

研究会だより

第67回岡山実験動物研究会例会

平成26年7月11日(金)午後1時30分から午後5時30分までマスカットキューブ(地域医療人育成センター岡山)3階マスカットホール(岡山大学鹿田キャンパス・歯学部棟東側)で樫木勝巳先生・矢田範夫氏(岡山大自然生命科学研究支援センター・動物資源部門)のお世話で開催された。

織田銃一会長による開会のあいさつの後、一般講演が行われた。一般講演1と2の司会は三上崇徳氏(川崎医科大・中央研究部・中央研究センター)が担当された。一般講演1は「バーコードを利用した実験動物飼育管理データシステムの構築」と題して上藤千佳氏ら(岡山大・自然生命科学研究支援センター動物資源部門)が、一般講演2は「ジャコウネズミの核型分析による分布拡大経路の推定(予報)」と題して平中夏海さんら(岡山理科大・理学部・動物学科)が講演された。続いて、一般講演3は「Snks0us:KAT-s系統における精巣萎縮の程度(予報)」と題して松本泰宣氏ら(岡山理科大・理学部・動物学科)が講演され、司会は高橋純夫先生(岡山大・大学院自然科学研究科)が担当された。一般講演4は「食虫類の実験動物Snksにおける腹腔内投与ビタミンA(チョコラA)の催奇形感受性(予報)」と題して本郷沙也加さんら(岡山理科大・理学部・動物学科)が、一般講演5は「マウス繁殖集団で新規に見出された失調歩行形質の遺伝様式とその特徴」と題して古野岬さんら(岡山理科大・理学部・動物学科)が講演され、司会は林泰資先生(ノートルダム清心女子大・大学院人間生活学研究科)が担当された。一般講演6は「マウス卵巣機能制御における転写因子Runx3の生理的役割」と題して小島史也氏ら(岡山大・院・自然科学)が講演され、司会は齋藤昇先生(岡山大大学院環境生命科学研究科)が担当された。

一般講演6が終了した後、休憩を取った。その後、事務局から会務報告があった。なお、会務報告は平成26年度第1回理事会の記載内容(86~88頁)を参照下さい。

会務報告終了後、一般講演7が「ニワトリにおける羽色調節の品種差」と題して高橋徹氏ら(岡山大・院・自然科学)によって講演され、司会は齋藤昇先生(岡山大・大学院環境生命科学研究科)が担当された。

一般講演終了後、特別講演に移った。特別講演は「鳥類の性決定とアロマターゼ遺伝子」と題して工藤季之先生(就実大・薬学部・薬学科)が講演され、司会は竹内栄先生(岡山大・大学院自然科学研究科)が担当された。続いて、特別講演2が行われた。特別講演2は「遺伝子改変マウス

を用いた基礎医学研究」と題して松山誠先生(重井医学研究所・分子遺伝部門)が講演され、司会は国枝哲夫先生(岡山大・大学院環境生命科学研究科)が担当された。

特別講演終了後、本会の事務局担当の国枝哲夫氏が閉会のあいさつを行った。その後、鹿田キャンパス・大学生協食堂で懇親会が持たれ、講師の先生方を囲んで会員相互の親睦を深めた。研究会例会、懇親会とも自然生命科学研究支援センター・動物資源部門の教職員の皆様方のご協力、ご参加をいただいたお蔭で、盛会のうちに執り行うことができた。

一般講演1

バーコードを利用した実験動物飼育管理データシステムの構築

上藤千佳・矢田範夫・上山和貴・荒川雅行・藤井匡寛・平山晴子・樫木勝巳
岡山大学自然生命科学研究支援センター
動物資源部門

<背景>動物実験計画書が承認されないままの実験や、承認された内容と異なる実験の実施、さらには飼育室・実験室内でケージから逸走した動物が発見される例など、動物実験をめぐる多くの不適切事例が報告されている。特に遺伝子組換え実験においてこうした事例が生じることは、研究機関にとって致命的な打撃をもたらしかねない。これらを防止するためには、動物実験計画書や組換えDNA実験計画書の承認状況や承認された内容と実際の実験内容に齟齬はないかなど、実験動物の飼育管理の現場で厳密なチェックが必要であるが、その作業は膨大かつ煩雑である。既製品のシステムも市販されているものの、導入コストと実際の使い勝手の点でハードルが高い。そこで我々は、バーコードとタブレットPCを利用した飼育管理システムの構築を試みた。その基本的なコンセプトは①第一に、技術者が現場で動物実験計画書の情報データにすばやくアクセスでき、容易に検索できること、②第二にそうしたシステムをできるだけ安価に、そして状況に応じてできるだけカスタマイズしやすいものにするこ、以上2点であった。

<方法>当施設ではケージ単位で飼育カードを割り当て、搬入申請書の受付番号、研究者所属・氏名、系統名、搬入年月日、収容数の情報を手書きでカードに記載している。また遺伝子組換え動物は一般の動物とは異なる色のカードで区別している。

今回我々は太さの異なる2種類のバーで13桁の数字を組み合わせる一般的なJANコードを用いた飼育管理データシステムを開発した。まず1枚のケージカードに12桁の数字を付与し、ラベルプリンター(KING JIM TEPPRA PRO)で作成したバーコードを貼付する。一方、ホストPC側にはExcel VBAを用いてデータベースを作成し、12桁の番号

に対応したケージの情報を登録する。各飼育室ではタブレット PC とバーコードリーダーを使ってケージ毎のデータをホスト PC から呼び出し、動物数の増減、繁殖状況等最新の情報を入力する。これらは研究者ごとの動物台帳と瞬時に同期され、飼育状況や動物実験計画書の承認の有無および承認済み動物実験計画書の内容を迅速正確に確認することができる。またデータベースには動物実験計画書の有効期限など、必要な項目の追加も可能であり、拡張性は非常に高い。また 1 セットが 15 万円以下で導入できるなど、コストも低く抑えることができる。

＜結論＞当施設でのこのシステムの全面稼働に向けて、これまで一部の飼育エリアで試運転をおこなってきた。その結果、以下のような利点があることが確認された。

- ①承認された動物実験計画書の内容どおりに実験が行なわれているかどうかを容易にチェックすることができるようになった。
- ②また、動物実験計画書や組換え DNA 実験計画書の有効期限を表示させることで、いわゆる「うっかり失効」を未然に防ぐことができる。
- ③そして、繁殖をしているケージでは交配日、出産日、離乳予定日を表示させることによって、無秩序な繁殖を防ぎ、効率的な繁殖が可能になる。これは結果として Reduction にも貢献することである。
- ④飼育室においてケージ単位で最新の動物数を管理することによって、万が一飼育室内で逃げている動物を発見した場合などでも、どこから逃げたのか、元のケージを特定することも容易になるだろう。

以上の通り、われわれが開発した飼育管理データシステムを用いた飼育管理の現場での動物実験実施状況のチェック体制の厳密化は、法令を順守した適正な動物実験の実施と使用数の削減をはかる上で有用であった。

一般講演 2

ジャコウネズミの核型解析による分布拡大経路の推定 (予報)

平中夏海・城ヶ原貴通・織田銑一
岡山理科大学理学部動物学科

【はじめに】ジャコウネズミは食虫目トガリネズミ科に分類される小型哺乳類であり、南アジア、東南アジアの熱帯、亜熱帯地域を中心に東はグアム島、西はアフリカ東岸、北は日本列島南部まで広く分布していることが報告されている。本種の分布拡大経路については、核型解析や遺伝子解析により実施されている。これらより本種は、原産地と考えられるインド北部から南下した個体群と、マレー半島方面へ分散した個体群がいると推察されている。これに加え、貿易により海を渡り、

スリランカからマレー半島へ、そしてその他東南アジア島嶼部、大陸沿岸部や日本へ移入したことが示唆されており、自然分布に加え、人の移動に伴って分布を拡大したと考えられている。このように、東南アジア・東アジアの分散経路についての分析は行われているが、インド洋西部沿岸地域の移動の詳細については不明である。本種の標準核型は $2n=40$ であるが、インド南部、スリランカ、マレー半島において $2n=30\sim 40$ の核型変異が報告されており、本種がインド南部あるいはスリランカよりマレー半島に人為的に分布を拡大した証拠として示されている。本研究では、既報の地域を含め、インド洋西部沿岸地域を中心とした広域的なジャコウネズミの移動経路を解明するための一指標として、核型解析を行なった。

【材料と方法】サンプルは、与那国産 1 個体、パキスタン産 9 個体、マレーシア産 2 個体、マダガスカル産 16 個体、中国産 3 個体のサンプルを分析中である。核型解析は、尾椎より繊維芽細胞を培養し、固定した後、ギムザ染色を行い、観察した。1 個体につき 30 個の細胞の観察を行い、核型を決定した。

【結果と考察】現段階において、与那国産 1 個体、マレーシア産 1 個体、パキスタン産 4 個体、マダガスカル産 2 個体の染色体数を確認した。確認した全てのサンプルの染色体数は $2n=40$ であった。マレー半島以東及び東アジアの染色体数は $2n=40$ 、マレー半島においては $2n=36\sim 40$ とされている。マレー半島以東の地域における結果は、既報の核型と同じであった。パキスタンの交易ルートとしては、シルクロードの時代より北方からの陸路ならびにインド亜大陸沿岸の海路が知られている。一方、マダガスカルについては、11 世紀頃よりインド洋交易（と人の移住）がある。また、近隣のモーリシャス、レユニオン、コロモ諸島にもジャコウネズミが生息しており、モーリシャスの個体群はミャンマーの個体群と近縁であるとされている。今後は C バンドや G バンドといった各種分染法による解析も加え、入手したサンプルについて観察を進めていく予定である。

一般講演 3

スunks Ous:KAT-s 系統における精巢萎縮の程度 (予報)

松本泰宜・池本眞希・城ヶ原貴通・織田銑一
岡山理科大学・理・動物

【はじめに】スunksとは、食虫目トガリネズミ科ジネズミ亜科ジャコウネズミ属に属する小型哺乳類で、ジャコウネズミ (*Suncus murinus*) の実験動物名である。KAT-s 系統は、精巢萎縮 (small testis) 個体が散発する系統として維持してきた。1997 年にスリランカ産とカトマンズ産を交配し育成を開始した SK 系統で見つかった小精巢個体

♂の同腹♀を KAT 系統♂に交配し、同じように同腹♀をさらに KAT♂に戻し交配を継続して作出・維持されてきた。作出開始時より、小精巣個体が散発し、精巣は正常の大きさから痕跡状態の精巣もみられた。しかしながら現在の小精巣の頻度・現状は不明である。そこで KAT-s 系統の精巣測定を行い、サイズや出現頻度を含め精巣萎縮の程度を評価した。

【材料と方法】精巣萎縮を散発する KAT-s は、岡山理科大学動物学科で飼育・繁殖しているスunks 系統である。KAT-s 系統の維持は、精巣萎縮の兄弟を持つ雌個体に KAT 系統を交配することで行っている。KAT-s 系統の精巣計測は出生 30 日齢の個体を用いた。計測は、安楽死させ、体重測定した後、左右両方の精巣を摘出し、精巣の長径・短径・重量を計測した。また、精巣の組織標本 (H. E. 染色) を作成し、精子形成の有無を観察した。

【結果と考察】スunks KAT-s 系統約 90 個体の精巣を摘出・計測した。その内、30mg 以下の精巣を持つ個体は 4 個体のみであり、最小重量は 23mg であった。1997 年に SK 系統で見つかった突然変異体の精巣は重量 5mg であることから、本研究でみられた精巣は、小精巣としてはかなり大きいことが明らかとなった。精巣の長径は最小 4.29mm, 最大 7.67mm, 短径は最小 2.56mm, 最大 5.64mm であった。精巣重量に対して精巣長径・短径はともに正の相関を示したが ($p < 0.001$), 個体の体重に対する精巣の重量との間には、相関は認められなかった ($p > 0.05$)。また、最小精巣の組織標本を観察したところ、精子の形成は確認されたが、通常の大さの精巣に比べ極端に精子数ならびに精子密度が少なかった。このような精巣萎縮♂個体の姉妹から系統育成を再構築し、後代に精巣萎縮個体の出現頻度が上昇するか、また、こうした精巣萎縮個体の繁殖能力があるのか、今後も KAT-s 系統の精巣を調べ、モデル系統の育成を継続する予定である。

一般講演 4

食虫類の実験動物スunksにおける腹腔内投与ビタミン A (チョコレート A) の催奇形感受性 (予報)

本郷沙也加・織田銃一
岡山理科大学理学部動物学科

【はじめに】ビタミン A は 1914 年エルマー・ヴァーナー・マッカラムによって発見され、夜盲症や免疫力の向上に効果があるとされる。一方で過剰摂取による健康被害が報告されており、とくに問題視されているのが奇形児の出生である。催奇形性に関してはマウス、ラット、ハムスター等で多数報告されているが、食虫類のスunksでは 1980 年代に報告されただけである。そこでビタミン A の催奇形感受性について検証を行った。

【材料と方法】使用したスunks (*Suncus murinus*) は岡山理科大学で系統維持されているネパール・カトマンズ産野生由来の KAT で、バングラデシュ産由来の BK に次ぐサイズの大きい系統である。マウスはクローズドコロニーの Slc:ICR である。スunks の場合は交配した翌日を 0 日とし、9 日目に子宮の膨らみを触診で確認した。マウスは交配翌朝に膈栓を発見した日を妊娠 0 日とした。使用したビタミン A はエーザイ株式会社のチョコレート筋注薬、5 万国際単位/ml (レチノールパルミチン酸エステル 33.333mg/ml) で腹腔内に単回投与を行った。マウスの場合は g 体重あたり 10, 25, 50, 100, 200, 400, 800 国際単位 (IU) を妊娠 7 日と妊娠 10 日に投与した。スunks の場合は g 体重あたり 10, 25, 50, 100, 200 IU (その後 5, 17.5, 20, 30 を追加) を妊娠 9 日と妊娠 12 日に投与した。それぞれの投与日は発生過程の比較からビタミン A の顔面あるいは四肢の発生に影響し易いと考えられる妊娠日とした。対照群には同量の生理的食塩水を投与した。マウスは妊娠 18 日、スunks は妊娠 29 日に胎児の外表に関して実体顕微鏡下で観察した。

【結果と考察】ICR マウスでは 200 IU 以下では奇形はみられず 400 IU でスunks と似た奇形が観察された。800 IU では死胚が増加し生存仔はすべて奇形 (外脳症を含む) であった。スunks KAT 系統では 5 IU で奇形は見られず、10 IU から軽微な奇形の発症率が増加し、50 IU 以上では死胚となった。妊娠 9 日投与では顔面の疣、眼球突出、眼瞼開存、無耳、耳下垂、小口、小顎が見られた。妊娠 12 日投与では内反足、短肢、短指、合指、曲尾が見られた。このことからスunks ではマウスに比して少量のビタミン A 投与で奇形が発生することが検証でき、マウスとの催奇形感受性の種差が判明した。奇形の種類は同傾向のため、奇形を引き起こすメカニズムは共通であるものの、胎児に到達するビタミン A 量の相違が考えられる。今後は感受性のデータを確定するとともに、ビタミン A の代謝、ビタミン A 貯蔵細胞、飼料、体内の脂肪量、その他の要因について検討を加えていく予定である。

一般講演 5

マウス繁殖集団で新規に見いだされた失調歩行形質の遺伝様式とその特徴

古野 岬・織田銃一
岡山理科大学理学部動物学科

【はじめに】マウス・ラットなどの実験動物では失調歩行を示すミュータントが多数報告されており、近年ではノックアウト動物も作成されている。それらの原因遺伝子は多様で、演者の一人・織田が関わったミュータントでは Rolling マウス (カルシウムイオンチャネル遺伝子変異, 第

8 染色体), Shambling マウス (髄鞘構造に関与する Caspr 遺伝子変異, 第 11 染色体), Joggle マウス (トランスポゾン挿入によるカルシウムイオンポンプ ATPase 遺伝子発現低下, 第 6 染色体), Dop (dilute opisthotonus) ラット (ミオシン Va 遺伝子変異, 第 8 染色体) がある。

2012 年に岡山理科大学理学部動物学科の実習用 ICR マウス (Slc:ICR 由来) 繁殖集団で, 失調歩行を示すマウスが散見された。遺伝性を想定し, 2013 年から交配実験をすすめてきた。今回は交配実験の結果と若干の形質の特徴を報告する。

【材料と方法】歩行失調を示した♂マウス (Slc:ICR 由来) は正常歩行する♀と交配し, その F1 を♂親に交配したところ歩行異常形質が分離し, 遺伝することを確認した。そのため実習用の繁殖集団とは別の系統として育成を開始した。通常の交配実験によって遺伝様式を求め, 交配記録からは初産日齢, リッターサイズ, 保育能力, 離乳率などの繁殖成績を求めた。また正常個体と対比しながら生後の行動発達を観察した。

【結果と考察】交配実験から失調歩行形質個体の出現率はそれぞれ, ヘテロ型♂×劣性ホモ型♀: 44.7%, 劣性ホモ型♂×ヘテロ型♀: 49.2%, 劣性ホモ型♂×優性ホモ型 (正常) ♀が 0% となった。性比に偏りはみられなかった。これらのことから, この形質は常染色体上の単純劣性遺伝子により支配されていることが判明した。そこでこの遺伝子を行動の特徴から Wobbling Okayama マウス (遺伝子記号: *wobl*) と命名した。失調歩行形質は歩行する際に全身が揺れ, 前肢より後肢の方が顕著である。これらの症状は個体ごとにわずかに強弱があり, 加齢により症状の進行もわずかに認められた。失調個体の♂♀とも通常飼育が可能であった。失調歩行形質は生後 10 日前後までは正常と区別しがたいが, 生後 15 日前後までには判別が可能であった。繁殖能力は *wobl* ホモ型の♂♀ともに有しており, 交配は可能であるが成功率は正常♂♀程ではない。*wobl* ホモ型♀の哺育能力はやや劣る傾向がみられ, 調査中である。場合によっては育児放棄モデル動物としての可能性も考えられる。*wobl* ホモ型動物を生産するにはヘテロ同士の交配が効率的かもしれないが, 遺伝子保存及び系統維持としての交配であるならば♀ヘテロ型×♂*wobl* ホモ型の交配がベターと考えられた。強制ヘテロ近交系 WOB-*wobl*/+ の育成は現在 F4 まで進行中である。遺伝子座を確定するためにはマッピング用の交配が必須であるが, そのためには日本産野生マウス由来の近交系 MSM (マイクロサテライト DNA の変異が大きい) を導入し, 交配計画をたてる必要がある。

一般講演 6

マウス卵巣機能制御における転写因子 Runx3 の生理的役割

Transcription factor Runx3 regulates ovarian functions in mice

小島史也¹, 斉藤優佳¹, 土家由紀子¹, 御興真穂^{1,2}, 竹内 栄^{1,2}, 高橋純夫^{1,2}

¹岡山大学院自然科学研究科生物科学専攻,

²岡山大理学部生物学科

Runx3 は Runt ドメイン転写因子の 1 つである。我々はこれまでに *Runx3* 遺伝子を欠損させたマウス (*Runx3*^{-/-}マウス) の雌は無排卵であり不妊であることを明らかにしてきた。しかしながらマウス卵巣における Runx3 の役割は不明である。そこで本研究ではマウス卵巣における卵胞発達制御およびステロイド合成制御における Runx3 の役割の解明を目的とした。

1. マウス卵巣における *Runx3* mRNA 発現

in situ hybridization 法により, マウス卵巣における *Runx3* mRNA 発現局在を解析した。*Runx3* mRNA は一次卵胞, 二次卵胞および胞状卵胞の顆粒膜細胞に発現しており, 黄体では発現していないことが分かった。

2. *Runx3* 欠損による卵胞発達の低下

卵巣内では卵胞は一次卵胞から二次卵胞を経て胞状卵胞へと発達し, 排卵に至る。3 週齢の *Runx3*^{-/-}マウス卵巣の一次卵胞及び胞状卵胞数は野生型マウスと比べ減少していた。また二次卵胞数は野生型マウスと比べ増加していた。

卵胞発達は二次卵胞以前までは下垂体前葉ホルモンの 1 つである卵胞刺激ホルモン (FSH) 非依存的に進行することから, *Runx3*^{-/-}マウスにおいて卵巣内の卵胞発達の機能が低下していることが考えられた。

3. *Runx3* 欠損によるステロイド合成酵素遺伝子の mRNA 発現の低下

卵巣ではステロイドホルモンであるエストロゲンが合成される。Real-time PCR 法により, マウス卵巣におけるステロイド合成酵素遺伝子の mRNA 発現を解析した。3 週齢の *Runx3*^{-/-}マウス卵巣において, ステロイド合成酵素である SCC の遺伝子である *Cyp11a1* および Aromatase の遺伝子である *Cyp19a1* の mRNA 発現が野生型マウスに比べ減少していた。8-9 週齢の *Runx3*^{-/-}マウス卵巣において, *Cyp11a1* mRNA 発現が野生型マウスに比べ減少していた。このことから *Runx3*^{-/-}マウスにおいて卵巣のステロイド合成にかかわる遺伝子の発現が低下していることが考えられた。

以上の結果から, Runx3 は雌マウスの卵巣において卵胞発達およびステロイド合成の制御に関与している可能性が示唆された。

一般講演 7

ニワトリにおける羽色調節の品種差

Breed difference in the regulation of feather coloration in chickens

高橋 徹, 西尾香織, 御輿真穂, 高橋純夫, 竹内 栄
岡山大大学院自然科学研究科生体統御学
グループ

ニワトリの羽色は主に二種類のメラニン色素に起因する。羽包メラノサイトが産生する暗色のユーメラニンと、明色のフェオメラニンである。これらのメラニン色素の合成はメラノコルチン系により制御されており、メラノコルチン1受容体 (MC1R) にメラノコルチンが結合することでユーメラニン合成が促進され、アグーチシグナルタンパク (ASIP) が結合することでフェオメラニン合成が促進される。

ニワトリには、成鳥で羽装色に顕著な雌雄差を示す品種がある。おかやま地どりもそのひとつで、オスは鞍部の羽が明るく胸部の羽が暗い婚姻色パターンを示すのに対し、メスは鞍部の羽が暗く胸部の羽が明るい逆影の保護色パターンを示す。当研究室の先行研究により、この羽装色の雌雄差は雌性ホルモン (エストロゲン) による *ASIP* 遺伝子の発現制御に起因すると結論付けられた (Oribe *et al.* 2012)。

本研究では、羽装色の雌雄差が *ASIP* 発現の雌雄差に起因することがニワトリで一般に言えるのかどうかを検討するため、おかやま地どりと同様な羽装色の雌雄差を示すトサジドリにおける羽装色と *ASIP* 発現との相関を調べた。

1. トサジドリにおける *ASIP* 発現と羽色との相関

おかやま地どりでは、成鶏のオス鞍部やメス胸部の明色の羽で *ASIP* class 1 mRNA の発現レベルが高く、オス胸部やメス鞍部の暗色の羽で発現が低い (Oribe *et al.* 2012)。RT-PCR 解析の結果、トサジドリでも、成鶏のメスは鞍部の暗色羽で発現が低く、胸部の明色羽で発現が高かった。また、オスの鞍部の明色羽でも発現が高かった。しかし、オス胸部の暗色羽では、オス鞍部やメス胸部の明色羽を凌ぐ高発現が観察された。このことは、トサジドリの (少なくとも胸部の) 羽色は *ASIP* によって決められていない可能性を示唆する。

2. トサジドリの羽色がメラノコルチンにより決定される可能性

メラノコルチン産生に働くプロホルモン転換酵素 1, 2 (*PC1*, *PC2*), 及び MC1R にメラノコルチンが結合することで発現が亢進する *P-protein*, *TYRP1* の発現を RT-PCR 解析した。その結果, *PC1*, *P-protein*, *TYRP1* の発現は、明色羽と比して暗色羽で有意に高かった。また, *PC2* も同様な傾向を示した。このことは、トサジドリの (少なくとも胸部の) 羽色は *PC1*, *PC2* により産生されるメラノコルチンによって決められている可能性を示唆する。

羽色調節の品種差が何によるのか、トサジドリの胸部で *ASIP* が高発現するのはなぜか、そして、その高発現が羽色に反映されない理由は何なのか、については今後の課題である。

特別講演 1

鳥類の性決定とアロマターゼ遺伝子

工藤 季之
就実大薬学部薬学科

有性生殖は、進化の大きな原動力の一つである。有性生殖を通じた遺伝情報の交換は、多細胞生物から単細胞生物に至るまで広く認められている。脊椎動物では、精巣で精子を作り出すオスと、卵巣で卵を作り出すメスという二つの性による有性生殖が行われる。同じ種の生物は、基本的にはほぼ同様の遺伝情報を持ちながら、ある個体はオスへ、ある個体はメスへと性分化が進んでいく。性的に未分化な状態から分化した状態へ移行するきっかけを性決定とよぶが、性決定の機構は生物種により極めて多様である。

哺乳類は、一部の例外を除き、XY 型の性染色体による性決定様式をとっている。オスのみがもつ Y 染色体上に存在するオス化マスター遺伝子が働くことにより、個体の性分化がメス型からオス型へとシフトする。現在、このオス化マスター遺伝子として知られているのが、SRY 遺伝子である。一方、鳥類は、哺乳類とはちょうど裏表の ZW 型の性染色体による性決定様式をとっている。様々な性分化に関与する遺伝子は見つかっているものの、現在のところ、性決定のマスター遺伝子と考えられるものは同定されていない。

脊椎動物の性分化に重要な役割をはたすものの一つに、性ホルモンがある。アロマターゼは、アンドロゲンをエストロゲンに変換する酵素で、性分化の際の発現が明瞭な性的二型性を示す。鳥類においては、個体発生時にエストロゲンの作用を阻害することで、メスからオスへの性転換が起こることが知られている。また逆に、エストロゲンを作用させる、もしくはアロマターゼ遺伝子を強制発現させることで、オスからメスへの性転換が起こることが示されている。このことから、鳥類における性決定のマスター遺伝子は、直接あるいは間接的にアロマターゼ遺伝子の発現を調節することにより、性分化を制御していると考えられる。

これまで、このようなコンセプトのもとで、鳥類のアロマターゼ遺伝子の解析を行ってきた。しかしながら、鳥類を実験動物として使用する際に直面する問題のため、その進行は思うに任せないのが現状である。鳥類を使うと、何がどう難しいのか。今回は、その苦闘の歩みを披露させていただくとともに、鳥類の性決定がどこまで解明されたのか、これからどのようなブレイクスルーが必要なのかをお話しさせていただきたい。

特別講演 2

遺伝子改変マウスを用いた基礎医学研究

松山 誠
重井医学研究所 分子遺伝部門

私は大学院修士課程から現在までジーンターゲットングの手法を用いて研究を行ってきました。今回は遺伝子改変マウスを用いた白内障・腎不全に関する研究をご紹介できればと考えています。

①ビメンチンのリン酸化部位に変異を導入した遺伝子改変マウスの解析

ビメンチンは細胞骨格を形成する中間系フィラメントの1つであり、主に間葉系細胞・がん細胞に存在する。またビメンチンの構築制御はリン酸化を通じて行われる。これまでの研究で、リン酸化反応が分裂期における娘細胞への均等分配に必要である事が明らかにされてきた。しかしマウスなどを用いた個体レベルにおいて、ビメンチンのリン酸化の生理的な機能はほとんど解明されていない。そこでビメンチンの「細胞周期に依存したリン酸化部位特異的」変異マウスの作製・解析を行い、ホモ変異マウスにおいて白内障を生じる事が明らかになったのでその報告を行う。ホモ変異マウスでは、生後2ヶ月頃から眼の水晶体の線維変性・配列異常が生じている事が分かった。また、細胞分裂が終了しているにもかかわらず、2つの娘細胞が完全に断裂されていない細胞が見られた。さらに、このマウスの水晶体の細胞に多倍体の細胞が認められた。すなわち、今回作製した遺伝子改変マウスにおける白内障という表現型は、このマウスのビメンチンが細胞周期依存的にリン酸化されない事によって、分裂期の異常を引き起こした結果である事が示唆された。

②急性腎不全における Sfrp1 の役割

Sfrp 遺伝子は Wnt シグナルの抑制因子であり、これまで5種類の Sfrp 遺伝子が知られている。Sfrp は発生過程に重要な役割を果たすが、病態との関連の研究はほとんど進んでいない。そこで本研究では Sfrp サブファミリーの中でも腎臓に強い発現が見られる Sfrp1 に注目し、Sfrp1 モノクローナル抗体や Sfrp1 ノックアウトマウスを使った解析から、急性腎不全時に Sfrp1 が重要な役割を果たすことが明らかになったのでその報告を行う。片側尿管結紮 (UUO) を施したマウスを用いて、腎臓における Sfrp1 タンパクの量を検討したところ、腎不全を起こさせない腎臓に比べ、腎不全を起こさせた腎臓では Sfrp1 タンパクの発現量の増加が認められた。次に、野生型と比べ Sfrp1 が欠損したマウスは、UUO による腎不全を起こした時、腎不全の特徴である尿管上皮細胞の線維化がより重篤化していた。また、UUO を施した Sfrp1 ノックアウトマウスは、アポトーシスを起こしている細胞の数が増加しており、さらに、アポトーシスを制御していると考えられている cJun リン酸化の量が亢進していた。以上の結果から、腎不全時に Sfrp1 が腎臓において重要な役割をしてい

ることが示唆された。

※※※※※※※※※※※※※※※※※※※※※※※※※※

第68回岡山実験動物研究会例会

平成26年11月28日(金)午前10時から12時10分まで岡山大創立五十周年記念館会議室(2階)で国枝哲夫氏(研究会事務局)のお世話で開催された。

会長の織田銑一先生から開会のあいさつがあり、その中で、今回の企画や実験動物・動物実験を取り巻く最近の状況、研究会の今後の活動や課題などについてスライドを用いて紹介された。

その後、直ちに一般講演1に移った。一般講演1は「次亜塩素酸水溶液について」と題して山下光治氏(榊エイチ・エス・ピー)が、一般講演2は「コーヒー成分によるアレルギー性鼻炎の緩和について」と題して佐伯綾希子さんら(ノートルダム清心女子大学大学院人間生活学研究科・食品栄養科学専攻、岡山大学大学院医歯薬学総合研究科(薬学系))が講演され、司会は城ヶ原貴通先生(岡山理科大学理学部)が担当された。一般講演3は「日本産ドブネズミからの近交系 DOB の育成」と題して田中 綾さんら(岡山理科大学理学部動物学科)が、一般講演4は「スンスにおけるキャラバン行動終期の検討」と題して上田孝昇氏ら(岡山理科大学理学部動物学科)が講演され、司会は平山晴子先生(岡山自然科学研究支援センター・動物資源部門)が担当された。続いて、一般講演5は「ペットボトル症候群モデルとしてのスンスの可能性」と題して品川文音さんら(岡山理科大学理学部動物学科)が、一般講演6は「マウス卵巣顆粒膜細胞におけるインスリン様成長因子I遺伝子の発現」と題して林 紗代さんら(岡山大学院自然科学研究科)が講演され、司会は松山 誠先生(重井医学研究所・分子遺伝部門)が担当された。一般講演終了後、短時間の休憩を取った後、会務報告があった。会務報告は平成26年度第2回理事会の記載内容(88~89頁)を参照下さい。

会務報告終了後、記念講演に移った。記念講演は「抗体の分子進化(親和性成熟)の研究:面白い結果は思いがけなく訪れる!」と題して大森斉先生(岡山大・大学院自然科学研究科)が講演され、司会は高橋純夫先生(岡山大・大学院自然科学研究科)が担当された。



記念講演終了後、長年にわたって本会の常務理事を務められ、さらに日本生物工学会西日本支部協賛のお世話をしていただいた大森 斉先生に感謝を込めて、織田銃一会長から花束が贈呈された。

一般講演 1

次亜塩素酸水溶液について

○山下光治、濱本裕司、安田悠人、小野朋子
(株) エイチ・エス・ピー

1. はじめに

近年、実験動物施設において次亜塩素酸水溶液による環境消毒、流水手洗い、噴霧による消臭・除菌、環境消毒、器具の消毒。さらに飲水などに使われるようになってきた。ここでは次亜塩素酸水溶液の概要と環境消毒試験について報告したい。

2. 次亜塩素酸水溶液の概要

・次亜塩素酸水は、次亜塩素酸ナトリウムと希塩酸を希釈混合して pH を中性～微酸性に調整したもので酸化による殺菌作用と消臭作用を有している。

・次亜塩素酸水溶液は pH により塩素種 (Cl_2 , HClO , ClO^-) の存在比率が変わり、中性～微酸性域で、殺菌作用の主体である非解離の次亜塩素酸 (HClO) の存在比率が最も高くなる。通例、有効塩素濃度 (FAC) は、50～200ppm 程度で使用されている。

・毒性試験から TDI (耐容 1 日摂取量) $144 \mu\text{g}/\text{日}/\text{Kg}/\text{体重}$ とされ (WHO 環境保健基準)、FAC50ppm で換算すると成人が毎日 150mL を誤飲しても健康に影響を与えない程度。

・消臭作用はアンモニア、硫化水素、メルカプタン、アルデヒド類に対して顕著である。

3. 環境消毒試験

1) 血液共存下部材表面における *Acinetobacter baumannii* の殺菌効果

ウマ脱繊維血液に *A. baumannii* を摂取し、ステンレス、プラスチック板に塗沫して、FAC50、100、200ppm 次亜塩素酸水溶液及び FAC200、1000、5000ppm 次亜塩素酸ナトリウム溶液を用いて、ふき取り及び浸漬処理の後、残存菌数を測定した。結果、浸漬処理は両被検液とも効果がほとんどなく物理的ふき取りが有効であった。また、2 回のふき取りを実施したところ次亜塩素酸水溶液は低濃度で次亜塩素酸ナトリウム溶液と同等の効果が認められた。

2) 手すり及び床の殺菌効果

手すり、床の一定面積を水道水、消毒用エタノール、FAC50ppm 次亜塩素酸水溶液で同じ手技でふき取り、残存菌を測定した。結果、FAC50ppm は消毒用エタノールと同等であった。

3) 靴底水槽の殺菌効果

ワゴンキャストの車輪部分を *S. aureus* 懸濁

液に浸漬し、3 時間風乾の後、水道水及び FAC50ppm の水槽 (水位 4mm) を同じ手技で 1、2 回転させ、ふき取りにて残存菌を測定した。結果、無処理 $10^{5-6}\text{CFU}/\text{キャスト}$ 、水道水 $10^5\text{CFU}/\text{キャスト}$ 、FAC50ppm $60\text{CFU}/\text{キャスト}$ であり FAC50ppm で 3 オーダーの減少が認められた。

4. まとめ

環境消毒において、次亜塩素酸水溶液は、滅菌はできないが消毒用エタノール、次亜塩素酸ナトリウム溶液と同等に使える。硬質非多孔性表面の消毒に有効であると考えられた。

一般講演 2

コーヒー成分によるアレルギー性鼻炎の緩和について

○佐伯 綾希子¹、鈴木 真奈美¹、曾我部 咲¹、
白神 俊幸¹、杉本 幸雄²、林 泰資¹

¹ ノートルダム清心女子大大学院人間生活学研究科・食品栄養学専攻

² 岡山大学大学院医歯薬学総合研究科 (薬学系)

【目的】一般に、ストレスはアレルギー疾患の増悪因子として知られている。しかし、アレルギー疾患とストレスの関連性は複雑であり、ストレスのタイプ、強さ、持続時間などによって大きく異なることが報告されている。

これまで我々は、ストレスが生体に及ぼす影響およびストレス制御の方策について研究してきた。特に最近、コーヒー揮発性成分の生理作用に着目し、この成分のストレス緩和作用について、マウスによる高架式十字迷路試験およびペントバルビタール睡眠試験によって明らかにした。また、使用する豆の種類によって、コーヒー揮発性成分が抗疲労様作用を有することも報告した。これらの結果は、コーヒー揮発性成分によってストレス制御が可能であることを示唆するものであった。本研究では、アレルギー疾患とストレスおよびコーヒー成分との関係を調べるために、アレルギー性鼻炎モデルマウスを作成し、アレルギー症状に対するカフェインとコーヒー揮発性成分の効果を検討した。

【方法】雌性 BALB/c 系マウスを使用し、卵白アルブミン (OVA) および水酸化アルミニウムゲルを初回感作として腹腔内投与した。その 5 および 14 日後に同様の投与を繰り返して全身感作を 3 回行った。初回感作から 21 日後より、連日、OVA を反復点鼻投与し、アレルギー性鼻炎モデルを作成した。鼻炎症状の観察は、鼻搔きとくしゃみ回数を測定した。完成した鼻炎アレルギーマウスに対し、カフェイン、コーヒー揮発性成分、ヒスタミン H_1 受容体阻害剤であるエピナスチン、抗不安薬であるジアゼパムを投与し、鼻炎症状の観察を行った。また尾静脈より血液を採取し、OVA 特異的 IgE を EIA 法により測定した。

【結果と考察】鼻炎症状の進行により、OVA 特異的 IgE が増加した。カフェインとエピナスチン投与は、マウスのくしゃみ回数と鼻搔き行動を抑制した。また、コーヒー揮発性成分は鼻搔き行動を抑制した。しかし、ジアゼパムは鼻炎症状に対して顕著な効果がなかった。アレルギー症状は軽微なストレスで緩和され、重度のストレスでは悪化するという報告がある。今回の結果は、カフェインおよびコーヒー揮発性成分が軽微なストレスサーとして作用した可能性が考えられる。

一般講演 3

特定外来生物マングースの化学的防除手法の検討～ダイファシノンについて～

城ヶ原貴通¹、中田勝士²、Robert T Sugihara³
橋本琢磨⁴、遊部久瑠美¹、平山琢二⁵、
山田文雄⁶

¹岡山理科大学、²環境省やんばる野生生物保護センター、³National Wildlife Research Center, USDA ⁴自然環境研究センター、⁵琉球大学、⁶森林総合研究所

マングースは、沖縄島ならびに奄美大島へハブおよび野鼠対策として導入された。沖縄島へは1910年、奄美大島へは1979年頃に導入され、その後、急速に生息域を拡大していった。これらの島では、在来食肉性哺乳類が生息しておらず、マングースによる在来希少種への影響が多数報告されるようになった。現在では、本種は外来生物法において特定外来生物に指定されており、環境省マングース防除事業ならびに沖縄県による積極的な対策が実施されている。防除対策の結果、沖縄島北部地域ならびに奄美大島全域において根絶が視野に入ってきた。また、在来希少種の回復が認められるなど、各地域・島においてマングース防除による効果が現れつつある。一方で、超低密度化したマングースを捕獲することは困難を極めており、マングース探索犬、捕殺罠の導入が進められてはいるが、一方で在来希少種の混獲など多くの問題を抱えているのが実情である。そこで、海外における外来哺乳類対策として一般に用いられる化学的防除手法についての検討を開始した。今回は、一般に殺鼠剤として多用されているダイファシノンによる検討を行ったので報告する。

実験には、ダイファシノン 50ppm1日投与群（雌雄各5個体）、50ppm3日投与群（雌雄各5個体）、標準群（雌雄各1個体）を設定した。ダイファシノンベイトは鶏ささみミンチを用い、基剤が均一に混ざるようにコーンオイルとともに混ぜ込んだ。なお、観察は投与開始日を含め15日間行った。

投与試験の結果、試験期間15日間において、1日投与群では7個体、3日投与群では9個体が死亡した。また、生存個体においても過度な出血が

認められるなど、野生化での生存が難しいと思われる症状を呈していた。加えて、妊娠雌個体において特に著しい効果を示した。今回は、50ppmにて実施したが、環境への流出あるいは在来希少種への影響も懸念されるため、今後は25ppmによる実験ならびにPAPPなど他の基剤による効果を検討する予定である。

一般講演 4

スunksにおけるキャラバン行動終期の検討

上田孝昇・吉岡歌穂・織田鉄一
岡山理科大学理学部動物学科

【背景と目的】食虫目トガリネズミ科ジネズミ亜科の特徴的な行動としてキャラバン行動が知られている。キャラバンとは親の移動に際し、幼仔が親あるいは同胞の身体を順次くわえ連なって移動する行動である。こうした行動は離乳前の幼仔期に親あるいは同胞と分離す、または異空間に放り出した時に強く発現する。キャラバン行動は3日齢から観察され、24日齢での消失が報告されている（成瀬ほか1978）。一方、キャラバン行動の消失時期には個体差があり、同胞が同時に一斉にキャラバン行動を消失させるわけではない。そこで、その原因の1つに体重（成長の指標）を仮定するとキャラバンの終期はどうなるか、体重差のあるKATとNAGの両系統でキャラバン行動の消失時期に差がみられるか、を検討した。同時にキャラバン行動を消失させる前兆やその前後の行動がどのようなものであるか、を観察した。

【材料と方法】実験にはKAT（1991年にネパール・カトマンズで捕獲した野生個体由来で、やや大型）とNAG（1973年に長崎で捕獲した野生個体由来で小型）の2系統のスunks（ジャコウネズミ *Suncus murinus* の実験動物名）を用い、オープンフィールド（76 cm×76 cm×15 cm）で観察を行った。雌親をオープンフィールド内に放した後、体重を測定した仔個体を一個体ずつ放し3分間観察した。

【結果と考察】キャラバン行動の消失には日齢以外に体重も関係し、KATでは仔の体重が30gを超えるとキャラバン形成は減少消失し、30g以下の個体ではキャラバン行動は延長され22日齢を過ぎて減少した。日齢で見ると22日齢より若い個体では体重が30gに近づいた個体からキャラバン行動は終了した。22日齢以降では30g未満であってもキャラバン行動の終了がみられた。強制的に低体重にした個体はキャラバン行動、追跡行動ともに期間の延長がみられた。これらのことから体重（成長の善し悪し）が要因の一つであると示唆された。NAGはKATと比較してキャラバン行動の継続時間が長い傾向にあった。キャラバン行動終了前後に追跡行動が観察された。追跡行動は他個体の身体をくわえずに後を追う行動であり、哺乳

行動に移行する行動としても頻繁に発現した。追跡行動の期間はおよそ 20 日齢から 30 日齢の間に行われ、体重の重い個体から順に終了する傾向にあった。キャラバン行動の終了時期の観察により、仔の身体的成長と精神的成長（自立）との間のズレを見出すことができるかもしれない。

【参考文献】

- 成瀬一郎、織田銑一、亀山義郎（1978）. 名古屋大学環境医学研究所年報, 29, 200-202.
- Tsujii, K. and Ishikawa T. 1984. Some observations of the caravaning behavior in the musk shrew (*Suncus murinus*). Behaviour, 90:167-183
- Tsujii, K., Matsuo, T. and Ishikawa, T. 1986. Developmental changes in the caravaning behavior of the house musk shrew (*Suncus murinus*). Behaviour, 99:117-138

一般講演 5

ペットボトル症候群モデルとしてのスunksの可能性

品川文音・沖田大輝・前 裕美・織田銑一
岡山理科大学理学部動物学科

【背景と目的】糖尿病とは血糖値が高くそれに伴って表れる様々な症状の総体を指していることが多い。その多くは遺伝的要因と生活習慣が原因となり、インスリンの分泌低下やその感受性が低くなることにより起こる 2 型糖尿病である。2 型糖尿病は中高年層に多くみられているが、若年層においても糖分を含む清涼飲料水を多飲・常飲することによる高血糖を引き起こす急性の 2 型糖尿病、いわゆるペットボトル症候群が知られている。しかしながら、こうした現象を理解するモデル動物については報告されていない。

食目トガリネズミ科の実験動物スunks（ジャコウネズミ *Suncus murinus*）Nem:KAT 系統に離乳直後からスクロース溶液を摂取させたところ高血糖をきたす個体が確認された（鈴木大輔、未発表）。一方、成獣では同様の処置を行っても高血糖は起こさなかった。そこでペットボトル症候群に似た現象を示す系統を育成する目的で、岡山理科大学で維持しているスunks系統にスクロースを負荷し、それにより高血糖を招来する個体あるいは系統がいるかどうかを検討した。

【材料と方法】岡山理科大学で維持しているスunks系統、Nem:KAT、Ous:KAT、Ous:BK、Jic:SUN-Her 及び Jic:EDS を用いた。10%スクロース溶液摂取の開始時期は離乳期（生後16-21日）とし、期間は概ね3-5週間とした。同時に ICR マウスを用いて離乳期の生後3週齢から10%と15%のスクロース溶液を摂取させた。飲水量は毎日、体重・血糖値・尿糖を一週間おきに測定した。血糖値の測定は尾の先端から採血し、メディセーフチップ（テ

ルモ）を用いた。尿糖はテストテープ（シオノギ）呈色反応を指標とした。

【結果と考察】血糖値上昇は、全てのマウスで見られなかった。スunksでは糖負荷前では血糖値、尿糖ともに平常であるが、糖負荷後200mg/dl以上の血糖値上昇は KAT で16個体中7個体、BK では12個体中3個体、SUN-Her では2個体中2個体、EDS では2個体中2個体見られた。KAT、BKにおいて血糖値が上昇した10個体のうち6個体では糖負荷1及び2週目で200mg/dl以上が観察され、そのあとはそれ以下になった。尿糖も血糖値が上昇した個体では合わせて観察されたが、血糖値が上昇した後下がった6個体中4個体では高尿糖を示す個体があった。また血糖値が上昇していない個体でも尿糖がみられるものもいた。SUN-Her、EDS では糖負荷を始めると一週目から三週目まで高血糖、高尿糖を示した。自然発症の若年性高血糖系統として開発された Nga:EDS は、その後、実験動物中央研究所で維持されてきた Jic:EDS は通常の餌では高血糖を示さず、糖負荷で高血糖を維持することが判明した。KAT、BK では糖負荷により高血糖、高尿糖を示す個体、示さない個体があり、選抜育成することでモデル動物としての可能性が考えられた。その中で血糖値が上昇した後下がるという傾向や血糖値が200mg/dlを超えないものでも高尿糖を示す個体もあり、尿で糖を排出することで血糖値を下げている可能性も考えられる。これらはスunksの特徴かもしれない。EDS だけでなく SUN-Her も糖負荷を行えば高血糖、高尿糖を示し、ペットボトル症候群のモデルとしての可能性が考えられた。

一般講演 6

マウス卵巣顆粒膜細胞におけるインスリン様成長因子 I 遺伝子の発現

林 紗代、小島史也、御輿真穂、竹内 栄、
高橋純夫
岡山大学大学院自然科学研究科

【目的】インスリン様成長因子 I (IGF1) は、マウス卵巣においては卵巣顆粒膜細胞で発現しており、IGF1 を欠損したマウスでは黄体や発達した卵胞が見られず無排卵となることから卵胞成熟に必須の因子であることがわかっている。IGF1 は、卵巣刺激ホルモン受容体 (FSHR) の発現を増強するなど、卵巣制御に関与していることは報告されているが、その発現制御機構には不明な点が多い。そこで本研究では、*Igf1* 発現制御機構の解明を目的として、マウス卵巣における *Igf1* mRNA 発現を解析した。

【方法】マウス卵巣における *Igf1* の発現開始時期を組織学的に特定するために、*Igf1* アンチセンス riboprobe を作成し、それを用いて *in situ* hybridization 法により 1 週齢から 3 週齢、8 週

齢の卵巣内の *Igf1* mRNA の発現を観察した。また、子宮内膜では、IGF1 は 17β -estradiol (E2) によって発現が促進されるが、卵巣では E2 の効果は不明である。そこで、2 週齢のマウスに E2 を投与し、*in situ* hybridization 法により卵巣内の *Igf1* mRNA 発現について調べた。

【結果】1 週齢では原始卵胞から 2 次卵胞までの卵胞が観察されたが、*Igf1* mRNA のシグナルは検出できなかった。2 週齢の卵巣では原始卵胞から前胞状卵胞までの卵胞が確認され、そのうち 2 次卵胞から前胞状卵胞までに *Igf1* mRNA のシグナルが検出できた。3 週齢以降の卵巣では、2 次卵胞から発達した胞状卵胞が観察され、それらの卵胞の顆粒膜細胞に *Igf1* mRNA シグナルが検出された。ついで、2 週齢の E2 投与個体の卵巣では、発達した前胞状卵胞において *Igf1* mRNA 発現の低下がみられた。これらの結果から、*Igf1* mRNA は 2 週齢から発現を開始しており、*Igf1* mRNA の発現は E2 によって抑制されることが示唆された。

記念講演

抗体の分子進化（親和性成熟）の研究： 面白い結果は思いがけなく訪れる！

大森 齊

岡山大学大学院自然科学研究科

免疫系は、抗原を感知して、その抗原に特異的に結合する抗体を作り出す。産生される抗体分子の際立った特徴は、免疫応答の過程で分子進化し、抗原に対するより高い親和性を獲得することである（親和性成熟と呼ばれる過程）。親和性成熟は、抗原刺激された B 細胞が胚中心内で活発に増殖する間に導入される高頻度突然変異による多様化と、生じた高親和性獲得クローンの選択によって進行するが、この過程で濾胞樹状細胞 (follicular dendritic cell (FDC)) が重要な役割を演じる。

抗体遺伝子への高頻度変異の導入は、AID (activation-induced cytidine deaminase) によって開始されるが、AID の機能発現には種々の補助因子が必要であり、我々は splicing factor の仲間である SRSF1-3 が必須であることを発見した

(Ref.1)。一方、胚中心での B 細胞の急速な分裂と変異導入を誘導する刺激の本体は解明されていない。一つの理由は、この過程を再現できる *in vitro* の実験系が確立されていないことによる。我々は、FDC の親和性成熟における役割を解明する目的で、マウスの FDC 細胞株 FL-Y を樹立することに初めて成功し、この細胞株が胚中心での FDC の役割を解析するための有用なツールとなることを実証した (Ref.2)。FL-Y の免疫機能を調べる過程で、偶然に脾臓中の c-kit 陽性細胞と共培養すると、新規な単球系細胞が分化してくること

を見出し、この細胞を FDMC (FDC-induced monocytic cell) と名付けた。

FDMC の役割を種々検討した結果、B 細胞の分裂を強く促進するという既知の単球系細胞には見られない性質を示し、この細胞が胚中心において、B 細胞の増殖と高頻度突然変異の誘導に必要な刺激を与える有力な候補となることを示した (Ref.3)。

さらに、FDMC は前駆細胞上の CSF-1 受容体 (CSF-1R) への刺激に依存して分化することを確認した。CSF-1R は通常 IL-34, CSF-1 (旧名 M-CSF) いずれのサイトカインのシグナルも同等に伝達するとされているが、興味あることに、FL-Y 細胞由来の IL-34 と CSF-1 のうち、IL-34 のみが FDMC の分化誘導活性を示し、CSF-1 は全く無効であった。これは、IL-34 のみに選択的に応答する CSF-1R シグナル経路の初めての発見となった (Ref.3)。まだ研究途上であるが、この新規な細胞系とシグナル経路の発見に至る予想外の展開と今後の展望について述べる。

Ref.1) Kanehiro, Y. et al. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **109**, 1216-1221 (2012).

Ref.2) Magari, M. et al. *J. Immunol.* **187**, 4210-4218 (2011).

Ref.3) Yamane, F. et al. *J. Leukoc. Biol.* **95**, 19-31 (2014).

公開シンポジウム

第 68 回岡山実験動物研究会（平成 26 年 11 月 28 日、10:00~12:00、岡山大学五十周年記念館大会議室 2 階）に続いて、同会場で公開シンポジウム（共催）が 13:00~17:40 まで開催された。

シンポジウムのタイトルは「The Frontier of the Reproductive Biology~生殖生命科学研究の最前線~」、主催は「若手研究者の研究能力向上を実現する生殖生命科学に関する国際共同研究」プログラム実施委員会で、共催は岡山実験動物研究会、岡山大學生殖補助医療技術教育研究センター、岡山大学自然生命科学研究支援センター動物資源部門津島南施設であった。

このシンポジウムでは 3 題の講演と 1 題の招待講演が企画され、すべて英語で講演、質疑が行われた。

はじめに、岡山大農学部長の奥田 潔先生から歓迎の意を込めた開会のご挨拶があり、その後、講演会に移り、司会は国枝哲夫先生が担当された。講演 1 野口純子氏（農業資源研究所 動物科学研究領域 動物発生分化研究ユニット）

Multiple Roles of Fkbp6 (FK506 binding protein 6) in Spermatogenesis ~精子形成において複数の役割を持つ遺伝子 Fkbp6~

講演 2 小倉淳郎氏（理研バイオリソースセンター 遺伝工学基盤技術室）

Recent Advancements in Nuclear Transfer
Cloning in Mice ～マウス核移植クローン技術
の最新事情～

講演 3 吉田松生氏 (基礎生物学研究所 発生生物学領域 生殖細胞研究部門)

Live Imaging-Based Investigation of Mouse
Spermatogenic Stem Cell Dynamic ～ライブ
イメージングを基盤としたマウス精子幹細胞
ダイナミクスの解明～

招待講演

Mary Ann Handel 博士 (米国ジャクソン研究所)
New Insights Into Reproduction from Unbiased
Mutagenesis ～突然変異マウスが教えてくれ
た生殖生物学の新境地～

成果報告

国枝哲夫氏 (岡山大学大学院 環境生命科学研究
科)

International research collaboration on
reproductive life science for the advancement
of research activity of young scientists
若手研究者の研究 能力向上を実現する生殖生命
科学に関する国際共同研究

藤原靖浩氏 (米国ジャクソン研究所)

Spcar3, a new mouse model for male meiotic
arrest and infertility

Spcar3, 男性の減数分裂の停止と不妊に関する
新たなモデル動物

シンポジウムは岡山理科大学の先生方等のご
協力により、盛会のうちに終えることができた。

シンポジウム終了後、岡山実験動物研究会と公
開シンポジウムとの合同懇親会が岡山大学生協
ピーチユニオン 4 階で開催された。織田銚一会長
からご挨拶があり、和気あいあいとした雰囲気
の中で、講師の先生方、会員、学生、参加者相互
の交流と親睦を深めた。

Lecture 1

Multiple roles of *Fkbp6* (FK506 binding protein 6) in spermatogenesis

Junko Noguchi

*Animal Development and Reproduction Research Unit,
National Institute of Agrobiological Sciences*

Spermatogenesis is a highly coordinated process to
generate gametes with enough quality and quantity.
To date numerous genes are shown to be essential for
spermatogenesis mainly through reverse genetic
approaches in mice. The disruption of *Fkbp6*, a
protein predominantly expressed in the testis, resulted
in male infertility, which evidenced to be a crucial
factor in spermatogenesis. The homozygous testes
display arrested spermatogenesis at meiotic prophase
with peri-nuclear ribosome aggregate appeared in the
pachytene spermatocytes. The morphological
characteristics led us to identify the causative
mutation in the locus (named *as*) of the

spontaneous mutant rat strain (Crackower et al,
Sci 300, 2003). Besides the aggregation of
ribosomes, the *Fkbp6* deficiency induced
aberrant chromosome pairings and massive
accumulation of Rad51/DMC1 in chromosome
cores in the spermatocyte.

Fkbp6 is a member of FK506 binding proteins
that commonly contain peptidyl prolyl cis-trans
isomerase (PPIase)/FK506 binding domain and
tetratricopeptide repeat (TPR) domains.
Recently the former is evidenced to neither
isomerization-active nor capable to bind to
FK506, a small immunosuppressive molecule
(Xiol et al, Mol Cell, 2012). While, both two
domains are shown to interact with several
different proteins biochemically, indicating that
FKBP6 possibly multiply functions in
regulation of spermatogenesis with mediating
molecular complex formation.

We are focusing to clarify the pathogenesis of
ribosomal aggregation under *Fkbp6* deficiency
using the rat mutant. Among exon 1-9 of the
gene, exon 8 is deleted in the *as* mutant loci.
The incomplete disruption of the gene, or
because of species-specificity, results in a
relatively mild abnormal phenotype in the
mutant rat testis compared to the knockout
mouse. The ribosome aggregate is observed in
spermatocyte at mid to late pachytene stage but
not at other stages in the rat mutant. By
yeast-two hybrid screening and based on the
reported information, we identified several
interactive proteins in the spermatocyte as
molecular partners of FKBP6 which are
possibly related to the aggregation. The picture
of the pathogenesis remains unclear, however
with the data we obtained I will outline the
FKBP6-involved ribosome biogenesis/
translation regulation in this talk.

Lecture 2

Recent advancements in nuclear transfer cloning in mice

Atsuo Ogura

*RIKEN BioResource Center, Tsukuba, Ibaraki, Japan
Graduate School of Life and Environmental Science,
University of Tsukuba, Ibaraki, Japan*

Somatic cell nuclear transfer (SCNT) cloning is the
sole reproductive engineering technology that endows
the somatic cell genome with totipotency. Because
somatic cells can be proliferated and gene-modified
in vitro, this technique has been expected to contribute
extensively to the farm animal production industry,
drug production, regenerative medicine and

conservation of invaluable genetic resource. Besides its broad practical applications, SCNT can provide unique and interesting experimental systems for genomic research, especially in epigenetics, to learn how the somatic cell genome is reprogrammed into a state equivalent to that of the fertilized oocyte: the so-called totipotent state. As far as has been tested in mammals, there might be a gap between blastomere NT cloning and SCNT (including ES cell cloning) in terms of the birth rates and the normality of cloned offspring. Therefore, it is reasonable to assume that there is an “epigenetic barrier” between preimplantation embryos and postimplantation somatic cells. The SCNT technique should somehow overcome these two epigenetic hurdles: somatic cell marking and cell-type-specific differentiation memory. Each hurdle might cause specific reprogramming errors and clone-associated abnormalities. I will review recent progress in somatic cell cloning, with a special emphasis on technical improvements based on epigenetic studies using the laboratory mouse as a model.

Lecture 3

Live Imaging-Based Investigation of Mouse Spermatogenic Stem Cell Dynamics

Shosei Yoshida

Division of Germ Cell Biology, National Institute for Basic Biology (NIBB), Okazaki, Japan

Mouse spermatogenesis represents a typical, robust stem cell system. Stem cells support not only the long-lasting steady-state spermatogenesis, but also regeneration that follows tissue insult and, in particular, after being transplanted into a host seminiferous tubules. However, it is poorly understood with regard to the cellular identity of the stem cells, and how their dynamics changes under different contexts.

We have analyzed the behavior of GFR α 1+ mouse spermatogonia. Pulse-labeling studies first demonstrated that GFR α 1+ spermatogonia showed a typical stem cell dynamics in steady state, where the constant number of stem cells persists while constantly producing differentiating cells. However, contrary to the classic thought that every stem cells divide asymmetry (“division asymmetry”), the fate behavior of individual stem cells are highly variable (“population asymmetry”). A parallel live-imaging study revealed that GFR α 1+ A-single (morphologically singly isolated) and syncytial spermatogonia continually interconvert with each other through stochastic incomplete cell divisions and fragmentation of syncytia, which is by itself contrary to the dogma that the stem cells are the A-single spermatogonia. We then found that a simple biophysical modeling scheme, governed by just a few parameters, nicely captured the seemingly complex fate behavior of GFR α 1+ cells. These data suggest that the entire population of GFR α 1+ spermatogonia

including A-single and syncytial spermatogonia comprises a single stem cell pool, in which cells follow a simple stochastic rule. We believe that these findings provides an important clue towards the understanding of the spermatogenic stem cells.

References

- 1) Hara, K., Nakagawa, T., Enomoto, H., Suzuki M., Yamamoto, M., Simons, B.D., and Yoshida, S. (2014). Mouse spermatogenic stem cells continually interconvert between equipotent singly isolated and syncytial states. **Cell Stem Cell** *14*, 658-672.
- 2) Klein, A.M., Nakagawa, T., Ichikawa, R., Yoshida, S., and Simons, B.D. (2010). Mouse germ line stem cells undergo rapid and stochastic turnover. **Cell Stem Cell** *7*, 24-224.
- 3) Nakagawa, T., Sharma, M., Nabeshima, Y., Braun, R.E., and Yoshida, S. (2010). Functional hierarchy and reversibility within the murine spermatogenic stem cell compartment. **Science** *328*, 62-67.
- 4) Yoshida, S., Sueno, M., and Nabeshima, Y. (2007). A vasculature-associated niche for undifferentiated spermatogonia in the mouse testis. **Science** *317*, 1722-1726.
- 5) Nakagawa, T., Nabeshima, Y., and Yoshida, S. (2007). Functional identification of the actual and potential stem cell compartments in mouse spermatogenesis. **Dev Cell** *12*, 195-206.

Invited Lecture

New Insights Into Reproduction from Unbiased Mutagenesis

Mary Ann Handel

*The Jackson Laboratory
Bar Harbor, ME*

Two practical problems in human reproductive medicine are management of unexplained infertility, and development of a variety of contraceptive strategies, particularly for males. Successful solutions to these problems rely on identification of key target genes and pathways contributing to fertility. Unbiased mutagenesis provides a fruitful strategy for the identification of such genes. The NIH-funded Reproductive Genomics program at the Jackson Laboratory has employed ENU mutagenesis and a three-generation breeding scheme to identify autosomal recessive infertility phenotypes. Gametogenesis phenotypes were assessed by thorough but rapid screening procedures. About 10% of the 500 pedigrees screened presented infertility phenotypes due to gamete absence or gamete malfunction. Interestingly, the vast majority (approximately 75%) of the identified mutations affect male fertility only; roughly 10% affect both male and female infertility; and a small minority affect female fertility only. A significant number of the mutated genes have been identified by standard positional cloning strategies enabled by the breeding scheme design, and others have been identified by high-throughput exome sequencing or deep sequencing of candidate genomic

懇親会が企画された。第66回研究会例会は12月13日(金)13:30から17:15まで岡山理科大50周年記念館4階多目的ホールで織田銃一先生(岡山理科大・理学部)のお世話で開催された。特別講演4題と交流会が企画された。

②研究会報の発行と原稿募集

第29号は4月に発行し、5月に会員に送付した。第30号の原稿募集案内を平成25年11月15日に行い、原稿提出締切は平成26年1月末日とした。

③会報(サンプル誌)寄贈・送付—文献情報のデータベース収録(6月)、○岡山大学学術成果リポジトリ等へのコンテンツ登録および公開、○特定非営利活動法人医学中央雑誌(医中誌)刊行会編集部収集採択課、○科学技術振興機構(JST)知識基盤情報部資料収集担当宛に研究会報第29号を謹呈・送付した。

④投稿規程の改正(研究会報第30号に掲載)

【現行】

3. 寄稿は、実験動物及び動物実験に関する総説、原著論文、短報並びに資料とし、A4サイズの要旨を用いて作成した原稿1部とその内容が打ち込まれたフロッピーディスクを提出する。
10. 別刷りの費用は、50部を超える場合に、その費用は著者負担とする。必要部数は投稿の際に事務局に指示する。

【改正】

3. 寄稿は、実験動物及び動物実験に関する総説、原著論文、短報並びに資料とし、A4サイズの添付ファイルとして事務局(編集担当)に送付する。
10. 別刷りは特別の場合を除き、PDFファイルで著者にお渡しする。
4. 著作を著者に改正《条文は省略》

⑤役員を選任

監事は菊永茂司先生(ノートルダム清心女子大)が林泰資先生(ノートルダム清心女子大)と交代された(第66回研究会例会の総会で承認)。

⑥ホームページで第65回研究会例会、第66回研究会例会の案内、講演要旨などを逐次公開した。

⑦会員の異動

入会 3名、退会 4名+賛助会員1社

⑧弔電:本会員の小野謙二氏(岡山大学名誉教授)が8月18日にご逝去なされた。

⑨日本実験動物技術者協会 第47回総会 in 晴れの国 岡山(平成25年9月27日~28日)に協力

⑩理事会の開催(2回) 研究会開催日

第65回(7月12日)、第66回(12月13日)

⑪拡大常務理事会の開催(2回) 5月9日、11月6日

2. 平成25(2013)年度の会計収支報告

収入の部として前年度繰越金390,928円、会費(41人66口)66,500円、賛助会費(8社)240,000円、寄付金(猪貴義先生)100,000円、寄付金(菊

永茂司先生)8,186円、寄付金(織田銃一先生)5,456円、郵便貯金利子17円となり、収入総額は811,087円、一方、支出の部として印刷費(第29号会報・別刷)225,067円、通信費27,990円、第65回研究会補助40,000円、第66回研究会謝金10,000円、補助50,000円、雑費2,230円となった。なお、雑費の内訳は振替手数料である。支出総額は355,287円で、残高は455,800円であった。会計収支決算報告書は平成26年2月3,4日に監事の先生方によって会計監査を受けた。

3. 平成26(2014)年度の活動経過と活動計画

①研究会を2回開催する。第67回研究会は7月11日(金)13:30~17:30まで縦木勝巳先生・矢田範夫氏(岡山大自然生命科学支援センター動物資源部門)のお世話でマスカットキューブ(地域医療人育成センター岡山)3階マスカットホールで開催されている。一般講演7題、特別講演2題、懇親会が企画されている。第68回研究会は11月29日(金)13:30~17:30まで織田銃一先生のお世話で岡山理科大学・創立50周年記念館で開催を予定している。特別講演・記念講演など計3題と懇親会を企画する。

②研究会報第30号を4月に発行し、5月に会員に送付した。93頁、140部白黒印刷。会報の製本(第25号~第30号)4冊、うち2冊寄贈(猪貴義先生・国会図書館)

③岡山大学学術成果リポジトリ等へのコンテンツ登録および公開を延長するとともに医中誌刊行会、JST知識基盤情報部へ会報を贈呈した。

④役員を選任 平成27年~28年度 会則:第6条(役員)、第7条(役員を選任)、第9条(役員の任期) 平成26年度第2回拡大常務理事会で検討する。

⑤ホームページで研究会、会報、講演会などを逐次紹介するなど、更なる充実を図る。

⑥会員の動向(7月9日現在)

入会希望: 臼田俊樹氏(学校法人英数館広島アニマルケア専門学校動物看護コース)

退会: 佐藤忠文氏(前環太平洋大学)

二宮基資氏(株クラレ バイオマテリアル部 開発課)

田中斎仁氏(株クラレ 研究開発本部 つくば研究センター)

⑦名誉会員の矢部芳郎先生が平成26年度春の叙勲(瑞宝中綬章)を受章なされた。

⑧理事会の開催(2回):第67回(7月11日)、第68回研究会の開催日

⑨拡大常務理事会の開催(2回):5月9日、10月上旬予定

⑩近隣大学・研究機関との交流の活発化及び若手の交流の場を作り出す。

⑪日本実験動物学会、地区研究会、関連研究会などと連携・協力し、情報交換を図る。

4. 平成26(2014)年度の会計中間報告

・人間生活学部)

熊谷多妙子氏(元岡山大自然生命科学研
究支援センター動物資源部門津島
南施設)

宮本 拓氏(前岡山大学院・環境生命科学
研究科)

⑦近隣大学・研究機関、中国四国の国立大学動物
実験施設の関係者との交流の活性化、情報交換及
び 若手の交流の場を作り出す。

⑧日本実験動物学会、関連研究会などとの連携、
協力、情報交換を図る。

⑨理事会の開催(2回):第67回研究会(7月11日)、
第68回研究会例会(11月28日)

⑩常務理事会の開催(2回):5月20日、10月15日

2. 平成26(2014)年度の会計収支中間報告
平成26(2014)年度(1月1日~11月25日)の
会計収支中間報告:収入の部として前年度繰越金
455,800円、会費(43人92口)92,000円、賛助会
費(8社)240,000円、会報代(5冊、送料込)3,156
円、寄付金(矢田範夫氏)6,984円、郵便貯金利息
29円、収入総額は797,969円となり、一方、支出
の部として、印刷費(第30号会報及び第25~30
号会報の製本)192,888円、通信費29,290円、第
67回研究会費謝金5,000円、補助40,000円、雑
費2,190円、支出総額は269,368円で、残高は
528,601円である。雑費の内訳は印字手数料350
円、振替手数料(8社)840円、収入印紙(5枚)1,000
円である。

3. 平成27(2015)年度の活動計画

①研究会例会の開催(2回)、第69回例会(会員の
持ち回り会場)は6月26日(金)13:30~17:30に川
崎医科大・現代医学教育博物館3階小講堂で、大
熊誠太郎先生・三上崇徳氏(川崎医科大)のお世
話で開催する。開催日時、会場はすでに仮予約が
なされた。企画は一般講演、特別企画、懇親会を
予定している。なお、特別企画のテーマは「動物
実験と社会—適切な動物実験の実施体制とは—」
(仮題)を考えている。第70回例会は12月上・中
旬に岡山理科大学創立五十周年記念館4階多目的
ホールで、愛甲博美先生・城ヶ原貴通先生(岡山理
科大理学部)のお世話で開催を予定している。

日本実験動物学会学術集会委員長から要請が
あった第4回実験動物科学シンポジウムの開催に
ついて、岡山理科大学の会員の間で検討してい
ただくことになった。なお、このシンポジウムは、
第1回が『第6回ラットリソースリサーチ研究会』
(会場:京都大)、第2回が『新たなライフサイエ
ンス研究の動向—鳥類リソースの整備と活用に向
けて—』(会場:名古屋大)、第3回が『先端研
究と動物実験—適正技術と動物実験倫理—』(会
場:山形テルサ)のテーマで開催されている。

②研究会報(第31号)の発行と会員への送付(4月
予定) 会報の大きさはA4版にする。

③岡山大学学術成果リポジトリ等へのコンテン

ツ登録及び公開を延長するとともに医中誌刊行
会、JST知識基盤情報部へ会報を贈呈する。

④ホームページの更なる充実と会員拡大を図る。

⑤常務理事会、理事会を各々年2回開催する。

⑥近隣大学・研究機関との交流の活発化及び若手
の交流の場を作り出し、実験動物関連学会、地区
研究会などと連携・協力し、情報交換を図る。

第68回研究会例会以降の活動報告

第69回研究会例会は本年6月26日(金)13:30
~17:30まで川崎医科大・現代医学教育博物館3
階小講堂で、大熊誠太郎先生・三上崇徳氏(川崎
医科大)のお世話で開催されることになり、特別
企画「動物実験と社会—適切な動物実験の実施体
制を考える」の準備がなされた。

特別企画の講師として、勝俣靖貴氏(文部科学省
研究振興局ライフサイエンス課)、喜多正和先生
(公私立大学実験動物施設協議会会長)、樫木勝巳
先生(岡山大学自然生命科学支援センター動物
資源部門)の3名の先生方が引き受けていただ
けることになった。

第70回研究会例会は愛甲博美先生・城ヶ原貴
通先生(岡山理科大学理学部)のお世話で12月11日
(金)10:00~12:00まで、また第4回実験動物科学
シンポジウム(主催:岡山実験動物研究会)は織田
銃一先生・愛甲博美先生・城ヶ原貴通先生(岡山
理科大学理学部)が中心になって企画され、同日の
13:00~18:00まで加計学園創立50周年記念館ホ
ール(岡山理科大学)で開催することになった。
シンポジウムのタイトルとしては「新たな疾患モ
デルが切り開く橋渡し研究」で、今後、(公社)日
本実験動物学会学術集会委員会と打ち合わせを
して検討することになっている。

会員の異動として、この間、臼田俊樹氏(広島
アニマルケア専門学校)、高山修氏(岡山大生
殖補助医療技術教育研究センター)、本橋秀之氏
(岡山大生殖補助医療技術教育研究センター)、木
村康二氏(岡山大学院環境生命科学研究所)、若
井拓哉氏(岡山大学院環境生命科学研究所)、森
田英利氏(岡山大学院環境生命科学研究所)が
入会された。一方、会員の佐藤芳範氏が本年2月
14日にご逝去されたため、退会となった。

第68回研究会例会以降の会計報告

前頁記載の平成26(2014)年度の会計収支中間
報告に追加、変更のあった項目と金額のみを下記
に示します。収入額は会費(43人94口)94,000円
で、収入総額は799,969円となった。一方、支出
額は第68回研究会例会補助(会場使用料含む)が
47,800円、雑費7,514円で、支出総額は322,492
円となり、残高は477,477円となった。雑費とし
て、会場使用料の振替手数料324円と記念講演花
束5,000円が新たに加わった。平成27(2015)年2
月5日に監事の先生方によって会計監査を受けた。