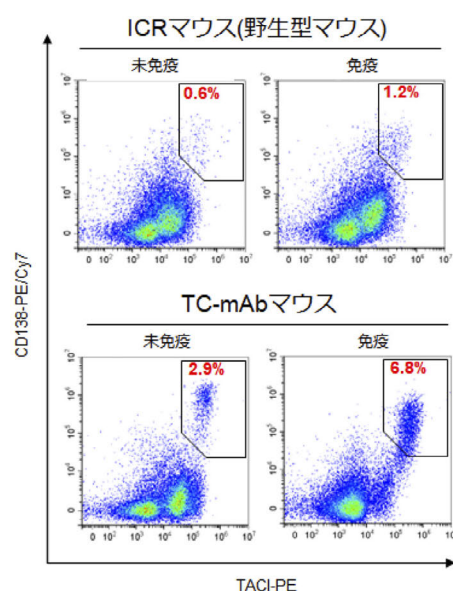
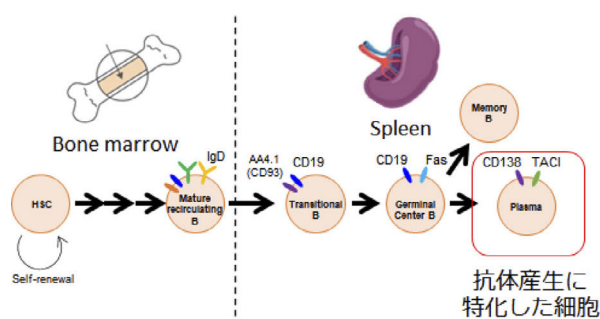


図6 野生型マウスと TC-mAb マウスにおける形質芽細胞/形質細胞の割合（参考論文1より改変）

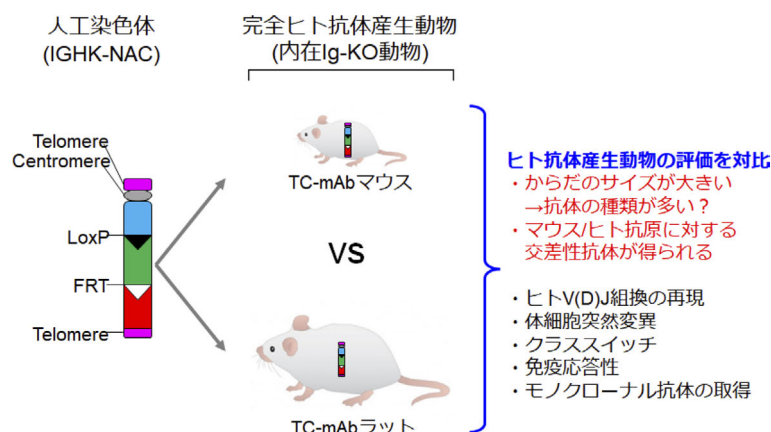


図7 TC-mAb マウスで使用した人工染色体 (IGHK-NAC) を用いた TC-mAb ラットの作製

物実験で感染予防・治療効果を報告したヒト抗体であり、迅速にヒト抗体医薬品が取得できる実例を示すことができたと考えている。

7. TC-mAb rats の作製と解析

TC-mAb マウスを作製する際に用いたマウス由来の人工染色体 (NAC) は、我々の研究室のこれまでの研究から、マウスだけでなくラットでも安定して保持されることが示されている [8]。そこで、ヒト抗体遺伝子を持つ IGHK-NAC を内在性遺伝子を破壊したラットに導入して TC-mAb ラットの作製を進めている (図7) (論文投稿中)。ラットの優位性を考えた場合、ラットはマウスに比べて体のサイズ (体重) が10倍以上であり、抗体の成熟器官の一つである脾臓組織も3倍以上であることから、作りだされる抗体の種類が増えることが期待される。また、マウスを免疫宿主動物とした場合には内在性のマウス抗原が存在するために免疫寛容が成立し、マウスとヒトに交差するような抗原が得られにくい。ラットを免疫宿主動物とした場合にはマウス由来の抗原に対しても抗体が誘導され、マウスとヒトに交差する抗体が得られることが期待される。

樹立された TC-mAb ラットの脾臓細胞を用いて次世代シーケンサによる抗体レパトアの解析を行ったところ、TC-mAb マウスと同様に導入したヒト抗体遺伝子セグメント全てが幅広く使用され、ヒトと類似した使用頻度を示した。また、V-D-J の組み合わせ頻度もヒトと類似していた。これらのことから、ヒト V-D-J 組換をラットやマウスで再現するには、抗体遺伝子全長を導入することが必要で十分であることが示唆される。一方、TC-mAb マウスとラットで異なる表現系も観察できている。例えば、成熟した抗体が生み出される過程で、体細胞突然変異による親和性成熟と、IgM から IgG1 等へのサブクラスのクラススイッチが起きるが、両方の割合ともに TC-mAb ラットの方が TC-mAb マウスよりも高頻度に生

表2 モノクローナル抗体を作製する上での TC-mAb マウスとラットの対比

	TC-mAbマウス	TC-mAbラット
抗体のレパートリ	- ヒトV(D)J組換を再現 - マウスより長い CDR3領域を持つ	- ヒトV(D)J組換を再現 - 体細胞突然変異率が高い
モノクローナル抗体の取得	- 抗体が効率よく得られる - ハイブリドーマ法、Single B cell技術などが利用できる	- ハイブリドーマ法で epitope の異なる抗体が多数得られる - B細胞数が多い (脾臓細胞数約3倍)
利点と欠点	- 形質細胞の割合が多い - 短期間の免疫方法 (約40日) を含め、約60日でヒト抗体が得られる	- ヒト・マウス交差性抗体の取得実績あり - 飼育・繁殖がマウスよりも手間がかかる

ることが検出されている。実際に、ovalbumin (OVA) をモデル抗原として用いてハイブリドーマ法によりモノクローナル抗体を作製したところ、ELISA で高い力価を示すクローンが多数得られ、様々なエピトープを認識する抗体が含まれていることが示唆された。TC-mAb マウスとラットの特徴を対比した結果を表2に示した。

8. まとめ

我々は、TC-mAb マウスとラットという2種類の完全ヒト抗体産生動物を用い、げっ歯類内でヒトの抗体産生がどの程度再現されるのかを詳細に解析している。ヒト抗体全長遺伝子を導入することによって初めて見出された、V-D-J 遺伝子セグメントの幅広い使用やヒト V(D)J 組換頻度の再現のように、TC-mAb マウスとラットで共通してヒトの表現型が再現された結果から、マウス人工染色体を用いた完全長の遺伝子を導入する意義と有用性が実証されたと考えられる。また、TC-mAb ラットと TC-mAb マウス

それぞれから誘導される抗体遺伝子配列を詳細に解析すれば、同じヒト抗体遺伝子に対する宿主タンパク質による影響の違いを見出すことが可能になり、複雑な機構により制御される抗体産生システムの理解につながると期待される。また、得られた知見を元に改変した TC-mAb マウス・ラットは次世代の完全ヒト抗体産生動物として抗体医薬品開発をさらに加速させる動物としての利用が期待される。

9. 謝辞

動物実験シンポジウムでの発表ならびに本稿の執筆にあたり、鳥取大学 押村光雄名誉教授（現：Trans Chromosomics 社、代表取締役）をはじめ、鳥取大学・染色体工学研究センター 久郷裕之教授／センター長、東京薬科大学・生命科学部 富塚一磨教授、九州大学・生体防御医学研究所 馬場義裕教授、ご協力頂きました多くのメンバー全員に心より感謝申し上げます。

参考文献

1. Satofuka, H., Abe, S., Moriwaki, T., Okada, A., Kazuki, K., Tanaka, H., Yamazaki, K.K., Hichiwa, G., Morimoto, K., Takayama, H., et al. (2022). Efficient human-like antibody repertoire and hybridoma production in trans-chromosomal mice carrying megabase-sized human immunoglobulin loci. *Nat. Commun.* 13, 1–15.
2. Onodera, T., Kita, S., Adachi, Y., Moriyama, S., Sato, A., Nomura, T., Sakakibara, S., Inoue, T., Tadokoro, T., Anraku, Y., et al. (2021). A SARS-CoV-2 antibody broadly neutralizes SARS-related coronaviruses and variants by coordinated recognition of a virus-vulnerable site. *Immunity* 54, 2385–2398.e10.
3. Almagro, J.C., Daniels-Wells, T.R., Perez-Tapia, S.M., and Penichet, M.L. (2018). Progress and challenges in the design and clinical development of antibodies for cancer therapy. *Front. Immunol.* 8.
4. Tomizuka, K., Shinohara, T., Yoshida, H., Uejima, H., Ohguma, A., Tanaka, S., Sato, K., Oshimura, M., and Ishida, I. (2000). Double trans-chromosomal mice: Maintenance of two individual human chromosome fragments containing Ig heavy and κ loci and expression of fully human antibodies. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 97, 722–727.
5. Moriwaki, T., Abe, S., Oshimura, M., and Kazuki, Y. (2020). Transchromosomal technology for genomically humanized animals. *Exp. Cell Res.* 390, 111914.
6. Lee, E.C., Liang, Q., Ali, H., Bayliss, L., Beasley, A., Bloomfield-Gerdes, T., Bonoli, L., Brown, R., Campbell, J., Carpenter, A., et al. (2014). Complete humanization of the mouse immunoglobulin loci enables efficient therapeutic antibody discovery. *Nat. Biotechnol.* 32, 356–363.
7. Satofuka, H., Wang, Y., Yamazaki, K., Hamamichi, S., Fukuhara, T., Rafique, A., Osako, N., Kanazawa, I., Endo, T., Miyake, N., et al. (2023). Characterization of human anti - EpCAM antibodies for developing an antibody – drug conjugate. *Sci. Rep.*, 1–11.
8. Kazuki, Y., Kobayashi, K., Hirabayashi, M., Abe, S., Kajitani, N., Kazuki, K., Takehara, S., Takiguchi, M., Satoh, D., Kuze, J., et al. (2019). Humanized UGT2 and CYP3A transchromosomal rats for improved prediction of human drug metabolism. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 116, 3072–3081.

実験動物感染症の現状

免疫不全マウスにおける *Corynebacterium mastitidis* 感染症

櫻木 求

大鵬薬品工業株式会社

要 約

実験動物に感染症を疑う所見が認められると微生物検査を実施されるが、施設ごとに定めた specific pathogen free (SPF) 検査項目に含まれない微生物が検出されることがある。当施設において担癌ヌードマウスが死亡し、病理検査により肺組織での炎症像を認めたことから、微生物感染症が疑われた。この結果を受け実施された同居動物の微生物検査により、血液から *Corynebacterium mastitidis* が検出された。

C. mastitidis は、当施設におけるマウスの SPF 検査項目に含まれない微生物であるが、他動物への感染拡大および実験への影響を考慮し、感染源、感染の流行状況および感染経路について調査を実施した。その結果、*C. mastitidis* がヒトの眼瞼等の常在菌であるほか、自施設への入荷動物に *C. mastitidis* の皮膚感染が成立していたことが判明した。また、腫瘍細胞の皮下移植を実施したマウスにおいて血液から *C. mastitidis* が検出されたことから、皮下注射などの実験操作により *C. mastitidis* の菌血症が誘導されたことが示唆された。さらに、*C. mastitidis* の皮膚感染が確認された担癌ヌードマウスにおいて過角化性皮膚炎（粉ふき症）の発症が確認された。

以上の結果から、*C. mastitidis* は免疫不全マウスにおいて容易に感染が成立する微生物であり、担癌モデルなどの疾患モデルマウスにおいては、肺炎や粉ふき症などの日和見感染症が発症する危険性が示された。当施設では、免疫不全動物棟のクリーンアップなどの感染対策を実施することで動物棟からの *C. mastitidis* 除去を達成した。さらに、再発予防対策として、当施設における免疫不全マウスに対する SPF 検査項目に、*C. mastitidis* および粉ふき症への関与が報告されている *Corynebacterium bovis* を追加することとした。

(実験動物ニュース 2023 Vol. 72 No. 4, p. 191-197.)

1. はじめに

動物実験では、信頼性を確保するため、specific pathogen free (SPF) 動物と呼ばれる特定の微生物および寄生虫を保有しない動物を使用することが多い。また、SPF 動物を扱う実験施設では、飼育動物の微生物学的な品質を管理し、実験成績への生物学的因子の影響がないことを証明するため、予め施設ごとに設定した SPF 検査項目に対し定期的に微生物モニタリング検査が実施される。微生物モニタリングにおける SPF 検査項目は、動物種および実験施設の用途・目的により異なり [1, 2]、マウスにおける SPF 検査項目としては、公益財団法人実験動物中央研究所 ICLAS モニタリングセンター（以下、ICLAS モニタリングセンター）や日本実験動物協会において設定している 12～19 項目のコアセット検査が一般的である [3, 4]。当施設におけるマウスの SPF 検査項目としては、ICLAS モニタリングセンターの微生物検査コアセットを基本検査項目に設定し、免疫不全動物棟で飼育している免疫不全マウスおよび図マウ

ス (BALB/c-nu/+) は免疫不全動物コアセットを、正常免疫動物棟で飼育しているマウスは通常動物コアセットを実施している。両動物棟ともに全検査項目の陰性を維持していた。

一般的に、実験動物に感染症が疑われた場合、感染の拡大防止としての動物の隔離措置や入退室制限、および同居動物に対する感染確認検査などの第一次対応が実施される。感染確認検査の結果などから微生物感染の発生が判断された場合、感染症の流行状況の把握などの第二次対応と共に、感染微生物除去を目的とした感染症対策が実施される [5]。

第一次対応において各施設で設定した SPF 検査項目に含まれていない微生物が検出された場合、それに続く対応は施設により異なり、第二次対応や感染対策は不必要と判断する施設も多いと考えられる。一方で、遺伝子改変動物や疾患モデル動物などの易感染性動物を飼育している施設では、SPF 検査項目に含まれない微生物による感染に対しても、第二次対応および感染対策が必要になると考える。

当施設において、マウス SPF 検査項目に含まれない *Corynebacterium mastitidis* の感染が免疫不全マウスに確認された。*C. mastitidis* はこのマウスの皮膚および血液から検出され、更に飼育している複数の免疫不全マウスへの感染伝播が確認されたことから、第二次対応と感染対策を実施した。本稿では、当施設において経験した *C. mastitidis* 感染の状況と感染対策について紹介する。

2. マウスにおける *C. mastitidis* 感染症：

発見と第一次対応

当施設の免疫不全動物棟において、腫瘍細胞を皮下移植したヌードマウスの死亡が確認された。本マウスは、腫瘍細胞の皮下移植は実施したものの被験物質投与などの実験処置は実施しておらず、死亡要因が不明であったため剖検を実施した。剖検の結果、肺の暗赤色化、気管内の血液様浸出液、さらに胸腔内に血液様胸水の貯留を認めたため、感染症を疑い、肺組織の病理検査を実施した。その結果、肺動脈周囲を中心とした浮腫および好中球浸潤、肺胞内の出血、フィブリン析出、ならびに炎症細胞（好中球、マクロファージ）の浸潤を認めた。以上の結果から、感染症の疑いは濃厚と判断し、第一次対応として該当飼育室の隔離・入退室規制を実施し、死亡マウスと同一ケージ内で飼育されていた同居同系統マウス

3 匹および同飼育室の微生物モニタリング検査用囲マウス 3 匹の微生物検査を ICLAS モニタリングセンターに依頼した。

同居マウスの剖検所見からは呼吸器系臓器を含めて著変を認めなかったものの、肺組織の病理検査では、肺静脈血液中に顆粒球細胞の微増と肺胞隔壁に好中球の軽微な浸潤を認めた（図 1）。さらに、肺剖面スタンプ培養検査（3/3 例）および血液培養検査（2/3 例）において *C. mastitidis* が検出され、*C. mastitidis* による軽度な菌血症の可能性が示唆された。一方、囲マウスにおいては、眼瞼・皮膚スワブ培養検査は全例で *C. mastitidis* を検出したものの、血液培養検査は陰性であった。微生物検査結果において、実験処置を施した同居マウスのみ血液から *C. mastitidis* を検出したことから、実験処置が菌血症の感染要因である可能性が考えられた。

ICLAS モニタリングセンターからの情報では、マウスへの *C. mastitidis* の実験感染で病変が認められなかったことから [6]、*C. mastitidis* の病原性は低い可能性が示されていた。しかしながら、最初に感染が疑われた動物が死亡していること、また同居動物において菌血症が確認されたことなどから、免疫不全マウスを用いた疾患モデルに対する危険性を考慮し、*C. mastitidis* の感染力、病原性および流行状況などの確認が必要と判断した。

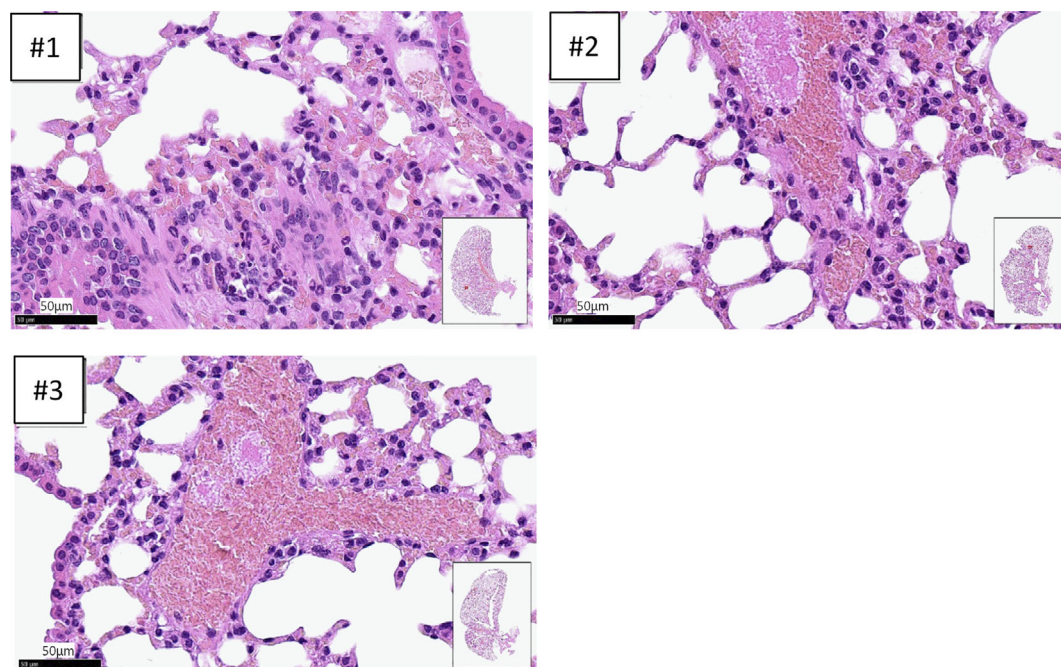


図 1 同居マウスにおける肺組織所見（HE 染色標本）

死亡個体と同一ケージにて飼育していた担癌ヌードマウス 3 匹の肺（左葉）から、病理標本を作製し、Hematoxylin-Eosin（HE）染色、Grocott & Gimsa 染色、Gram 染色を実施した。#1-#3 の肺において、肺静脈内血液中に顆粒球系細胞の微増ならびに肺胞隔壁（間質）に好中球の軽微な浸潤を認めた。光顕下において菌体は認められなかった（ICLAS モニタリングセンター検査報告書をもとに作成）。

3. マウスにおける *C. mastitidis* 感染症：第二次対応

免疫不全マウスにおいて *C. mastitidis* 感染による病態発生の危険性が疑われたことから、論文調査により感染力や病原性を確認し、感染源調査のために各生産業者における *C. mastitidis* 感染状況を確認した。さらに、追加検査を実施することによりマウス間の感染経路および流行状況を確認した。

1) 感染力・病原性の確認（論文調査）

C. mastitidis は、不顕性乳房炎を発症したヒツジの乳から分離された細菌で [7]、ヒトの眼表面の正常微生物叢の一種であり [8]、マウスの眼表面でも同定されている [9]。また、*C. mastitidis* はマウスの口腔内にも存在し、咬傷に伴う化膿性炎症および包皮腺膿瘍への関与が報告されている [10]。さらに、アトピー性皮膚炎モデルマウスにおいては、アトピー性皮膚炎の発症初期には *C. mastitidis* が検出されるが、病態進展と共にそれが *Staphylococcus aureus* および *C. bovis* に置換されることも報告されている [11]。このように *C. mastitidis* は、ヒトおよびマウスの眼瞼や皮膚などに常在する菌で、皮膚疾患などに関与することが確認できたが、菌血症やどの臓器に感染するかなどの情報は論文調査から見出すことはできなかった。

2) 感染源の確認

C. mastitidis 感染症発生当時、当施設免疫不全動物棟に入荷履歴のある生産業者に対し、入荷した全系統（3 生産業者、8 系統）における *C. mastitidis* 感染の確認の協力を依頼した。全ての *C. mastitidis* 検査は、ICLAS モニタリングセンターにて実施した。免疫不全マウス 7 系統の全てが、眼瞼・皮膚スワブ培養検査及び血液培養検査共に陰性を示した。一方、ヌードラットでは、血液培養検査は陰性であったが、眼瞼・皮膚スワブ培養検査において *C. mastitidis* が検出された。動物からの感染源としてヌードラットが示唆さ

れたが、当施設においてヌードラットは隔離飼育を実施しており、ヌードラットから免疫不全マウスに感染が伝搬する可能性は低い。また、*C. mastitidis* はヒトの眼瞼周囲の常在菌であることから [8]、研究員が無意識に自身の眼周囲を接触し、その後マウスに触れるなどの不注意行動が感染要因である可能性が考えられた。

3) 感染経路の確認

菌血症はマウスの健康状態や実験結果への影響することが推測されるため、菌血症に対する感染経路の特定は急務と判断した。第一次対応での検査結果から、*C. mastitidis* 菌血症の主要因として実験処置が推定されたことから、未処置マウスと実験処置マウス（腫瘍細胞皮下移植マウス）で感染状況を比較した。その結果、実験処置マウス全例が皮膚スワブ培養検査および血液培養検査において *C. mastitidis* 陽性を認めた。一方、未処置マウスでは、皮膚スワブ培養検査は全例が陽性であったが、血液培養検査では 4 マウス 3/3 例、ヌードマウス 2/3 例で *C. mastitidis* 陰性であった（表 1）。1 例の未処置ヌードマウスに血液から *C. mastitidis* を検出したが、当時散見された雄性ヌードマウスにおける闘争による咬傷が感染要因である可能性が考えられた。以上の結果から、免疫不全マウスにおける *C. mastitidis* 菌血症の要因として、皮膚感染のある動物において、皮下注射などの実験処置が行われたことが示唆された。

当施設での飼育が皮膚感染の要因であるかどうかを確認するため、日本クレア株式会社（以下、日本クレア）に協力を仰ぎ、同一ロットのヌードマウス（BALB/cAJcl-nu/nu）及び SCID マウス（C.B-17/lcr-scld/scldJcl）を 2 施設（日本クレアの施設及び当施設）に分けて飼育し、*C. mastitidis* 検査の結果を比較した。日本クレアにて飼育したマウスは、眼瞼・皮膚スワブ培養検査および血液培養検査共に全例陰性であった。一方、当施設で飼育したマウスは、血液培養検査

表 1 菌血症における実験処置の影響

処置	系統	<i>C. mastitidis</i>	
		眼瞼・皮膚スワブ培養	血液培養
未処置マウス	4 マウス	陽性 (3/3)	陰性 (3/3)
	ヌードマウス	陽性 (3/3)	陰性 (2/3)
実験処置マウス	ヌードマウス（試験 1）	陽性 (3/3)	陽性 (3/3)
	ヌードマウス（試験 2）	陽性 (3/3)	陽性 (3/3)

未処置マウスには、微生物モニタリングのため使用済み床敷き添加法により 8 週間飼育した 4 マウス（BALB/cAJcl-nu/+, 雄性：3 匹）、および 6 週間飼育した無処置の雄性ヌードマウス（BALB/cAJcl-nu/nu：3 匹）を用いた。実験処置マウスは、6 週齢の雄性ヌードマウスにヒト腫瘍細胞を皮下移植し、3 週間（試験 1：3 匹）または 6 週間（試験 2：3 匹）飼育した担癌モデルマウスを検査に用いた。腫瘍細胞皮下移植時の皮膚消毒には、消毒用エタノールを使用した。*C. mastitidis* の皮膚感染は眼瞼・皮膚スワブ培養検査にて、血液内感染は血液培養検査にて評価した。

査では陰性であったが、眼瞼・皮膚スワブ培養検査では全例が陽性を示した（表2）。これらの結果から、*C. mastitidis* 皮膚感染は当施設での飼育により発生することが明らかになり、また、実験処置を行わない状況においては菌血症は発生しないことが再確認された。

4) 流行状況の確認

動物棟内における *C. mastitidis* 感染の流行状況を確認するため、感染動物確認時より使用しているマウス飼育室4室で飼育した囲マウスを検査した。この結果、4室全ての囲マウスにおいて眼瞼・皮膚スワブ培養検査で *C. mastitidis* 陽性が確認され、免疫不全動物棟内全体に *C. mastitidis* 感染が蔓延していることが明らかとなった。また、正常免疫動物棟においては、飼育室の囲マウスの眼瞼・皮膚スワブ培養検査では *C. mastitidis* 陽性または陰性を示す飼育室が混在しており（陽性：4飼育室、陰性：5飼育室）、腫瘍細胞皮下移植マウスにおける血液内感染は確認されなかった。この状況から、正常免疫マウスにおいては、*C. mastitidis* 感染による実験結果への影響は小さいと判断した。

4. マウスにおける *C. mastitidis* 感染症： 過角化性皮膚炎（粉ふき症）

当施設での第二次対応の実施中、ヌードマウスを用いた担癌モデルで粉ふき症の発症が確認された。同一試験内の複数個体においても軽微な粉ふき症症状が確認され、また、闘争による咬傷と健康状態の悪化を示した個体においては重度の粉ふき症症状が確認された（図2A）。ヌードマウスにおける粉ふき症は、原因菌として *C. bovis* が知られており、施設内に蔓延すると除染が難しい病原体であることが報告されている [12-14]。弊社においても過去に粉ふき症が蔓延し根絶が困難であった経験があり、現施

設においても、粉ふき症を発症したマウスは速やかに除外するなど徹底した対策を実施していた。このような状況においてヌードマウスに粉ふき症の発症が多数確認されたことから、*C. mastitidis* 感染のほかに *C. bovis* 感染も疑われたため、発症マウスにおける両菌の検査を実施した。

C. bovis は何れの動物からも検出されず、*C. mastitidis* は全ての個体から検出された（表3）。また、重症個体の病理検査からは皮膚病変にグラム陽性桿菌が確認され（図2B）、眼瞼・皮膚スワブ培養検査の結果と合わせると、病変部に認められた細菌は *C. mastitidis* であると考えられた。以上の結果より、*C. mastitidis* は粉ふき症の原因菌の一つとなる可能性が示唆された。

5. マウスにおける *C. mastitidis* 感染症：感染対策

菌血症に対する対策としては、皮下注射などの実験処置時における皮膚消毒の見直しが必要と考え、*Corynebacterium* 属菌に除菌効果の高いヨード系消毒液による皮膚消毒を検証した。細胞移植前に63%エタノール含有ポビドンヨード（イソジンフィールド®）で皮膚消毒し、3種類の腫瘍細胞皮下移植マウス試験において血液からの *C. mastitidis* 検出の有無を確認した。この結果、何れの試験動物においても *C. mastitidis* の皮膚感染は確認されたが、血液から *C. mastitidis* は検出されなかった（表4）。以上の結果から、ヨード系消毒液を用いた皮膚消毒は、皮下移植等の実験処置による *C. mastitidis* 菌血症の防御に有効であることが示唆された。

皮膚感染に対する対策としては、クリーンアップ後の飼育室を *C. mastitidis* 陰性飼育室（2室）として設け、飼育室への入室制限や専用実験処置室の設置を実施した。これらの処置により、飼育開始2か月後の囲マウスを対象とした検査では、両室とも *C. mastitidis* 陰性であり、感染防止の達成が確認できた。

表2 飼育施設における *C. mastitidis* 感染発生の確認

検査	系統	匹数	日本クレア		当施設	
			眼瞼・皮膚スワブ培養	血液培養	眼瞼・皮膚スワブ培養	血液培養
第1回	ヌードマウス	9	陰性 (9/9)	陰性 (9/9)	陽性 (9/9)	陰性 (9/9)
	SDCI マウス	9	陰性 (9/9)	陰性 (9/9)	陽性 (9/9)	陰性 (9/9)
第2回	ヌードマウス	3	陰性 (3/3)	陰性 (3/3)	陽性 (3/3)	陰性 (3/3)
	SDCI マウス	3	陰性 (3/3)	陰性 (3/3)	陽性 (3/3)	陰性 (3/3)
第3回	ヌードマウス	3	陰性 (3/3)	陰性 (3/3)	陽性 (3/3)	陰性 (3/3)
	SDCI マウス	3	陰性 (3/3)	陰性 (3/3)	陽性 (3/3)	陰性 (3/3)

日本クレアにおいて繁殖飼育した雄性的のヌードマウス（BALB/cAJcl-nu/nu）および SCID マウス（C.B-17/lcr-scld/scldJcl）の2系統のマウスから、それぞれ出生時期の異なる3ロットを選択して確認試験に使用した。各ロットのマウスは、5週齢時において2群に分け、1群を当施設に入荷後、*C. mastitidis* 陽性マウスが飼育されている飼育室にて飼育した。7週間の飼育後、両施設から動物を ICLAS モニタリングセンターに搬送して *C. mastitidis* 検査を実施した。*C. mastitidis* の皮膚感染は眼瞼・皮膚スワブ培養検査にて、菌血症は血液培養検査にて評価した。

しかし、4 か月後の検査では、1 飼育室の囲マウスにおいて *C. mastitidis* 皮膚感染が確認され、同飼育室にて飼育している担瘤マウスにおいても *C. mastitidis* の皮膚感染が確認された [data not shown]。入室制限を

実施している飼育室への感染伝搬の要因は不明であるが、共有実験機器の消毒が不十分であった可能性や、研究者の不注意により病原体が持ち込まれた可能性がある。以上のように、動物棟内に *C. mastitidis*

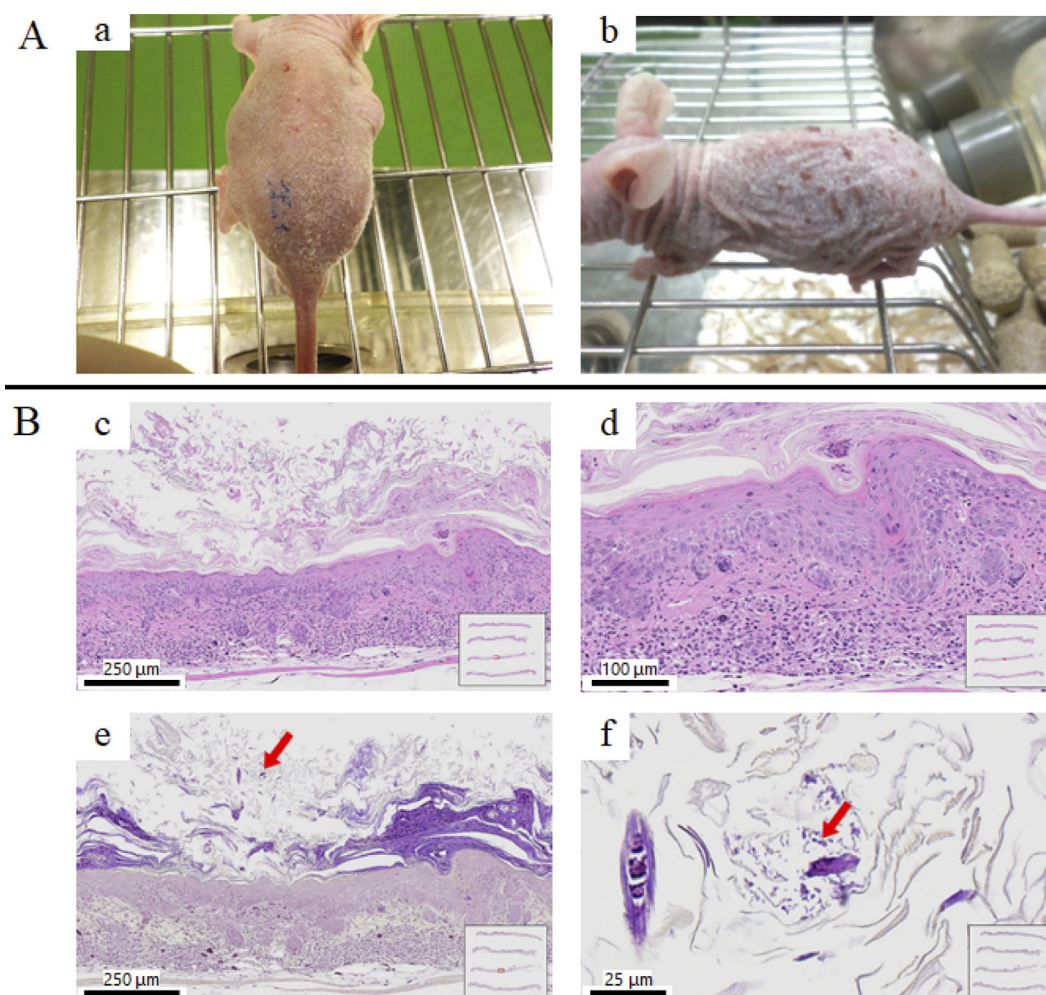


図2 ノードマウスにおける粉ふき症

A: 粉ふき症発症マウスの外景所見: 6 週齢, 雄性ノードマウス (BALB/cAJcl-nu/nu) に腫瘍細胞を皮下移植し, 5 週間後に複数の個体に軽微な粉ふき症症状を認めた [a]。また, 別試験における腫瘍細胞皮下移植ノードマウスにおいては, 闘争による咬傷と重度の粉ふき症症状が確認された [b]。B: 重症粉ふき症を呈したマウスにおける皮膚組織所見: 表皮肥厚に伴い, 好中球を混じた不全角化が認められ, 真皮の血管周囲性に好中球, マクロファージ浸潤を認めた [c,d]。増殖を認めた角質層表層において, Gram 染色陽性を示す短桿菌の菌塊が認められた (赤色矢印) [e,f] (ICLAS モニタリングセンター検査報告書をもとに作成)。

表3 粉ふき症発症マウスにおける微生物検査

症例	系統	例数	<i>C. bovis</i>		<i>C. mastitidis</i>	
			皮膚スワブ培養	皮膚 PCR	皮膚スワブ培養	血液培養
軽症例	ノードマウス	7	陰性 (7/7)	陰性 (7/7)	陽性 (7/7)	陰性 (7/7)
重症例	ノードマウス	1	陰性	陰性	陽性	陰性

粉ふき症を発症した腫瘍細胞移植ノードマウス (BALB/cAJcl-nu/nu, 軽症: 7 例, 重症: 1 例) における *C. bovis* 及び *C. mastitidis* 検査を実施した。 *C. bovis* 検査は背部皮膚スワブの培養検査及び皮膚の PCR 検査を, *C. mastitidis* 検査は背部皮膚スワブの培養検査及び血液培養検査を実施した。

表4 ヨード系消毒液を用いた皮膚消毒による *C. mastitidis* 菌血症の防御

試験	系統	匹数	<i>C. mastitidis</i>	
			眼瞼・皮膚スワブ培養	血液培養
試験1	ヌードマウス	5	陽性 (5/5)	陰性 (5/5)
試験2	ヌードマウス	5	陽性 (5/5)	陰性 (5/5)
試験3	ヌードマウス	5	陽性 (5/5)	陰性 (5/5)

6週齢・雄性ヌードマウス (BALB/cAJcl-nu/nu) に3種類のヒト腫瘍細胞を皮下移植し、3～5週間後に *C. mastitidis* 検査を実施した。皮下移植時の皮膚消毒には、63%エタノール含有ポビドンヨード (イソジンフィールド®) を用い、消毒液の乾燥確認後に右側胸部の皮下に腫瘍細胞を移植した。*C. mastitidis* の皮膚感染は眼瞼・皮膚スワブ培養検査にて、菌血症は血液培養検査にて評価した。

感染エリアを残した状況での感染陰性エリアの運用は、入室制限等の対策を実施していても感染が拡散する危険性が示唆された。

上記の状況から、免疫不全動物棟全体のクリーンアップを実施すると共に、研究員に対して、自分自身の眼瞼周囲および皮膚への接触を回避することと、ヨード系消毒液を用いた消毒についての注意喚起をおこなった。また、感染源の可能性が示唆された免疫不全ラットの飼育室は、他動物棟へ変更した。さらに、再発防止対策として、免疫不全マウスにおける入荷動物への微生物統御項目と飼育動物の微生物モニタリング項目に *C. mastitidis* および *C. bovis* を追加した。これらの対策により、免疫不全動物棟における *C. mastitidis* の排除が達成でき、現在に至るまでの4年間、再発がない状態が維持されている。

6. おわりに

Corynebacterium 属菌の中でマウスの SPF 検査項目に含まれるのは、感染により肺、肝臓および腎臓に膿瘍が生じる *C. kutscheri* (ネズミコリネ菌) のみである [15]。しかし、ヌードマウスにおいては、粉ふき症の病原菌として *C. bovis* が報告されている [12-14]。*C. mastitidis* は包皮腺炎 [10]、眼瞼炎 [6] およびアトピー性皮膚炎モデル [11] などで検出されているが、自然感染における感染力や病原性は明らかではない。また、マウスに対する感染実験では病変を再現することができず、*C. mastitidis* は第一義的な病原体ではなく、2次的な感染を呈した細菌とも考えられている [6]。

当施設で発生した *C. mastitidis* 感染症は、飼育しているほぼ全ての免疫不全マウスに皮膚感染が伝搬し、その皮膚感染マウスにおいては、皮下注射などの実験操作により菌血症が発生したことが強く示唆された。また、マウス間の闘争による咬傷によっても菌血症が誘導される可能性が考えられた。本事例の発端となった死亡動物が、*C. mastitidis* に感染していたかは、微生物検査ができなかったために不明である。

また、感染動物の長期飼育による病態確認や感染実験も実施していないため、*C. mastitidis* 感染が免疫不全マウスを用いた疾患モデルにどのような病態を誘導するかは明らかではない。しかし、*C. mastitidis* の菌血症を認めたマウスでは肺組織における炎症などが確認されており、*C. mastitidis* 感染が実験結果に影響を及ぼす可能性は大きいと考えられた。

粉ふき症は、ヌードマウスにおいて過角化性皮膚炎 (鱗屑性皮膚炎) 症状を呈する、*C. bovis* が原因菌の日和見感染症であることが報告されている [12-14, 16]。一方で、*C. bovis* 感染動物における病態がさまざまであることから *C. bovis* 変種の存在が報告され [17]、また、*Staphylococcus xylosus* も鱗屑性皮膚炎の罹患動物の皮膚から分離され、原因菌の一つとして報告されている [18]。我々の過去の経験でも、粉ふき症マウスの皮膚病変の PCR 検査では *C. bovis* が陰性である症例を多数確認しており、粉ふき症の原因菌として *C. bovis* とは異なる微生物の存在が示唆されていた。当施設における粉ふき症マウスの微生物検査において、皮膚病変から *C. bovis* は検出されずに *C. mastitidis* が検出されたことは、*C. mastitidis* が粉ふき症の原因菌の一つである可能性を示している。粉ふき症は施設内に蔓延すると根絶が困難な感染症であり、重症例では体重減少や死亡個体の発生も認められる [12, 17]。弊社が過去に経験した粉ふき症発生においては、重症動物の消瘦、移植腫瘍細胞の増殖速度の遅延及び評価化合物の効力変化など、実験への大きな影響が確認されたことから、*C. mastitidis* は免疫不全マウスにおいては除外すべき微生物と判断した。

今回の *C. mastitidis* 感染の経験から、動物施設における SPF 検査項目に含まれない微生物感染症が確認された場合、その微生物の感染力および病原性が低いと報告されていても、飼育動物の系統および動物モデルの病態などを加味して総合的に感染対策の必要性を判断することが重要と考えられた。特に、免疫不全マウスを用いた疾患モデルは微生物への感受

性が高いことが予測されるため、その微生物による感染は、健康状態が悪化した際に日和見感染として発症する危険性が高いと考える。

7. 謝辞

当施設入荷動物における *C. mastitidis* 感染状況の確認のために検査の承認および検査実施へのご協力を頂きました、日本クレア株式会社、ジャクソン・ラボラトリー・ジャパン株式会社（旧日本チャールス・リバー株式会社）、日本エスエルシー株式会社およびインビオサイエンス株式会社の皆様方、また、皮膚感染発生の施設間差の確認にご協力をいただいた、日本クレア株式会社の影山様および佐渡様に深謝申し上げます。

参考文献

- 久和 茂. 実験動物学, 157–168. 朝倉書店. 東京. 2018.
- 公益社団法人日本実験動物協会. 実験動物の感染症と微生物モニタリング, 1–13. アドスリー. 東京. 2017.
- 公益財団法人実験動物中央研究所 ICLAS Monitoring Center. 検査項目, マウス・ラットの微生物検査項目. <https://www.iclasmonic.jp/microbiology/inspection/mouse.html> [Cited 20th Jun 2023].
- 公益財団法人日本実験動物協会. 実験動物生産関連, 微生物モニタリング, 微生物モニタリング新日動協メニューの改訂. https://www.nichidokyo.or.jp/pdf/production/monitoring_3.pdf [Cited 20th Jun 2023].
- 社団法人日本実験動物学会. 実験動物としてのマウス・ラットの感染症対策と予防, 51–63. アドスリー. 東京. 2011.
- 林元 展人. ボルデテラ等細菌感染の話題. 第 57 回日本実験動物学会, JALAM 講演会. 2010.
- Fernandez-Garayzabal J.F., Collins M. D., Huston R. A., Fernandez E., Monasterio R., Marco J., et al. *Corynebacterium mastitidis* sp. Nov., Isolated from Milk of Sheep with Subclinical Mastitis. *Int. J. Systematic Bacteriology*. 1997; 47(4): 1082–1085.
- Aoki T, Kitazawa K., Deguchi H., and Sotozono C. Current Evidence for *Corynebacterium* on the Ocular Surface. *Microorganisms*. 2021; 9(2): 254.
- Nagarajan V., Leger A. J. St., Zhang A., Silver P., and Caspi R. R. Draft Reference Genome Sequence of *Corynebacterium mastitidis* RC, an Ocular Commensal, Isolated from Mouse Conjunctiva. *Microbiol. Resour. Announc.* 2022; 11(6): e00187-22.
- Radaelli E., Manarolla G., Pisoniet G., Balloi A., Aresu L., Sparaciari P., et al. Suppurative Adenitis of Preputial Glands Associated with *Corynebacterium mastitidis* Infection in Mice. *J. Am. Assoc. Lab. Anim. Sci.* 2010; 49: 69–74.
- Kobayashi T., Glatz M., Horiuchi K., Kawasaki H., Akiyama H., Kaplan D. H., et al. Dysbiosis and *Staphylococcus aureus* colonization drives inflammation in atopic dermatitis. *Immunity*. 2015; 42(4): 756–766.
- 渡邊利彦. *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. 2014; 63(2): 28–31.
- Burr H. N., Lipman N. S., White J. R., Zheng J., and Wolf, F. R. 2011. Strategies to prevent, treat, and provoke *Corynebacterium* –associated hyperkeratosis in athymic nude mice. *J. Am. Assoc. Lab. Anim. Sci.* 50: 378–388.
- Manuel C. A., Pugazhenth U., and Leszczynski J. K. Surveillance of a Ventilated Rack System for *Corynebacterium bovis* by Sampling Exhaust-Air Manifolds. *J. Am. Assoc. Lab. Anim. Sci.* 2016; 55(1): 58–65.
- 公益社団法人日本実験動物協会. 実験動物としてのマウス・ラットの感染症対策と予防, ネズミコリネ菌, 70–71. アドスリー. 東京. 2011.
- Dole V. S., Henderson K. S., Fister R. D., Pietrowski M. T., Maldonado G., and Clifford C. B. Pathogenicity and genetic variation of 3 strains of *Corynebacterium bovis* in immunodeficient Mice. *J. Am. Assoc. Lab. Anim. Sci.* 2013; 52: 458–466.
- Scanziani E., Gobbi A., Crippa L., Giusti A. M., Giavazzi R., Cavalletti E., and Luini M. Outbreaks of hyperkeratotic dermatitis of athymic nude mice in northern Italy. *Lab Anim.* 1997; 31(3): 206–11.
- Russo M., Invernizzi A., Gobbi A., and Radaelli E. Diffuse scaling dermatitis in an athymic nude mouse. *Vet. Pathol.* 2013; 50(4): 722–726.

研究室・施設便り

岡山理科大学 理学部 動物学科 動物資源学研究室

目加田和之

岡山理科大学は、1964年に設立された岡山県岡山市と愛媛県今治市の2キャンパスに8学部20学科1コース2研究科を構える大学です。筆者が属している理学部動物学科がある岡山キャンパスは、岡山平野の北端に連なる丘陵部に位置し、周辺にはいろいろな野生動物が生息する緑豊かな環境です(写真1, 2)。

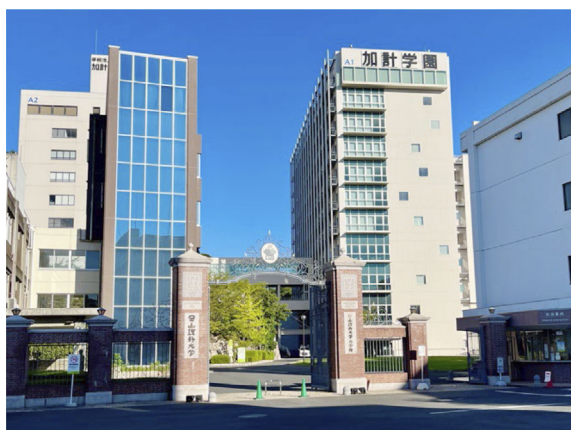


写真1 岡山理科大学正門

2008年に開設した理学部動物学科は定員45名の比較的小さな学科です。理学, とりわけ博物学・基礎生物学の伝統に根ざして、人間社会と自然の調和を図り、基礎や応用を築く動物学的な研究・教育の実践をコンセプトとしています。動物学といっても、さまざまな分野や学び方があるため、動物学科では、解剖学、生理学、遺伝学といった動物学の基本分野から、実験動物学、動物保全学など応用分野まで、動物学全体をカバーできるよう科目を設定しています。また、学生個々の興味や個性を大切にするため、必修科目を極力減らし、4年次には自分の好きな調査・研究に没頭できるようなカリキュラム構成としています。卒業研究のテーマも学生本人の興味に基づき、節足動物や昆虫のような無脊椎動物から哺乳類、野生動物から展示、実験動物まで、その対象はさまざまです(写真3)。

筆者が主催する動物資源学研究室では、スunks(ジャコウネズミ)やハタネズミ、トゲマウスなど、食虫類や非マウス・ラットの小型齧歯類の野生由来系統を維持しています。キャンパス内に学科専用の動物飼育室があり、当研究室の学生を中心に、1年生



写真2 スカイテラス(岡山キャンパス)からは岡山市内を一望できる。



写真3 動物学科の動物飼育室や学生実習室が入る建物の玄関。シロクマの剥製が出迎える。

から4年生までの学生の有志が協力しながら、日々、動物の飼育作業をしています。動物学科では、他にもヌートリアやニホンジカといった中・大動物の飼育も行っています。多彩な生きた動物を通じて、それぞれの動物の特徴や特色を理解するとともに、動物の飼育方法や繁殖コロニーを維持する技術や知識を学ぶことができる環境となっています。

当研究室で維持している動物の多くは、スンクスの実験動物化で著名な織田銃一先生（元岡山理科大学理学部教授）が、前所属先の名古屋大学大学院生命農学研究科の研究室で系統育成・保存されていたものです。織田先生が名古屋大学を定年退官され、2010年に岡山理科大学へ異動されたのに伴い、本学に導入されました。筆者は織田先生の名古屋大学時代の学生で、織田先生の指導の下、新たな野生動物の実験動物化や系統育成を行っていました。大学院修了後、マウスのみを扱う研究所で、マウスリソースの収集・保存・提供の業務に従事していましたが、2015年に岡山理科大学へ異動し、古巣の動物たちと触れ合う環境に回帰したのを機に、研究対象を非マウス・ラットの野生由来系統に特化しました。

現在は、繁殖コロニーの維持管理の傍ら、それらがもつ、遺伝学、形態学、生理生殖、行動、栄養学など、様々な生物学的特徴について調べています。ヒトや動物の多様な生命機能の解明のため、マウスやラットのような一般的な実験動物では知ることが困難な知見を明らかにできるユニークな動物資源として、それらの付加価値向上につながればと考えています。

以下、当研究室で維持している野生由来系統を紹介します。一研究室ではやれることは限られます。当研究室の動物に対して興味・関心をお持ちになられた方、利用してみたい方は是非、筆者までご連絡いただければ幸いです。

スンクス（ジャコウネズミ）

学名：*Suncus murinus*、英名：house musk shrew (house shrew)

食虫類（無盲腸目）としては、実験動物関連の教科書に登場する唯一の実験動物種として知られています。アジアの熱帯・亜熱帯を中心に温帯域の一部に分布し、食性は高タンパク質食（昆虫食、肉食）です。種内変異が大きく、体サイズや毛色、染色体数などに地理的変異が見られ、異なる地域を起源とする野生由来繁殖コロニーが育成されています。スンクス特

有の行動としてキャラバンという親仔の連結行動が有名です。

スンクスの主な特徴

- 短い消化管
（体長程度の腸管，ヒト型単胃，盲腸の欠如）
- ジャコウ腺・肛門腺の存在
- 異形菌性（全菌種が揃う），二生菌性
- 嘔吐易発性（動揺酔，放射線酔，化学物質による嘔吐）
- モチリンの発現（マウス・ラットでは偽遺伝子化）
- スクラーゼ活性欠損
- 扁桃の存在（マウス・ラットにはない）
- Dio2動物（ヒトはDio2型，マウス・ラットはDio1型）
- 低温不耐性
- 肝臓機能障害と脂肪肝（アポBタンパク合成不全）
- 若年性高血糖・高血圧（EDS系統の育成）
- 薬物感受性の統差と特異性
（ビタミンA，AraC，メトトレキサートなど）

スンクスの維持コロニー（系統別）

KAT 系統

ネパール・カトマンズ起源の野生由来系統。1992年に名古屋大学農学部で育成された系統です。一般研究やコンジェニック系統を育成する場合の標準系統として利用されています。繁殖は良好で、性格は比較的温順。2010年に岡山理科大学に導入（写真4）。

NAG 系統

長崎市茂木町起源の野生由来系統。スンクスで最初に育成された繁殖集団（1973年，名古屋大学）を由来としています。体毛や皮膚は最も黒く、比較的小型な体サイズです。性格はやや神経質。2010年に岡山理科大学に導入（写真5）。



写真4 KATスンクス系統

BK-Slc45a2^{ocao} 系統

アルビノ様毛色変異系統。沖縄県具志川市で捕獲された白化野生個体を起源とし、BK系統（KAT系統とバングラデシュ起源の交雑由来）へ戻し交配されたものです（名古屋大学で育成）。ヒトのOCA4変異に相当。2010年に岡山理科大学に導入（写真6）。

TESS 系統

4種類の常染色体劣性遺伝子：巻き毛（*ch*）、クリーム毛色（*cr*）、淡毛色赤眼（*rd*）、およびスクラーゼ欠損（*suc*）変異を有する変異系統（名古屋大学で育成）。それぞれ、多良間島、インドネシア、沖縄の野生個体とNAG系統に見つかった変異で、交配により四重変異に固定されています。2010年に岡山理科大学に導入（写真7）。

ハタネズミ類

哺乳類の中でも種分化の著しいグループの一つであるハタネズミ（*Microtus* 属）の繁殖コロニー群です。ハタネズミは60種を超える分類群でユーラシア大陸と北米大陸に広く分布しています。複胃と大きな盲腸をもち、食性は草食です。種によって異なった染色体構成や社会構造をもつことが知られています。これまでに、いくつかの種が実験動物化されており、草食家畜の栄養学的研究や細胞遺伝学的研究、社会神経科学的研究分野などで利用されています。

ハタネズミの維持コロニー（動物種別）

ユーラシアハタネズミ（系統名：Mar）

学名：*Microtus arvalis*, 英名：Eurasian vole（common vole）

1969年から1970年にかけてハンガリーで捕獲された野生個体を起源とし、日本獣医生命科学大学で育成された系統です。繁殖様式は一夫多妻型（乱婚型の傾向あり）。2015年に岡山理科大学に導入（写真8）。

ロシアハタネズミ（系統名：MrosA）

学名：*Microtus levis*, 英名：Russian vole（East European vole）

1995年にロシア・サンクトペテルブルクで捕獲された野生個体を起源とし、ロシア科学アカデミー・シベリア支部の研究所で維持されていた繁殖コロニーを由来としています。2001年に名古屋大学に導入し、系統育成が行われました。上述のユーラシアハタネズミとは同胞種の関係にあります。繁殖良好で、性格は温順。繁殖様式は一夫多妻型。2010年に岡山理科大学に導入（写真9）。



写真5 NAG スンクス系統



写真6 BK-Slc45a2^{ocao} スンクス系統。写真は ocao/ocao ホモ型の個体



写真7 TESS スンクス系統



写真8 ユーラシアハタネズミ（Mar 系統）

ニホンハタネズミ（系統名：Mmon2）

学名：*Microtus montebelli*, 英名：Japanese grass vole

日本固有のハタネズミ種。1977年に埼玉県桶川市で捕獲された野生個体を起源とし、日本獣医生命科学大学で維持されていた繁殖コロニーを由来としています。クリーム毛色変異（常染色体劣性遺伝）を有しています。繁殖様式は一夫多妻型。2015年に岡山理科大学に導入（写真10）。



写真9 ロシアハタネズミ（MrosA系統）

プレーリーハタネズミ（系統名：Moch）

学名：*Microtus ochrogaster*, 英名：Prairie vole

北米産のハタネズミ種。アメリカで実験動物化され、日本国内の研究室で維持されていたもの。本種は、一夫一妻型の繁殖様式をとることで有名で、つがいの絆が強く、オスも仔育てに参加することなどが知られています。2017年に岡山理科大学に導入（写真11）。



ギュンターハタネズミ（系統名：Mgun）

学名：*Microtus guentheri*, 英名：Günther's vole

ギリシャ、トルコ周辺に生息する大型のハタネズミ。ロシアレミングの名称で日本国内の研究室で維持されていたものですが、mtDNAの塩基配列および染色体核型解析から、レミングではなくギュンターハタネズミであることが判明しています。2016年に岡山理科大学に導入（写真12）。

写真10 ニホンハタネズミ（Mmon2系統）。左：野生色の個体，右：クリーム毛色変異のホモ型個体。

その他齧歯類の維持コロニー

アラビアトゲマウス（系統名：Aco）

学名：*Acomys dimidiatus*, 英名：Arabian spiny mouse (Eastern spiny mouse)

中東地域の乾燥地帯に分布し、背面にトゲ状の被毛をもつ齧歯類。1998年に、国内の研究室から名古屋大学に分与された動物を由来としています。トゲマウスは、皮膚や耳介、骨格筋などの組織に高い再生能を有することが知られています。また、早生性動物であり、妊娠期間は38日と長く、脳、腎臓、肺などの出生前発達が見られます。新生仔は被毛が生え、開眼しており、出生直後から歩行可能。月経を伴う性周期を有することも報告されており、哺乳類の再生モデルやヒトの周産期のモデル動物として期待されています。当初、本系統は、カイロトゲマウス（*A. cahirinus*）として維持されていましたが、遺伝解析によりアラビアトゲマウスであることが判明し、以降はアラビアトゲマウス系統として維持されています。



写真11 プレーリーハタネズミ（Moch系統）



写真12 ギュンターハタネズミ（Mgun系統）

繁殖特性や再生能はカイロトゲマウスと同様。繁殖良好で、性格は温順。2010年に岡山理科大学に導入(写真13)。

トリトンハムスター(キヌゲネズミ)(系統名: Tri)
学名: *Tscherskia triton*, 英名: Triton hamster (Greater long-tailed hamster)

150 g程度まで成長する大型のハムスター。1991年に中国吉林省で捕獲された野生個体を起源とし、名古屋大学で系統育成されたものです。性格は粗暴。2010年に岡山理科大学に導入(写真14)。

スナネズミ(系統名: Mer)

学名: *Meriones unguiculatus*, 英名: Mongolian gerbil

日本生物科学研究所と県立和歌山医科大学から名

古屋大学に、それぞれ1974年と1977年に分与された動物を由来とし、非近交系で維持されてきたものです。てんかん様発作の発症率はおおよそ47% (2019年調査)。2010年に岡山理科大学に導入(写真15)。



写真14 トリトンハムスター (Tri系統)



写真13 アラビアトゲマウス (Aco系統)。写真は成体母獣とその仔(7日齢)。



写真15 スナネズミ (Mer系統)

維持会員便り

革新的な技術と自動化でライフサイエンスに貢献する、ミウラ

三浦工業株式会社 メディカル関東支店
吉川大輔

はじめに

三浦工業株式会社は、ボイラと関連機器の製造、販売、メンテナンスを一貫して行っている会社です。また、そのメインとなるボイラ事業から、水処理装置・食品機器・滅菌器・薬品等の製造販売、メンテナンス事業、環境計量証明業等と幅広く行っております。その中で、動物実験施設様にてご使用いただける産業用滅菌器・洗浄器は、メディカル事業部で設計、製造をしております。皆様の機器運用に際して重要となる納品後のメンテナンスは、国内約100の拠点に、1,200名を超えるフィールドエンジニアが在籍し、機器トラブル、お客様のご要望に対応しております。加えて、24時間365日のバックアップ体制を整えており、夜間、休日にも輪番制でフィールドエンジニアが待機し、トラブルに対応いたします(写真1)。

本社、メディカルショールームの紹介

三浦工業の本社は、創業時より愛媛県松山市にご 있습니다。愛媛県松山市は、ご存じの通り道後温泉、松山城が有名であり、令和四年度は約478万人が観光で訪れる観光地です。滅菌器導入の際、工場検収で松

山の工場にお越しいただくお客様も松山市内で宿泊され、道後温泉で湯浴みする方もよくいらっしゃいます。

松山市内には、松山本社に併設された堀江工場および本社から車で20分程度の距離にある北条工場がありますが、三浦工業の主な製品は、この二か所の工場で製造しています。その中でも、メディカル事業部の製品で、実験動物施設様で使用される蒸気滅菌器、洗浄器、小型ボイラなどはほぼ全て北条工場で製造しております。

また、北条工場敷地内には今回紹介させていただきたい、【メディカルショールーム】がございます。こちらのショールームには、滅菌器、洗浄器、乾燥器などを設置し、実機をご覧いただくことはもちろん、お客様のご要望に応じた洗浄テストや滅菌テストも行っています。実際、洗浄器導入検討の際、お客様にご来社いただき、その洗浄効果を事前に確認いただいたり、お客様の商品開発に際しての滅菌テストを行ったりといった提案をしています。

今回、以下でご紹介させていただく動物実験施設様への洗浄器およびオゾン過酸化水素混合ガス滅菌器につきましても、このショールームでテスト対応できますので、ご興味をお持ちいただけましたら、ご依頼ください(写真2)。



写真1 三浦工業(株)松山本社



写真2 メディカルショールーム

動物実験施設様におけるバッチ式全自動洗浄器の活用のご紹介

皆様の施設では飼育器材をどのように洗浄されていますでしょうか。手洗い・機械洗浄等、さまざまな方法で洗浄されているのではないかと思います。お客様からお話を聞くうちに、洗浄作業に関する多くの問題点があることが分かりました。

まずは、作業従事者の確保の問題です。作業従事者の従事時間が長いことや、手荒れや腰痛などの身体的負荷が大きいことが多数聞かれました。

次に、洗浄精度のばらつきです。経験年数により洗浄レベルが異なることや、人により洗浄具合の差が出る可能性はあります。また、新人が従事する場合、時間をかけた教育が必要になり、一定の洗浄レベルに達するまでに時間が必要となります。

最後に、ヒューマンエラーの問題です。薬品の入れ忘れや作業工程の抜けは、人が作業をしている限りゼロにすることはできません。

全自動洗浄器を活用することで、これらの問題を改善することが可能です。全自動洗浄器の一例として、弊社製品である全自動洗浄器RUシリーズがあります。

このRUシリーズは、洗浄、乾燥、潤滑防錆をお客様の洗浄物に合わせて自由に設定でき、設定したコースを全自動で行います。作業従事者は、洗浄物を装置にセットしスタートボタンを押すだけで、後は洗浄器が全ての作業を行います。また、シャワーと超音波を組み合わせたハイブリット洗浄方式の採用により、「シャワーだけ」、「超音波だけ」では落ちにくい汚れも落とすことができます。1台でシャワーと超音波の2役であっても省スペースを実現しつつ、洗浄槽は大容量となっています。

次に、洗浄能力の面では、毎分1トンを超える循環流量でパワフルなシャワー洗浄が可能です。また、マルチ超音波発振方式、周波数や出力を変えた複数の発振を加えることで単周波発振に比べ強力な洗浄が可能です。省エネの観点での特徴としては、洗浄物量に合わせて3段階に超音波洗浄の水位設定ができるため、洗浄物が少ない場合は低水位とすることで節水が可能です。その他の機能としては、65℃～95℃の範囲で熱水除染処理が可能、また洗剤の自動投入、投入監視、残量確認機能がついているため確実な洗浄を行うことができます(写真3)。

この全自動洗浄器RUシリーズを導入いただきました一般企業様の事例を紹介します。

こちらのお客様の洗浄器導入の動機としては、①作業従事者の従事時間を短縮したい、②作業従事者の負担を軽減したい、③作業従事者による洗浄精度のばらつきを安定させたい、の3つの問題を解消するために新しい洗浄器導入を検討いただきました。動物飼育施設の規模は飼育ケージ数1,000個で、対象洗浄物はケージ、ケージの蓋、給水瓶、給水瓶先管です。

洗浄器導入前の運用では、ケージ本体はロータリーケージワッシャーで洗浄し、ケージの蓋、給水瓶、給水瓶先管は手洗い機械洗浄を行っていました。給水瓶は、浸漬・ブラッシング・シャワー洗浄を行った後、浸漬による消毒を実施。給水瓶先管は浸漬・超音波・手洗いを行った後、浸漬による消毒。ケージの蓋は、超音波とシャワー洗浄を行った後、浸漬による消毒を行っていました。

これらの洗浄作業の問題点として、作業従事者が従事する工程が多い、長時間の手作業により身体的な負担が大きい、複数の機器使用による洗浄物の移し替えて発生する作業姿勢の維持等に伴う腰痛リスクなどがありました。また、こちらのお客様ではロータリーケージウォッシャーを扱う際は、労働安全対策として1人での機器の使用は禁止されているため、複数人での作業が必要となっています。

また先にも述べておりますが、作業従事者により洗浄精度にばらつきが見られることや、新規従事者への教育が問題となっていました。



写真3 全自動洗浄器RU型

全自動洗浄器導入後、作業内容に変化が見られました。人手作業が必要となるのは、対象器材を洗浄ラックにセットして洗浄器の中に投入し、スタートスイッチを押す部分のみとなります。シャワー洗浄と超音波洗浄の併用に加え、高温熱風乾燥を設定することで器材を乾燥状態で取り出すことが可能です。また、従前作業では浸漬で消毒を行っていましたが、この洗浄器では90℃の熱水シャワーにより消毒を行っています。1つの洗浄器内で作業が完結するため、洗浄物の移し替え作業がなくなりました。

一例として、給水瓶先管の洗浄作業の比較を紹介します。全自動洗浄器導入前では30分かかっていた人手作業が、導入後は10分となり、1/3になりました。機械作業は10分から70分と総時間は増えましたが、変更前は二晩の浸漬作業を行っており、トータルの洗浄作業時間は大幅に減少、洗浄物の移し替えなどを含めた手作業時間も大幅に減少しています(図1)。

次に、給水瓶先管のATP検査の結果です。洗浄後の数値が清浄状態と同等程度となっていますので、洗浄器導入前と同様の洗浄効果が得られていると言えます。また、洗浄器を使用することで、洗浄品質も安定します(表1)。

洗浄器導入による改善点は、以下の通りです。

- ① 洗浄の全自動化により、人手作業の大幅な削減ができました。その結果、従事時間を低減することができています。
- ② 浸漬槽からの洗浄物の引き上げ、洗浄器間の移し替え作業がなくなり、身体への負担や長時作業の負担も軽減することができています。
- ③ 作業従事者の技量によらない再現性のある洗浄、洗浄剤・薬品の入れ忘れ等のヒューマンエラーのリスク低減により、洗浄品質の確保ができます。

オゾン過酸化水素混合ガス滅菌器のアプリケーション事例の紹介

電子機器をクリーンルームに持ち込む際は、どのような処理をされていますでしょうか。電子機器に常用される除染法には紫外線殺菌やアルコール噴霧による消毒等がありますが、紫外線(UV)殺菌では、UVの当たらない箇所は効果がない、プラスチック等は劣化の恐れがある、といった問題点が考えられます。アルコール噴霧による消毒では、作業者により消毒レベルが異なる、電子機器は水分厳禁であり、液晶表面への影響などが考えられます。

前後比較：給水瓶先管

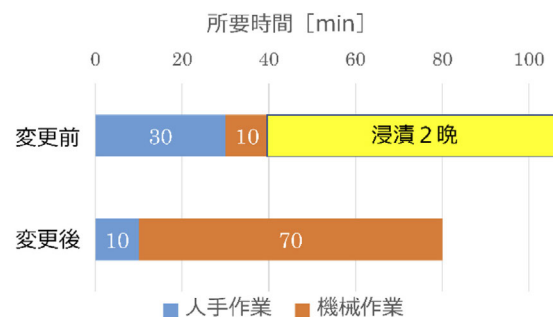


図1 洗浄器導入による改善効果

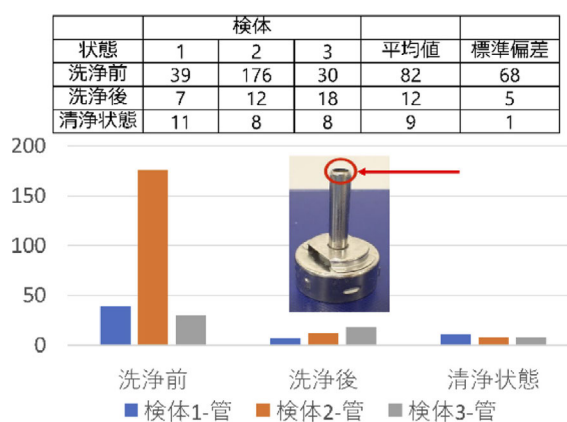


表1 給水瓶先管ATP検査結果

これらの問題点を解決するべく、オゾン過酸化水素混合ガス滅菌器XZ型(以下、XZ-010型)を用いて滅菌処理を行った結果をご紹介します。

XZ-010型の機器仕様は、チャンバー内容積：約100 L、処理時のチャンバー内温度：約50℃、使用薬剤：過酸化水素水+オゾンガス、使用ユーティリティ：AC200 V 3相、となります(詳細は弊社営業にお問い合わせください)。大きな特長は、新滅菌技術【ETstera】システムを搭載していることです(写真4)。

【ETstera】システムの作用原理は、過酸化水素に少量のオゾンを添加することで反応性が高く酸化力の強いヒドロキシラジカルを効率よく生成することができます。生成したヒドロキシラジカルにより細菌やウイルス等の微生物を効率的に殺滅又は不活化することが可能です。この技術により過酸化水素を単独で使用する滅菌法と比較して、低濃度の過酸化水素により同等以上の不活化が可能となり、高い滅菌性能を実現しています(図2)。



写真4 オゾン過酸化水素混合ガス滅菌器XZ型

このXZ-010型を用いて行った電子機器の滅菌試験をご紹介します。試験に用いた電子機器は、動物実験施設のクリーンエリア内に搬入する代表的なもの、スマートフォン・タブレット・電子天秤・ノートパソコンを用いました(図3)。これらの電子機器についてオゾン過酸化水素混合ガス滅菌を行い、殺菌効果の評価を行いました。

まず、滅菌の性能評価としてバイオロジカルインジケータ(以下、BI)を用いた殺菌効果試験を行いました。

- ・電子機器の表面にBIを複数配置した後、標準モードでハーフサイクル処理を行い、指標菌の生残有無を評価(SCD培地/55℃/1週間)。
- ・指標菌: *Geobacillus stearothermophilus* (ATCC#7953) 菌数 2.1×10^6 /Disc (6mm) True Indicating社製を使用。

次に、ケミカルカルインジケータ(以下、CI)を用いた滅菌剤浸透性試験を行いました。こちらも先ほどのBIと同様に電子機器の表面にCIを複数配置した後、標準モードでハーフサイクル処理を行い、CIの変色状況に基づいて過酸化水素ガスおよびオゾンガスの浸透性を評価しました。

滅菌時の機器の包装形態は以下の通りです。

- ・セルロース系の包装紙は過酸化水素が吸着するため、タイベック製の滅菌バッグを使用。
- ・滅菌バッグのフィルム面に滅菌対象物が密着すると薬剤の浸透を妨げるため、蓋付バスケットまたはラップ材を使用。
- ・スマートフォン、タブレット、電子天秤は蓋付バスケットに入れ、滅菌バッグで包装。ノートパソコン

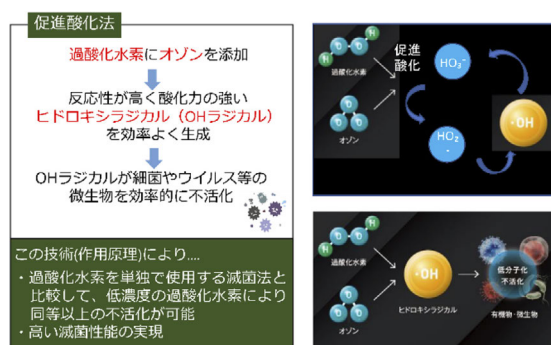


図2 ETstera システムの作用原理



図3 試験対象の電子機器

は、内部への滅菌剤浸透性を考慮し、開いた状態で滅菌用ディスプレイラップを使用して包装。

上記の内容で滅菌試験を実施しましたが、3回の滅菌性能評価において、スマートフォン・タブレット・電子天秤・ノートパソコン全て、CIの変色、BIの陰性を確認できております。参考にノートパソコンのインジケータを貼り付けた写真および各インジケータの評価結果を添付します(図4、表2)

次に、二つ目の評価項目として、滅菌後の電子機器の機能性評価を行いました。標準モードで3回連続処理した後、機器の機能が損なわれていないことを確認しました。確認項目は、電源が入るか、充電能力は損なわれていないか、動画再生はできるか、ボタン機能は生きているか、オーディオ機能は失われていないか、の5点です。

この機能性評価においても、全ての機器で使用上の問題点は確認されませんでした。

今回実施しました殺菌効果試験、及び機能性評価の範囲において、XZ-010型を用いての電子機器の滅菌には効果があり、また機器の破損も抑えられる可

能性が確認できました。実際は、各電子機器の滅菌動線（XZ-010型は片扉仕様のみ）など、検討項目も残っていますが、既存の手法と比較してご検討いただける滅菌手法になります（表3）。

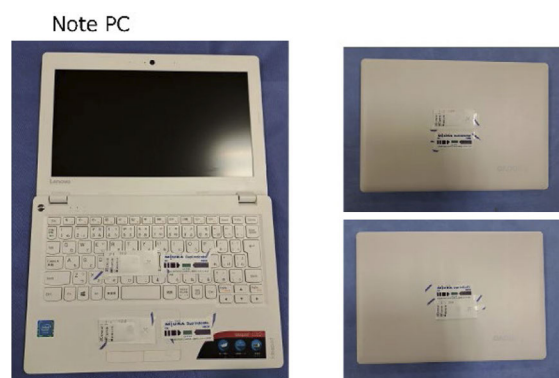


図4 ノートパソコンのBI,CIの配置

Note PC A、Note PC B

機差	インジケータ	カバー：裏面	カバー：裏面	内製：キーボード	内製：ヒンジ部	評価
Note PC A	CI	n=3 変色	n=3 変色	n=3 変色	n=3 変色	○
	BI	n=3 緑色	n=3 緑色	n=3 緑色	n=3 緑色	
Note PC B	CI	n=3 変色	n=3 変色	n=3 変色	n=3 変色	○
	BI	n=3 緑色	n=3 緑色	n=3 緑色	n=3 緑色	

3回の滅菌性能評価において、いずれもケミカルインジケータの変色、バイオロジカルインジケータの陰性を確認した。

表2 滅菌性能に関する試験結果

さいごに

今回ご紹介した洗浄器RU型、オゾン過酸化水素混合ガス滅菌器XZ-010型は、冒頭で述べた松山市のショールームに常設されており、各テスト、機器観覧も常時受け付けております（事前予約は必要となります）。他にも、蒸気滅菌器による滅菌テスト、乾燥器を用いた乾燥テストなども対応可能であり、みなさまのご来訪と合わせて心よりお待ちしております。

各テストにて、みなさまの業務効率化の手ごたえを実感いただき、夜は道後温泉にゆっくりつかって日ごろの疲れを癒していただけますご招待ができますことを願っております。

Note PC A、Note PC B

	Note PC A		Note PC B	
	前	後	前	後
1.電源が入るか	○	○	○	○
2.充電できるか	○	○	○	○
3.充電量	100%	100%	100%	100%
4.動画が見れるか	○	○	○	○
5.ボタンが効くか	○	○	○	○
6.音はでるか	○	○	○	○

3回連続の滅菌処理後、使用上の問題点は確認されなかった。

表3 OA機器の作動性確認結果

会員便り

研究者として歩み始めたきっかけ —若手研究者目線—

滋賀医科大学 動物生命科学研究センター 幹細胞・ヒト疾患モデル研究分野
松本翔馬

はじめに

滋賀医科大学動物生命科学研究センターの松本翔馬と申します。この度は東京大学大学院農学生命科学研究科の藤井 渉先生にご紹介いただき、実験動物ニュースの会員便りを執筆させていただくこととなりました。藤井先生は現在、獣医学専攻の実験動物学研究室に移られましたが、私が大学院生だった頃は応用動物科学専攻の応用遺伝学研究室で助教をされていました。所属している研究室は異なるものの、研究室間の垣根が低く、専攻全体で非常に密なコミュニケーションが取れる環境でしたので、在学時から仲良くさせていただき大変お世話になりました。当時（今もかもしれませんが...）生意気な私を可愛がってくださった貴重な先生の1人です。今回執筆の機会をいただいたのも、先日つくばで開催された第70回日本実験動物学会総会にて久しぶりにお会いしたのがきっかけで、この学会が繋いでくれた有り難い縁の1つだと実感しています...とは言ってみたものの、私自身実は今年本学会に入会させていただいたばかりで、総会への参加も初めてでした。藤井先生には開口一番、「大丈夫？マイクの前独占して学会荒らしてない？」と言われ、お会いしたのが午前のセッション終わりでしたので「もう遅いです。笑」と答えてしまいました。会場では藤井先生だけでなく、今までお世話になった先生方に数多くお会いすることができ、非常に有意義な時間を過ごすことができました。改めて実験動物学という領域が生物学研究になくてはならないもので、多くの方が紡いできた功績の積み重ねによって成立しているのだと再認識したところ です。

私自身学位を取得して3年少々と、本格的に研究を始めて間もない立場にありますので、本稿ではどのような経緯で研究者を志すようになり、第1歩を踏み出したこの3年間でどのように過ごしてきたのかお話しさせていただこうかと思います。研究の道を入

生の選択肢に入れている学生さんはもちろん、現在バリバリ活躍されている先生方にも「まだまだ若いな」と温かい目で一読いただけますと幸いです。

学生時代

小学生の頃から理科が好きで（本当のことを言うと体育の方が好きです）、特に物理、化学分野にずっと興味がありました。その頃は自分が生物学者になるなど微塵も思っておらず、もっと別の職業をイメージしていました。ざっくり理科が好きと言っても生物には特に興味がないまま高校まで進み、やはり高校でも物理、化学を選択、大学入試にもこの2科目を使用しました。元々暗記が苦手ということもあり、「ただ覚えるだけ」という認識でしかなかった生物学はむしろ苦手な部類だったと思います。大学受験でもすべて化学系の学科を受験しました。ただ、塾でいつも隣の席に座って競い合っていた友達が、「生物が面白い」と言っていたのが受験後にとても気になってしまい、唯一生命科学科を受けていた明治大学（これもたまたま全学部入試で受験したため）に入学することを決意しました。生物学に目覚めた瞬間です。この後の経緯も同様ですが、基本的に気分屋でふらふらと気の向くままに行動している節はあります。

学部生の時は明治大学農学部の大鐘 潤先生のもと、当時あまり広くは知られていないエピジェネティクス（主に対象としたのはDNAメチル化）、バイオインフォマティクス分野を中心に研究生活をスタートさせました。ブタ下垂体のDNAメチル化解析を行ううちに、もっとディープなエピジェネティクスの世界に飛び込みたい！と思うようになり、修士課程からは大鐘先生が師事されていたエピジェネティクス分野の権威である塩田邦郎先生の研究室、東京大学の細胞生化学研究室へと移りました。入室前はエピジェネティクスを！と考えていましたが、修士課程からはかねてより興味のあった幹細胞分野に惹か

れ(このあたりもふらふらしています...), 当時准教授だった田中 智先生に指導していただくことになりました。田中先生は世界で初めてマウス胚盤胞から栄養膜幹細胞(TS細胞 ; 胎盤の幹細胞)を樹立したいわゆる胎盤研究のエキスパートです[1]。私はカニクイザルTS細胞の樹立という非常にチャレンジングなテーマで研究を始めました。現在ではヒトTS細胞も樹立されていますが, その頃は霊長類TS細胞が存在せず, マウスと同じ条件では樹立できないことまで報告されている状況でした[2]。コントロールやクライテリアも存在しない細胞株の樹立ということもあり, 学生には非常に難しいテーマでしたが, そのおかげで様々な解析技術や柔軟な考え方ができるようになってきたのだと思います。そんな中, 何とか論文としてカニクイザルTS細胞(macTS細胞と命名)を世の中に発表できた時は, 本当に嬉しかったのを鮮明に覚えています[3]。私の人生プランでは修士号を取得したら製薬企業に就職しよう!と考えていたのですが, すっかり研究の魅力に取り憑かれてしまい, そのまま東大の博士課程に進みます。この段階で気持ちはアカデミア1択になっていました。私が研究の道を志した1番の理由は, 世界中でまだ誰も知らない真実を自分の力で明らかにしていく, またそれを聞いてくださった方が「それ面白いね!」と共感してくれた時の喜びなのだと思います。今まで「ただ覚えるだけ」と認識していた生物学が, 「自分の力で切り開いていくもの」に変わった瞬間です。振り返ってみれば, 仮説通りに進んでいかないことも研究にハマったきっかけのような気がします。大鐘先生, 田中先生, 2人のボスとの出会いのおかげで今こうして研究の道に進むことができました(図1)。



図1 学生時代の2人のボスとの写真
左から田中先生, 筆者, 大鐘先生

学位取得後

博士課程を修了してから現在までは, 滋賀医科大学動物生命科学研究センターの依馬正次先生の研究室で特任助教をしています。修士課程, 博士課程とカニクイザルの細胞を扱っていたので, 国内最大級のカニクイザル飼育施設であるこのセンターは, 私の目に大変魅力的に映りました。滋賀医大に着任するきっかけは, 依馬先生がサル胎盤研究の相談で田中先生のもとを訪れたことにあります。当時細胞生化学研究室では皆マウスTS細胞を用いた研究を行っており, 唯一サルTS細胞を扱っていたということもあってミーティングに同席させていただくことになりました。世間話の延長で, 依馬先生から新たに胎盤研究を始めるにあたり詳しいスタッフを探している旨を伺い, 「ちょうど翔馬はいまD3で, 今年修了見込みですよ」という田中先生のお言葉もあったことで現在に至ります。自分にとっては興味の対象的にもドンピシャで大変有り難いお話でした。大した就活の努力をすることもなく次の場所が決まり, 本当に恵まれた道を歩んできているなとつくづく思います。無事博士号をディフェンスした時期はCOVID-19が世間を騒がせ始めた頃(2020年1月)でしたので, ラボの同期も次の研究室探しには相当苦戦していました。まだ中間審査前の学生だったにも関わらず, ポストを空けて半年以上も待っていてくださいました依馬先生には感謝してもしきれません。このような経緯で研究者としてスタートラインに立つことができました。研究生生活(滋賀編)の幕開けです。

若手研究者としての生活

...というタイトルにしてみたものの, 学生の頃とあまり変わらない生活をしています。特に夜早く帰るわけでもなく, 土日にも普通に実験したりと何かが変わった実感は正直ありません。もちろん書類仕事や学生の指導, 講義など, 研究以外の仕事はそれなりに増えたものの, 私にとっては生活が変わるというレベルではありませんでした。変わったのはさすがにスウェットでラボに行かなくなった程度...。依馬先生以外の方とはもちろんはじめましてということになるのですが, 依馬先生, 助教の岡村永一先生は発生学の大家であるJanet Rossant先生のラボ出身で少し身近に感じました。というのも, 私自身修士課程の学生時代に1ヶ月弱の短期でトロントのRossant先生, Brian Cox先生のもとに留学させていただいており(図2), 世間は狭いなーと感じてしまいました。



図2 トロント大学にて(Welcome backか何かのイベント) 右は短期留学時に面倒を見てくれた友達Dr. Ursula(当時学生), 左は筆者

突然短期留学の話ですが、カナダのグループとは学生時代に共同研究をしており、留学始めの数日は各研究者とのミーティングをセッティングして田中先生と2人、オタワ、トロントを回りました。ミーティング中、急に田中先生が作成したスライドを渡され、「じゃあ説明よろしく!」と突然振られた時はさすがに「振るなら先に教えて...」と焦りましたが、そんなイベントのおかげで英語も話せるようになったと思うことにします。トロント滞在時はなぜか私の部屋にだけ大量のbed bug(南京虫)が徘徊しており、痛みも痒みも嫌悪感も特になかったので部屋も変えてもらわず終始一緒に生活していたのですが、帰国しすぐに四肢全体が鬱血したのも今となってはいい思い出です(笑)。

だいぶ脱線したので話を戻します。

滋賀医大に赴任してからはカニクイザルを対象とした研究がさらに加速しました。これまでは細胞株を樹立して扱っていたに過ぎませんが、生体由来サンプルを用いた解析や*in vivo*実験も実施することができ、非常に有意義な時間を過ごしています。依馬研究室は発生工学分野に明るいため、遺伝子改変技術を身に付けることができたのは、今後のキャリアを考えても大きなプラスになったのではないかと思います。

ます。現在はずっと続けてきたカニクイザル胎盤の研究に加え、もう少し広げて着床に関連した子宮の研究、新規遺伝子改変技術の開発、疾患モデルカニクイザルの研究などを行っています。また、附属病院も隣接していることから臨床研究グループとの交流も盛んで、ヒト検体を用いた研究も数多く実施しています。やはり今でもテーマを含めふらふらと幅広く手を出していますが、逆に様々な分野の知識や技術を身に付けることができ、個人的にこの生き方には満足しています。多分野を渡り歩いてきたからこそできる分野横断的な研究を開拓するのが次の大きな目標です!かねてより最も力を入れている胎盤研究については、当センターに来たことによって実際に目で見て触れることができたのが個人的に大きな経験となっており、げっ歯類と霊長類の違いだけでなく、ヒトと非ヒト霊長類の違いについても非常に理解が進みました[4]。また、動物センター職員ということもあり、今まで深く考えてこなかった実験動物学の重要性にも気付くことができ、研究者として少しは成長できているのではないかと思います。

おわりに

ここまでざっくりと私が研究者を志した経緯や、学生時代から現在のポストに至るまでの歴史を記述させていただきました。研究には「運鈍根勘」が大事だと言われますが、私には「運」の部分がタイミングよく舞い込んでくれた印象しかありません。そういう意味ではこれから研究者を目指す方にとって参考になったとは全く思えませんが、多くの方々と出会い、交流の輪を広げられたことが、その「運」を呼びこんだ一因になっているのではないかと思います。

話は戻り、先日初めて参加させていただいた日本実験動物学会総会では、大変有り難いことに優秀発表賞をいただくことができました(図3)。初めての学会で勝手も分からなかったのですが、冒頭にもあるように、気にせずいつも通りの自分でマイクの前に立ちまくり質問を投げていたことも、もしかしたら評価されていたのかな?なんて思ったりします。そうでなくとも、普段のこのスタイルが功を奏し、意見交換会などでははじめましての方が積極的に話しかけてくださいました。やはり皆さんの研究を聞くのは楽しいですし、ここから共同研究が始まったりすることを考えるとなかなか辞められません。

学生さんも積極的にいろんな方に話しかけたり質問したりと自発的にアクションすることで、将来のボスや研究の道に進むきっかけをくれるような人に出会えるかも...?といったところで今回は筆を置かせていただきます。機会があれば、研究生生活(続編)でまたお目にかかれる日を楽しみにしております!

引用文献

- 1) S. Tanaka et al., Science, (1998). PMID: 9851926
- 2) T. Kunath et al., Placenta, (2014). PMID: 25443433
- 3) S. Matsumoto et al., Sci Rep., (2020). PMID: 32321940
- 4) S. Matsumoto* et al., Reprod Med Biol., (2023). PMID: 373777534)



図3 第70回日本実験動物学会総会にて
左は依馬先生、右の調子に乗っているのが筆者

会員便り

マウスおよびラット生殖工学技術の研究開発

熊本大学生命資源研究・支援センター 資源開発分野
中尾聡宏

はじめに

熊本大学生命資源研究・支援センターの中尾聡宏と申します。この度、東海大学の三浦浩美先生からのご紹介で、会員だよりを執筆させていただくことになりました。このような貴重な機会を賜り、関係の先生方に心より御礼申し上げます。

私は、熊本大学生命資源研究・支援センターの中潟直己先生(現職:生殖工学共同研究分野, 特任教授)、竹尾透先生(資源開発分野, 教授)のご指導のもと、マウスおよびラットの生殖工学技術の研究に取り組んでいます。私が初めて生殖工学と出会ったのは、薬学部2年生で受講した生殖工学実習でした。生殖工学実習は、2日間午後のみの実習でしたが、そこで私は心底生殖工学の面白さに魅了されたことを憶えています。振り返ってみると、わずか8時間ほどの実習が現在の私の礎となっており、どんなに短い経験であっても、一つの出会いが人生を左右し得ることを実感しています。

また、先日、実家の片付けをしている折、幼稚園と小学生の卒業文集が見つかりました。読んでみると、私の幼稚園時の将来の夢は「旅人」、小学生時は「科学者」でした。現在、生殖工学に関する研究開発を行い、また、学会や研究会等で国内・海外含め様々な場所に赴く機会をいただいていることを考えると、無自覚なまま幼少の頃の夢を叶えておりました。雑多な内容となってしまいましたが、以降では、私がこれまでに研究開発に携わってきた生殖工学技術の中から、最新のマウスおよびラット受精卵の作製技術に関して紹介致します。

マウス受精能獲得精子選別技術の開発と体外受精への応用

哺乳動物の精子は、射精された直後は受精能を有しておらず、生理的、生化学的、物理的な精子の変化が起こり(受精能獲得)、卵子と受精できるようになります。そのため、体外受精で高い受精率を得るため

には、受精能獲得を起こした精子を選別して、卵子と培養することが重要です。

そこで私たちは、受精能獲得を起こした精子を選別するために、生命科学研究に汎用されているセルソーターを用いて精子の選別を試みましたが、従来のセルソーターでは電荷により精子が破壊され、運動性を維持したまま精子を選別することは不可能でした。次に、細胞への侵襲性が低いという特徴を持つマイクロ流路チップセルソーターの利用を試みしました(図1A)。マイクロ流路チップセルソーターを用いることで、運動性を維持したままマウス精子を回収することに成功しました[1]。

さらに、精子の先体反応を受精能獲得マーカーとして、受精能獲得精子の選別も検討しました。先体反応精子をPNA Lectin-FITCにより標識し、PNAの蛍光強度をもとに精子を選別し(AR-lowおよびAR-high)、運動性解析および体外受精を行いました。選別した精子は、いずれも高い運動性を維持していました(図1B)。さらに、蛍光強度の低いAR-low精子と比較し、蛍光強度の高いAR-high精子は、体外受精において高い受精率を示すことを明らかにしました(図1C)。また、選別を行った精子から得られた受精卵は、胚移植により産子へと発生することも確認しています。本結果より、受精能獲得精子を選別することで体外受精における受精率が向上することがわかりました。今後、様々な受精能獲得マーカーを用いた精子の選別を行うことで、さらなる体外受精技術の改良に繋がると考えています。

新規受精能獲得誘起化合物 DMACD の発見

前述の実験でも示された通り、体外受精において高い受精率を得るためには、受精能獲得を確実に誘導することが重要です。そこで私たちは、精子の受精能獲得を誘導する新規化合物の探索を行いました。以前より、精子の受精能獲得には、精子膜中のコレステロールの漏出が関与していることが知られていま

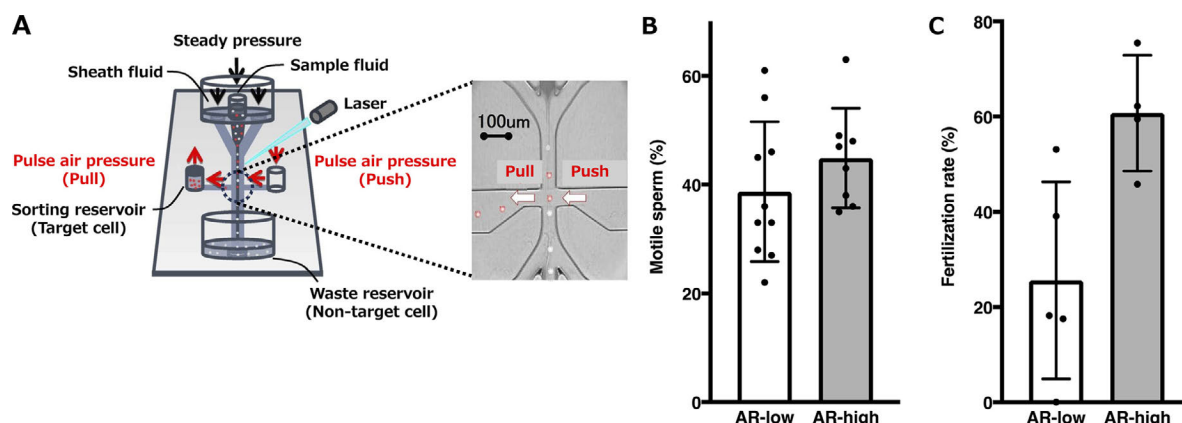


図1 マイクロ流路チップセルソーターを用いた精子の選別

マイクロ流路チップを用いたセルソーターにより精子の選別を行った (A)。先体反応精子をPNA Lectin-FITCにより標識し、FITCの蛍光強度により、AR-lowおよびAR-highに選別し、運動性解析 (B) および体外受精 (C) を行った。

Sci Rep 10, 8862 (2020) <https://doi.org/10.1038/s41598-020-65931-z>

す。実際に、コレステロールアクセプターであるウシ血清アルブミン (BSA) や、メチル- β -シクロデキストリン (MBCD) を精子に処理することで、精子の受精能が向上します。近年、私たちは、コレステロールの漏出に関与せずに、精子の受精率を向上させる化合物としてジメチル- α -シクロデキストリン (DMACD) を発見しました [2]。

DMACDを精子に処理することで、体外受精における精子の受精率が向上しました (図2A)。DMACD処理精子由来の受精卵は、胚移植により正常に産子へと発生することも確認しています。また、興味深いことに、DMACDは、これまで受精能獲得に重要と考えられてきた精子膜からのコレステロールの流出を促進せず (図2B)、リン脂質の漏出を促進することで (図2C)、精子の受精率を向上させることが分かりました。さらに、DMACD処理精子の機能解析を行ったところ、これまで受精能獲得のマーカーとして知られているハイパーアクチベーション、膜流動性の増加、脂質ラフトの局在変化および先体反応も正常に起きていることが確認できました。本結果より、DMACDは、新規メカニズムにより精子の受精能獲得を誘導し、受精率を向上させることが明らかとなりました (図2D)。本知見は、リン脂質の漏出を標的とした、新たな受精能獲得技術の開発に繋がると考えています。

生体内での受精効率が向上する受精適期の発見

受精卵を作製する方法として、体外受精のほかに、交配により生体内で受精卵を作製する方法があります。成熟雌マウスでは、発情周期に従い、8-10個の卵子が排卵され、生体内のほぼ全ての卵子が受精します。これまでに私たちは、インヒビン抗血清 (IAS) とウマ絨毛性ゴナドトロピン (eCG) を投与する超過剰排卵誘起法 (IASe) を開発しており、1匹の幼若雌マウスから、約100個の卵子を排卵させることに成功しています。しかしながら、IASeにより超過剰排卵処理した雌マウスを交配に用いても、受精する卵子は20個程度でした。私たちは、排卵と交配のタイミングが生体内での受精率に及ぼす影響を検討し、超過剰排卵雌マウスの生体内での受精効率の改善に取り組みました [3]。

IASe投与後の排卵タイミングを確認し、排卵前 (従来法)、排卵中、排卵後の3つの時期に分類しました。各時期において交配を制限しても、高い交配陽性率 (85%以上) が得られました。また、排卵中と排卵後に交配を行うことで、排卵前と比較し、受精率が向上し (図3A)、得られる受精卵子数が3倍にまで増加しました (図3B)。排卵後交配により得られた胚は、胚移植により正常に産子へと発生することも確認しています。本結果から、排卵タイミングと交配タイミングを同期させることで、超過剰排卵雌マウスにおける生体内での受精効率の改善に成功し、効率的な生体由来受精卵の作製が可能になりました (図3C)。本

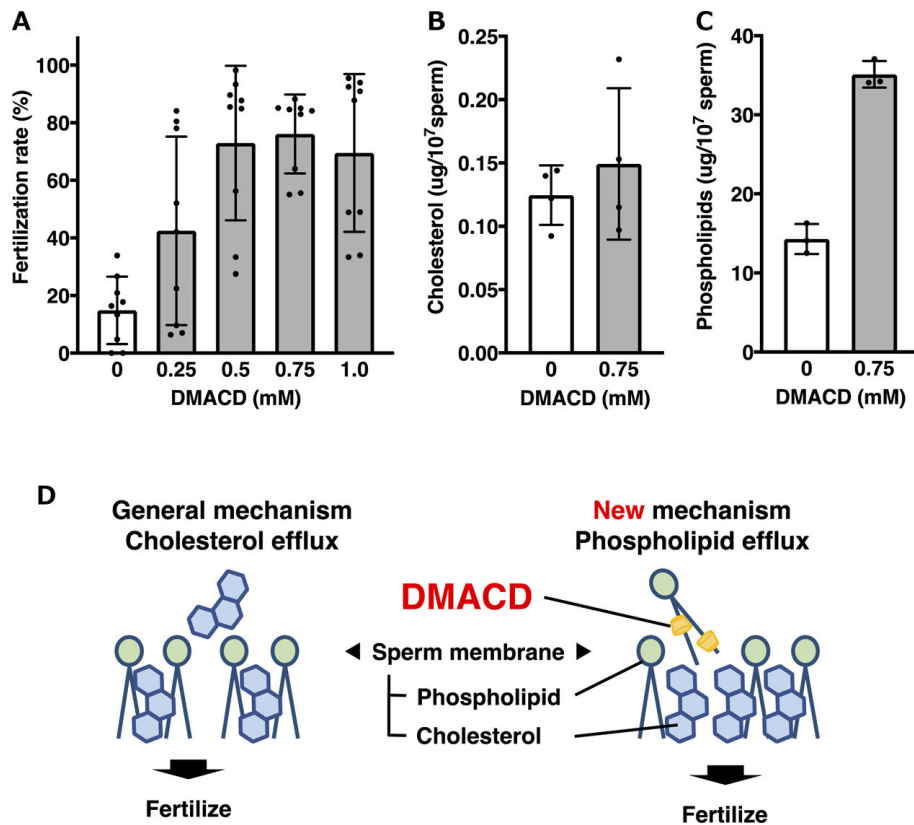


図2 DMACDが精子の受精率および精子膜からの脂質流出に及ぼす影響
DMACDを精子に処理し、体外受精における受精率 (A)、精子生体膜から流出したコレステロール量 (B) およびリン脂質量 (C) を測定した。DMACDは、これまで重要と考えられてきたコレステロールの流出を介さず、リン脂質の流出により精子の受精能を向上させた (D)。
Biol Reprod 108, (2023) <https://doi.org/10.1093/biolre/ioad013>

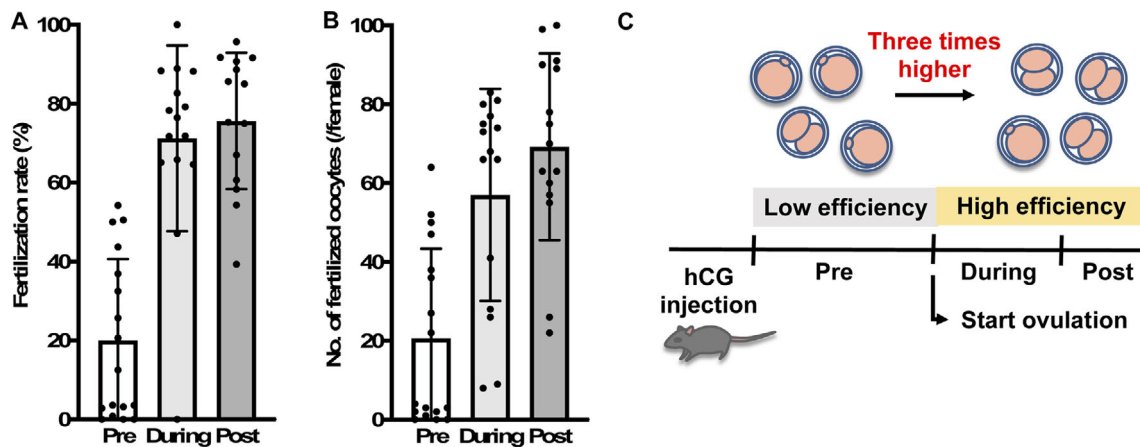


図3 排卵と交配タイミングが生体内の受精効率に及ぼす影響
超過剰処理を施した雌マウスを用いて、各排卵タイミングにおいて雄マウスと交配を行った。交配の翌日に卵管灌流により受精卵を回収し、受精率 (A) および1匹の雌マウスから得られた受精卵子数 (B) を算出した。排卵中と排卵後に交配を行うことで、排卵前と比較し、得られる受精卵子数が3倍に増加した (C)。
PLoS One 18, (2023) <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0281330>

知見は、遺伝子改変マウスの作製への応用、卵子ドナー数の削減による3R実現への貢献に繋がると考えています。

ラット精子の凍結保存および凍結精子を用いた体外受精技術の開発

ラットは、医学・生命科学研究において、マウスに次いで汎用されている実験動物です。ラットは、マウスと比較して体が大きく、高い認知機能やよりヒトに近い代謝経路を持つことから、脳・神経研究、毒性試験、外科治療のモデル動物として優れています。また、遺伝子改変ラットの作製も容易になったことから、実験動物としてのラットの需要が高まっています。しかしながら、ラットの生殖工学技術の開発が遅れており、ラットを用いた研究の基盤が整備されていないことが課題でした。そこで私たちは、遺伝子改変ラットの保存と作製に有用な、ラット精子の凍結保存および凍結精子を用いた体外受精技術の開発を行いました。

ラット精子は、他の哺乳動物の精子と比較して物理的刺激に弱く、これまで精子の凍結保存が極めて困難でした。私たちは、ラット精子の凍結障害の回避に、凍結前の予冷が有効であることを見出し、凍結融解後も高い運動性を維持できるラット精子凍結保存法の開発に成功しました[4]。また、ラット凍結精子

を用いた体外受精技術の開発に取り組み、高濃度のウシ血清アルブミン (BSA) をラット凍結精子に処理することで、体外受精における受精率を向上させること、卵丘細胞の除去が、体外受精率の向上に有用であることも明らかとし (図4A, B)、種々のラット系統において、凍結精子を用いた効率的な受精卵の作製が可能となりました[5]。本法で作製した受精卵は、胚移植により正常に産子へと発生することも確認しています。

さらに、本技術を応用することで、受精過程を可視化するシステムの開発も行いました[6]。本研究により、ラットの生殖工学に関する基盤技術が開発され、今後、ラットを用いた研究の推進に貢献できると考えています。

生殖工学技術オンライン指導システムの開発

私たちは、生殖工学技術の開発と同時に、本技術に関する研修会を通じて、人材育成にも取り組んでいます。本研修会では、マウス生殖工学に関する最新の技術と知識を共有するため、マウス生殖工学技術に関する講義、技術のデモンストレーション、対面での指導を行なってきました。しかしながら、2020年以降のコロナ禍においては、研究者や技術者の移動制限により、対面での研修会の開催や参加が困難となり、ヒトの移動を伴わない研修会の開催が求められ

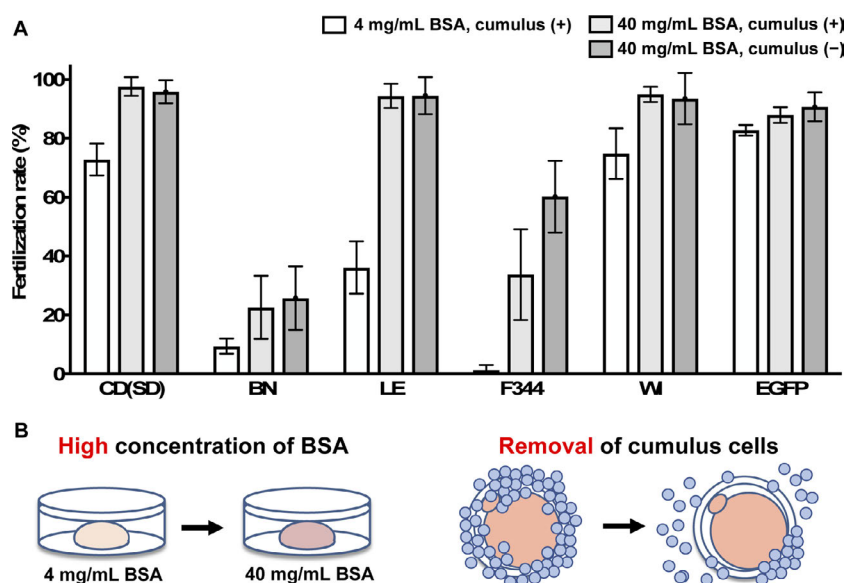


図4 ラット凍結精子を用いた体外受精

ラット精子の凍結保存を行い、融解後、体外受精を行った (A)。高濃度の BSA (40 mg/mL) および卵丘細胞の除去は、ラット凍結精子の受精率を向上させた (B)。

Lab Anim 51, (2022) <https://doi.org/10.1038/s41684-022-01053-5>

ました。さらに昨今では、デジタル技術を活用したデジタルトランスフォーメーション (DX) の推進が求められ、場所にとらわれない人材育成の需要も高まっています。そこで私たちは、マウス生殖工学技術オンライン指導システムの開発を行いました。

本システムでは、全ての生殖工学機器をオンライン化することで、Zoom等のビデオ会議ツールやYouTube等の動画共有サービスを介して、遠隔での技術指導を可能にしました。すでに本システムを運用して、国内製薬メーカーやタイのコンケン大学とオンライン研修会を開催しています。また、スリランカの実験動物学会主催の学会では、リアルタイムで生殖工学技術のデモンストレーションを行いました。本システムは、国際的に高まるマウス生殖工学技術に関する人材育成の課題をDXにより解決し、生命科学における研究支援人材の育成に有用であると考えています。また、今後は、マウスおよびラットの生殖工学に関する技術研修会の開催に向けて準備を進めていきたいと考えています。

最後に

生殖工学技術は、不妊治療をはじめとした生殖医療だけでなく、人工授精による良質な家畜の大量繁殖、凍結保存や体外受精による希少動物の保全や実験動物の作製等、様々な分野に応用されており、臨床、食料、産業、環境における、様々な課題を解決し得る重要な科学技術です。私たちは、マウスやラットの生殖細胞を用いて生殖工学研究を行うことで、これらの課題解決に有用な技術開発を目指しています [7]。

さらに、熊本大学生命資源研究・支援センターでは、本技術を活用して、マウスバンクおよびラットバンクを運営し、遺伝子改変マウスおよびラットの利

活用の推進や、技術支援を行っています。今後も、生殖工学に関する研究を進め、技術開発への応用に取り組みたいと考えています。

参考文献

1. Nakao S, Takeo T, Watanabe H, Kondoh G, Nakagata N. Successful selection of mouse sperm with high viability and fertility using microfluidics chip cell sorter. *Sci Rep* 2020; 10: 8862.
2. Nakao S, Ito K, Sakoh K, Takemoto K, Watanabe H, Kondoh G, Irie T, Nakagata N, Takeo T. Dimethyl- α -cyclodextrin induces capacitation by removing phospholipids from the plasma membrane of mouse sperm. *Biol Reprod* 2023; 108: 671–681.
3. Nakao S, Ito K, Sugahara C, Watanabe H, Kondoh G, Nakagata N, Takeo T. Synchronization of the ovulation and copulation timings increased the number of in vivo fertilized oocytes in superovulated female mice. *PLoS One* 2023; 18: e0281330.
4. Nakagata N, Mikoda N, Nakao S, Nakatsukasa E, Takeo T. Establishment of sperm cryopreservation and in vitro fertilisation protocols for rats. *Sci Rep* 2020; 10: 3768.
5. Takeo T, Nakao S, Mikoda N, Yamaga K, Maeda R, Tsuchiyama S, Nakatsukasa E, Nakagata N. Optimized protocols for sperm cryopreservation and in vitro fertilization in the rat. *Lab Anim (NY)* 2022; 51: 256–274.
6. Nakagata N, Nakao S, Mikoda N, Yamaga K, Takeo T. Observation of the in vitro fertilization process in living oocytes using frozen-thawed sperm in rats. *Theriogenology* 2023; 199: 69–76.
7. Takeo T, Nakao S, Nakagawa Y, Szein JM, Nakagata N. Cryopreservation of mouse resources. *Lab Anim Res* 2020; 36: 33.

会員便り

学位取得から10年目を控えて…

大阪公立大学 獣医学研究科 獣医病理学教室
田中美有

大阪公立大学獣医学研究科 助教の田中美有（たなかみゆう）と申します。京都大学大学院医学研究科附属動物実験施設の成瀬智恵先生からのご紹介で会員便りを執筆させていただくことになりました。私は獣医病理学を専門としております。所属する大阪公立大学獣医病理学教室では、伴侶動物や動物園・水族館の飼育動物など様々な動物の自然発生病変の病理診断（生検・剖検）および病態解析を行いながら、研究内容としては、神経疾患モデルを中心として、多くの疾患モデル動物（主にラット）の病態解析に携わってきました（図1）。今回、どんなテーマで会員便りを執筆するか悩みましたが、もうすぐ学位取得から10年目をむかえようとしていますので、ただただ動物が大好きで小動物臨床医を目指していた自分が研究者になるまでを振り返りつつ、これまで主に取り組んできた2つの神経疾患モデルラットの研究成果についてご紹介したいと思います。

獣医師を志すまで

私は幼い頃から動物が大好きで、ビーグルとウサギ、沢山の魚達と暮らしながら、動物に関する本を読み漁っていました。本で知って興味を持ったことがあると、次は自分で実際に見てみたい・経験したいと思い、盲導犬協会のボランティアをしたり、動物愛護センターの見学に行ったりなどしていました。その流れで、動物愛護や動物実験についても中学生の頃に知ったと記憶しています。我が家のビーグルは、チェリーアイ、てんかん、ヘルニアといった複数の病気を経験しました（“THE ビーグル”ですね…）。お世話になっていた動物病院の獣医師は、動物たちの治療はもちろん、動物種や犬種によって罹りやすい病気が違うことを子供にも理解できるように教えてくださり、動物と暮らす中で、動物の病気や動物種ごとの違いにも興味を持つようになりました。また、神経疾患に罹患した動物と暮らした経験から、てんかん



図1 これまでに携わった研究内容と獣医病理学

やヘルニアなどの神経系疾患を治せる獣医師になりたいと思い、獣医師を志すにいたりしました。

獣医病理学との出会いと研究者を志すまで

一時期は某漫画の影響も受けて北の大地に憧れを抱きつつも、小動物の臨床獣医師を志望し、大阪府立大学の獣医学科に入学しました。クラスメイトの8割以上が関西人だったので、愛知県出身の私は、たくさんのカルチャーショックを経験しました…。学部3年生の時、獣医病理学の講義・実習を受講して、学問としての獣医学の面白さを初めて実感したと記憶しています。組織標本を顕微鏡下で覗き、絵を描くような感覚で丁寧にミクロ所見をとっていくことで病気を診断できることが楽しく、魅力的でした。研究室は、大好きな病理学を深く学びたい・沢山の標本を観察してみたい、という理由で、現在の所属研究室でもある、獣医病理学教室を選択しました。我々の研究室では、学部の卒業研究に加えて、動物病院や動物園・水族館から依頼される病理検査にも携わることができるため、多くの動物種の様々な疾患を経験し、その病理像を学びました。誰かが顕微鏡を覗いて考え込んでいたら、1人2人…と学生（時には教員も）が集まってきて、自然にディスカッションが始まるような環境で、大変ながらも楽しく、着実に獣医病理学を学ぶことができました。（いまでも、学生たちが鏡検していると気になって仕方ないですが、診断を出してやるまではなるべく我慢しています…。）また、当時は留学生も多く、日本語と英語（とジェスチャー）をまじえながら、獣医病理学や研究内容や実験手技、おいしいカレーやチキンの作り方で、たくさんのことをディスカッションできる環境にもあり、英語でのコミュニケーション能力を培うこともできました。卒業研究は、入学前から関心のあった神経疾患に関するテーマを選択し、新たなミエリン（髄鞘）疾患モデルVF（vacuole formation）ラットの原因遺伝子の解析と病態解析に取り組みました。本モデルラットは、病態や原因遺伝子が未知である自然発症モデルでしたので、私にとって、実験は宝探しのような感覚でした。研究は想像していた以上に楽しく、わくわくするもので、“なぜ、どんなメカニズムで病気になるのか”を考えながら研究を行っていく中で、多くの動物や人の疾患の診断・治療に結びつく基礎研究の重要性を感じました。また、臨床も含めて総合的に疾患や生命現象を理解することのできる獣医病理学をさらに深く追求したいと思うようにもなりました。そのよ

うなタイミングで、研究対象のVFラットの原因遺伝子および変異を同定したことも、博士課程への進学を決意することを後押ししてくれました。学部卒業後、そのまま博士課程に進学してVFラットに関する研究を続け、大阪府立大学にて学位を取得しました。博士課程在籍中は多くのチャンスをいただき、短期留学や海外での学会発表はもちろん、複数の神経疾患モデルラットの病理学的解析に携わる機会を得たことで、自身の経験値を高めることができたのはもちろんのこと、国内外の様々な分野の研究者とコミュニケーションをとるきっかけにもなりました。

大学院在籍中には、もう1つの目標でもあった、獣医病理学専門医の資格も取得することができました。

学位取得後の研究歴

学位取得後の3年間は、京都大学大学院医学研究科附属動物実験施設のポストドクとして、ナショナルバイオリソースプロジェクト「ラット」(NBRP-Rat)の運営に参画し、NBRP-Ratに寄託されるラットの系統情報の管理を担当しておりました。研究については、大学院の頃より共同研究で携わっていた、神経軸索ジストロフィーモデルラットやアトピー性皮膚炎モデルラットをはじめとする、複数の疾患モデルラットの病態解析に携わりました。さらに、京都大学では、X連鎖重症複合免疫不全症(X-SCID)ラットコロニーにおけるラットポリオーマウイルス2(Rat PyV2)感染症も経験し、Rat PyV2感染症例の病理学的・遺伝学的検索と国内の実験用ラットにおける汚染状況の調査を行いました。呼吸器症状を呈したX-SCIDラットの肺の組織標本上に封入体を発見したためにウイルス感染を疑い、すみやかに原因を明らかにすることができたことは、獣医病理学専門家としても非常に大きな経験となりました。なお、こちらの研究成果については、参考文献[1]に発表しており、また、実験動物ニュース Vol. 70 No. 1の「実験動物感染症の現状」でも紹介しておりますので、ぜひそちらをご一読いただけますと幸いです。

その後は、母校である大阪府立大学に特任助教として赴任し、附属獣医臨床センター（動物病院）に新設される検査科・病理診断部門の検査体制を整備しながら、院内症例の病理診断業務や参加型臨床実習を主とした獣医学教育に3年間従事しました。この間は研究時間を確保することに苦慮しつつも、診断業務終了後の時間と休日を使いながら細々とでも研究を続け、Rat PyV2感染症に関する研究を論文にまと

めることができました [1]。その後、出身研究室である獣医病理学の助教に着任し、現在3年目となります。

最後に、これまで様々な疾患モデルラットの研究に携わってきた中でも、主要な2つの神経疾患モデルラットについての研究内容を簡単にご紹介いたします。

ミエリン異常ミュータント VF ラットの病理学的・遺伝学的研究

本研究は、私が大阪府立大学・同大学院在籍中に主要研究課題としていたものです。

所属研究室では、難治性疾患であるミエリン疾患のメカニズム解明や、ミエリン形成・維持機構の解明を目指して、ミエリン低形成、脱髄など、様々な病態の複数種の自然発症ミエリン異常ミュータントラットの病態解析を行ってきました。いずれのミュータントラットも、ミエリン構成蛋白そのものをコードする遺伝子には変異がなく、新規ミエリン関連因子の同定に貢献したものです。そのうちの1系統である VF (vacuole formation) ラットは、京都大学大学院医学研究科附属動物実験施設で発見された、振戦症状を示すミュータントラットで、振戦症状は4～10週齢をピークとしてその後は軽減する、という非常にユニークな発症パターンを特徴とします。病理組織学的には、VF ラットの脊髓白質ではミエリン低形成と軸索周囲の空胞形成が認められます。空胞病変の経時的な病変観察により、空胞病変の減少と振戦症状の改善時期が一致していたことから、空胞病変が振戦症状の発症に関与する可能性を示しました。また、VF ラットのミエリン病変形成には、ミエリン形成細胞であるオリゴデンドロサイト (OL) の分化・成熟異常と、ミエリン形成時の OL 内でのミエリン構成蛋白の輸送異常が関与することを明らかにしました。さらに、VF ラットにおける *Dopey1* 遺伝子のナンセンス変異を同定し、正常ラットの中樞神経系では、DOPEY1 蛋白が OL (OL 前駆細胞および成熟 OL) と神経細胞において強く発現し、ゴルジ装置・エンドソームに局在することを示しました。本研究で同定した VF ラットの原因遺伝子 *Dopey1* は、これまで哺乳動物における機能は未知であり、*Dopey1* の異常を有するモデル動物・疾患は、VF ラット以外に報告されておられません。本研究によって、*Dopey1* が新規のミエリン関連因子であることを初めて示し、ミエリン形成時の蛋白質輸送や OL の分化・成熟において重

要である、という新たなミエリン形成メカニズムを提示しました (図2)。また、DOPEY1 蛋白が、OLに加えて神経細胞においても強く発現している点は非常に興味深く、今後、ミエリン形成・維持における神経細胞/軸索と OL との相互作用を解析する上でも、VF ラットは非常に有用なモデル動物となると期待しています。本研究の成果は2本の論文にまとめ [2, 3], 2016年に日本獣医病理学専門家協会 (JCVP) 奨励賞を受賞しました。

新たな神経軸索ジストロフィーモデル *Hspa8* 遺伝子変異ラットに関する研究

本研究には、博士課程進学前後より10年以上携わっており、現在の主な研究テーマの1つとなっています。神経軸索ジストロフィー (Neuroaxonal dystrophy: NAD) は、神経系におけるスフェロイド (腫大軸索) 形成を特徴とする神経変性疾患です。NAD に分類される代表的疾患には、乳児型神経軸索ジストロフィー (infantile neuroaxonal dystrophy: INAD) など国内の小児慢性特定疾病対象疾患などが含まれており、治療法の確立を目指した病態解明が課題となっています。INAD の *PLA2G6* (phospholipase A2 group VI) 遺伝子変異など、一部の NAD では原因遺伝子が同定されていますが、その病態メカニズムは十分には解明されていません。また、既報の NAD モデル動物は、INAD モデルマウスや *gad* (gracile axonal dystrophy: 逆行性軸索変性) マウスなどのマウスモデル数種に限られていました。獣医学領域では、犬や猫、牛、馬など複数の動物種で NAD が報告されており、とくに犬では、ロットワイラーなど犬種特異的な NAD が国内外で報告されています。日本国内で

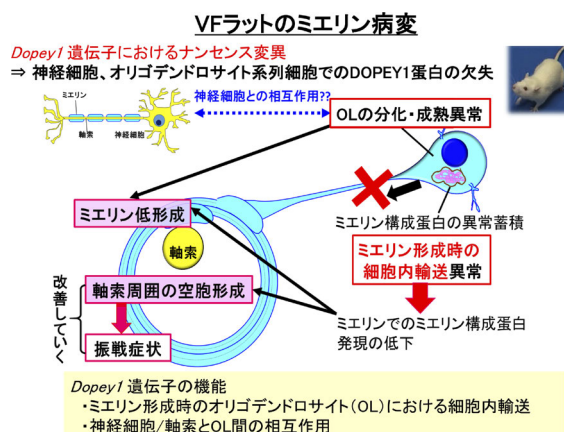


図2 VF ラットの中樞神経系病変のまとめ

は、パピヨンおよびパピヨン・チワワのミックス犬のNADが知られており、ヒトのINADと同一の原因遺伝子が同定されています。私は学部生の頃にパピヨンのNADの自然発症例の剖検例の経験があり、電子顕微鏡レベルでの詳細な病変解析を行っていました[4]。本研究で着目したラットは、若齢時から後肢の歩行異常・運動失調を呈するミュータント系統KKラットであり、京都大学(当時)の芹川先生・庫本先生との共同研究で、原因遺伝子の同定や病態解析を行ってきました。病理組織学的解析の結果、KKラットの脊髄(主に胸髄・腰髄の背索)および小脳・脳幹を中心とした中枢神経系において多数のスフェロイドが観察され、病理組織学的にNADと診断しました。軸索病変は、深部感覚に関連した感覚神経路に主座することも明らかにしています。本系統の病理学的解析には、先述の犬のNAD症例の解析経験が非常に役立ちました。中枢神経系以外にも、坐骨神経などの末梢神経系におけるスフェロイド形成や脾臓・胸腺における異常所見も見出しています。また、遺伝子解析の結果、原因遺伝子として、ラット第8染色体上の*Hspa8* (heat shock protein family A (Hsp70) member 8) 遺伝子におけるミスセンス変異を同定しました。さらに、ゲノム編集技術により、*Hspa8* 遺伝子変異ラットを新たなNADモデルとして確立しました。*Hspa8* 遺伝子はHSPA8 (HSC70: Heat shock cognate 71 kDa protein) 蛋白をコードし、主な機能としてはシャペロン介在性オートファジー (CMA) や軸索輸送(速い輸送と遅い輸送のスイッチの役割) が知られています。近年、HSPA8蛋白の発現やCMAの活性異常が、パーキンソン病や筋萎縮性側索硬化症などの神経変性疾患の病態への関与が示唆されているものの、ヒト・動物のいずれにおいても、*Hspa8* 遺伝子変異によって引き起こされる疾患(神経変性疾患を含む)はこれまでに報告されておらず、新たなNADおよび軸索変性の病態メカニズム解明が期待されます。引き続き、*Hspa8* 遺伝子変異によるNADの病態メカニズムについての詳細な解析を進めているところです。(こちらの研究成果は、神経系の学術雑誌に投稿しており、アクセプト目指してリバイスの対応中です…!)

さて、拙い文章でつらつらと書きつらねましたが、私が幸運だったのは、多くの経験の機会を与え、私が興味をもったことに耳を傾け自由に調べさせてくださる先生方にご指導いただけたこと、とてもアクティブで素晴らしい研究環境に恵まれたことであつたと思います。自分が指導していただく立場だった頃は、先生方が新しいデータを前にして、本当に楽しそうに今後の展望をお話しされており、自身の研究意欲をかきたてられ、一緒にわくわくしながら実験してデータを出していたように思います。助教に着任してから、“指導教員”という立場で学部生の研究指導をするようになってみて、学生の研究指導の難しさを実感しており、日々悩みながら研究に取り組んでいます…。つつい、日々の雑務などに追われてしまい、あまり純粋に研究を楽しめていない、なかなか良いアイデアが浮かびづらくなっているなあ…というのが正直なところです。学位取得10年目という節目を機に、いったん初心に戻ってみて、まずは自分自身が、研究や新しい専門知識・技術を学ぶことの楽しさ・わくわく感を常に感じながら、私が先生方から教わってきたように、学生たちにもその楽しさを伝えていけるような教員・研究者でありたい(なりたい)と思っております。

参考文献

1. Tanaka M, Kuramochi M, Nakanishi S, Kuwamura M, Kuramoto T. Rat polyomavirus 2 infection in a colony of X-linked severe combined immunodeficiency rats in Japan. *J Vet Med Sci.* 2018; 80(9): 1400–1406.
2. Tanaka M, Izawa T, Yamate J, Franklin RJM, Kuramoto T, Serikawa T, Kuwamura M. The VF rat with abnormal myelinogenesis has a mutation in Dopey1. *Glia.* 2014, 62(9): 1530–1542.
3. Tanaka M, Soma K, Izawa T, Yamate J, Franklin RJM, Kuramoto T, Serikawa T, Kuwamura M. Abnormal myelinogenesis in the central nervous system of the VF mutant rat with recoverable tremor. *Brain Res.* 2012, 1488: 104–112.
4. Tanaka M, Yamaguchi S, Akiyoshi H, Tsuboi M, Uchida K, Izawa T, Yamate J, Kuwamura M. Ultrastructural features of canine neuroaxonal dystrophy in a Papillon dog. *J Vet Med Sci.* 2017, 79(12): 1927–1930.

日本実験動物学会からのお知らせ

令和5年度維持会員懇談会の開催

日頃より（公社）日本実験動物学会へのご理解とご支援を頂きありがとうございます。

維持会懇談会は動物実験に関する話題を広く情報共有、周知する目的で開催されています。本年度も現地開催＋ライブ配信のハイブリッドにて下記要領で開催いたします。維持会員の皆様に限らず、実験動物や動物実験にかかわる多くの方のご参加お待ちしております。

財務特別委員会一同

令和5年度（公社）日本実験動物学会 維持会員懇談会

テーマ：パンデミック再来への備え、実験動物の関わりの検証
（現地開催＋ライブ配信）

日時：令和5年11月17日（金）13:00～17:10

会場：川崎生命科学・環境研究センター（LiSE）

アクセス <https://kawasaki-lise.jp/access.php>

参加費：無料

参加申込：JALAS HP 維持会員懇談会より申込書入手（10月27日締切）

<https://www.jalas.jp/meeting/ijikai.html>

I 講演会

「パンデミック再来への備え、実験動物の関わりの検証」 13:00～17:00

1. 理事長挨拶 13:00～13:15

「動物実験の機関管理体制の推進（仮）」

公益社団法人日本実験動物学会 三好一郎 理事長

2. 特別講演 13:15～14:15

座長：今井良悦・桑原正貴

「コロナ後の国内ワクチン開発の現状と問題点（仮）」

国立感染症研究所インフルエンザ・呼吸器系ウイルス研究センター
長谷川秀樹 先生

休憩 14:15～14:35

3. 話題提供 14:35～15:35

座長：西田 淳・山田久陽

1) 14:35～15:05

「霊長類モデルを用いたワクチン有効性評価」

滋賀医科大学 病理学講座 伊藤 靖 先生

2) 15:05 ～ 15:35

「感染症研究に有用な小型実験動物の開発と供給」
公益財団法人実験動物中央研究所 伊藤 守 先生

休憩 15:35 ～ 15:55

3) 15:55 ～ 16:20

「コロナウイルス研究に貢献するゴールデンハムスター：
その繁殖成績と生殖工学の現状について（仮）」
理化学研究所バイオリソース研究センター 小倉淳郎 先生

4) 16:20 ～ 16:45

「感染動物実験の受注の課題と体制整備（仮）」
ハムリー株式会社 小松原博文 先生

4. 企業紹介 16:45 ～ 17:00

II 意見交換会 17:00 ～ 19:00

場 所：TREX Kawasaki River Café
参加費：5,500 円（維持会員、非維持会員のいずれも）

2024 ～ 25 年度理事候補者選挙について（告示）

公益社団日本実験動物学会選挙管理委員会

公益社団法人日本実験動物学会の 2024 ～ 25 年度理事候補者選挙に関わる通知を 2023 年 10 月に行います。

今回の選挙は、電子投票システムを利用し、立候補者の受付も電子投票システム上で実施します。被選挙人名簿（2023 年 4 月 1 日現在）及び電子投票システムによる選挙の方法、スケジュールについて 10 月上旬までに学会のホームページに掲載しますので、それらを確認の上、記載の要領に従って立候補と投票の手続きを行ってくださいようお願いいたします。

第 71 回日本実験動物学会総会の開催

大会長：浅野雅秀（京都大学医学研究科附属動物実験施設）

日 時：令和 6 年 5 月 29 日（水）～ 31 日（金）

会 場：ロームシアター京都 & 京都市勧業館みやこめっせ

〒 606-8342 京都府京都市左京区岡崎最勝寺町 13

<https://rohmttheatrekyoto.jp/access/>

開催案内は大会 URL（準備中）をご覧ください。

Experimental Animals

— 和 文 要 約 —

Vol. 72, No. 4 October 2023

原著

Targeted proteomic analysis reveals that crocodile oil from *Crocodylus siamensis* may enhance hepatic energy metabolism in rats 425–438

Wirasak FUNGFUANG^{1, 2)}, Krittika SRISUKSAI²⁾, Pitchaya SANTATIVONGCHAI³⁾, Sawanya CHAROENLAPPANIT⁴⁾, Narumon PHAONAKROP⁴⁾, Sittiruk ROYTRAKUL⁴⁾, Phitsanu TULAYAKUL⁵⁾ and Kongphop PARUNYAKUL²⁾

¹⁾Kasetsart University Research and Development Institute, Kasetsart University, Ngamwongwan Road, Chatuchak, Bangkok 10900, Thailand, ²⁾Department of Zoology, Faculty of Science, Kasetsart University, Ngamwongwan Road, Chatuchak, Bangkok 10900, Thailand, ³⁾Bio-Veterinary Science (International Program), Faculty of Veterinary Medicine, Kasetsart University, Ngamwongwan Road, Chatuchak, Bangkok 10900, Thailand, ⁴⁾Functional Ingredients and Food Innovation Research Group, National Center for Genetic Engineering and Biotechnology (BIOTEC), National Science and Technology Development Agency, Phahonyothin Road, Khlong Nueang, Khlong Luang, Pathum Thani 12120, Thailand, ⁵⁾Department of Veterinary Public Health, Faculty of Veterinary Medicine, Kasetsart University, Malaiman Road, Kamphaeng Saen, Nakhon Pathom 73140, Thailand

The liver is a key organ governing body energy metabolism. Dietary fats influence energy metabolism and mitochondrial functioning. Crocodile oil (CO) is rich in mono- and polyunsaturated fatty acids that contain natural anti-inflammatory and healing properties. Our study examined how CO affects the expressions of liver proteins involved in energy metabolism in rats. Twenty-one male Sprague Dawley rats were divided into three groups and underwent oral gavage with 3 ml/kg of sterile water (N group), CO (CO group), or palm oil (PO group) for 7 weeks. Body weight, energy intake, liver weight, liver indexes, blood lipid profiles, and liver-energy intermediates were measured. The liver proteome was analyzed using shotgun proteomics, and the functions and network interactions of several candidate proteins were predicted using the STITCH v.5.0 software. Body weights, energy intake, liver contents, and lipid profiles did not differ between the groups. However, hepatic oxaloacetate and malate levels were significantly higher in the CO group than in the PO group. Targeted proteomics reveals that 22 out of 1,790 unique proteins in the CO group were involved in energy-generating pathways, including the tricarboxylic acid cycle and oxidative phosphorylation (OXPHOS), and were correlated with the AMP-activated protein kinase signaling pathway. Cluster analysis of 59 differentially expressed proteins showed that OXPHOS-associated proteins were upregulated in the CO group and that three glycolytic metabolism-related proteins were downregulated in the CO group. CO may enhance hepatic energy metabolism by regulating the expressions of energy expenditure-related proteins.

ApoE 遺伝子欠損は高血圧自然発症ラットにおいて動脈脂質沈着を促進させる439–445

松尾裕之^{1,2)}・川上浩平¹⁾・大原浩貴²⁾・金子武人³⁾・真下知士⁴⁾・山田高也¹⁾・並河 徹²⁾¹⁾島根大学総合科学研究支援センター実験動物部門, ²⁾島根大学病理学講座病態病理学,³⁾岩手大学大学院理工学研究科, ⁴⁾京都大学大学院医学研究科附属動物実験施設

高血圧症と動脈硬化症の多くは深刻な心血管疾患を持つ患者から発見される。それ故、高血圧症と動脈硬化症を同時に発現する動物モデルはリスクが複合するといった研究に使いやすい。そこで我々はCRISPR/Cas9を用いて高血圧自然発症ラット (SHR) のアポリポタンパク質 E (*ApoE*) 遺伝子を欠損させ、高血圧症と動脈硬化症を併せ持つ遺伝的モデルの確立を試みた。我々は *ApoE* 遺伝子の5'末端の13塩基対の欠損を持つ SHR^{*ApoE*(-/-)} の確立に成功し、*ApoE* タンパク質の欠損をウェスタンブロッティングで確認した。SHR^{*ApoE*(-/-)} の血圧はSHRと同等であり、高脂質高コレステロール飼料 (HFD) の摂取が原因でトリグリセリドと同様にLDLコレステロールも有意に増加した。HFDを摂取したSHR^{*ApoE*(-/-)} は8週間後、ヒトの成熟したアテローム性障害に観察される軽い脂質沈着が大動脈と腸間膜動脈に見られた。加えて、動脈硬化症の形成における酸化ストレスの増加の影響を調査するため、ペルオキシレドキシン2 (*Prdx2*) の欠損をSHR^{*ApoE*(-/-)} に導入した。しかしながら、*ApoE* と *Prdx2* を欠損したSHRはアテローム形成を示さなかった。さらに、食塩負荷は脂質沈着の形成を促進したがアテローム形成を促進しなかった。これらの結果は *ApoE* 欠損マウスと比較して、SHR^{*ApoE*(-/-)} は深刻な高血圧症を持っているにもかかわらず動脈硬化症に抵抗性があることを示した。

P53 欠失 K-RasG12V 発現単一細胞由来の多型型横紋筋肉腫細胞株による

新規実験動物モデルの樹立446–453

齋藤浩充・鈴木 昇

三重大学研究基盤推進機構先端科学研究支援センター動物機能ゲノミクス

多型型横紋筋肉腫は、成人の骨格筋に発症する。この腫瘍は悪性度が高く、治療法の解明が急務である。稀な腫瘍であるため、その分子メカニズムや治療標的の解明には、実験系の確立が必要である。我々は、以前、p53 遺伝子欠失と大腿部骨格筋組織での癌型 K-Ras 発現により、多型型横紋筋肉腫が発症することを証明した。この研究において、癌型 K-Ras 発現細胞は多様であり、発症までの期間をコントロールすることが困難であった。我々は、腫瘍形成能をもつ単一細胞由来の細胞株により、これらの問題点を解消した新たな実験動物モデル樹立した。原発腫瘍由来の細胞株の肺転移コロニーの細胞をクローンし310細胞株を、続けてGFP発現RMSg2をクローンした。樹立した全ての細胞株は、皮下移植により安定してヒト多型型横紋筋肉腫と同じdesmin陽性でbizarre giant cellsを含む特徴的な組織型を再現できた。また、RMSg2細胞を皮下移植、または静脈注入したマウスは、肺転移モデルとして利用可能であった。RMSg2細胞株は、多分化能と高い腫瘍形成能をもち、遺伝子発現のレベルでは、RTPCRにより種々の癌幹細胞及び骨格筋に存在するstem/progenitor細胞であるactivated fibro-adipogenic-progenitors, PW1⁺/Pax7⁺ interstitial cells, satellite cellsのマーカー遺伝子を発現していた。我々が樹立したモデルは、*in vitro* で容易に安定して維持でき、*in vivo* で腫瘍組織を再現可能であり、多型型横紋筋肉腫の研究に有用なものになると考えられる。

Nuclear factor of Activated T cellsの転写活性を検出する

レポーターマウスの作出454–459

山崎憲政¹⁾・三浦健人¹⁾・尾形佐和子¹⁾・三浦舟華¹⁾・内村有邦²⁾・佐藤康成²⁾・
利重匡亮²⁾・細見直永¹⁾・Maribet Gamboa³⁾・北村紀子⁴⁾・神沼 修¹⁾¹⁾広島大学原爆放射線医科学研究所疾患モデル解析研究分野, ²⁾放射線影響研究所分子生物科学部,³⁾Department of Ecology, Faculty of Sciences, Universidad Católica de la Santísima Concepción,⁴⁾東京都医学総合研究所ウイルス感染プロジェクト

Nuclear factor of Activated T cells (NFAT) は、免疫応答やその他の生体反応に重要な転写因子である。NFATの活性を *in vitro* および *in vivo* で解析するシステムを構築するため、NFATによって発現調節される enhanced green fluorescent protein (EGFP) 遺伝子コンストラクトを導入したレポーターマウスを作成した。NFATが共転写因子である activator protein (AP)-1 と共結合するヒト IL2 遺伝子の -286 から -265 の配列を6つ連結し、チミジンキナーゼ最小プロモーターと EGFP 遺伝子配列に結合した。得られたレポーターカセットを C57BL/6 受精卵に導入し、トランスジェニック (Tg) マウスを得た。誕生した110匹のマウス中7匹に導入遺伝子が検出され、2系統がレポーターマウスとしての性質を示した。これらのマウスの CD4⁺ および CD8⁺ T細胞における EGFP 蛍光は、CD3 および CD28 を介する刺激により増強された。phorbol 12-myristate 13-acetate (PMA) および ionomycin (IOM) それぞれ単独での刺激は弱く、またそれらの複合刺激は強く EGFP 発現を増強した。刺激に伴う異なるパターンの EGFP 発現上昇が、分化誘導した各種 T細胞サブセットで観察された。ヘルパー T (Th) 1, Th2, Th9 および制御性 T細胞では、PMA + IOM 刺激による EGFP 発現誘導が CD3/CD28 刺激による誘導よりも強力であり、Th17 細胞では両刺激条件で同等の EGFP 発現誘導がみられた。我々が作出した NFAT レポーターマウスは、NFAT/AP-1 が協調作用する転写活性化を T細胞において解析するのに有用である。

AAV9-CMV-iCreの胎盤内注入によるダブルレポーターマウス胚の

多臓器広範囲へのトランスダクション460–467

Natalia Gogoleva^{1, 2)}・Zeynab Javanfekr Shahri^{1, 2)}・野田篤志²⁾・Ching-Wei Liao^{1, 2)}・脇本 新^{1, 2)}・井上由理²⁾・Hyojung Jeon^{2, 4)}・高橋 智^{2, 3, 5)}・濱田理人^{2, 3)}¹⁾筑波大学大学院ヒューマンバイオロジー学位プログラム, ²⁾筑波大学医学医療系解剖学発生学研究室,³⁾筑波大学医学医療系生命科学動物資源センター, ⁴⁾筑波大学医学医療系幹細胞治療研究室,⁵⁾筑波大学国際統合睡眠医科学研究機構

アデノ随伴ウイルス血清型9 (AAV9) は、血液脳関門でさえも通過し、様々な細胞種を効率よく導入できることから、遺伝子導入のツールとして注目されている。本研究では、ダブルレポーター・トランスジェニックマウス (GRR) 胚における AAV9-CMV-iCre の胎盤内注入による導入効率について検討しました。その結果、AAV9-CMV-iCre は、E9.5 から E11.5 の胚において、肝臓、心臓、脳、胸腺、腸を含む複数の臓器のトランスダクションをもたらすことが実証されました。これらの結果は、AAV9-CMV-iCre の胎盤内注入が、GRR マウス胚で広範囲にトランスダクションを行うための実行可能な方法であることを示唆している。

脂肪乳剤の投与はマウスにおいてプロポフォールの麻酔作用を減弱するが
チアミラルとの相互作用は少ない.....468-474

東 倫子¹⁾・田原春早織²⁾・足立裕史^{3, 4)}・里元麻衣子⁵⁾・田村高廣⁶⁾・
松田直之¹⁾・佐藤(朴) 會士²⁾・奥田真弘²⁾

¹⁾名古屋大学医学部名古屋大学医学系研究科救急・集中治療医学分野,

²⁾愛知学院大学歯学部麻酔学講座, ³⁾静岡済生会総合病院救命救急科,

⁴⁾済生会保健・医療・福祉総合研究所, ⁵⁾東邦大学医療センター大森病院麻酔科,

⁶⁾名古屋大学医学附属病院外科系集中治療部

脂肪乳剤は、脂質蘇生法として知られる、薬物の動態を変化させる可能性が報告されてきた。しかし、その詳細は未だに不明である。今回の研究では、プロポフォールとチアミラルとの比較を通じて、容量効果と、それ以外の脂肪乳剤の薬物動態学的な効果（リピッドシンク）を調べた。オスの成獣マウスにプロポフォールまたはチアミラルを静脈内投与した。麻酔薬は生理食塩水、10%および20%大豆油で希釈した。各静脈内注射量は10 ml/kgに設定した。入眠を達成するための50%有効量（ED₅₀）を、プロビット分析によって計算した。容量効果を確認するために0, 10, および20 ml/kgの生理食塩水、または、10%および20%の大豆油を同時に、或いは事前に投与した。その後、別のマウスに2倍及び3倍有効量の麻酔薬を投与し、注射後の麻酔時間を測定した。最後に、初回投与から30秒後に、大豆油を追加投与し、時間を計測した。プロポフォールとチアミラルのED₅₀は5.79 (0.61) (平均 (SE)) および8.83 (0.84) mg/kgだった。脂質による希釈は両方の麻酔薬のED₅₀を増加させた。2倍量投与時の麻酔時間は、プロポフォールで125 ± 35 (平均 ± SD) 秒、チアミラルで102 ± 38秒だった。大豆油の追加投与は、プロポフォールの麻酔時間のみを有意に短縮した。脂肪乳剤の投与が水相中の非エマルジョン状態の遊離プロポフォールを減らして、その麻酔作用を減弱する可能性を示した。この作用は、リピッドシンクの機序による脂質蘇生法を理解する手掛かりになり得る。

Phosphoglycerate kinase (PGK) 1 succinylation modulates epileptic seizures and the
blood-brain barrier.....475-489

Yuemei LUO, Juan YANG, Lijia ZHANG, Zhenzhen TAI, Hao HUANG,
Zucui XU and Haiqing ZHANG

Department of Neurology, Affiliated Hospital of Zunyi Medical University, 149 Dalian Road, Zunyi,
Guizhou 563003, P.R. China

Epilepsy is the most common chronic disorder in the nervous system, mainly characterized by recurrent, periodic, unpredictable seizures. Post-translational modifications (PTMs) are important protein functional regulators that regulate various physiological and pathological processes. It is significant for cell activity, stability, protein folding, and localization. Phosphoglycerate kinase (PGK) 1 has traditionally been studied as an important adenosine triphosphate (ATP)-generating enzyme of the glycolytic pathway. PGK1 catalyzes the reversible transfer of a phosphoryl group from 1, 3-bisphosphoglycerate (1, 3-BPG) to ADP, producing 3-phosphoglycerate (3-PG) and ATP. In addition to cell metabolism regulation, PGK1 is involved in multiple biological activities, including angiogenesis, autophagy, and DNA repair. However, the exact role of PGK1 succinylation in epilepsy has not been thoroughly investigated. The expression of PGK1 succinylation was analyzed by Immunoprecipitation. Western blots were used to assess the expression of PGK1, angiostatin, and vascular endothelial growth factor (VEGF) in a rat model of lithium-pilocarpine-induced acute epilepsy. Behavioral experiments were performed in a rat model of lithium-pilocarpine-induced acute epilepsy. ELISA method was used to measure the level of S100β in serum brain biomarkers' integrity of the blood-brain barrier. The expression of the succinylation of PGK1 was decreased in a rat model of lithium-pilocarpine-induced acute epilepsy compared with the normal rats in the hippocampus. Interestingly, the lysine 15 (K15), and the arginine (R) variants of lentivirus increased

the susceptibility in a rat model of lithium-pilocarpine-induced acute epilepsy, and the K15 the glutamate (E) variants, had the opposite effect. In addition, the succinylation of PGK1 at K15 affected the expression of PGK1 succinylation but not the expression of PGK1 total protein. Furthermore, the study found that the succinylation of PGK1 at K15 may affect the level of angiostatin and VEGF in the hippocampus, which also affects the level of S100 β in serum. In conclusion, the mutation of the K15 site of PGK1 may alter the expression of the succinylation of PGK1 and then affect the integrity of the blood-brain barrier through the angiostatin / VEGF pathway altering the activity of epilepsy, which may be one of the new mechanisms of treatment strategies.

破傷風トキソイド接種によるアカゲザルへの液性免疫誘導490–495

村田めぐみ・コウバ アナスタシア・兼子明久・森本真弓・石上明代・夏目尊好・
鷺崎彩夏・宮部一西脇貴子・鈴木樹理・明里宏文
京都大学ヒト行動進化研究センター

2014年から2015年にかけて、当施設放飼場で飼育されているアカゲザルに破傷風が断続的に発生した。施設の土壌が破傷風菌芽胞で汚染されていることが疑われたため、破傷風発症予防のため破傷風トキソイドワクチン接種が推奨された。しかし、飼育群のうち高齢個体はワクチン接種による免疫応答が不十分となる可能性があり、その場合十分な予防効果が誘導されないことが危惧された。そこで、全年齢層のアカゲザルを対象に破傷風トキソイドを1年間隔で2回接種後3年間の追跡調査を行い、抗体応答の動態を評価した。その結果、ワクチン接種により全年齢層の動物で抗破傷風トキシン特異的抗体が誘導されること、より若年齢の個体ほど高レベルの抗体が誘導されることが明らかとなった。抗体レベルは2回目の接種から1年後にピークを迎え、その後低下したが、高齢個体の抗体レベルは破傷風発症から保護するとされる閾値より高値を維持していた。実際、当施設のアカゲザルは2022年現在までに破傷風の発症は見られていないことも併せ、このワクチン接種プロトコルは高齢個体を含むアカゲザルの破傷風予防に有効であると考えられた。

The analgesic effects of dezocine in rats with chronic constriction injuries.....496–504

Baojun FU, Jingjing JIANG and Yuqiong HUANG

Department of Anesthesiology, Sixth affiliated Hospital of Guangzhou Medical University, Qingyuan People's Hospital, No. 21 Yinquan South Road, Qingcheng District, Qingyuan, Guangdong Province 511518, P.R. China

Neuropathic pain (NP) is caused by diseases or dysfunction of nervous system and has a considerable negative impact on patients' quality of life. Opioid analgesics can be used for NP treatment. However, the effect of dezocine on NC remains unknown. In this study, we aimed to investigate the analgesic and intestinal effects of various doses of dezocine in rats with chronic constriction injuries (CCI). 100 rats were equally divided into 5 groups: the low (D1 group), medium (D2 group), and high (D3 group) doses of dezocine, and sham operation and model groups. The effects of dezocine on pain, analgesic effect, pain response, and tension and contraction frequencies of intestinal smooth muscles were assessed. With an increase in the dezocine dosage, the cumulative pain scores of rats decreased and analgesic effect significantly increased; mechanical withdrawal threshold (MWT) and thermal withdrawal latency (TWL) improved in varying degrees. The expression of the NP-related proteins glial fibrillary acidic protein (GFAP) and connexin 43 (Cx43) was also improved by dezocine treatment. The results of western blot and ELISA showed that IL-6, and monocyte chemotactic protein-1 (MCP-1) levels also decreased significantly with an increase in the dezocine dose, indicated that dezocine alleviated the inflammatory microenvironment. The dezocine exhibited

no significant effect on the tension or contraction frequencies of intestinal smooth muscles of rats. In conclusion, the analgesic effect of dezocine on rats with CCI is dose-dependent and has little effect on the tension or contraction frequencies of intestinal smooth muscles. Our research proved the analgesic effect of dezocine in rats with CCI, and provided further insights into new therapies for NP treatment.

Effect of felodipine on indomethacin-induced gastric ulcers in rats 505–512

Nergis AKBAŞ¹⁾, Bahadır SÜLEYMAN²⁾, Renad MAMMADOV²⁾, Mine GÜLABOĞLU³⁾, Emin Murat AKBAŞ⁴⁾ and Halis SÜLEYMAN²⁾

¹⁾Department of Medical Biochemistry, School of Medicine, Erzincan Binali Yıldırım University, 24030, #Erzincan, Türkiye, ²⁾Department of Pharmacology, School of Medicine, Erzincan Binali Yıldırım University, 24030, #Erzincan, Türkiye, ³⁾Department of Biochemistry, School of Pharmacy, Atatürk University, 25400, #Erzurum, Türkiye, ⁴⁾Department of Internal Medicine, School of Medicine, Erzincan Binali Yıldırım University, 24030, #Erzincan, Türkiye

Felodipine is a calcium channel blocker with antioxidant and anti-inflammatory properties. Researchers have stated that oxidative stress and inflammation also play a role in the pathophysiology of gastric ulcers caused by nonsteroidal anti-inflammatory drugs. The aim of this study was to investigate the antiulcer effect of felodipine on indomethacin-induced gastric ulcers in Wistar rats and compare it with that of famotidine. The antiulcer activities of felodipine (5 mg/kg) and famotidine were investigated biochemically and macroscopically in animals treated with felodipine (5 mg/kg) and famotidine in combination with indomethacin. The results were compared with those of the healthy control group and the group administered indomethacin alone. It was observed that felodipine suppressed the indomethacin-induced malondialdehyde increase ($P<0.001$); reduced the decrease in total glutathione amount ($P<0.001$), reduced the decrease superoxide dismutase ($P<0.001$), and catalase activities ($P<0.001$); and significantly inhibited ulcers ($P<0.001$) at the tested dose compared with indomethacin alone. Felodipine at a dose of 5 mg/kg reduced the indomethacin-induced decrease in cyclooxygenase-1 activity ($P<0.001$) but did not cause a significant reduction in the decrease in cyclooxygenase-2 activity. The antiulcer efficacy of felodipine was demonstrated in this experimental model. These data suggest that felodipine may be useful in the treatment of nonsteroidal anti-inflammatory drug-induced gastric injury.

Effects of taxifolin on aspirin-induced gastric damage in rats:

macroscopic and biochemical evaluation 513–519

Serkan CERRAH¹⁾, Nergis AKBAS²⁾, Fatih OZCICEK³⁾, Renad MAMMADOV⁴⁾, Durdu ALTUNER⁴⁾, Halis SULEYMAN⁴⁾ and Seval BULUT⁴⁾

¹⁾Department of Gastroenterology, Erzurum City Hospital, Ataturk neighborhood, Çat Yolu Street, No: 36, 25240, Erzurum, Türkiye, ²⁾Department of Medical Biochemistry, School of Medicine, Erzincan Binali Yıldırım University, Başbağlar neighborhood 1429. Street No:2/1 24100, Erzincan, Türkiye, ³⁾Department of Internal Medicine, School of Medicine, Erzincan Binali Yıldırım University, Başbağlar neighborhood 1429. Street No:2/1 24100, Erzincan, Türkiye, ⁴⁾Department of Pharmacology, School of Medicine, Erzincan Binali Yıldırım University, Başbağlar neighborhood 1429. Street No:2/1 24100, Erzincan, Türkiye

Taxifolin (dihydroquercetin) is a flavanonol isolated from various plants and has antioxidant effects. The aim of our study was to macroscopically and biochemically investigate the effects of taxifolin on aspirin-induced oxidative gastric damage in rats and to evaluate them by comparison with those of famotidine. Rats were divided into four drug administration groups: a healthy control group, an aspirin-only group (ASG), a taxifolin + aspirin group (TASG), and a famotidine + aspirin group (FASG). The results revealed that in light of the results that we obtained, 50 mg/kg taxifolin had anti-

ulcer effects. At this dose, taxifolin was able to bring COX-1 activities to a level close to those seen in healthy rats with appropriate macroscopic, oxidant/antioxidant, and biochemical parameters. Based on these results, it can be said that taxifolin may be successfully used as a more potent alternative to famotidine, which is the currently accepted treatment for aspirin-induced ulcers.

C57BL/6 垂系統における ADR 腎症感受性の違い 520–525

渡邊正輝・角谷桃香・日裏剛基・佐々木隼人・佐々木宣哉

北里大学獣医学部実験動物学研究室

アドリアマイシン (ADR) 腎症は、慢性腎臓病 (CKD) の病態解明に最も広く用いられているモデルである。しかし、マウスへの適用は BALB/c (BALB) など一部の系統に限られており、標準系統である C57BL/6J (B6J) では ADR 腎症は発症しない。一方、Arifらは、同じく標準系統である C57BL/6N (B6N) が ADR 感受性であることを報告しているが、未だ続報はなかった。そこで、本研究では、B6J 系統の C57BL/6Jcl (JJcl)、B6N 系統の C57BL/6NCrl (NCrl)、C57BL/6NJcl (NJcl) の間で ADR 腎症感受性すなわち腎糸球体障害の感受性の違いを精査した。その結果、ADR 投与により、腎糸球体障害の指標である尿中アルブミン量が有意に上昇したのは NCrl のみであった。また、組織学的解析でも、NCrl でのみ腎糸球体障害の指標であるメサングウム領域の拡張が認められた。しかし、NCrl は両指標共、ADR 腎症感受性系統である BALB と比較して、非常に軽度であった。さらに、眼窩静脈投与と尾静脈投与における薬物血中濃度は同等とされているが、ADR について比較した報告は無い。そこで、ADR の投与経路における尿中アルブミン量を比較したところ、感受性系統の BALB、NCrl 共に、眼窩静脈投与より尾静脈投与の方が尿中アルブミン量が高値であった。本研究により、1) B6 垂系統の内、NCrl が ADR に感受性であること、2) 眼窩静脈投与は尾静脈投与よりも簡便でマウスに対する侵襲性が低い、腎糸球体障害の程度が低いことが明らかとなった。

マウスにおけるゲノム編集効率に影響を与える要因の効率的な

評価システムの構築 526–534

坂井勇介¹⁾・岡部百合¹⁾・板井 元^{2,3)}・塩澤誠司^{1,2)}

¹⁾ 久留米大学医学部疾患モデル研究センター、²⁾ 慶應義塾大学医学部総合医科学研究センター、

³⁾ 株式会社 JAC

ゲノム編集技術は、遺伝性疾患モデルの作成や遺伝子機能解析などを目的とし、実験動物学分野において広く利用されている。しかしながら、非相同末端結合を介した単純なノックアウトと比較して、相同組み換えによるノックイン効率が低いことはこの技術における主要な課題の一つである。これまで多くの研究者がこの課題に取り組み、様々な解決方法が模索されてきたが、十分に解決されたとはいえない。本研究では、マウスの Tyr 遺伝子座において、ゲノム編集の際に容易に遺伝型を判定しうる系を、*in vitro* および *in vivo* 双方で確立した。このゲノム編集では、Cas9 による切断部位と donor template のデザインを工夫することにより、PCR 産物の制限酵素断片長多型 (RFLP) 解析によって野生型、ノックアウトおよびノックインを容易に判別することができる。また、チロシナーゼ遺伝子に温度感受性変異体である H420R 変異が導入されることにより、ノックインマウスをその特異な毛色で判定することができる。この系を用い、マウス胚におけるゲノム編集の効率に与える低分子化合物の効果を評価したところ、ノックイン効率を向上させる低分子化合物を見出すことに成功した。このことから、このゲノム編集システムはノックイン効率を向上させる効果を持つ化合物のスクリーニングに適していると考えられる。

Humanized CD36 (hCD36) mouse model supports the preclinical evaluation of therapeutic candidates targeting CD36..... 535–545

Xiulong XIE^{1–3)}, Zhenlan NIU¹⁾, Linlin WANG¹⁾, Xiaofei ZHOU¹⁾, Xingyan YU^{1–3)}, Hongyan JING^{1–3)} and Yi YANG^{1–3)}

¹⁾Biocytogen Pharmaceuticals (Beijing), 12 Baoshen South Street, Daxing District, Beijing 102600, P.R. China, ²⁾Jiangxi University of Chinese Medicine, No. 1688, Meiling Avenue, Xinjian District, Nanchang, Jiangxi 330004, P.R. China, ³⁾Yangtze Delta Drug Advanced Research Institute, No.100, Dongtinghu Road, Haimen, Jiangsu 226133, P.R. China

CD36 (also known as scavenger receptor B2) is a multifunctional receptor that mediates lipid uptake, advanced oxidation protein products, and immunological recognition, and has roles in lipid accumulation, apoptosis, as well as in metastatic colonization in cancer. CD36 is involved in tumor immunity, metastatic invasion, and therapy resistance through various molecular mechanisms. Targeting CD36 has emerged as an effective strategy for tumor immunotherapy. In this study, we have successfully generated a novel hCD36 mouse (Unless otherwise stated, hCD36 mouse below refer to homozygous hCD36 mouse) strain where the sequences encoding the extracellular domains of the mouse *Cd36* gene were replaced with the corresponding human sequences. The results showed that the hCD36 mice only expressed human CD36, and the proportion of each lymphocyte was not significantly changed compared with wild-type mice. Furthermore, CD36 monoclonal antibody could significantly inhibit tumor growth after treatment. Therefore, the hCD36 mouse represent a validated preclinical mouse model for the evaluation of tumor immunotherapy targeting CD36.

維持会員（五十音順）（97社）

（令和5年10月4日現在）

会 員 名	〒	住 所
アーク・リソース（株）	861-5271	熊本県熊本市西区中原町 383-2
（株）IHI 物流産業システム	135-8710	東京都江東区豊洲 3-1-1 豊洲 IHI ビル
（株）アイテクノ	391-0004	長野県茅野市城山 10-10
アイパークインスティテュート（株）	251-8555	神奈川県藤沢市村岡東 2-26-1
旭化成ファーマ（株）	410-2321	静岡県伊豆の国市三福 632-1
味の素（株）	210-8681	神奈川県川崎市川崎区鈴木町 1-1
あすか製薬（株）	108-8532	東京都港区芝浦 2-5-1
アステラス製薬（株）	305-8585	茨城県つくば市御幸が丘 21
（株）アドスリー	162-0814	東京都新宿区新小川町 5-20 サンライズビル II 3F
（株）アニマルケア	160-0022	東京都新宿区新宿 5-18-14 新宿北西ビル 7F
（株）アニメック	183-0031	東京都府中市西府町 3-17-4
EPトレーディング（株）	162-0821	東京都新宿区津久戸町 1-8 神楽坂 AK ビル 6階
（株）イナリサーチ	399-4501	長野県伊那市西箕輪 2148-188
インビボサイエンス（株）	210-0821	神奈川県川崎市川崎区殿町 3-25-12
エーザイ（株）	300-2635	茨城県つくば市東光台 5-1-3
（株）LSIM 安全科学研究所	105-0023	東京都港区芝浦 1-2-3 シーバンス S 館 8階
（株）大塚製薬工場	772-8601	徳島県鳴門市撫養町立岩字芥原 115
小野薬品工業（株）	618-8585	大阪府三島郡島本町桜井 3-1-1
小原医科産業（株）	165-0022	東京都中野区江古田 4-28-16
オリエンタル酵母工業（株）	174-8505	東京都板橋区小豆沢 3-6-10
花王（株）	321-3497	栃木県芳賀郡市貝町赤羽 2606
科研製薬（株）	426-8646	静岡県藤枝市源助 301
鹿島建設（株）	107-8348	東京都港区赤坂 6-5-11
北山ラベス（株）	396-0025	長野県伊那市荒井 3052-1
キッセイ薬品工業（株）	399-8304	長野県安曇野市穂高柏原 4365-1
九動（株）	841-0075	佐賀県鳥栖市立石町惣楽 883-1
共立製薬（株）	300-1252	茨城県つくば市高見原 2-9-22
協和キリン（株）富士リサーチパーク	411-8731	静岡県駿東郡長泉町下土狩 1188
（有）葛生運送	287-0224	千葉県成田市新田 280-1
クミアイ化学工業（株）	439-0031	静岡県菊川市加茂 3360
（株）クレハ	974-8686	福島県いわき市錦町落合 16
グローバル・リンクス・テクノロジー（株）	433-8116	静岡県浜松市中区西丘町 943-1
（株）ケー・エー・シー	604-8423	京都府京都市中京区西ノ京西月光町 40
KM バイオロジクス（株）	869-1298	熊本県菊池市旭志川辺 1314-1
興和（株）	189-0022	東京都東村山市野口町 2-17-43
サイヤジェン（株）	170-0002	東京都豊島区巣鴨 1-20-10 宝生第一ビル 4階
三協ラボサービス（株）	132-0023	東京都江戸川区西一之江 2-13-16
参天製薬（株）	630-0101	奈良県生駒市高山町 8916-16
（株）三和化学研究所	511-0406	三重県いなべ市北勢町塩崎 363
サンワテクノス（株）	104-0031	東京都中央区京橋 3-1-1 東京スクエアガーデン 18F
（株）ジェー・エー・シー	153-0043	東京都目黒区東山 1-2-7 第 44 興和ビル 3階
GemPharmatech Co., Ltd.	12 Xuefu Rd,	Jiangbei New Area District, 210031, Nanjing, China

会 員 名	〒	住 所
シオノギテクノアドバンスリサーチ (株)	561-0825	大阪府豊中市二葉町 3-1-1
(公財) 実験動物中央研究所	210-0821	神奈川県川崎市川崎区殿町 3-25-12
清水建設 (株)	104-0031	東京都中央区京橋 2-16-1 8 階
ジャクソン・ラボラトリー・ジャパン (株)	222-0033	神奈川県横浜市港北区新横浜 3-17-6
昭和セラミックス (株)	486-0934	愛知県春日井市長塚町 1-1-9
(有) 新東洋製作所	334-0073	埼玉県川口市赤井 2-13-22
(株) 新日本科学安全性研究所	891-1394	鹿児島県鹿児島市宮之浦町 2438 番地
(株) シーエーシー	103-0015	東京都中央区日本橋箱崎町 24 番 1 号
住友化学 (株)	554-8558	大阪府大阪市此花区春日出中 3-1-98
(株) 精研	542-0081	大阪府大阪府中央区南船場 2-1-3
清和産業 (株)	132-0033	東京都江戸川区東小松川 4-57-7
ゼリア新薬工業 (株)	360-0111	埼玉県熊谷市押切字沼上 2512-1
千寿製薬 (株)	650-0047	兵庫県神戸市中央区港島南町 6-4-3
ゾエティス・ジャパン (株)	151-0053	東京都渋谷区代々木 3-22-7 新宿文化クイントビル 14 階
第一三共 (株)	134-8630	東京都江戸川区北葛西 1-16-13
大正製薬 (株)	331-9530	埼玉県さいたま市北区吉野町 1-403
ダイダン (株)	210-0821	神奈川県川崎市川崎区殿町 3-25-22 ライフイノベーションセンター R407
武田薬品工業 (株)	251-8555	神奈川県藤沢市村岡東 2-26-1
(株) 中外医科学研究所	244-8602	神奈川県横浜市戸塚区戸塚町 216 番地
中外製薬 (株)	412-8513	静岡県御殿場市駒門 1-135
千代田テクノエース (株)	221-0022	神奈川県横浜市神奈川区守屋町 3-13
(株) ツムラ	300-1192	茨城県稲敷郡阿見町吉原 3586
帝人ファーマ (株)	191-8512	東京都日野市旭が丘 4-3-2
(一財) 動物繁殖研究所	300-0134	茨城県かすみがうら市深谷 1103
東洋熱工業 (株)	104-0031	東京都中央区京橋 2-5-12 東熱ビル
トーアエイヨー (株)	960-0280	福島県福島市飯坂町湯野字田中 1
トキワ科学器械 (株)	110-0005	東京都台東区上野 5-11-1
Transnetyx	8110	Cordova Rd, Suite 119, Cordova TN, 38016 USA
(株) 夏目製作所	113-8551	東京都文京区湯島 2-18-6
日本エスエルシー (株)	431-1103	静岡県浜松市西区湖東町 3371-8
日本化薬 (株)	115-8588	東京都北区志茂 3-31-12
日本クレア (株)	153-8533	東京都目黒区東山 1-2-7
日本実験動物器材協議会	153-8533	東京都目黒区東山 1-2-7 日本クレア (株) 内
(公社) 日本実験動物協会	101-0051	東京都千代田区神田神保町 3-2-5 九段ロイヤルビル 502 号室
日本実験動物協同組合	101-0032	東京都千代田区岩本町 2-8-10 神田永谷マンション 602
日本新薬 (株)	601-8550	京都府京都市南区吉祥院西ノ庄門口町 14
(一財) 日本生物科学研究所	198-0024	東京都青梅市新町 9-2221-1
日本たばこ産業 (株) 医薬総合研究所	569-1125	大阪府高槻市紫町 1-1
日本たばこ産業 (株) たばこ中央研究所	227-8512	神奈川県横浜市青葉区梅が丘 6-2
日本農産工業 (株)	220-8146	神奈川県横浜市西区みなとみらい 2-2-1 ランドマークタワー 46F
日本農薬 (株) 総合研究所	586-0094	大阪府河内長野市小山田町 345 番地
バイオサイトジェン	101111	中国北京市大興区宝参南街 12 豪院
パニーグループ 日本事務所	370-0074	群馬県高崎市下小島町 290-1
ハムリー (株)	306-0101	茨城県古河市尾崎 2638-2
(一財) 阪大微生物病研究会	565-0871	大阪府吹田市山田丘 3-1 大阪大学内
フィード・ワン (株)	221-0835	神奈川県横浜市神奈川区鶴屋町 2-23-2

会 員 名	〒	住 所
(株) ボゾリサーチセンター	412-0039	静岡県御殿場市竈1284
三浦工業(株)	108-0074	東京都港区高輪2-15-35 三浦高輪ビル2F
Meiji Seika ファルマ(株)	104-8002	東京都中央区京橋2-4-16
持田製薬(株)	412-8524	静岡県御殿場市神場字上ノ原722
(株) ヤクルト本社	186-8650	東京都国立市泉5-11
八洲EIテクノロジー(株)	116-0014	東京都荒川区東日暮里3-11-17
ライオン(株)	256-0811	神奈川県小田原市田島100
レッテンマイヤー・ジャパン(株)	101-0052	東京都千代田区神田小川町3-26-8 エゾ 神田小川町三丁目ビル3F
(株) レナテック	259-1114	神奈川県伊勢原市高森4-19-15

(公社) 日本実験動物学会 会員の入会・退会・変更の申込みについて

会員の入会・変更の申込みは下記の方法で受け付けております。

<https://www.jalas.jp/>

(公社) 日本実験動物学会ホームページより受け付け
会員情報の変更はホームページの会員ページにログインしてできます。

[入会・退会・変更の申込みについてのお問い合わせ] Email office2@jalas.jp

[その他ご不明な点はこちらまで]

公益社団法人 日本実験動物学会 事務局
〒113-0033 東京都文京区本郷6-26-12 東京RSビル3F
TEL 03-3814-8276 FAX 03-3814-3990 Email office@jalas.jp

● 編集後記 ●

やっと秋めいてきました。何か急激に気温が低下し風邪をひきそうです。コロナが落ち着いてきている反面、インフルエンザは猛威を振るっているようです。皆さんお気を付けください。また、異常気象で世界的に洪水など多発しています。国内でも大雨による災害が続いていますね。被災された方々には心よりお見舞いを申し上げます。11月には、維持会員懇談会が17日(金)に開催されます。テーマは、「パンデミック再来への備え、実験動物の関与の検証」(現地開催+ライブ配信)です。ライブ配信は現地に来られない遠方の方々にもご参加していただけるようご配慮をされたとのことですので、皆さんご参加のほどお願いいたします。本号にも最終のお知らせを掲載いたしましたので、シンポジストの先生と演題名をご確認いただけると幸いです。また、本号では昨年の実験動物科学シンポジウムの先生方による特集を組むことができました。タイトルは、「ヒト化動物の最新研究」で、シンポジウムのこのセッションでご発表いただいた全員の先生から寄稿いただきました。序文に引き続き、「ヒト化動物を用いた薬物代謝・動態研究への応用」(明治薬大・小林先生)、「免疫不全マウスを基盤としたヒト化肝臓マウスの開発と医学・創薬研究への活用」(実中研・末水先生)、「ヒト化マウス技術を用いた抗腫瘍免疫反応の誘導」(実中研・高橋先生)、「完全ヒト抗体産生動物の解析と抗体医薬品開発への応用」(鳥取大・里深先生)で構成されています。寄稿いただきました先生方にはこの場をお借りして御礼申し上げます。読者の皆様、是非、ご一読していただくと幸いです。他にも「実験動物感染症の現状」のシリーズで、「免疫不全マウスにおける *Corynebacterium mastitidis* 感染症」(大鵬薬品・櫻木先生)、「研究室・施設便り」では、「岡山理科大学理学部 動物学科動物資源学研究室」(目加田先生)、「維持会員便り」では、「革新的な技術と自動化でライフサイエンスに貢献する、ミウラ」(三浦工業・吉川先生)、「会員便り」には3名の先生(滋賀医大・松本先生、熊本大・中尾先生、大阪公大・田中先生)に寄稿いただきました。次号、本年度の実験動物科学シンポジウムの先生方より単独総説の寄稿や維持会員懇談会の開催報告もありますので、ご期待ください。また、単独で総説をご寄稿いただける先生が居られましたら是非ご連絡をお願いいたします。引き続き、内容の豊富な実験動物ニュースに育てていきたいと思いますので、どうかよろしくをお願いいたします。

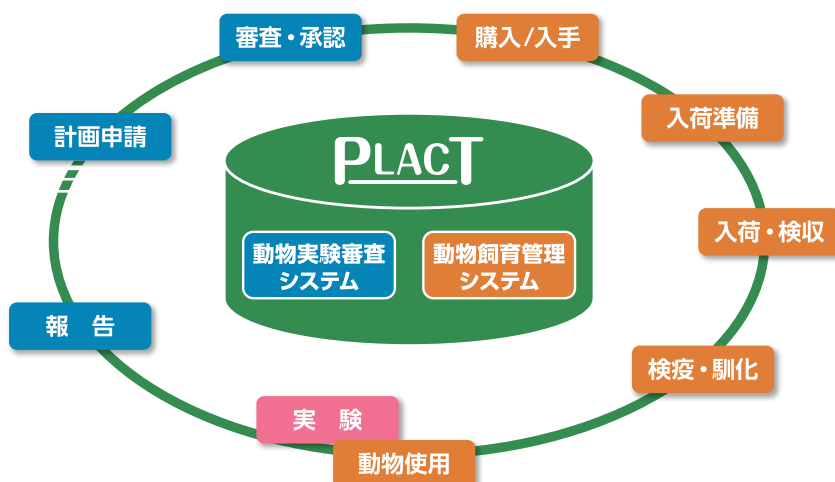
【広報・情報公開検討委員会】

広告掲載一覧

株式会社 シーエーシー	実験動物管理システム
日本クレア株式会社	実験動物等企業広告
北山ラベス株式会社	実験動物等企業広告
日本エスエルシー株式会社	飼料
日本エスエルシー株式会社	実験動物
九動株式会社	実験動物等企業広告
わかもと製薬株式会社	感染症診断キット
株式会社 ケー・エー・シー	実験動物総合受託事業
株式会社 夏目製作所	銅製小物の新ブランド
株式会社 アニメック	ペーパーハット
ダイダン株式会社	実験動物飼育ラック
ハムリー株式会社	二酸化塩素ガス発生デバイス
株式会社東京メニックス	マーマセット用 I C U

動物管理システム **PLACT**

動物実験・遺伝子組換え実験の計画申請から飼育管理まで
動物実験業務の一連の流れをサポート



実験審査

審査の支援機能、各種確認作業の自動化により、審査業務の作業負荷を軽減

- ✓ 委員会向け：付箋機能、変更点表示
- ✓ 事務局向け：教育受講・申請必須項目などのチェック自動化、停滞した審議のリマインド、審査状況の把握
- ✓ 申請者向け：過去申請のコピー、関連実験紐づけ



飼育管理

獣医担当・飼育担当の連携強化、飼育室・飼育動物の情報を一元管理、飼育管理業務をトータルサポート

- ✓ 獣医学的ケア支援：異常所見の共有迅速化、処置記録の管理
- ✓ 飼育管理業務支援：匹数管理、飼育室予約
- ✓ 個体情報の管理：体重、飼育履歴などを個体毎に管理
- ✓ 転記作業の削減：タブレットで飼育室内から観察記録登録

動物管理システム「PLACT」に関するお問い合わせは、下記までご連絡ください



株式会社 **シーエーシー**

PLACT担当

〒103-0015 東京都中央区日本橋箱崎町24-1

E-mail

pharma@cac.co.jp

URL

https://service.cac.co.jp/pharma/drug_discovery/plact





新しい発見を変わらない品質で
動物実験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。

マウス・ラット・コモンマウス・モット

● クローズドコロニー

- **マウス** Jcl:ICR
● **ラット** Jcl:SD, Jcl:Wistar
BrlHan:WIST@Jcl(GALAS)

● 近交系

- **マウス** C3H/HeNjcl, C3H/HeJcl*
C57BL/6Njcl, C57BL/6Jcl*
BALB/cAjcl, BALB/cByJcl*
FVB/Njcl, DBA/2Jcl*, 129^{ter}/SvJcl
● **ラット** F344/Jcl

● ハイブリッド系

- **マウス** B6C3F1/Jcl, B6D2F1/Jcl,
MCH(ICR)/Jcl (Multi Cross Hybrid)

● 疾患モデル

免疫不全モデル

- **マウス** BALB/cAjcl-nu
C.B-17/1cr-scld Jcl
NOD/Shijic-scld Jcl
ALY[®]/NscJcl-aly
● **ラット** F344/Njcl-rnu

1型糖尿病モデル

- **マウス** NOD/Shijcl

2型糖尿病モデル

- **マウス** KK/Tajcl, KK-A^y/Tajcl
BKS.Cg-m+/+Lepr^{db}/Jcl*
● **ラット** GK/Jcl, SDT/Jcl, SDT fatty/Jcl

アスコルビン酸合成能欠如モデル

- **ラット** ODS/Shijcl-od

網膜変性疾患モデル

- **ラット** RCS/Jcl-rdy

関節リウマチモデル

- **マウス** SKG/Jcl

外用保湿剤・外用殺菌消毒薬効果検証モデル

- **マウス** NOA/Jcl

ヒトDuchenne型筋ジストロフィーモデル

- **マウス** C57BL/10-mdx/Jcl

● 遺伝子改変動物

短期発がん性試験モデル

- **マウス** CByB6F1-Tg(HRAS)2Jic

乳腺がん高感受性モデル

- **ラット** Hras128/Jcl

膝がん短期発がんモデル

- **ラット** Kras301/Jcl

生体恒常性維持機構解析モデル

- **マウス** α-Klotho KO/Jcl

- **マウス** klotho/Jcl

アレルギーモデル

- **マウス** OVA-IgE/Jcl (卵アレルギー)
TNP-IgE/Jcl (化学物質アレルギー)

● Germ free

- **マウス** MCH(ICR)/Jcl[Gf], C57BL/6Njcl[Gf]
BALB/cAjcl[Gf]

● コモンマウス・モット

- Jcl:C.Marmoset(Jic) (国内生産)

その他の取り扱い動物

● (公財) 実験動物中央研究所維持系統

● フェレット(輸入販売)

生産地: 中華人民共和国/輸入販売代理店
(株) 野村事務所) を通じて国内販売

実験動物用飼料

一般動物用飼料/家畜・家禽試験用飼料/放射線
滅菌飼料/特殊配合飼料/成分分析

器具・器材

飼育ケージ/飼育機・ラック/自動飼育システム/
クリーンエアシステム/バイオハザード対策システム
/空調設備・排水処理システム/管理・実験機器/
施設計画コンサルティング

受託業務

微生物学的クリーニング/遺伝子改変マウスの作製
/モノクローナル抗体作製/受精卵採取・凍結処理
/凍結受精卵の供給/系統維持及び生産/各種
処置動物作製/マイクロバイオーム研究のサポート
(無菌動物・ノトバイオームマウス作製および
受託試験)/各種受託試験 他

関連業務

動物輸出入/微生物モニタリング/遺伝子モニタリング
/各種データ/情報サービス

業務提携

Physiogenex社(仏): 代謝性疾患領域に特化した薬効
薬理試験受託サービス

* This substrain is at least (a number-20 by definition) generations
removed from the originating JAX® Mice strain and has NOT been
re-infused with pedigree stock from The Jackson Laboratory.



日本クレア株式会社

www.CLEA-Japan.com

[動物・飼料のご注文先: AD受注センター TEL.03-5704-7123]

東京 A D 部	〒153-8533	東京都目黒区東山1-2-7	TEL.03-5704-7050
大阪 A D 部	〒564-0053	大阪府吹田市江の島6-5	TEL.06-4861-7101
東京 器材部	〒153-8533	東京都目黒区東山1-2-7	TEL.03-5704-7600
大阪 器材部	〒564-0053	大阪府吹田市江の島6-5	TEL.06-4861-7105
札幌出張所	〒063-0849	北海道札幌市西区八軒九条西10-4-28	TEL.011-631-2725
仙台出張所	〒983-0014	宮城県仙台市宮城野区高砂1-30-24	TEL.022-352-4417
名古屋出張所	〒465-0093	愛知県名古屋市中区東一社3-79	TEL.052-715-7580

私たちは、生命科学発展のサポートを通じて
人々の幸せと社会に貢献してまいります

科学性と動物福祉の両立を目指した
品質管理と実験管理
日本実験動物協会福祉認証取得施設

実験動物生産・供給

- **SPFウサギ (SPF項目 8項目)**
Kbl:JW(日本白色種)
Kbl:NZW(ニュージーランドホワイト種)
Kbl:Dutch(タッチ種)
- **Healthyウサギ (SPF項目 6項目)**
Kbs:JW(日本白色種)
Kbs:NZW(ニュージーランドホワイト種)
- **実験用イヌ** TOYO Beagle
- **実験用ネコ** Narc:Catus

バイオ関連支援サービス

- 広範囲な動物実験関連業務を代行します
 - 非GLP試験
 - 実験動物長短期飼育
 - 変異型ロドプシンTgウサギ(有色・白色)
 - 各種Tgウサギ作製
 - 担癌マウス作製
- ポリクローナル抗体作製 ● 抗体精製
- モノクローナル抗体作製
- 細胞培養・凍結保存
- GMP対応試験
 - 発熱性物質試験
 - 細胞毒性試験
 - 急性毒性試験
 - 抗原性試験
 - 溶血性試験
- 微生物検査代行(動物・検査セット)



北山ラベス株式会社

Laboratory Animals Breeding & Equipment Supply

〒396-0025 長野県伊那市荒井3052番地 1

TEL.0265-78-8115 FAX.0265-78-8885

LabDiet®
Your work is worth it.®

PicoLab® シリーズ

海外の施設で使用される飼料をあなたの動物へ



SUMMARY OF
IRRADIATED RODENT DIETS

アメリカ合衆国含め世界で販売増加
日本でも人気のLabDiet®製品です!

※本製品はガンマ線照射済飼料です。

※比較的低価格でのご購入いただけます。

☑ 海外の研究で使用されている飼料と
同じ飼料を使いたい

☑ 海外の施設との共同研究で、
使用する飼料を合わせたい

☑ 世界で実績のある飼料を使いたい

日本
総代理店



SLC

日本エス エル シー株式会社

〒431-1103 静岡県浜松市西区湖東町3371-8

TEL(053)486-3178代 FAX(053)486-3156 <http://www.jslc.co.jp/>

ご注文はこちら

関東エリア
(053)486-3155(代)

関西エリア
(053)486-3157(代)

九州エリア
(0942)41-1656(代)

SLCの実験動物



マウス

●アウトブリード

Slc: ddY

Slc: ICR

●インブリード

DBA/1JmsSlc(コラーゲン薬物誘導関節炎)

BALB/cCrSlc

C57BL/6NcrSlc・C57BL/6JmsSlc

C3H/HeSlc

C3H/HeNslc

C3H/HeYokSlc

DBA/2CrSlc

NZW/NSlc

A/JmsSlc

AKR/NSlc

NC/NgaSlc(薬物・アレルギー誘導アトピー性皮膚炎)

C58A/NSlc

129x1/SvJmsSlc

●B10コンジェニック

C57BL/10SnSlc

B10.A/SgSnSlc・B10.BR/SgSnSlc

B10.D2/nSgSnSlc・B10.S/SgSlc

●ハイブリッド

B6D2F1/Slc(Slc:BDF1)

CB6F1/Slc(Slc:CBF1)

CD2F1/Slc(Slc:CDF1)

B6C3F1/Slc(Slc:B6C3F1)

※上記以外の系統については御相談ください。

●ヌードマウス(ミュータント系)

BALB/cSlc-*nu*(*Foxn1*^{nu})

KSN/Slc(*Foxn1*^{nu})

●疾患モデル

BXSB/MpJmsSlc-*Yaa*(自己免疫疾患)

C3H/HeJmsSlc-*lpr*(自己免疫疾患・*Fas*^{lpr})

C57BL/6JmsSlc-*lpr*(自己免疫疾患・*Fas*^{lpr})

C57BL/6Slc-*gld*(自己免疫疾患・*Fas*^{gld})

MRL/MpJmsSlc-*lpr*(自己免疫疾患・*Fas*^{lpr})

NZB/NSlc(自己免疫疾患)

NZBWF1/Slc(自己免疫疾患)

WBB6F1/Ki-*Ki*^{tr}/Ki-*Ki*^{tr}/Slc(肥満細胞欠損貧血・*Ki-Kit*^{tr})

NC/Nga(皮膚炎)

★ SAMR1/TaSlc(非胸腺リンパ腫・SAM系対照動物)

★ SAMP1/SkuSlc(老化アミロイド症)

★ SAMP6/TaSlc(老年性骨粗鬆症)

★ SAMP8/TaSlc(学習・記憶障害)

★ SAMP10/TaSlc(脳萎縮・うつ様行動)

★ SAMP15-*Sgt*(SGT2変異による慢性糖質・脂質代謝障害・うつ様行動)

★ C57BL/6N Daruma(肥満モデル)

★ AKITA/Slc

C57BL/6HamSlc-*ob/ob*(肥満・2型糖尿病・*Lepr*^{ob})

★ HIGA/NscSlc(IgA腎症)

★ B6.KOR/StmSlc-*ApoE*tm(アポE欠損高脂血症・*ApoE*tm)

★ C.KOR/StmSlc-*ApoE*tm(アポE欠損高脂血症・*ApoE*tm)

★ C.KOR/StmSlc-*Traf3ip2*tm(アトピー性皮膚炎・*Traf3ip2*tm)

ラット

●アウトブリード

Slc: SD

Slc: Wistar

Slc: Wistar/ST

●インブリード

F344/NSlc

BN/Slc(薬物誘導性関節炎)

DA/Slc(薬物誘導性関節炎)

LEW/Slc(薬物誘導性関節炎)

ACI/NSlc(免疫)受注

●ヌードラット

Slc: Long-Evans-*nu/nu*

●疾患モデル

★ SHR/Izm(高血圧)

★ SHRSP/Izm(脳卒中)

★ WKY/Izm(SHR/Izmのコントロール)

★ SHRSP/Ezo(AD/HD)

★ SHRSP/Dmcr(NASHモデル【HFC飼料給餌】)

DIS/EisSlc(食塩感受性高血圧症)

DIR/EisSlc(食塩抵抗性)

Slc: Zucker-*fa/fa*(肥満・*Lepr*^{fa})

HWY/Slc(ヘアレスラット)

モルモット

●アウトブリード

Slc: Hartley

ウサギ

●アウトブリード

Slc: JW/CSK

Slc: NZW

ハムスター

●アウトブリード

Slc: Syrian

●疾患モデル

J2N-k(心筋症モデル)

J2N-n(J2N-kのコントロール)

スナネズミ

●インブリード

MON/Jms/GbsSlc

無菌動物(ラット)

●インブリードラット

F344/NSlc(GF)

●インブリードマウス(三協ラボサービス株)

☆ Tsl: C57BL/6Ncr

遺伝子改変動物

●疾患モデル

★ APP^{tg}-Tg[C57BL/6-Tg(APP^{tg})](オligoマモデル-老人痴呆形成モデル)

★ APP^{tg}-Tg[C57BL/6-Tg(APP^{tg})](APP^{tg}の対照動物)

★ Tau609 Tg[C57BL/6-Tg(*tau*609)](タウ病理)

★ Tau784 Tg[C57BL/6-Tg(*tau*784)](タウ病理)

★ Tau264 Tg[C57BL/6-Tg(*tau*264)](Tau609, Tau784の対照動物)

ーノックインマウス

★ OSK-KI[C57BL/6-Tg(OSK-KI)](マウスAβを産生)

(特許第6323876号)

●マウス

C57BL/6-Tg(CAG-EGFP)(グリーンマウス)

★ C57BL/6-Tg(CAG-EGFP)(グリーンマウス)

★ C57BL/6-Tg(CAG-EGFP)(グリーンマウス)

★ C57BL/6-Tg(CAG-EGFP)(グリーンマウス)

★ C57BL/6-Tg(CAG-EGFP)(グリーンマウス)

★ C57BL/6-Tg(CAG-EGFP)(グリーンマウス)

★ C57BL/6-Tg(CAG-EGFP)(グリーンマウス)

★ C57BL/6-Tg(CAG-EGFP)(グリーンマウス)

★ C57BL/6-Tg(CAG-EGFP)(グリーンマウス)

★ C57BL/6-Tg(CAG-EGFP)(グリーンマウス)

★ C57BL/6-Tg(CAG-EGFP)(グリーンマウス)

★ C57BL/6-Tg(CAG-EGFP)(グリーンマウス)

★ C57BL/6-Tg(CAG-EGFP)(グリーンマウス)

★ C57BL/6-Tg(CAG-EGFP)(グリーンマウス)

★ C57BL/6-Tg(CAG-EGFP)(グリーンマウス)

★ C57BL/6-Tg(CAG-EGFP)(グリーンマウス)

★ C57BL/6-Tg(CAG-EGFP)(グリーンマウス)

★ C57BL/6-Tg(CAG-EGFP)(グリーンマウス)

★ C57BL/6-Tg(CAG-EGFP)(グリーンマウス)

(株)星野試験動物飼育所

●アウトブリードマウス

☆ Hos: HR-1(ヘアレス)

☆ Hos: HRM-2(メランイン保有ヘアレス)

●疾患モデルマウス

☆ NSY/HOS(2型糖尿病)

●疾患モデルラット

☆ HOS: OLETF(2型糖尿病)

☆ HOS: 2FDM-*Lepr*^{ob}(2型糖尿病)

(一財)動物繁殖研究所

●インブリードマウス

☆ JCS(4日性周期)

●疾患モデルマウス

☆ C57BL/6Jms-*Lepr*^{ob}(肥満2型糖尿病)

☆ SOD(肥満2型糖尿病)

●アウトブリードラット

☆ lar: Wistar-Ismamichi

☆ lar: Long-Evans

エンヴィーゴ(旧ハランOEM生物動物)

●アウトブリードラット

RocHan¹: WIST

●インブリードマウス

GBA/CoOlaHsd

●免疫不全モデルマウス

C.B-17/IcrHsd-*Prkdc*^{scid}

その他動物

●ミニブタ(Conventional)

☆ (一財)日生研-NPO法人医用ミニブタ研究所

●マイクロミニブタ(Conventional, Clean)

☆ 国内繁殖生産(富士マウス株)

●ヘビータ(SPF)SHIZUOKA EXPIG

☆ 静岡県畜産技術研究所中小家畜センター

●ビーグル犬(Conventional)

☆ 国内繁殖生産(一財)動物繁殖研究所

●フレット(Conventional)

☆ 自家繁殖生産(中伊豆支所)

★印は受託生産動物、☆印は仕入販売動物です。



日本エス エル シー株式会社

〒431-1103 静岡県浜松市西区湖東町3371-8

TEL(053)486-3178代 FAX(053)486-3156

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

営業専用
TEL

関東エリア (053)486-3155(代)

関西エリア (053)486-3157(代)

九州エリア (0942)41-1656(代)



動物販売



試薬販売



体外受精・移植



動物輸送



飼育・管理



微生物検査

鳥栖（佐賀県）、熊本（熊本県）、筑波（茨城県）



KYUDO CO., LTD.
九動株式会社



E-mail: web_req@kyudo.co.jp

URL: http://www.kyudo.co.jp/

確かな実験データは 確実なチェックから・・・

スピーディ

スムーズ

高感度



- 抗体検出感度に優れ、特異性、再現性が高く、どのような場所でも簡便に検査ができ、in-house モニタリングに最適です。
- 酵素標識物として、プロテインAを使用していますので、同一試薬で、マウス・モルモット・ウサギ・ハムスターの抗体検査ができます。

ELISAによる実験動物の感染症診断キット

モニライザ®

MONILISA®

- モニライザ® IVA**(96ウェル)
HVJ, MHV/SDAV, *M. pulmonis*, Tyzzer菌抗体検査用
- モニライザ® HVJ**(96ウェル)
HVJ抗体検査用
- モニライザ® MHV**(96ウェル)
MHV/SDAV抗体検査用
- モニライザ® Myco**(96ウェル)
M. pulmonis 抗体検査用
- モニライザ® Tyzzer**(96ウェル)
Tyzzer菌抗体検査用
- モニライザ® HANTA**(48ウェル)
Hantavirus抗体検査用

公益財団法人 実験動物中央研究所
頒布元 ICLAS モニタリングセンター

〒210-0821 神奈川県川崎市川崎区殿町3丁目25番12号
TEL.044-201-8525 FAX.044-201-8526

製造
販売元



わがもと製薬株式会社

〒103-8330 東京都中央区日本橋本町二丁目2番2号
TEL.03-3279-0381 FAX.03-3279-1271

2019.3

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/>

鋼製小物の新ブランド

<https://leprex.jp>



株式会社 **夏目製作所**



CERTIFIED

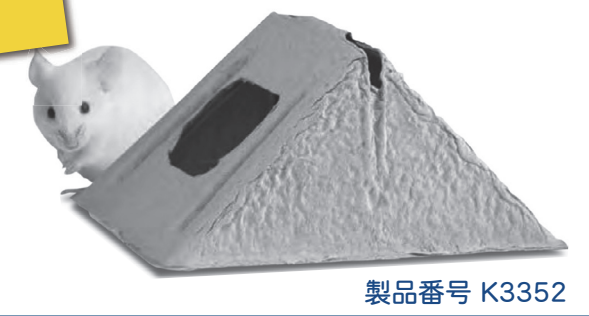
Bio-Huts™

初めてのマウス用検定済みペーパーハット



The Industry Standard
Just Got Better!

- オートクレープにかけられます。
- アクリルアミドを含みません。
- 汚染物質検査済。
- GLP適合原料
- 2方が開いているので観察がしやすい。
- 簡単に割れてHalf Hutが2個になる。



製品番号 K3352

お問い合わせとご用命は.....

● 製造元: 

www.bio-serv.com

● 輸入元:  株式会社 アニメック

〒183-0031 東京都府中市西府町3-17-4 Tel: 042-333-7531 Fax: 042-333-0602

アニメックの製品 URL: <http://animec-tokyo.sakura.ne.jp>
E-mail: animec@theia.ocn.ne.jp

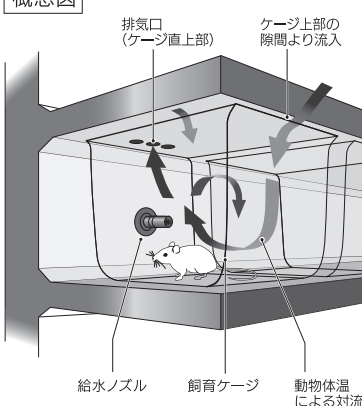
「ダイダン」の一方方向気流ラックがさらに進化！ 特許 第4961404号、第5749901号

実験動物飼育ラック アイラックシステム

Novel One Way Air Flow Rearing Equipment (iRack System)

「アイラックシステム」とは、オープンラックの「易操作性」と、IVCのような「安全性」を同時に兼ね備えた実験動物飼育ラックです。

概念図



オープンラック
IVC Individual Ventilation Cage

▶

アイラックシステム
操作しやすい! 安全! 省エネ!
よこれにくい! 感染リスクが少ない!

● **環境面の向上**

安定した一方方向気流により、アレルギー・感染リスク・臭気の低減、実験精度の向上、動物福祉の向上が可能。

● **操作性の向上**

ラック前面に扉などがなく、ケージの操作性や清掃性が向上。

● **ランニングコスト削減**

さらに小排気風量(当社比30~60%)で、外気負荷・搬送動力エネルギーを削減。

構造と特長

ケージ個別換気方式の採用	良好な気流による均一な温度分布
高度な一方方向気流の形成	床敷交換の削減が可能に
遮蔽物がなくケージの出し入れが容易に	メンテナンスも容易に

ダイダン株式会社

<https://www.daidan.co.jp/>

二酸化塩素ガス発生デバイス HaLu-R (即効型)

HaLu-Rはスティックを折るだけで、短時間で高濃度の二酸化塩素ガスを放出します。
これまでオートクレーブやアルコールに適さず十分な殺菌を行えなかった器材に対して、
高水準な除菌が実現可能です。



① デバイスを折り曲げ、内部の
ガラスアンプルを割ります。



② 10回程度振って、デバイス内
の試薬を十分混和させます。



③ 液体の変色を確認。フィルター
を通してガスが発生します。



お問い合わせ

本社営業所 TEL 0280-76-4477
東京営業所 TEL 048-650-4477
大阪営業所 TEL 06-6306-4477

E-Mail hb@hamri.co.jp
E-Mail tb@hamri.co.jp
E-Mail ob@hamri.co.jp



マーモセット用 ICU (O₂ 保温ケージ)

Marmos 3

マーモス スリー



- ・暖房温度設定 (環境温度～38℃)※冷房機能無
- ・酸素濃度設定 (21%～50%)
- ・殺菌ランプ内蔵 (ON / OFF)
- ・換気モード (ON: 定周期換気、OFF: 換気ハッチ常時閉)

S1/2 タイプ 外寸: W630×D680×H760mm
内寸: W566×D650×H566mm

※ケージごと収容可能な L1/2 タイプ (内寸: W566×D650×H776) も御座います。

マーモセットの術後回復、体調管理に！



〒359-1141 埼玉県所沢市小手指町 2-1442-8
<https://www.t-menix.com>



website



本体: S1/2 タイプ
マルチハンガー、専用ラック (キャスター付き) はオプション