

A . 日本獣医解剖学会

シンポジウム

3月30日(日) 15:00~16:30 第7会場

培養系を用いた生殖腺研究の新展開

A-S-1 - 4

3月30日 15:00 -16:30

九郎丸正道 (東大)

- A-S-1 ES細胞の培養系における生殖系列細胞の分化
豊岡やよい¹、恒川直樹²、野瀬俊明²
(¹理化学研究所・発生再生科学総合研究センター・多能性幹細胞研究チーム、
²三菱化学生命科学研究所・生殖発生研究室)
- A-S-2 マウス未分化生殖原基の器官培養法-性分化過程におけるDNAのメチル化解析への応用例-
水上拓郎¹、金井克晃¹、金井正美²、平松竜司¹、藤澤正彦¹、九郎丸正道¹、林良博¹
(¹東大・獣医解剖、²杏林大・医)
- A-S-3 出生初期における雄性生殖細胞(Gonocyte)の増殖再開機構の研究
永野麗子¹
(¹日本学術振興会・科学技術特別研究員、農業生物資源研究所・生体防御研究
グループ・疾患モデル動物研究チーム)
- A-S-4 マウス精巢の再凝集培養
中牟田信明¹、小林繁¹
(¹九歯大・口解1)

サテライトフォーラム

3月30日(日) 16:40~17:40 第7会場

A-F-1 - 2

3月30日 16:40 -17:40

田中慎 (長寿研)

- A-F-1 マウス腎臓の組織構造 - 系統および雌雄の特性 -
矢吹映¹
(¹鹿児島大・農・家畜解剖)
- A-F-2 低酸素暴露における一酸化窒素の役割
山本欣郎¹
(¹岩手大学・獣医解剖)

一般口演

3月30日(日) 9:00~12:00 第7会場

A-1 - 18

3月30日 9:00 -9:20

谷口和之 (岩手大)

- A-1 七面鳥頭部皮膚組織の構造
荒井理恵¹、尼崎肇¹、山野秀二¹
(¹日獣大・解剖)
- A-2 運動負荷による馬蹄壁中層の角細管密度の変化について
桑野睦敏¹、小平和道²、高橋公正²、上野孝範¹、平野司郎¹、吉原豊彦¹
(¹JRA総研、²日獣大病理)

3月30日 9:20-9:30

山野秀二 (日獣大)

- A-3 アライグマ指球腺における糖質の組織細胞化学的研究
安井禎¹、月瀬東¹、マイヤーウィルフリード² (¹日大・獣医解剖、²ハノーバー獣医大)

3月30日 9:30-9:50

月瀬東 (日大)

- A-4 肥満および糖尿病ラットの舌に関する組織化学的研究
坂田美乃¹、山本欣郎¹、阿久津仁美¹、益山拓²、斎藤徹³、谷口和之¹
(¹岩手大学・獣医解剖、²日本たばこ産業安全性研究所、³日獣大・実験動物)

- A-5 糖尿病ラットの嗅覚系に関する組織化学的検討
阿久津仁美¹、坂田美乃¹、益山拓²、山本欣郎¹、谷口和之¹
(¹岩手大・獣医解剖、²日本たばこ・安全性研究所第一グループ)

3月30日 9:50-10:00

杉田昭栄 (宇都宮大)

- A-6 マツカワ(*Verasper moseri*)の嗅覚器の個体発生
森命¹、山本欣郎¹、天野勝文²、山森邦夫²、山野目健³、谷口和之¹
(¹岩手大・獣医解剖、²北里大・水産・魚類生理学、³岩手県水産技術センター)

3月30日 10:00-10:20

橋本善春 (北大)

- A-7 樹立ブタ腸管上皮幹細胞株の性状
木戸丈友¹、麻生久¹、渡邊康一¹、大和田修一¹、山口高弘¹ (¹東北大院農・機能形態)
- A-8 牛の空腸および回腸パイエル板の形態と機能 III リンパ濾胞内 IgG および IgAmRNA 発現細胞の局在
保田昌宏¹、藤野資子¹、小河大輔¹、那須哲夫¹、村上隆之¹ (¹宮崎大・家畜解剖)

3月30日 10:20-10:40

北川浩 (神戸大)

- A-9 シェーグレン症候群 IQI マウスモデル下顎腺における B 細胞ケモカイン(BLC)および B 細胞刺激因子 (BLyS) mRNA の発現
今野明弘¹ (¹北大獣医解剖)
- A-10 クローン牛末梢血と乳汁におけるリンパ球の性状
宮澤光太郎¹、本多正史¹、米内美晴²、斉藤則夫²、麻生久¹、山口高弘¹
(¹東北大院農、²(独)家畜改良センター)

3月30日 10:40-11:00

眞鍋昇 (京大)

- A-11 ラット骨髄における赤芽球の脱核過程へのアポトーシスの関与
横山俊史¹、江藤貴雄¹、塚原伸治¹、河南保幸¹、北川浩¹ (¹神戸大院・自然科学)
- A-12 生後初期におけるラット終脳外側中隔におけるアポトーシス発現細胞
井波広一¹、塚原伸治¹、北川浩¹、河南保幸¹ (¹神戸大院・自然科学)

3月30日 11:00 -11:20

木曾康郎 (山口大)

A-13 ブタ卵胞退行における細胞死受容体を介したアポトーシス制御
井上直子¹、松井俊勝¹、前田晃央¹、中川真輔¹、眞鍋昇¹、宮本元¹ (¹京大・生体機構)

A-14 Fas/APO-1/CD95 を介した細胞死シグナルの細胞内伝達経路のリアルタイム解析の試み
眞鍋昇¹、小南勝也¹、酒巻和弘²、井上直子¹、後藤康文¹、宮本元¹
(¹京大院・農・生体機構、²京大院・生命科学)

3月30日 11:20 -11:40

福田勝洋 (名古屋大)

A-15 加齢に伴う視床下部 - 下垂体 GH 軸の形態学的変化
桑原佐知¹、塚本康浩¹、田中愼²、佐々木文彦¹ (¹大阪府大・獣医解剖、²国立長寿研)

A-16 F344/N ラットの生殖加齢特性-1
田中愼¹、山本貴子¹ (¹長寿研)

3月30日 11:40 -12:00

松元光春 (鹿児島大)

A-17 子宮腺形成不全マウスモデルにおける生殖能力
深水大¹、本道栄一¹、木曾康郎¹ (¹山大解剖学研究室)

A-18 ICR マウスおよびモロシヌスマウスにおける子宮腺の分布
鬼木宏幸¹、本道栄一¹、並河鷹夫²、木曾康郎¹
(¹山大・解剖学研究室、²名古屋大学大学院生命農学研究科)

3月30日(日) 13:00~14:50 第7会場
A-19 - 29

3月30日 13:00 -13:20

昆泰寛 (北大)

A-19 マウス血管形成における *Sox17*, *Sox18* の相補的役割
松井利康¹、金井克晃¹、金井正美²、野馬隆志¹、石井万幾¹、城所知秀¹、九郎丸正道¹、
川上速人²、林良博¹ (¹東京大・農学生命・獣医解剖、²杏林大・医・解剖第2)

A-20 (演題取り消し)

3月30日 13:20 -13:40

星信彦 (北里大)

A-21 マウス各系統精巢における熱ストレス抵抗性に関する研究
上総勝之¹、並木由佳¹、昆泰寛¹、安居院高志¹ (¹北大院・獣医実験動物)

A-22 減数分裂中期特異的アポトーシス関連コンジェニックマウスの解析
昆泰寛¹、並木由佳¹、上総勝之¹、安居院高志¹ (¹北大院・獣医実験動物)

3月30日 13:40 -14:00

佐々木文彦 (大阪府大)

A-23 Peculiar Bundles of Filaments and Multivesicular Nuclear Body in Somatic Cells of the Lesser Mouse Deer Testes: An Ultrastructural Study
アンドリアナビピン ピンタン¹、金井克晃¹、木村順平²、福田勝洋³、九郎丸正道¹、林良博¹
(¹東大・獣医解剖、²日大・生物資源・獣医解剖、³名大・生命農学・動物形態)

- A-24 Diethylstilbestrol 曝露による雄マウスの生殖障害発現機序
星信彦¹、割田克彦¹、橋本統¹、長谷川喜久¹ (¹北里大・実験動物)

3月30日 14:00-14:20

木村順平 (日大)

- A-25 *Sry* 遺伝子導入マウスの未分化生殖原基を用いた *Sry* による *Sox9* 遺伝子の発現制御
城所知秀¹、金井克晃¹、藤澤正彦¹、金井正美²、的場章悟¹、九郎丸正道¹、多屋長治³、
米川博通³、林良博¹ (¹東大・獣医解剖、²杏林大・医、³(財)東京都臨床研)

- A-26 未分化生殖原基の前後軸におけるステージ特異的な精巣分化能の差異
平松竜司¹、金井克晃¹、水上拓郎¹、中野久丹子²、金井正美³、九郎丸正道¹、林良博¹
(¹東大・獣医解剖、²東工大・生命理工、³杏林大医)

3月30日 14:20-14:40

山本雅子 (麻布大)

- A-27 マウス性分化初期におけるセルトリ前駆細胞内での *Sry* 依存的グリコーゲン代謝調節
的場章悟¹、金井克晃¹、城所知秀¹、野馬隆志¹、佐藤剛¹、九郎丸正道¹、林良博¹
(¹東京大・獣医解剖)

- A-28 マウス胎仔生殖腺発生過程における integrin $\alpha 3$ の発現解析と MFG-E8 との関連性
石井万幾¹、金井克晃¹、金井正美²、田島陽一³、平松竜司¹、松井利康¹、九郎丸正道¹、
佐内豊³、林良博¹ (¹東大・農学生命・獣医解剖、²杏林大・解剖第2、³(財)東京都臨床研)

3月30日 14:40-14:50

九郎丸正道 (東大)

- A-29 イモリの生殖細胞に発現する *Vasa* 遺伝子
恒川直樹¹、中村文²、福井彰雅³、浅島誠³、野瀬俊明²
(¹三菱化学生命研、東大理、²三菱化学生命研、³東大・総合文化)

3月31日(月) 9:00~11:40 第7会場
A-30 - 45

3月31日 9:00-9:10

武藤頭一郎 (北里大)

- A-30 家畜生体用 X 線 CT による成体牛頭部の構造観察
浅利昌男¹、尼崎肇²、撫年浩³、藤田和久³
(¹麻布大・解剖第一、²日獣大・解剖、³家畜改良センター)

3月31日 9:10-9:20

浅利昌男 (麻布大)

- A-31 絶滅した日本のオオカミの遺伝的特徴と系統解析
石黒直隆¹、堀内基広¹ (¹帯広大・獣医公衆衛生)

3月31日 9:20-9:40

北村延夫 (帯畜大)

- A-32 ニワトリ臍管結紮による臍臓組織変化に関する形態学的研究
武藤頭一郎¹、長竿淳¹、桐山千絵子¹、吉岡一機¹、辻尾祐志¹、谷口和美¹、大野秀樹¹
(¹北里大・獣医解剖)

- A-33 胆管結紮ニワトリに認められた鶏冠ならびに精巣の萎縮に関する形態学的研究
吉岡一機¹、今井志穂¹、佐々木美也子¹、谷口和美¹、筏井宏実²、武藤頭一郎¹
(¹北里大・獣医解剖、²北里大・獣医寄生虫)

3月31日 9:40-10:00

萬場光一 (山口大)

A-34 甘味受容体蛋白質 T1R3 の肝臓および膵臓における発現
谷口和美¹、吉岡一機¹、武藤顕一郎¹ (¹北里大・獣医解剖)

A-35 methimazole 投与ラットにおける甲状腺濾胞上皮細胞の形態学的研究
辻尾祐志¹、長竿淳¹、吉岡一機¹、谷口和美¹、武藤顕一郎¹ (¹北里大・獣医解剖)

3月31日 10:00-10:10

尼崎肇 (日獣大)

A-36 腱炎における腫瘍壊死因子(TNF) の関与
保坂善真¹、桐沢力雄²、岩永敏彦³、山本悦子¹、植田弘美¹、竹花一成¹
(¹酪農学園大・獣医解剖、²酪農学園大・獣医微生物、³北大院・解剖)

3月31日 10:10-10:20

小川和重 (大阪府大)

A-37 細胞トレーサーとしての半導体ナノ粒子の可能性
桃あさみ¹、花木賢一²、遠山稿二郎³、山本 健二⁴、谷口隆秀¹、本多英一¹
(¹農工大・家畜微生物、²学術振興会・科技特、³岩手医科大・医・第二解剖、
⁴国際医療センター研究所)

3月31日 10:20-10:40

竹花一成 (酪農大)

A-38 成熟マウスの肝臓における Eph レセプターの発現
岡田法能¹、小川和重¹、パスクアーレエレナ²、森山光章³、津山伸吾⁴、佐々木文彦¹
(¹大阪府大・獣医解剖、²The Burnham Institute、³大阪府大・統合生理、
⁴大阪府大・分子生物)

A-39 成熟マウスの腎臓における Eph レセプターの発現
小川和重¹、和田大樹¹、岡田法能¹、パスクアーレエレナ²、津山伸吾³、佐々木文彦¹
(¹大阪府大・獣医解剖、²The Burnham Institute、³大阪府大・分子生物)

3月31日 10:40-11:00

神谷新司 (日獣大)

A-40 遺伝性腎疾患 (ICGN) マウスにおける腎性貧血発症機序の解明
山田一山口美鈴¹、山田一内尾こずえ¹、後藤康文¹、森俊治¹、坂田千夏¹、永尾雅哉²、
小倉淳郎³、山本美江⁴、宮本元¹、眞鍋昇¹
(¹京大院農生体機構、²京大院生命科学、³理研バイオリソースセンター、
⁴感染研獣医科学)

A-41 腎尿管間質線維芽細胞培養系を用いた遺伝性腎疾患 (ICGN) マウス腎線維症発症の分子メカニズムの解析
後藤康文¹、内尾-山田こずえ¹、山口-山田美鈴¹、小倉淳郎²、山本美江³、宮本元¹、眞鍋昇¹
(¹京都大・農・生体機構学研究室、²理化学研究所・理研バイオリソースセンター・
遺伝工学基盤技術室、³国立感染症研究所・獣医科学部)

3月31日 11:00-11:10

有嶋和義 (麻布大)

A-42 整備環境下で維持された SPF C57BL/6Cr マウスの腎臓の加齢による形態変化
矢吹映¹、鈴木秀作²、松元光春¹、西中川駿¹
(¹鹿児島大・農・家畜解剖、²鹿児島大・生命科学資源開発研究センター)

3月31日 11:10 -11:30

那須哲夫 (宮崎大)

A-43 ラット肛門括約筋のリンパ管, 血管の分布, 走行とペプチド性神経との関係
権田辰夫¹、竹内崇師¹、安食隆¹ (¹島根医大, 動物実験施設)

A-44 ヤギ膵臓における NOS 免疫反応陽性神経細胞の形態学的解析
平松浩二¹、下田暁子¹、大島浩二¹ (¹信州大・農)

3月31日 11:30 -11:40

上原正人 (鳥取大)

A-45 シバヤギ網膜における神経節細胞の分布について
宍井里依¹、青山真人¹、杉田昭栄¹ (¹宇都宮大院・機能形態)

A-S-1 ES 細胞の培養系における生殖系列細胞の分化

豊岡やよい¹、恒川直樹²、野瀬俊明²

(¹理化学研究所・発生再生科学総合研究センター・多能性幹細胞研究チーム、²三菱化学生命科学研究所・生殖発生研究室)

マウス始原生殖細胞 (primordial germ cell; PGC) は、胎生 6 日目後に初期胚の未分化な細胞集団である epiblast 細胞の中から選別、決定されると考えられているが、未分化な細胞集団からごく少数の PGC が選別、決定される機構についての分子生物学的な知見は未だ少ない。マウス Vasa 遺伝子は初期胚の未分化細胞や ES 細胞では発現が認められず、移動期後期から胎仔生殖巣に到着する前後の、分化の進んだ PGC から発現がみられるため、ES 細胞と分化した生殖細胞の識別するための分子マーカーとなりうる。我々は PGC の *in vitro* 分化モデル系を構築する目的で、マウス Vasa 遺伝子座を lacZ および eGFP 遺伝子に置換 (knock-in) した ES 細胞を樹立した。それらの細胞株で胚様体形成による分化誘導を行うと、lacZ および eGFP 発現細胞、つまり Vasa 発現細胞の出現が観察され、ES 細胞から PGC への *in vitro* における分化誘導が可能であることが明らかとなった。さらに胚体外組織からの PGC 誘導シグナルと考えられている BMP4 を強制発現する細胞株と knock-in ES 細胞との共培養を行った結果、BMP4 発現細胞が Vasa 発現細胞に対して強い誘導能力を持つことが明らかとなった。また cell sorting により純化した Vasa 発現細胞を 12.5 日目胚の胎仔精巣と共培養し再構成精巣を構築させると、Vasa 発現細胞が再構成精巣の精細管に定着し精子形成を行っている様子が観察され、Vasa 発現細胞が成体の生殖細胞への分化能力を持っていることが証明された。我々の構築した PGC の *in vitro* 分化モデル系は、PGC の分化決定機構の研究のための有力なツールになり得ると考えられる。

A-S-3 出生初期における雄性生殖細胞 (Gonocyte) の増殖再開機構の研究

永野麗子¹

(¹日本学術振興会・科学技術特別研究員、農業生物資源研究所・生体防御研究グループ・疾患モデル動物研究チーム)

哺乳類の雄性生殖細胞 (gonocyte) は、Waldyer (1906) をはじめとする多くの研究者によって、発生ステージ、形態学的特徴により精粗細胞の前駆体として定義されている。その中で (1) 胎生後期における増殖の一時的な停止 (arrest) (2) 出生初期の増殖再開 (reproliferation) および (3) 精細管の基底膜への移動と定着 (relocation) は、将来的に精子形成へ進行する重要な基盤となるにも関わらず生物学的意義やメカニズムについては、未だ明らかにされていない。加えて、雌は胎生後期に減数分裂前期まで進行するという雄性生殖細胞との分化の相違から、卵形成と精子発生の時間的ずれをもたらし意味についても大変興味深い。近年、精子発生のメカニズムを探るひとつのアプローチ方法として *in vitro* を用いた解析を多くの研究者によって試みられている。方法として、精巣の断片を丸ごと培養する器官培養法 (organ culture system) と酵素処理後、細胞をばらばらにした細胞培養法 (共培養; co-culture system、単培養; single cell culture system) に大別出来る。器官培養法は、細胞の空間的配置や微細な環境が生体内に極めて近いこと、分化の程度も良く、外的因子の効果など精巣内のみで直接起こる現象を明確に捉えることが出来るという優れた面を備える。我々は gonocyte の reproliferation におけるメカニズムに注目し、出生初期の精巣器官培養系を確立後、gonocyte の reproliferation を *in vitro* で再現することに成功し、その系を利用して様々な解析を試みることで、reproliferation を誘導する因子や調節メカニズムの一部を明らかにすることが出来たので、ここで詳細に報告する。

A-S-2 マウス未分化生殖原基の器官培養法・性分化過程における DNA のメチル化解析への応用例

水上拓郎¹、金井克晃¹、金井正美²、平松竜司¹、藤澤正彦¹、九郎丸正道¹、林良博¹

(¹東大・獣医解剖、²杏林大・医)

近年、内分泌攪乱物質問題、生殖医療、クローン動物の作出など社会的な生殖生物学への関心あるいは要求が日々増大しているが、これらの基盤である哺乳動物の生殖細胞、生殖腺の分化メカニズムの解明は余り進展していない。その原因は、哺乳類の生殖腺の生殖細胞や体細胞の分化を再現できる有効な細胞株が樹立されていない為、その特異的な分子や遺伝子の機能を調べる手段が KO マウスや TG マウスなどの個体レベルでの解析に限定されている点にある。我々は、細胞レベルと個体レベルの解析系の間際に位置する器官培養系に注目し、未分化生殖原基から精巣・卵巣の分化誘導できる器官培養法を確立した。その結果、雌では、減数分裂を経て、二次卵母まで、雄では、セルトリ細胞、ライディッチ細胞の分化誘導が可能となり、精巣、卵巣の形成が培養下で再現できることとなった。哺乳類の性分化は、Y 染色体上の精巣決定遺伝子 *Sry* から誘導される一連の遺伝子発現により制御されるが、これらは、DNA 鎖およびクロマチンの高次構造を制御していると推測されており、未分化生殖腺から精巣・卵巣への性分化過程においては、DNA メチル化などエピジェネティックレベルでの遺伝子発現調節機構が関与している可能性が強く示唆されている。しかし、DNA のメチル化を担う *Dnmt* の欠損マウスは生殖腺発生以前の時期に胎生致死を示し、生殖腺発生における影響についての解析は困難であった。そこで我々は、*Dnmt* の標的阻害剤である 5-azacytidine を器官培養系に用いた結果、雄において精巣索の形成が有意に阻害されることを見いだした。本会では、マウス未分化生殖原基の器官培養法の詳細とともに、このメチル化解析の結果を報告する。

A-S-4 マウス精巣の再凝集培養

中牟田信明¹、小林繁¹

(¹九歯大・口解 1)

環境中ないし食品中に含まれる化学物質の生殖毒性試験にとつて、哺乳類精巣の組織培養は不可欠な技術である。我々はマウスの精巣組織から細胞浮遊液を調製し、96 穴プレート中で再凝集塊をつくらせる新しい培養系の開発に取り組んでおり、今回その概要について報告する。被膜を除去した生後 2 ないし 5 日齢のマウス精巣をコラゲナーゼ中で攪拌し、次にトリプシンで処理すると細胞浮遊液が得られた。これをウェルあたり約 1 万個の細胞が含まれるように希釈してプレートにまくと、ウェルの底に沈んだ細胞が 1 個の凝集塊をつくり、精細胞とセルトリ細胞は外側に、ライディッチ細胞は内側に分かれて配置した。凝集塊を形成した後は無血清培地による維持が可能で、精母細胞への分化を示す mRNA の発現も認められた。更に改良を加えることによって、多検体の解析を効率的に行うことの可能な本培養系は非常に有用なものになると我々は考えている。

A-F-1 マウス腎臓の組織構造 - 系統および雌雄の特性 -

矢吹映¹

(¹ 鹿児島大・農・家畜解剖)

腎臓は、形態学的特徴と機能が密接に関連している器官であり、その構造的変化は機能的変化をよく反映している。それ故に、臨床、応用あるいは基礎研究に関わらず、組織学的検索に重きが置かれている。この観点において、重要な基礎となるのは正常な組織構造の把握であり、実際に腎臓の組織構造については、ネフロン各区分ごとに電子顕微鏡レベルまでの検索が古くから行われている。しかしながら、動物実験で最も基礎的な事項である「動物の特性」についてはほとんど明らかにされておらず、各種実験動物の系統や雌雄の特性については依然として不明点が多い。これは、実験動物として最も使用頻度が高いマウスや腎臓の形態解析が最も進んでいるラットでも同様である。このような背景から、われわれは、各種実験動物の系統および雌雄に依存する腎臓の組織学的特性を検索している。今回は、マウスでこれまで得られた成績について新知見を含めて紹介する。なお、実験成績は比較的使用頻度の高い Jcl: ICR, C57BL/6Cr Slc, BALB/cA Jcl, C3H/HeN Jcl および DBA/2Cr Slc の 5 系統のマウスで得られたものである。

A-F-2 低酸素暴露における一酸化窒素の役割

山本欣郎¹

(¹ 岩手大学・獣医解剖)

近年の蛍光指示薬の開発によって形態学的な研究においても様々なパラメーターを取り扱うことが可能となってきた。バイオイメージングという言葉で表される一連の仕事は、形態学と生理学を統合する新しい手法として細胞生物学の領域では不可欠な技術となっている。しかしながら、この研究技法の導入には大きな設備投資が必要であるし、細胞の扱いにも技術的な習熟が必要である。今回の発表では、一酸化窒素を例に取って簡便なイメージングの技法を紹介すると共に、形態学と生理学との接点をどう扱うかを考えたい。低酸素暴露の際に種々の細胞では NO が産生され、細胞保護と細胞障害の二つの相反する作用を持つことが知られている。そこで、迷走神経遠位神経節における NO の動態を形態学的手法を用いて観察し、NO の機能を考察した。まず、NADPH-diaphorase 反応と eNOS, nNOS, iNOS に対する抗体を用いた免疫組織化学によって eNOS の存在を明らかにした。次に、diaminofluorescein (DAF) を未固定のスライス標本に適用し NO 産生量の変化を半定量的に検討した結果、低酸素暴露によって DAF 反応が増強した。Photoconversion 法による電子顕微鏡による観察では、DAF 反応産物がミトコンドリア内膜に認められた。さらに、dichlorofluorescein (DCF) によって活性酸素体産生量の変化を検討した結果、DCF の反応は低酸素暴露により減弱したが、3 分間の酸素再暴露により最初の値よりも強い蛍光強度を示した。以上の結果から、低酸素暴露の際に eNOS によって産生された NO はミトコンドリア内膜の呼吸鎖に作用してミトコンドリア電位の維持を通じて細胞保護に働き、酸素の再暴露は過剰に産生された NO とパーオキシナイトライトを生成して細胞障害に関与していると予測された。

A-1 七面鳥頭部皮膚組織の構造

荒井理恵¹、尼崎肇¹、山野秀二¹

(¹日獣大・解剖)

【目的】七面鳥 *Meleagris gallopavo* の頭部は、特徴的な前頭部の突起、頸部からおこる肉垂、背側上頸部の肉阜状の皮膚構造を有する。また、この背側上頸部の皮膚は生体では青色を呈しているが、これら皮膚には青色の色素は存在してない。この部の青色の発色はチンダル散乱現象によるものと考えられている。さらに生体活動を反映し、肉垂などの形状や色が変わることも知られている。本研究では七面鳥のこれら頭部皮膚構造を組織学的調べ、加えて皮下の血流変化をサーモグラフィにより観察し、七面鳥頭部皮膚組織の特徴の解析を試みた。【材料と方法】実験には本邦で飼育されている雄のブロンズ種七面鳥 *Meleagris gallopavo* の成鳥を3例を使用した。生体観察は室温および湿度管理下でVTRにより頭部付属器の状態や色を観察した。また同時にサーモグラフィによる撮影を行い、皮膚温度の観察を行った。組織学的検索では、HE、MT、PASなどの一般染色およびリン脂質および糖脂質の検出のための組織化学的な試験を行った。【結果とまとめ】頭部の突起部は活動・興奮時には収縮するが、休息時には弛緩する。この構造は良く発達した皮下の血管網と上皮下の筋組織によって支持されていた。肉垂部も突起部と類似する構造を有しており、サーモグラフィ所見などからその形状は上皮下の発達した血管網と血流の変化および筋組織によって調節されていることが示唆された。また、頸部の青色発色部位では特異的な配列を示したメラニン色素層と比較的厚い極性脂肪を含む上皮下結合組織層の構造が認められ、これらの構造がチンダル散乱を起こしていることが示唆された。

A-3 アライグマ指球腺における糖質の組織細胞化学的研究

安井禎¹、月瀬東¹、マイヤー-ウィルフリート²

(¹日大・獣医解剖、²ハノーバー獣医大)

【目的】哺乳類の皮膚において、その付属腺からの分泌物には種々の糖残基を有する糖タンパク質が含まれ、それらが皮膚の生理機能に深く関わっていることが知られている。また、他の食肉目と異なり前肢を巧みにつかうアライグマは、その指球の真皮および皮下組織に、単一管状のエックリン腺が存在している。本研究では、アライグマ指球のエックリン腺上皮における糖タンパク質の局在と、皮膚機能との関連性を組織化学的に追究した。【材料と方法】成熟した雄アライグマを麻酔下にて放血殺後、直ちに指球を採取した。組織片を顕微鏡および電顕観察用に分け、固定、包埋後、切片とし、一般形態観察用と種々の糖検出染色反応を施し顕微鏡ならびに電顕用試料とした。【結果】顕微鏡観察において、エックリン腺上皮は PA-TCH-SP-PD 法、s-HID 法、s-LID 法を施したところ、暗調細胞は強い反応性を示したが、明調細胞の反応性は弱いものであった。また、レクチン法を用いたところ RCA-120、PNA、SSA、MAA は暗調細胞と明調細胞で著しく異なった染色性を示した。電顕的観察においては、PA-TCH-SP 法を施したところ、ゴルジ装置と明調細胞のグリコーゲン粒子が強く反応し、PA-TCH-SP-PD 法ではそれらの反応性がより顕著となり、また分泌顆粒も強陽性を示した。電顕レクチン法では、Con A、RCA-120、WGA が主に分泌顆粒に結合性を示した。【考察】アライグマ指球のエックリン腺上皮には、種々の糖残基を有する相当量の中性糖タンパク質と、シアル酸を含む酸性糖タンパク質が局在していた。これらの糖質は、マーキングや感染防御に関与するとともに、皮膚表面を保護することにより、指球の感覚を鋭敏に保持していると考えられる。

A-2 運動負荷による馬蹄壁中層の角細管密度の変化について

桑野睦敏¹、小平和道²、高橋公正²、上野孝範¹、平野司郎¹、吉原豊彦¹

(¹JRA 総研、²日獣大病理)

【目的】馬蹄の蹄壁中層には角細管が無数に存在する。角細管は蹄壁の堅牢性を維持する力学的単位と考えられており、負荷される運動が強くなるとその数を増すと信じられてきたが、これを科学的に検証した報告は無い。そこで、規定運動を負荷した群と未負荷の群で角細管を観察して、運動の有無が角細管に与える影響を調査した。【材料と方法】サラブレッド種(雌)を用い、その6頭を1歳後期から約9ヶ月の間、基礎馴致から育成調教まで実施し(運動負荷群)、4頭を放牧のみ実施した(放牧群)。これらの右前肢蹄を採材後、蹄中位で高さ約2cmに水平切断した後、蹄尖、内および外蹄側、内および外蹄踵の5カ所に区分して、それぞれの蹄壁中層を得た。得られた材料をホルマリン固定後、樹脂包埋し、角細管に対して直角の方向で薄切後、マイクログラインダーを用いて研磨標本(HE染色)を作製した。その後、各部位の蹄壁中層の表層から深層までの厚み(蹄壁厚)および幅4mmの蹄壁中層内に含まれる角細管数を測定し、角細管密度および蹄壁表層から深層までの分布パターンを2群間において比較した。【結果】放牧群に対して運動負荷群の角細管数および角細管密度は蹄壁5箇所全てで少ない傾向を示した。とくに、蹄尖および外蹄側では角細管密度に、内および外蹄側では角細管密度に、t検定($p < 0.05$)によって有意差を認めた。一方、各部位の蹄壁厚および角細管の分布パターンには両群に差はなかった。【考察】今回の実験では、運動負荷群で角細管数および角細管密度が減少しており、過去の通説とは逆の結果が得られた。角細管は蹄冠乳頭からつくられるが、運動が蹄冠の組織に何らかの刺激を与え、蹄冠乳頭が少なくなった可能性が考えられた。

A-4 肥満および糖尿病ラットの舌に関する組織化学的研究

坂田美乃¹、山本欣郎¹、阿久津仁美¹、益山拓²、斎藤徹³、谷口和之¹

(¹岩手大学・獣医解剖、²日本たばこ産業安全性研究所、³日獣大・実験動物)

【目的】糖尿病による糖代謝異常によって、様々な合併症一つとして味覚障害が起こることが報告されている。糖尿病性味覚障害の詳細は明らかになっていないため、本研究では肥満モデル動物である Zucker fatty (ZF) ラットとインスリン非依存型自然発症糖尿病のモデル動物である Zucker-diabetic fatty (ZDF) ラットを用いて舌の形態学的検索を行った。【方法】ZF ラット、ZDF ラットおよびコントロールラットの舌を酢酸を除いたブアン液で固定し、パラフィン連続切片を作製した。HE染色、糖鎖を特異的に認識するレクチン組織化学染色、糖尿病により形成される AGE (終末糖化産物) と AGE 受容体 (RAGE) に対する免疫組織化学染色を行った。【結果と考察】HE染色ではZFラットとZDFラットのエプネル腺に脂肪滴と推測される小空胞が認められ、舌腺の機能低下による味覚受容の異常が示唆された。レクチン染色ではZDFラットの舌乳頭周囲の一部の神経において反応性に変化が見られ、特に甘味応答に関する味覚伝達の異常が示唆された。AGE と RAGE の発現様式では、ZDF ラットの舌上皮顆粒層、有棘層で反応性が亢進していた。従って、AGE-RAGE 系の作用により舌上皮での活性酸素産生が誘導され、舌上皮角化亢進により舌苔が形成されて味覚障害が引き起こされる可能性が示唆された。また、ZDF ラット毛細血管内皮細胞において AGE の反応性が亢進していたため、血栓形成によって味蕾や神経の栄養供給に異常が起こり、味覚障害が引き起こされている可能性が示唆された。糖尿病性味覚障害はこれらの様々な要因による複合的な結果として生じると考えられた。

A-5 糖尿病ラットの嗅覚系に関する組織化学的検討

阿久津仁美¹、坂田美乃¹、益山拓²、山本欣郎¹、谷口和之¹
(¹岩手大・獣医解剖、²日本たばこ・安全性研究所第一グループ)

糖尿病は様々な合併症を引き起こすことが知られている遺伝的・代謝的多因子疾患である。ヒトにおいては合併症として嗅覚障害の発症が確認されているが、その発症メカニズムは不明であるため、糖尿病モデル動物を用いてその詳細を解明することが期待されている。そこで本研究では、遺伝的に糖尿病を発症するモデル動物として SDT ラットを用い、その嗅覚系組織を組織化学的に詳細に観察した。ブアン液で灌流固定した SDT ラットおよび対照動物の SD ラットから副嗅球を含む嗅球、嗅上皮、鉤鼻器を採材し、パラフィン包埋した後 5 μm 厚の切片を作製した。切片には HE 染色および糖尿病個体の組織に特異的に蓄積される AGE (advanced glycation end-product) および RAGE (receptor for AGE) に対する免疫組織化学的染色を施し、光学顕微鏡にて観察した。その結果、HE 染色を行った SDT の嗅上皮では上皮内に硝子物質様の構造が観察され、SD の嗅上皮とは異なる組織像が認められた。また AGE 免疫染色では、SDT の嗅上皮自由縁付近に SD より強い陽性反応が認められた。RAGE 免疫染色では、SD の嗅上皮において陽性細胞が SDT より数多く認められた。以上より、SDT ラットでは主に嗅上皮において組織化学的变化が生じ、嗅上皮自由縁付近の抗 AGE 抗体陽性反応が増強されていたことから、AGE の蓄積に由来する細胞の変性や細胞死の発生などにより、匂い物質の受容や嗅球へのシグナル伝達に異常が生じている可能性が推察された。

A-7 樹立ブタ腸管上皮幹細胞株の性状

木戸文友¹、麻生久¹、渡邊康一¹、大和田修一¹、山口高弘¹
(¹東北大院農・機能形態)

【目的】我々はこれまで、ブタ腸管 M 細胞の成長過程における分布と性状を明らかにし、M 細胞が腸管上皮幹細胞から分化する可能性を示した。そこで本研究では、M 細胞の分化とその機序を解明するために、ブタ腸管上皮幹細胞株の樹立を試み、その性状を検討した。【材料と方法】供試ブタは出生直後の 3 元交雑種(LWD,雌)を用いた。ブタ小腸の粘膜上皮細胞層を採取し、細胞を調整した後に、培養系に移した。細胞の増殖が確認された時点で、細胞のクローニングを行った。細胞の性状は、免疫組織化学および ELISA 法によるホルモン量の測定により解析した。【結果】細胞 8000 個のクローニングを行い、石垣状の形態を有する上皮細胞様の細胞株を 1 株樹立した。得られた細胞株は、ブタ腸管上皮細胞のマーカーであるサイトケラチン K8.13 抗体に陽性反応を示したことから、PIEC(porcine intestinal epithelial cell)とした。また、PIEC は 80 代以上の継代培養が可能で、培養開始 3 日目で 3.14 倍に増殖し、培養開始 5 日目で 4.87 倍になりコンフルエントに達した。さらに、PIEC は、腸上皮内分泌細胞の形態を有し、セクレチン、ソマトスタチン抗体に陽性反応を示した。それぞれのホルモンの細胞内濃度は、セクレチンが培養開始 3 日目で最高に達し、419.78ng/mg protein であり、ソマトスタチンは培養開始 1 日目で最高に達し、172.51ng/mg protein であった。以上の結果より、今回樹立した PIEC は腸内分泌細胞の特徴を有しており、また、優れた増殖活性を有することから、多能性腸管上皮幹細胞である可能性が極めて高いことが判明した。

A-6 マツカワ(*Verasper moseri*)の嗅覚器の個体発生

森侖¹、山本欣郎¹、天野勝文²、山森邦夫²、山野目健³、谷口和之¹
(¹岩手大・獣医解剖、²北里大・水産・魚類生理学、³岩手県水産技術センター)

【目的】魚類の嗅覚器は形態学的に主嗅覚系と副嗅覚系に分化していないが、これらの機能を有するサブセットの存在が生理学的に示唆されている。我々はカレイ目一種であるマツカワには前鼻孔と後鼻孔があること、鼻腔の底面に嗅上皮ヒダが一定のパターンで配列すること、嗅上皮に少なくとも 2 種類の感覚細胞が存在していることを明らかにしてきた。しかしながら、その発生過程はまだ明らかにされていないため、本研究ではマツカワの嗅覚器の形態を孵化より経時的に観察した。材料・方法] 0~56 日齢のマツカワを 7 日齢毎に 4%パラホルムアルデヒド液で浸漬固定した。鼻部を切り出した後、厚切り切片を作製し、トルイジンブルー染色を行い光学顕微鏡で組織構造を観察した。また、鼻部の表面構造を SEM により観察した。【結果】マツカワの嗅覚器は 7 日齢では長楕円形の鼻窩として観察され、鼻窩には線毛が見られた。厚切り切片では支持細胞、基底細胞、感覚細胞が観察された。28 日齢では鼻窩が深くなり、鼻窩の辺縁のほぼ中央が両側から内腔に向かってせりだしたひょうたん形を呈していた。42 日齢では左眼球の右方への移動が見られ、せりだしていた鼻窩の辺縁がつながり鼻窩の背面を覆う完全な蓋をとになり、前鼻孔と後鼻孔によって外部と交通する鼻腔が形成された。切片では、鼻腔底部に 1 本の嗅上皮ヒダが観察され、副鼻囊が後方に広がるのが認められた。49 日齢では前鼻孔が管状に伸び、成熟マツカワとほぼ同様の形態となった。【まとめ】マツカワの嗅覚器の形成は孵化直後より始まり、7 日齢では鼻窩が出現し、42 日齢までに鼻腔が形成される。7 日齢ですでに感覚細胞が出現し、42 日齢では嗅上皮ヒダの形成が見られた。

A-8 牛の空腸および回腸パイエル板の形態と機能 III リンパ濾胞内 IgG および IgAmRNA 発現細胞の局在

保田昌宏¹、藤野資子¹、小河大輔¹、那須哲夫¹、村上隆之¹
(¹宮崎大・家畜解剖)

【目的】牛には空腸パイエル板(jPP)と回腸パイエル板(iPP)の 2 種類のパイエル板が存在する。これまでの研究で、生後 1 ヶ月前後に境に jPP リンパ濾胞内には多数の CD4 陽性細胞が出現するが、iPP リンパ濾胞内にはほとんど観察されないことが明らかとなった。そこで本研究では、CD4 陽性細胞の出現がリンパ濾胞の機能に及ぼす影響について、それぞれのリンパ濾胞内における IgG および IgAmRNA 発現細胞の出現と局在をもとに観察した。【材料と方法】実験には黒毛和牛の子牛(出生直後から 5 ヶ月齢)を用いた。各月齢における jPP と iPP 領域を採取、凍結切片を作製し免疫組織化学的染色 (IS) を行うとともに、IgG および IgAmRNA の発現とその局在を *in situ* hybridization 法にて検出した。【結果と考察】2 週齢までには IS で初乳由来であると考えられる IgG が主として観察され、IgGmRNA は jPP および iPP とともにドーム領域に観察されるものの、各リンパ濾胞内にはその発現が観察されなかった。加えてこの時期、T 細胞は jPP および iPP のドーム領域には観察されたがリンパ濾胞内にはほとんど観察されなかった。5 ヶ月齢までには jPP リンパ濾胞内のみ IgG および IgAmRNA の発現と CD4 陽性細胞が多数観察された。さらに IgGmRNA 発現細胞数が IgA のそれより多いことも明らかとなり、子牛の腸管免疫には IgG が主であると考えられた。JPP リンパ濾胞内 IgG および IgAmRNA 発現細胞の出現は CD4 陽性細胞の出現と関連しており、jPP および iPP の機能的な差は生後 1 ヶ月程度経て現れることが示唆された。

A-9 シェーグレン症候群 IQI マウスモデル下顎腺における B 細胞ケモカイン(BLC)および B 細胞刺激因子 (BLyS) mRNA の発現

今野明弘¹
(¹北大獣医解剖)

【背景と目的】シェーグレン症候群(SS)は唾液腺・涙腺を標的とする自己免疫性疾患である。演者は、これまでに SS 自然発症モデルである IQI マウスの初期病巣形成過程を研究し、初めに樹状細胞が増殖して集塊を形成し、そこに CD4⁺T 細胞と B 細胞が浸潤してリンパ球浸潤巣が形成されること、病巣でプロフェッショナル抗原提示細胞の条件を満たすのは樹状細胞と上皮細胞であること、さらに、局所では Th1 応答が起きていることを明らかにした。しかし、Th2 サイトカイン(IL-4, IL-5)が陰性にも関わらず、初期には T 細胞とほぼ同数の、慢性期には T 細胞を上回る数の B 細胞が増殖する理由(補助シグナル)は不明であった。本研究の目的は、IQI マウス SS 病巣における B 細胞増殖メカニズムの研究のため、BLC および BLyS mRNA の発現を罹患組織で検討することにある。

【材料・方法・結果】12 週齢(初期 SS)および 15 ヶ月齢(慢性期 SS) IQI マウス、および 12 週齢 BALB/c マウス(陰性対照)の下顎腺の RT-PCR 法では、BLC-PCR 産物は 12 週齢 BALB/c マウスでは全く認められず、12 週齢 IQI マウスでわずかに、15 ヶ月齢 IQI マウスで明瞭に認められた。12 週齢および 15 ヶ月齢の IQI マウスでは、BLC と同様に BLyS-PCR 産物も確認された。DIG 標識リポプローブを用いた 15 ヶ月齢 IQI 下顎腺・組織切片の ISH 法では、病巣内の一部の細胞に両 mRNA の発現が観察された。

【考察】IQI マウス SS 病巣における B 細胞増殖に BLC および BLyS が関与する可能性が示唆された。また、最近、ヒト SS で BLC および BLyS が注目されており、IQI マウスは両分子が関与するメカニズムの研究において良いモデルになりうる。

A-11 ラット骨髄における赤芽球の脱核過程へのアポトーシスの関与

横山俊史¹、江藤貴雄¹、塚原伸治¹、河南保幸¹、北川浩¹
(¹神戸大院・自然科学)

【目的】先に演者らは赤芽球系細胞の成熟過程にはアポトーシスの機構が関与するが、最終的に赤芽球系細胞は細胞死には至らないことを明らかにした(JVMS, 64, 913-919, 2002)。このことから哺乳類に特有な赤芽球の脱核にアポトーシスの機構が関与することが想定された。そこでラット骨髄を用いてアポトーシス発現細胞における大食誘導シグナルであるホスファチジルセリン (PS)およびトロンボスポンジン (TSP)を免疫組織化学的に検出し、赤芽球の脱核過程へのアポトーシスの関与について考察した。【材料と方法】正常の血中エリスロポイエチン濃度を有するラットの骨髄(8例)を摘出し、その一部をピオチン化 annexin V と反応させて PLP 固定後に ABC 法をおこなった。残りの試料については PLP 固定後に抗 TSP 抗体を用いた酵素抗体間接法をおこなった。常法にしたがってパラフィンまたはエポキシ樹脂に包埋し、光学顕微鏡的または電子顕微鏡下で PS および TSP の局在を調べた。【結果】赤芽球系細胞では PS は好塩基赤芽球から表出し、赤芽球系細胞の成熟につれてその発現量が多くなった。脱核段階に至った多染赤芽球や好酸赤芽球では PS が脱核途上の突出した核周囲に特に強く表出した。超微形態学的にも同所見が確認された。また TSP は前赤芽球から細胞表面に検出され、脱核過程にある多染赤芽球や好酸赤芽球の核周囲の細胞表面に特に強く表出した。【結論】赤芽球における脱核にはアポトーシスの機構が関与していることが示唆されるとともに、脱核後の赤芽球の核の処理には大食誘導シグナルである PS および TSP が関与することが示唆された。

A-10 クローン牛末梢血と乳汁におけるリンパ球の性状

宮澤光太郎¹、本多正史¹、米内美晴²、斎藤則夫²、麻生久¹、山口高弘¹
(¹東北大院農、²(独)家畜改良センター)

【目的】クローン牛の T 細胞機能は必ずしも十分に理解されていない。本研究では、クローン牛の免疫機能を明らかにする研究の一環として、体細胞クローン牛の血中と乳汁における CD4⁺T 細胞と CD8⁺T 細胞の変動と末梢血のリンパ球層(LC)でのサイトカイン発現について正常牛と比較検討した。

【材料と方法】家畜改良センターで作出した卵管上皮細胞由来のホルスタイン種体細胞クローン牛を 6 頭使用した。末梢血と乳汁の採取は分娩後、経日的に 6 ヶ月間行った。末梢血と乳汁から比重遠心法を用いて LC を分離した。また、末梢血 LC から RNA を調整した。一次抗体としてウシ CD3、CD4、CD8 のモノクローナル抗体を用いて、CD3 と CD4、CD3 と CD8 の免疫二重染色を行い、Flow Cytometer により陽性細胞の割合を解析した。また、ウシのサイトカイン cDNA の配列をもとにプライマーを設計し、RT-PCR 法により末梢血 LC でのサイトカイン発現について検討した。

【結果】体細胞クローン牛の泌乳期乳汁中 LC の CD4⁺T/CD8⁺T 細胞割合は、分娩 5 日後が最も高く、泌乳後期になるにつれて減少し、分娩 6 ヶ月後では 1 前後であった。この変動は正常牛とほぼ同様であった。また、体細胞クローン牛の血中の CD4⁺T/CD8⁺T 細胞割合は正常牛に比べ、やや低い傾向を示した。さらに、今回検討した末梢血 LC のサイトカイン発現(IL2、IL4、IL10、TNF-、TGF-、IFN-)は正常牛との違いが認められなかった。

A-12 生後初期におけるラット終脳外側中隔におけるアポトーシス発現細胞

井波広一¹、塚原伸治¹、北川浩¹、河南保幸¹
(¹神戸大院・自然科学)

【背景と目的】脳の性分化過程において、形態学的な雌雄差がみとめられる性的二型核が形成され、生理機能の雌雄差が生じると考えられている。ラットの外側中隔(LS)は性行動発現の雌雄差に関与しているが、LS に存在する神経細胞数についての雌雄差は明らかではない。ラットにおいて生後初期におけるアポトーシス発現細胞数の雌雄差が性的二型核の形成に関与することが報告されている。本研究では、生後 16 日間における LS のアポトーシス発現細胞を調べ、LS の雌雄差形成におけるアポトーシスの関与を検証した。【材料と方法】生後 1, 4, 6, 8, 11, 16 日齢雌雄ラットの LS 前額断切片を作製し、抗 single stranded DNA (ssDNA)抗体を用いて免疫組織化学的にアポトーシス発現細胞を検出した。光学顕微鏡による観察および ssDNA 陽性細胞数の計測をおこなった。【結果】生後 1-8 日において、アポトーシス発現細胞は雌雄 LS の腹側部に最も多く観察された。LS 背側部にも多数のアポトーシス発現細胞がみとめられたが、LS 中間部では少数であった。生後 8 日間の LS のアポトーシス発現細胞数は加齢に伴い増加した。11-16 日齢ではアポトーシス発現細胞の数は著しく減少し、LS に散在していた。さらに、生後 6 日齢雌の LS に存在したアポトーシス発現細胞数は同齢雄よりも多い傾向にあった。【考察】以上の結果から、LS に存在する神経細胞の数は生後 10 日以前のアポトーシス機構により制御されていることが示唆された。また、神経細胞数の性差がアポトーシスによって引き起こされる可能性があり、現在詳細な解析を進めている。

A-13 ブタ卵巣退化における細胞死受容体を介したアポトーシス制御

井上直子¹、松井俊勝¹、前田晃央¹、中川真輔¹、眞鍋昇¹、宮本元¹
(¹京大・生体機構)

【目的】哺乳類の卵巣における卵巣の選択的滅亡には顆粒層細胞のアポトーシスが支配的に関与している。しかし、未だその誘起因子やシグナル伝達経路について不明な点が多い。今回、細胞死受容体を介するアポトーシス伝達系である Fas ligand (FasL)-Fas 系および tumor necrosis factor (TNF)-related apoptosis-inducing ligand (TRAIL)-TRAIL 受容体系のブタ卵巣における局在を調べた。併せて初代培養顆粒層細胞を用いて TRAIL が顆粒層細胞にアポトーシスを誘導できるか否か調べた。【方法】常法に従って、ブタ卵巣のパラフィン切片と凍結切片を作製し、FasL、Fas、TRAIL および TRAIL 受容体(6種が知られている)の局在を調べた。次いで健康卵巣(直径3~5mm)から顆粒層細胞を単離・培養して供した。24時間前培養後、TRAIL(0、200、400ng/ml)を添加し、0~12時間共培養した。培養後、培養顆粒層細胞における活性化型 caspase-3等の局在を免疫細胞化学的に共焦点レーザー走査型顕微鏡を用いて調べ、アポトーシス誘導の有無を調べた。【結果と考察】FasL および Fas は退化初期と退化中期の卵巣の顆粒層細胞に局在した。特に Fas は卵巣腔側の顆粒層細胞に強く発現していた。Fas とは逆に、TRAIL および TRAIL 受容体は主に基底膜側の顆粒層細胞に局在した。TRAIL は培養時間依存的に顆粒層細胞にアポトーシスを誘導した。これらから顆粒層細胞において FasL-Fas および TRAIL-TRAIL 受容体系がアポトーシス制御に関与していると考えられた。

A-15 加齢に伴う視床下部・下垂体 GH 軸の形態学的変化

桑原佐知¹、塚本康浩¹、田中慎²、佐々木文彦¹
(¹大阪府大・獣医解剖、²国立長寿研)

【背景及び目的】成長ホルモン(GH)は体の成長や代謝に重要なホルモンで、その分泌は主に視床下部弓状核(ARC)と室周囲核(PeN)からそれぞれ分泌される成長ホルモン放出ホルモン(GHRH)とソマトスタチン(SS)によって調節されている。下垂体におけるGHの産生は、マウス、ラット等のげっ歯類において、加齢に伴い減少することが報告されているが、その中枢の加齢変化については、ほとんど知られていない。そこで今回、視床下部・下垂体GH軸への加齢の影響を形態学的に検討することを目的とした。【材料と方法】動物は、NIA コントラクト Aging Farm より購入した2、4、12、24か月齢の雌雄C57BL/6J マウスを用いた。視床下部、下垂体のパラフィン切片を作成し、視床下部ARCをGHRH、PeNをSS、下垂体をGHの各抗体を用いて免疫染色した後、それぞれを計量計測学的に検討した。【結果及び考察】視床下部ARCにおけるGHRH陽性ニューロン数は、雄では加齢に伴う顕著な減少が見られた。また雌でも2から12か月齢において減少していた。PeNのSS陽性ニューロン数は、雄では有意な変化が認められなかった。一方、雌では、4か月齢以降、加齢に伴う顕著な減少が見られた。下垂体GH陽性細胞は、雄では2から12か月齢において、また雌では、2から4、12から24か月齢において数や面積の減少が見られた。以上の結果から、GH軸は、雌雄異なったパターンでの加齢変化を示し、雄ではGHRHの減少が、また雌ではGHRH及びSS両方の同調した減少が、GHの減少に影響を及ぼしている可能性が示唆された。

A-14 Fas/APO-1/CD95 を介した細胞死シグナルの細胞内伝達経路のリアルタイム解析の試み

眞鍋昇¹、小南勝也¹、酒巻和弘²、井上直子¹、後藤康文¹、宮本元¹
(¹京大院・農・生体機構、²京大院・生命科学)

【目的】哺乳類の卵巣においては排卵に際して99%以上の卵巣が選択的滅亡し、これに顆粒層細胞のアポトーシスが支配的に関与している。しかし誘起因子やシグナル伝達経路には未解明な点が多い。演者らはこの細胞死シグナル伝達系の解明を進めている。細胞死受容体を介したアポトーシスシグナルの細胞内伝達機構を調べる新手法として、2種の蛍光タンパクをペプチドで結合した複合タンパクをコードする遺伝子をヒト培養細胞に導入して発現させ、生細胞内で fluorescence resonance energy transfer (FRET) を観測することで細胞内シグナル伝達系をリアルタイムに観測できる in vitro FRET 法を開発している。【方法】2種の蛍光タンパク(cyan fluorescent protein: CFP および yellow fluorescent protein: YFP)を4アミノ酸残基からなるペプチド(ひとつは caspase-8 の基質となる IETD、もうひとつは caspase-3 の基質となる DEVD)で結合した複合タンパクをコードする遺伝子を HeLa 細胞に導入して強制発現させた。【結果と考察】CFP は 440nm の励起光を受けて 480nm の蛍光を発するが、複合タンパクでは近接する YFP の影響を受けて 528nm の蛍光を発した。Fas ligand が Fas に結合してアポトーシスが誘起された場合、両タンパクを結合しているペプチドが各 caspase の作用で切断され、波長が 480nm に変化した。興味深いことに、従来伝達系のの上流に位置するので細胞膜近傍で活性化していると考えられてきた caspase-8 が核近傍から活性化することが分かった。

A-16 F344/N ラットの生殖加齢特性-1

田中慎¹、山本貴子¹
(¹長寿研)

長寿医療研究センターの Aging Farm では、F344/N ラットを加齢育成している。今回はその繁殖特性を捕捉し、加齢モデルとして利用できる範囲の特定する目的で性周期の存続に注目した。29日齢を20例、1から26か月齢の10の月齢群(各群3例)を用いた。ラットの性周期は腔垢検査法により特定した。腔垢像からa)発情前期、b)発情期、c)発情後期、d)休止期と各性周期相を判定した。性周期の開始は、腔開口をしていない20例から特定した。残りのラットは、加齢による性周期の存続に注目し、3-4か月間、腔垢を観察した。各ラットの組織採取は、d)を認めた午後に解剖し、各臓器を秤量し、一部は固定して組織学的観察に供した。腔開口は1.3±0.1か月齢、最初の発情期相は1.5±0.2か月齢で認められた。以後、総ての個体で性周期13か月齢まで平均4.9±0.3日周期で規則的に回帰した。加齢に伴い14-18か月齢(16.2±1.6か月齢)で周期の回帰しない個体が出現し、周期は停止した。周期停止後の腔垢には連続して白血球が出現し、c)またはd)と同様の期間が続いた。しかし不規則にb)に類似した腔垢像が単発的に出現した。27.1±0.5か月齢以降、b)に類似した腔垢像はみられなくなり、観察した30か月齢までc)またはd)と同様な腔垢像のみが観察された。本研究の結果から、F344/Nでは、1.5±0.2か月齢で最初の発情期相を確認して以後、性周期は規則的に回帰し、16.2±1.6か月齢で停止し、27.1±0.5か月齢で腔垢像の一過性変動も停止する、という3つの転換時期を特定した。従って近交系ラットF344/Nを加齢研究で用いる際には、16か月齢以降ならば繁殖周期による影響の軽減された状態で、27か月齢以降ならばない状態で用いる事ができると考えられた。

A-17 子宮腺形成不全マウスモデルにおける生殖能力

深水大¹、本道栄一¹、木曾康郎¹

(¹山大解剖学研究室)

ヒツジやウシでは新生子に卵巣ホルモンを投与することにより子宮腺を欠損させることが可能である。これらの動物では常に妊娠率が減少することから、子宮腺が妊娠の維持に何らかの関わりを持っていることが示唆されている。そこで今回、子宮腺形成不全マウスを作製することにより着床と妊娠におけるマウス子宮腺の役割を検討した。生後4日目にICRマウス新生子の皮下にプロジェステロンの滲み込んだシリコンを埋め込み、以後2週間毎に同様の処置を行った。埋め込みは常に左側に行い、シリコンは8週齢で取り出した。8週齢、12週齢(シリコン除去4週後)、18週齢(同10週後)のマウスから非妊娠子宮を採取し、性周期がみられるようになった10週齢(シリコン除去2週後)~12週齢(同4週後)のマウスを用いて妊娠7、14日の子宮を観察した。18週齢(シリコン除去10週後)のマウスに関しては産子数も調べた。プロジェステロン処置を行った結果、8、12週齢の子宮には子宮腺がほとんど存在せず、18週齢ではその数がわずかに増加していたが、正常数よりは有意に少なかった。妊娠7、14日で解剖した結果、着床数はいずれも左右の子宮角で異なった。妊娠7日の子宮・胎盤に組織学的な異常は認められなかったが、妊娠14日では基底脱着膜にアミロイドの沈着部位や流産部位が見られた。18週齢の子宮腺形成不全マウスの妊娠例では7匹の子が生まれた(うち1匹は死産)。妊娠7日目における着床数の平均が16であったのに対して実際の産子数が6匹であったこと、さらに妊娠14日目の子宮内に異常が起こっていたことから子宮腺形成不全マウスでは妊娠後期に流産が起こった可能性がある。

A-19 マウス血管形成における *Sox17*, *Sox18* の相補的役割

松井利康¹、金井克晃¹、金井正美²、野馬隆志¹、石井万幾¹、城所知秀¹、丸丸正道¹、川上速人²、林良博¹

(¹東京大・農学生命・獣医解剖、²杏林大・医・解剖第2)

Sox(*sry*-related HMG box)ファミリーは、哺乳類の精巣決定遺伝子 *Sry* の DNA 結合領域である HMG ボックスと高い相同性を示す一連の転写因子群である。マウスおよびヒトにおいて、現在までに約20数種類の *Sox* 遺伝子が同定されており、様々な細胞の分化決定に重要な役割を担うことが明らかとなっている。*Sox* ファミリーは、その一次構造から幾つかのサブグループ(subgroup A-H)に分類することができ、*Sox17*, *Sox18* は *Sox7* と共にサブグループ F に属している。

Sox18 の dominant negative 変異を持つ ragged マウスが循環器系や被毛に異常を示すのに対し、*Sox18*^{-/-} マウスは血管系における異常を示さない。一方、我々は、*Sox17*^{-/-} マウスが胚性内胚葉の分化異常により胎生致死であることを明らかとしている。*Sox17* は胎仔期の血管内皮細胞において強く発現するが、*Sox17*^{-/-} マウスの血管系に顕著な異常は認められない。これらの結果は、*Sox17*, *Sox18* が血管形成において機能相補する可能性を強く示唆している。

そこで、我々は *Sox17*, *Sox18* の血管形成過程における機能解明を目的として、*Sox17*^{-/-}/*Sox18*^{-/-} マウスを作成し、その表現系を *Sox17*^{mid}/*Sox18*^{-/-} マウスと比較検討した。その結果、*Sox17*^{-/-}/*Sox18*^{-/-} マウスは全ての雌個体において不妊を呈し、卵巣形成異常および一部臓器の血管系異常が認められた。本会では、これらの知見をもとに *Sox17*, *Sox18* の血管形成における機能について考察したい。

A-18 ICRマウスおよびモロシヌスマウスにおける子宮腺の分布

鬼木宏幸¹、本道栄一¹、並河鷹夫²、木曾康郎¹

(¹山大・解剖学研究室、²名古屋大学大学院生命農学研究所)

胚の着床と子宮腺の分布との間には相関性があることが示唆されてきた。そこで、多産型のICRマウスと少産型のモロシヌスマウスを用いて、子宮腺の分布と産子数との間に関係性があるかどうかを調べた。そのため、子宮腺の分布の3次元(3D)モデルを作成した。ICR(n=4)およびモロシヌス(n=3)の非妊娠子宮を用い、8μmの厚さで連続切片を作成し、H-E染色を行った。子宮腺数の密度および分布を調べるために10枚ごと(80μm間隔)の切片を、片側子宮角全長に渡って調べた。3Dモデルはこれらの切片を用いて、子宮組織像をデジタルカメラで撮影後、PCにおいて、三次元モデル構築ソフトウェア「3D-サーフェス」(Ratoc System Engineering Co.,LTD.)を用いて作成した。子宮の全長にわたって子宮腺の分布を調べた結果、ICRおよびモロシヌスともに、子宮腺の多い領域と少ない領域が混在しており、子宮腺の分布が様でないことが明らかになった。ICRの方がモロシヌスに比較して子宮腺の多い領域数は多かった。また、ICRの子宮腺数は全体的に見てもモロシヌスに比較して多かった。さらに、子宮腺は反間膜側および側面に多く存在し、間膜側にはあまり分布していなかった。子宮腺の多い領域数は、片側子宮角につきICRでは6~9箇所、モロシヌスでは1~2箇所であった。この子宮腺の多い領域、あるいは少ない領域に着床していると考えらるなら、平均産子数12~16匹の平均産子数2~3匹のモロシヌスでの子宮腺の分布の差は、両側子宮角に着床するとして、産子数と一致する。このことは、子宮腺の分布と胚の着床との関連性を想起させる。

A-20 (演題取り消し)

A-21 マウス各系統精巣における熱ストレス抵抗性に関する研究

上総勝之¹、並木由佳¹、昆泰寛¹、安居院高志¹
(¹北大院・獣医実験動物)

【目的】哺乳類の精子形成は一般的に体温より2~8 低い温度を要する。停留精巣による不妊症において、熱ストレスに由来する細胞損失メカニズムには不明な点が多い。本研究の目的は、実験的停留精巣術後におけるマウス精巣の系統差を明確にすることによって熱ストレス抵抗性因子の存在に関する基礎的知見を得ることにある。【方法】10 系統のマウスとそのうちの3 系統によるF1 を用いた術後の精巣における変化を形態学的及び分子生物学的に比較観察した。【結果】術後14 日目、A/J, BALB/c, CBA/N, C3H/He, C57BL/6 (B6), ddY, ICR の停留精巣重量は未処置精巣の50%以下に減少していたが、AKR/N (AKR), MRL/MpJ-+/+ (M+), MRL/MpJ-*lpr/lpr* (*lpr*)のそれは約70%であった。前者を感受性群、後者を抵抗性群とした。セルトリ細胞インデックス及び半定量的RT-PCRの結果、抵抗性群では感受性群と比較し後期精母細胞と円形精子細胞の高い残存率が認められた。さらに感受性群のみで術後TUNEL染色陽性細胞の高い出現率が認められたうえ、感受性群のみでProliferating cell nuclear antigen免疫組織化学染色陽性細胞の顕著な減少が見られた。F1解析の結果、B6とM+とのF1、B6とAKRとのF1は熱ストレス感受性、M+とAKRとのF1は抵抗性を示した。【結論】上述の所見より、M+、*lpr*、AKR3系統の精巣は熱ストレス抵抗性因子を有し、感受性マウスに比較し低いアポトーシスの出現率と高い細胞増殖活性を示すことが明らかとなった。さらにMRLとAKRに見られる熱ストレス抵抗性は遺伝的に同一である可能性が示唆された。

A-23 Peculiar Bundles of Filaments and Multivesicular Nuclear Body in Somatic Cells of the Lesser Mouse Deer Testes: An Ultrastructural Study

アンドリアナビピン ピンタン¹、金井克晃¹、木村順平²、
福田勝洋³、九郎丸正道¹、林良博¹

(¹東大・獣医解剖、²日大・生物資源・獣医解剖、³名大・生命農学・動物形態)

Sexually mature lesser mouse deer were obtained in East Malaysia. The testes were perfused with 5% glutaraldehyde, postfixed with 1% OsO₄, dehydrated in ethanol, and embedded in Araldite. The semithin and ultrathin sections of testes were cut and observed by light microscopy and transmission electron microscopy (JEM-1200). As a result, in Leydig cells, two types of bundles of filaments were frequently recognized. These bundles of filaments were peculiar in Leydig cell, but not in other testicular cells. One of the two types was the bundles of actin filaments (approximately 5 nm in diameter). They were present in the nucleus and cytoplasm. Another one was the bundles of intermediate filaments (approximately 10 nm in diameter). They were present only in the cytoplasm. The existence of peculiar bundles of filaments in Leydig cell has never been reported in testicular cells of any other mammalian species. Thus, it seems likely that the bundles of actin and intermediate filaments are specifically present in Leydig cells of lesser mouse deer, but their functions are still unclear. On the other hand, multivesicular nuclear body (MNB), specifically present in the Sertoli cell nucleus of ruminant testes, was infrequently encountered within the Sertoli cell nucleus of lesser mouse deer. MNB, associated with nucleolus, was composed of vesicles, irregular tubules, and ribosome-like structures. Since the MNB, though less developed compared to that of bulls and goats, was present even in the Sertoli cell nucleus of primitive ruminant lesser mouse deer, the MNB should be a common structure of ruminant Sertoli cells.

A-22 減数分裂中期特異的アポトーシス関連コンジェニックマウスの解析

昆泰寛¹、並木由佳¹、上総勝之¹、安居院高志¹
(¹北大院・獣医実験動物)

【目的】MRLマウス精巣には減数分裂中期特異的にアポトーシスが多数出現する。演者らは、本表現型がExonuclease I (*Exo1*) 遺伝子のスプライス異常に起因することを、戻し交配個体を用いた染色体マッピング法によって明らかにしてきた。今回、染色体上の*Exo1*周辺がMRL由来でその他がC57BL/6由来となるコンジェニックマウス(CM)を作製し解析した。【方法】材料として、MRLとC57BL/6とのF1個体にC57BL/6を戻し交配し、第8世代以上の個体からF1を作製することで、MRL由来*Exo1* (第1染色体約100cM)をホモに持つCMを作製した。8週齢個体より精巣を採取し顕微鏡標本とした。HE染色標本から精子数ならびに精母細胞数をSertoli cell indexとして算出し、近交系あるいは戻し交配個体のデータと比較した。さらに、CMゲノムDNAから*Exo1*のスプライス異常に起因すると考えられる領域を増幅し、*in vitro* splicing実験をおこなった。【結果】CMホモ個体の体重に対する精巣重量比は、ヘテロ個体のそれに比較し明らかに小型であった。精子数はホモ個体で有意に低かった。また、ホモ個体の異常Metaphase値はヘテロ個体のそれに比較し有意に高かった。これらの差は、近交系ならびに戻し交配個体のデータにほぼ一致した。さらに、CMにおいては、正常第2精母細胞もホモ個体で有意に減少していた。*in vitro* splicing実験では、*Exo1*の第8イントロンbranch siteがTの場合スプライスされ、Aの場合スプライスされなかった。上述の結果より、精子形成異常を有するMRLマウスの特性が改めて示された。

A-24 Diethylstilbestrol 曝露による雄マウスの生殖障害発現機序

星信彦¹、割田克彦¹、橋本統¹、長谷川喜久¹
(¹北里大・実験動物)

【目的】Estrogen agonistとして最も力価が強いdiethylstilbestrol (DES)を、胎生期およびヒトの胎齢3~4カ月に相当するマウスの新生子期に曝露させ、その性成熟期以降における生殖障害発現機序を検討した。【方法】未経産ICRマウスを交配後、DES 10 µgを妊娠7、10、13、16日に皮下投与した。得られた新生子雄マウスには、出生後3~7日の5日間にかけてSesame oil (IUE*群)ならびにDES 0.1 µg (IUE+NE** 0.1 µg群)、DES 1 µg (IUE+NE 1 µg群)、DES 10 µg (IUE+NE 10 µg群)を1日1回皮下投与した(*IUE: *in utero* exposure, **NE: neonatal exposure)。対照として胎生期および新生子期共にSesame oil (Control群)を投与した。各投与群とも8週齢で組織学的、内分泌学および分子生物学的に、また、8~16週齢で妊孕能について検討した。【結果】Control群で妊孕能100%であったのに対し、胎生期のみDES投与で60%、さらに新生子期にDESを投与することで著しく低下し、IUE+NE 1 µgおよび10 µg群では妊孕能は認められなかった。胎児・新生子期の短期間DES曝露のみでも、性成熟期において血中FSH、LHおよびテストステロン濃度が低下し、内分泌学的変化のみならず、StAR、AR、ER遺伝子の発現量の変化が示され、細胞増殖ならびに精子形成の阻害が引き起こされた。【総括】器官形成期および中枢神経系の発達時期における内分泌攪乱物質の曝露は、性成熟期に達してもなおステロイドホルモン合成系および受容体遺伝子の発現に影響を及ぼし、生殖内分泌系の持続的かつ不可逆的破壊を引き起こすことが示された。

A-25 *Sry* 遺伝子導入マウスの未分化生殖原基を用いた *Sry* による *Sox9* 遺伝子の発現制御

城所知秀¹、金井克晃¹、藤澤正彦¹、金井正美²、の場章悟¹、
九郎丸正道¹、多屋長治³、米川博通³、林良博¹
(¹東大・獣医解剖、²杏林大・医、³(財)東京都臨床研)

哺乳類の性決定は Y 染色体上に存在する *Sry* 遺伝子の有無により制御されており、*Sry* が未分化生殖原基において一過性(マウスにおいて、ts14-24)に発現することにより、精巢形成を誘導する。*Sox9* は *Sry* の下流で機能する精巢形成因子であり、1) *Sry* の発現上昇と一致して *Sox9* の発現量が雄特異的に上昇する、2) ヒト *SOX9* 変異の一部が XY 女性を示す、3) *Sox9* 単独により XX 雄マウスを誘導できることから、確証を得るまでには至っていないものの、現在のところ *Sry* の標的として *Sox9* が最も有力視されている。

我々は、*Hsp70.3* プロモーター領域に *Sry* 遺伝子を連結した発現ベクターを用いて、XX 雄を示すトランスジェニックマウス(Tg マウス)を作出した。組織学的および半定量的 RT-PCR 解析を行った結果、この Tg マウスの *Sry* は、正常 XY 個体での *Sry* の発現開始以前から生殖原基内に恒常的に発現していること、12.5dpc (ts30) の XX^{Sry} において、精細管形成が正常 XY と比べ、前/後部で遅延することが明らかとなり、正常 XY 個体と比較して *Sry* の発現量の弱い Tg マウスであることが推測される。次に、*Sry* の発現量の異なる XX^{Sry}(低レベル)、XY(正常)、XY^{Sry}(高レベル)3 種の雄マウスを用いて、初期性分化過程(ts12-30)における *Sox9* の発現を検討した。その結果 *Sox9* の発現量は XX^{Sry} < XY < XY^{Sry} の順に高い発現を示した。一方、XX^{Sry}、XY^{Sry} いずれにおいても、*Sox9* の発現開始時期は正常 XY 個体とほぼ同時期であることが明らかとなった。以上の結果は、*Sox9* の発現量は、*Sry* の発現量に依存的に制御されていることを強く示唆し、*Sox9* は *Sry* によって直接制御を受けているという仮説を強く支持する。

A-27 マウス性分化初期におけるセルトリ前駆細胞内での *Sry* 依存的グリコーゲン代謝調節

の場章悟¹、金井克晃¹、城所知秀¹、野馬隆志¹、佐藤剛¹、九郎丸正道¹、林良博¹
(¹東京大・獣医解剖)

哺乳類の *Sry* は精巢形成を誘導するマスター遺伝子である。その発現は、未分化生殖原基で一過性に認められ、マウスでは tail somite stage(ts)14(胎齢 11.0 日)から開始し、ts18(11.5 日)でピークに達した後減少し、ts24(12.0 日)までに消失する。*Sry* の発現により、ts16~18 で体腔上皮細胞の増殖、中腎細胞の生殖隆起への侵入が促進され、ts24 以降に精細管形成を誘導する。これまで我々は、胎子精巢特異的に性分化期の体細胞内にグリコーゲン顆粒が存在することを見出し、今回、体細胞内でのグリコーゲン蓄積と *Sry* との関連性について詳細な検討を行った。ts10 から 2ts(約 4 時間)ごとに生殖原基を採取し、PAS 染色により組織学的に解析した結果、ts12 までの生殖隆起内の体細胞は雌雄とも陽性反応は認められなかった。しかし、*Sry* の発現が始まる ts14 において、生殖細胞に隣接する一部の SF-1 陽性細胞が PAS 陽性を呈し、その数は ts16~18 で顕著に増加し、ts18 以降生殖細胞を取り囲んだ一次性索様の構造をとることが明らかとなった。これは、*Sry* の発現開始時期と一致してセルトリ前駆細胞にグリコーゲンの蓄積が誘導されることを強く示唆する。さらに、このグリコーゲンの蓄積が *Sry* に直接起因するのかが検討するため、*Sry* 性転換 Tg マウスを用いた結果、XY 個体の生殖原基と同様に XX^{Sry} 個体においても PAS 陽性細胞が生殖細胞周囲に認められた。以上の結果から、セルトリ前駆細胞内におけるグリコーゲンの蓄積は、*Sry* の直接的な下流カスケードに含まれ、さらに生殖細胞との相互作用が関与していることが強く示唆された。本会では、*Sry* からグリコーゲン代謝調節へのシグナル経路について、生殖細胞との関連性も含めて考察したい。

A-26 未分化生殖原基の前後軸におけるステージ特異的な精巢分化能の差異

平松竜司¹、金井克晃¹、水上拓郎¹、中野久丹子²、金井正美³、
九郎丸正道¹、林良博¹
(¹東大・獣医解剖、²東工大・生命理工、³杏林大医)

哺乳動物の性分化において、Y 染色体上の性決定遺伝子 *Sry* は、未分化生殖原基を精巢に誘導する中心的な役割を担っている。*Sry* の発現は、ts(tail somite stage)14(胎齢 11.0 日)頃から、未分化生殖原基の中央部より開始し、その後、前部/後部へと広がり、ts18(11.5 日)までに全領域にわたって認められるようになる。また、前部においてのみ中腎細管が存在し、後部において、卵精巢を示す異常個体において卵巢領域が頻りに認められる。これらのことは、胎子の未分化生殖原基において、前・中・後部の前後軸が既に存在することを強く示唆する。そこで、我々は、未分化生殖原基の前後軸と精巢への分化能との関係について検討するため、ts10~17 のマウス未分化生殖原基を、前部、中央部、後部の 3 つに分割し、5 日間器官培養後、組織学的に精細管形成能、ライディッヒ細胞の分化能を検討した。その結果、ts12~14 からの培養群では、中央部においては正常な精細管形成が形態的に確認されたが、前部、後部の生殖原基においては不明瞭であった。さらに、ts15~17 からの培養群では前部/中央部において、正常な精細管形成が誘導された。一方、ライディッヒ細胞の分化は、ts12 以降の培養群において全ての領域でその分化が確認されたが、ts10/11 からの群では、前部においてのみ認められた。以上の結果から、雄の未分化生殖原基における精細管形成能は、*Sry* の中央部での発現開始と一致して、ts12~14 において、中央部が、前部/後部と比較して、高い精細管形成能を示すこと、さらに、ライディッヒ前駆細胞は、ts12 頃から生殖原基の前部より中央/後部へと移動する可能性が示唆された。

A-28 マウス胎仔生殖腺発生過程における integrin v 3 の発現解析と MFG-E8 との関連性

石井万幾¹、金井克晃¹、金井正美²、田島陽一³、平松竜司¹、
松井利康¹、九郎丸正道¹、佐内豊³、林良博¹
(¹東大・農学生命・獣医解剖、²杏林大・解剖第 2、³(財)東京都臨床研)

MFG-E8 (milk fat globule-EGF factor8) は、2 つの Notch 様 EGF ドメインと 2 つの discoidin ドメインが連結した構造を持つ分泌蛋白であり、N 末側の EGF repeat 内に存在する RGD 配列が、integrin v 3 と結合すると想定されている。我々はこれまでに、胎仔期において、生殖原基が MFG-E8 の主要産生部位の一つであり、マウス胎仔生殖原基の形成初期において、一過性に生殖腺間質内の一部の体細胞から分泌され、中腎と生殖腺の境界領域に蓄積されることを見出し、このことから、MFG-E8 が生殖腺原基の形態形成過程で、細胞接着因子として機能することが示唆された。そこで我々は、MFG-E8 の各ドメインおよび EGF ドメイン中の RGD 配列を RGE に変換した EGFmutant の融合タンパクを用いて生殖腺および中腎の体細胞における細胞接着能の解析を行い、EGF ドメインを介した細胞接着が生殖腺特異的であることを報告した(第 133 回本学会)。

今回さらに、MFG-E8 の細胞接着能と integrin v 3 との関連性を検討するため、whole mount *in situ* hybridization 法を用いて、胎齢 10.5 から 15.5 日の生殖腺における integrin v および 3mRNA 各々の発現パターンの解析を行った。その結果、生殖腺に強い発現が両者で見られ、その共発現部位は PGCs およびそれに隣接する体細胞であることが確認された。本学会ではこの結果を踏まえ、生殖腺形成における MFG-E8 と integrin v 3 の細胞間相互作用について考察する。

A-29 イモリの生殖細胞に発現する Vasa 遺伝子

恒川直樹¹、中村文²、福井彰雅³、浅島誠³、野瀬俊明²
(¹三菱化学学生命研、東大理、²三菱化学学生命研、³東大・総合文化)

両生類は無尾類(カエル)と有尾類(イモリやサンショウウオ)とに大別することができる。両生類生殖細胞の発生に関する研究は、古くから無尾類において詳しく行われ、その受精卵には生殖質の存在が示されている。この母性因子として供給される生殖質は、生殖細胞の決定を担うことが実験発生的に証明されている。一方、有尾類の場合、生殖質の存在を明確に示した観察例はなく、それゆえ生殖細胞は中胚葉誘導期の後天的誘導により運命決定されると推定されてきた。しかし、魚類や鳥類に見られるように、生殖質の形状は生物種によって様々であることから、有尾両生類の生殖質の有無についても分子レベルで詳細な検討を加える必要がある。そこで我々は有尾類における生殖細胞の決定様式を解明するため、イモリ Vasa 遺伝子に着目した。Vasa 遺伝子は様々な動物種で単離され、いずれの場合も生殖細胞を追跡するための優れた分子指標となることが示されている。Vasa 遺伝子の単離は、有尾類のなかでも多くの利点を持つアカハライモリ(*Cynops pyrrhogaster*)を材料にして行い、その精巢 cDNA ライブラリーから cDNA クローンを得た。また、GST-Vasa 融合蛋白質をもとにイモリ VASA 特異抗体を調製した。これまでの解析から、カエル、ニワトリ、マウス等の場合と同様、イモリ Vasa 遺伝子産物は生殖細胞でのみ発現していることが判明した。さらに免疫組織化学的手法等を用いて、卵子発生過程や初期発生過程における VASA 蛋白質および発現細胞の挙動を検討している。

A-31 絶滅した日本のオオカミの遺伝的特徴と系統解析

石黒直隆¹、堀内基広¹
(¹帯広大・獣医公衆衛生)

【目的】日本には明治時代まで2種類のオオカミ(北海道のエゾオオカミと本州、四国、九州のニホンオオカミ)が生息していたが、狩猟により絶滅した。エゾオオカミは形態的にもニホンオオカミに比べて大きく大陸系のオオカミとされてきた。一方、ニホンオオカミは大陸系のオオカミに比べ体型が小さくイヌに近い形質を有していた。本研究では、絶滅したオオカミの骨よりミトコンドリア DNA を増幅し、エゾオオカミとニホンオオカミの遺伝的な違いについて解析して大陸系のオオカミと比較したので、その成績を報告する。【材料と方法】エゾオオカミは北海道大学北方生物圏フィールド科学センター植物園に所蔵されている四肢骨を2個体解析した。ニホンオオカミは、第134回日本獣医学会で報告した四国・高知産のニホンオオカミ1個体に加えて、骨の特徴からニホンオオカミと同定され博物館などに保存されていた試料4個体を解析した。ミトコンドリア DNA (mtDNA) の分析は、骨より骨粉を採取し骨に残存している mtDNA の D-loop 600bp を PCR 法にて増幅し、これまで報告されているオオカミとイヌの塩基配列と比較して系統解析を行った。【結果と考察】今回解析したエゾオオカミ2体は、mtDNA の塩基配列が同じであり、系統解析した結果、大陸系のオオカミに分類され、増幅した600bpの塩基配列はカナダ・ユーコン地方のオオカミと同じであった。ニホンオオカミに関しては、2個体は十分な領域が増幅できなかったが、残り2個体は以前報告した高知産のニホンオオカミと系統樹上ほぼ同じグループに位置し、大陸系のオオカミとは異なっていた。共同研究者:片岡登、遠藤秀紀、岩田榮之、加藤克、市川秀雄

A-30 家畜生体用 X 線 CT による成体牛頭部の構造観察

浅利昌男¹、尼崎肇²、撫年浩³、藤田和久³
(¹麻布大・解剖第一、²日獣大・解剖、³家畜改良センター)

【目的】大型 X 線 CT 装置(CT)により、非侵襲性に大型家畜の生体内構造を明らかにすることが可能となるが、本邦では大型家畜を検査対象とする大型のCTの開発が遅れていた。しかし、畜産技術協会および家畜改良センターにより大型のCTが開発設置されその活用が可能となった。本報告は、JRA 特別振興資金により(社)畜産技術協会が、(独)家畜改良センターと共同研究で実施した肉用牛遺伝資源活用体制整備事業の一貫で行なわれたものであり、成牛頭部の連続CT撮影を行い画像解析ソフトにより3次元再構築後、画像の解析を試みた。【材料と方法】実験には雌ホルスタイン種の成牛を用いた。観察は生体および死後12時間以内の検体の観察を同時に試みた。撮影部位は眼窩後縁を前位とし、角突起後縁を後位とした範囲で5mm間隔にて走査し連続撮影をした。本装置は、東芝メディカル社製で、撮影した検体は撮影終了後直ちに凍結し撮影部位に相当する部位を帯鋸で横断し、画像と切断面の比較観察を行った。【結果とまとめ】CT像の撮影および続く画像解析ソフトによる解析によって、頭部の立体構造の観察が可能となった。さらに骨組織、軟部組織などの各成分を分離し、あるいは合成し、頭部の再構築が可能となった。本調査により複雑な形状で頭蓋骨内に広がる副鼻腔の形状が周囲構造との位置関係を保ちながら明らかになった。本装置の利用は、大型産業動物の生体情報を非侵襲性に得ることを可能とし、体部の観察とその画像診断的応用のみならず、個体の成長過程における筋・骨など特定部位の発達など連続的な調査への活用や複雑な構造の立体画像化による教育的活用まで、幅広い応用が今後期待された。

A-32 ニワトリ臍管結紮による臍臓組織変化に関する形態学的研究

武藤頭一郎¹、長竿淳¹、桐山千絵子¹、吉岡一機¹、辻尾祐志¹、谷口和美¹、大野秀樹¹
(¹北里大・獣医解剖)

我々はこれまで、鳥類の臍島内に臍外分泌部が存在し、介在導管上皮細胞が臍島内分泌細胞の機能に関わっていることを報告してきた。今回は、ニワトリ臍管結紮による臍島および外分泌部が介在導管上皮細胞の形態学的変化について光学顕微鏡的、免疫組織化学的および電子顕微鏡的観察によって検索したものである。検体は白色レグホン種成鶏10例で、3例を無処置対照群、7例を実験群とし、全臍管を結紮後7、14、21日に採材した。ケタミン深麻酔下で放血により安楽死後、臍臓を採取した。なお細胞増殖活性を検査する目的で採材1時間前に5-bromo-2-deoxyuridine(BrdU)50mg/Kgを腹腔内投与した。組織片は4%buffered paraformaldehyde(0.1M 磷酸緩衝液 pH7.4)、または0.5%glutaraldehyde+1.5%paraformaldehyde(同緩衝液)で固定、常法通り各種の標本を作成し、各検索により以下の知見が得られた。1.臍管結紮後7日では臍外分泌部終末部は退行し、増生した導管によって占められていた。この傾向は経時的に進行していた。また、残存する臍島周囲には正常に近い外分泌部が観察された。2.増生した多数の導管にはBrdU反応性を示し細胞増殖活性を示す細胞や、抗インスリンおよび抗ビメンチン免疫染色においてしばしば陽性反応を示す細胞が観察された。3.増生した導管上皮内に内分泌細胞が多数観察された。また、未分化細胞と思われる小型の細胞も導管上皮細胞の間に観察された。以上のことから、臍管結紮したニワトリの臍臓では、導管の増生が盛んに生じ、これら増生した導管を構成する上皮細胞から、内分泌細胞などの前駆細胞となる未分化細胞が生じることが示唆された。

A-33 胆管結紮ニワトリに認められた鶏冠ならびに精巣の萎縮に関する形態学的研究

吉岡一機¹、今井志穂¹、佐々木美也子¹、谷口和美¹、篠井宏実²、
武藤顕一郎¹

(¹北里大・獣医解剖、²北里大・獣医寄生虫)

【目的】様々な肝疾患に伴ない内分泌疾患、血液疾患、皮膚疾患などの多臓器病変が併発する事が知られているものの、その病理発生については未だ不明な点が多い。今回、我々は肝疾患の研究で汎用される胆管結紮モデル動物の作出過程において肝疾患に伴う多臓器病変を認めた。そこで本研究では胆管結紮ニワトリに認められた鶏冠ならびに精巣の萎縮について検討を行った。【材料と方法】実験材料は雄の成鶏9羽で、6羽については肝外胆管結紮後、5週および10週に安楽殺された。なお、その他の3羽は対照群とした。採材された組織片は常法に従い組織学的、免疫組織化学的および電子顕微鏡学的検索を行った。また、血清 testosterone 濃度の測定も行った。【結果および考察】肉眼的に実験の経過に伴い鶏冠および精巣の萎縮が観察され、結紮後10週で鶏冠の最大長が対照群の約1/2、精巣の長径が1/3にそれぞれ減少していた。組織学的に精巣においては精子形成が認められず、精細管の萎縮と間質の肥厚が特徴的であった。肥厚した間質には線維成分の増生に加え大型脂肪滴を有するLeydig細胞の増殖が観察された。一方、鶏冠においては表皮直下における血管の萎縮と真皮における粘液の減少が認められた。また免疫組織化学的に androgen receptor 抗体陽性細胞は経時的に減少する傾向を示していた。なお、血清 testosterone 濃度は実験群で低値を示していた。以上の結果は胆管結紮ニワトリにおける鶏冠ならびに精巣の萎縮に対し、androgen 分泌の低下が密接に関連していることを示唆していた。

A-35 methimazole 投与ラットにおける甲状腺濾胞上皮細胞の形態学的研究

辻尾祐志¹、長竿淳¹、吉岡一機¹、谷口和美¹、武藤顕一郎¹
(¹北里大・獣医解剖)

【目的】甲状腺は他の内分泌器官と比較し極めて特異的な分泌様式をもち、その機能状態と形態の関連について未だ不明な点が多い。そこで本研究では、ラットに抗甲状腺剤であるmethimazole(MMI)を投与し、濾胞上皮細胞の形態学的変化について検討を行った。【材料・方法】材料は7~8週齢のWistar系ラット雄、計12匹の甲状腺で、MMIを0.04%の濃度でD.Wに溶かしたものを自由給餌し、10、20、30日後に血清T₄測定のため血液サンプル採取後4%PFA固定により採材した。採材された甲状腺組織片は常法に従いパラフィン包埋され薄切切片作成し、HE染色、AZAN染色、PAS染色、PCNA抗体を用いた免疫染色を施し観察を行った。【結果と考察】肉眼的にMMI投与ラットの甲状腺は重量を増加させ肥大し、血清T₄は対照群に比較し有意に低値を示していた。組織学的にはPAS染色に赤紫色を呈するコロイドの経時的な消失と濾胞腔の減少が観察された。濾胞上皮細胞は経時的に立方~円柱状に細胞丈を増し、AZAN染色ではアソカルミンGで染色される細胞質内顆粒が増加する傾向を示していた。また多数の有糸分裂像も観察され、PCNA抗体では10日で最も高い増殖活性を示していた。以上のことから、MMI投与により甲状腺のコロイド産生は低下するものの、濾胞上皮細胞の増殖活性やサイログロブリン合成は活性化しているものと解された。

A-34 甘味受容体蛋白質 T1R3 の肝臓および膵臓における発現

谷口和美¹、吉岡一機¹、武藤顕一郎¹
(¹北里大・獣医解剖)

【目的】味蕾の味細胞のapical surfaceにはさまざまな種類の味覚受容体蛋白質が存在している。甘味受容体の蛋白質のうちT1R3は、ノーザンブロッティングにより、味細胞のみならず、他の臓器にも messenger RNA の発現が報告されている。そこで、本研究は、味細胞以外のどの臓器の何細胞にこの蛋白質が局在するのかわかり、とりわけ肝臓と膵臓に注目して、観察することにより、この蛋白質の性質により迫ることを目的とした。【材料と方法】材料としてヒトおよびマウスの肝臓および膵臓のパラフィン切片を用いた。ヒトのパラフィン切片は市販のものを購入した。マウスは4%パラフォルムアルデヒド4%スクロース0.1Mリン酸緩衝液で灌流固定し、味蕾を含む諸臓器を採取し切片を作製した。Gene bankより遺伝子情報をダウンロードし、ヒトとマウスに共通する部分を選んで、これに対する抗体をデザインして作成し、組織切片を免疫組織化学的に観察した。【結果】マウスの味蕾の味細胞においては、この蛋白質が発現している細胞とそうでない細胞が混在していた。ヒトおよびマウスの肝臓の小葉間胆管および介在部の細胞に、また膵臓のduct cells および腺房中心細胞に、その発現が認められた。【考察】直接味に接することのない肝臓や膵臓においても甘味受容体蛋白質 T1R3 が発現していることが免疫組織化学的に確認された。肝臓や膵臓においては、胆汁や膵液のおとる通り道である duct を形成する細胞に認められたことから、胆汁や膵液中の甘味の受容に関わり、これにより消化過程の調節の役割を果たしている可能性が示唆された。あるいは、この蛋白質は未知のなんらかの機能を果たしている可能性も考えられた。

A-36 腱炎における腫瘍壊死因子(TNF) の関与

保坂善真¹、桐沢力雄²、岩永敏彦³、山本悦子¹、植田弘美¹、
竹花一成¹

(¹酪農学園大・獣医解剖、²酪農学園大・獣医微生物、³北大院・解剖)

【背景と目的】TNF は炎症や免疫反応の調節など生体に多様な作用をもたらすサイトカインであるが、一方でアポトーシスを誘導することも知られている。皮膚や関節の炎症ではTNFは炎症の動向を左右する物質であることが解明されているが、腱における関与は明確ではない。腱炎における組織変性機序を解明し予防治療法を提示することはウマのみならず、スポーツ医学の面からもヒトの運動器障害対策に大きく貢献する可能性を有する。我々は腱炎におけるTNFの関与を明らかにするため腱の状態によるTNF発現の変化を検索し、コラーゲン線維やグリコサミノグリカン(GAG)などの細胞外マトリックス成分の変化について解析した。【材料と方法】ウマの浅指屈筋腱から正常および炎症腱を採取し、各状態でのTNFとその関連因子の発現を形態学的(免疫組織化学、ISH法)、生化学的(immunoblot法)手法によって検索した。また組織変性を確認するため基質中のGAGを解析し、光学、電子顕微鏡で腱細胞とコラーゲン線維を観察した。【結果と考察】TNFの発現はいずれの腱でも認められ、持続的発現であることが明らかになったが、炎症腱での発現量は顕著であった。炎症腱では、突起を伸らし粗面小胞体が発達した腱細胞の存在、線維直径およびGAG組成の変化、線維の走行異常やアポトーシス発現の増加などを確認した。炎症下の皮膚や関節に見られる類似の変化は、TNFの過剰発現とその誘導因子が影響していると考えられている。したがって腱においてもTNFは炎症の鍵物質であり、TNFとその誘導因子が腱変性を進行させたと推察できる。腱炎時にTNFや誘導因子の発現量や期間を調整することは腱変性を抑制し、炎症後の癒着形成を抑え治癒を促進できると考えられる。

A-37 細胞トレーサーとしての半導体ナノ粒子の可能性

桃あさみ¹、花木賢一²、遠山稿二郎³、山本 健二⁴、谷口隆秀¹、本多英一¹

(¹農工大・家畜微生物、²学術振興会・科技特、³岩手医科大・医・第二解剖、⁴国際医療センター研究所)

【目的】有機蛍光色素に比べて蛍光強度・耐光性等で優れた特性を有する半導体ナノ粒子 (QDs) は、生物学分野への様々な応用研究が進められている。我々は Vero 細胞がアルブミン存在下で QDs をエンドソームに貯留することを見出し、その保持時間を観察して細胞トレーサーとしての可能性について検討を行った。【方法】本研究で用いた QDs は 560nm または 640nm の蛍光を発する親水性粒子である。はじめに QDs の分散補助剤として 10 種のアルブミンの選抜を蛍光光度計を用いて行った。次に、選抜したアルブミン存在下で QDs を Vero 細胞に取り込ませた。経目的にサンプリングして細胞をホルマリン固定し、蛍光画像を取得した。QDs の対照として FITC 標識 BSA を用い、同様の検討を行った。【結果と考察】QDs の分散補助剤としてはヒツジ血清アルブミンが最も良好であった。FITC 標識 BSA を保持する細胞は処理後 1 日目にはほとんど認められなかったのに対して、QDs を保持する細胞は 7 日後でも観察された。しかし、細胞分裂に伴って QDs を保持する細胞・QDs を含むエンドソームの数は減少した。分裂後の細胞に QDs が保持されるか否かは、分裂前の QDs を含むエンドソームの数に依存するようである。耐光性と蛍光強度の極めて高いエンドソームマーカーとして生物学研究に活用可能であった。そして、QDs はエンドソーム内で長時間貯留されることから、例えば QDs 標識した細胞を個体へ移植した場合、数日間の細胞トレーシングに応用できる可能性がある。

A-39 成熟マウスの腎臓における Eph レセプターの発現

小川和重¹、和田大樹¹、岡田法能¹、バスクアーレエレナ²、津山伸吾³、佐々木文彦¹

(¹大阪府大・獣医解剖、²The Burnham Institute、³大阪府大・分子生物)

Eph はレセプターチロシンキナーゼの中で最大のファミリーを構成し EphA と EphB の 2 種類に大別され、そのリガンドも Ephrin-A と Ephrin-B に大別される膜タンパクである。EphA は主に Ephrin-A と、EphB は Ephrin-B と結合する。結合により Eph は自己リン酸化して活性化し、アクチンフィラメントの動態などを制御して細胞の接着や遊走、組織の境界形成や細胞間の認識などに働く。Eph は発生期に一過性に強く発現するため、研究は主に発生期の組織・器官を対象に行われている。我々はその機能的特性から、組織・器官形成を完了した成体の組織にも Eph が発現し、組織構築の維持などなんらかの役割を果たしていると考え研究を進めている。発生期の腎臓では、腎小体形成への関与を示唆する報告があるものの、成体の腎臓に関しては、ある種の Eph の発現をノーザンブロットで示した報告は認められるが、発現細胞の特定やその機能を調べた報告は全く見当たらない。そこで成熟マウスの腎臓における Eph と Ephrin の発現細胞を調べ、その機能的役割の検討を試みた。材料は 8~12 週齢の Balb/c マウスの腎臓を用いた。免疫組織化学染色により EphB1 はメサングウム細胞、EphB2 は遠位尿細管、EphB5 は近位尿細管、Ephrin-B1 は糸球体内皮細胞と足細胞、近位尿細管、遠位尿細管に発現していることが明らかになった。免疫沈降とウエスタンブロットにより EphB2、EphB5 におけるチロシンのリン酸化が明らかになり、これらのレセプターは成熟マウスの腎臓において活性化していることが判明した。現在、初代培養尿細管上皮細胞を用いて Eph の機能を検討している。

A-38 成熟マウスの肝臓における Eph レセプターの発現

岡田法能¹、小川和重¹、バスクアーレエレナ²、森山光章³、津山伸吾⁴、佐々木文彦¹

(¹大阪府大・獣医解剖、²The Burnham Institute、³大阪府大・統合生理、⁴大阪府大・分子生物)

レセプターチロシンキナーゼの中で最大のファミリーを構成する Eph は、原がん遺伝子として発見された膜タンパクで EphA と EphB に大別される。そのリガンドは Ephrin と呼ばれ、A と B に大別される膜タンパクである。EphA は主に Ephrin-A と、EphB は Ephrin-B と結合し、結合により Eph は自己リン酸化して活性化する。活性化した Eph は、他のレセプターチロシンキナーゼで一般に認められている細胞増殖促進作用を示さず、細胞の接着や遊走、組織の境界形成や細胞間の認識などに働く。Eph は発生期に一過性に強く発現するため、研究は主に発生期の組織・器官を対象に行われている。我々はその機能的特性から、組織・器官形成を完了した成体の組織にも Eph が発現し、組織構築の維持などなんらかの役割を果たしていると考え研究を進めている。肝臓に関しては、ある種の Eph の発現をノーザンブロットで示した報告は認められるが、発生期あるいは成熟期を問わず、発現細胞の特定やその機能を調べた報告は全く見当たらない。そこで、成熟マウスの肝臓における Eph と Ephrin の発現を調べ、発現細胞の特定を試みた。材料として 8~12 週齢の雌雄 Balb/c マウスの肝臓を使用した。RT-PCR 法により EphA2、Ephrin-A1、EphB2、Ephrin-B1 の発現が明らかになった。また、免疫組織化学染色により Ephrin-A1、Ephrin-B1 は類洞内皮細胞と静脈内皮細胞およびクッパー細胞に、EphB2 は神経線維と静脈内皮細胞に局在していた。EphA2 に関してはその局在を検討中である。現在、肝臓における Eph の機能解析実験を計画している。

A-40 遺伝性腎疾患 (ICGN) マウスにおける腎性貧血発症機序の解明

山田-山口美鈴¹、山田-内尾こずえ¹、後藤康文¹、森俊治¹、坂田千夏¹、永尾雅哉²、小倉淳郎³、山本美江⁴、宮本元¹、眞鍋昇¹

(¹京大院農生体機構、²京大院生命科学、³理研バイオリソースセンター、⁴感染研獣医科学)

【目的】貧血は慢性腎疾患において病態早期から現れる合併症 (腎性貧血) であるが、発症機序は優れた自然発症性モデル動物が少ないため未だ解明されていない。ICR 系マウスの突然変異体である ICR-derived glomerulonephritis (ICGN) 系マウスは、遺伝性腎炎症候群の病態モデルとして国立感染症研究所にて確立されたが、腎性貧血の適切なモデルでもある。(第 129-135 獣医学会)。今回、ICGN マウスにおける腎性貧血と鉄欠乏との関連性について報告する。【方法】あらかじめ眼底採血によりクレアチニン値を調べて病態の進行程度を判定し、雄性 ICGN 系マウスを発症初期と末期の 2 群に分類した。健康対象として雄性 ICR マウスを用いた。BrdU 投与 (100mg/kg, ip) 2 時間後、エーテル麻酔下に頸静脈採血を行い、迅速に臓器 (腎・肝・脾・骨髄) を摘出した。血清鉄濃度などの血清生化学検査を行うとともに、常法にしたがって各臓器のパラフィン切片を作製し、病理組織化学的解析を行った。【結果と考察】健康対照と比較して、ICGN マウスでは発症初期において正球性正色素性貧血を示し、発症末期では血清中鉄濃度の低下・脾臓での溶血・尿への鉄結合タンパク質の排出を伴う小球性貧血を示し、鉄欠乏も ICGN マウスの貧血の一誘因であると推察される。また、健康対象には全く認められないが、ICGN マウスの腎臓においては、近位尿細管上皮細胞や尿細管間質に鉄の沈着が認められた。

A-41 腎臓細管間質線維芽細胞培養系を用いた遺伝性腎疾患 (ICGN) マウス腎線維症発症の分子メカニズムの解析

後藤康文¹、内尾・山田こずえ¹、山口・山田美鈴¹、小倉淳郎²、山本美江³、宮本元¹、眞鍋昇¹
(¹京都大・農・生体機構学研究室、²理化学研究所・理研バイオリソースセンター・遺伝工学基盤技術室、³国立感染症研究所・獣医科学部)

【目的】ICR マウスの突然変異体である ICGN マウスは、遺伝性腎炎症候群をともなう病態モデル動物で、加齢とともに腎炎を発症し、病態進行にもなって糸球体および尿細管領域で線維症変性を呈する。今回、このマウスの腎線維化のメカニズムを解明すべく、細胞外マトリックス遺伝子の発現を多面的に制御する transforming growth factor (TGF)- β 1 の役割を腎線維芽細胞系を用いて検討した。【方法】ICGN マウスおよび健常対照として同週齢の ICR マウスを供した。エーテル麻酔下に屠殺し、腎を摘出した。腎から differential sieving 法により尿細管間質の線維芽細胞を単離・培養した。この培養細胞を用い、免疫細胞化学法や分子生物学的手法を用いて実験を行った。【結果と考察】ICR マウス由来の腎線維芽細胞と比較して、ICGN マウスでは多くの線維芽細胞が線維を盛んに合成・分泌する myofibroblast (α -smooth muscle actin 陽性) に分化していた。これは TGF- β 1 シグナルに対する線維芽細胞の感受性の差異によるものであることが、レポーターアッセイによって明らかとなった。この感受性の差異は、ICGN マウス線維芽細胞の細胞内で TGF- β 1 シグナル伝達因子である Smad4 の発現が高まっているために転写因子である Smad2, 3/Smad4 複合体の核移行が促進されることに起因することがわかった。これらの知見から、ICGN マウスでは TGF- β 1 シグナルに対する線維芽細胞の感受性が高まるため細胞外マトリックス遺伝子の発現が高まり、腎線維症が誘導されることが示唆された。

A-43 ラット肛門括約筋のリンパ管、血管の分布、走行とペプチド性神経との関係

権田辰夫¹、竹内崇師¹、安食隆¹
(¹鳥根医大、動物実験施設)

肛門管のリンパ管は肛門直腸リンパ節を経て、大動脈腰リンパ節に注いでいる。しかし、肛門管の壁内リンパ管の分布、走行に関しては、リンパ管の特異的染色法が無かったため、今日なお不明な点が多い。そこで、今回我々は Werner(1987)の方法及び我々が考案した多重染色法を応用し、肛門管壁内のリンパ管と毛細血管の関係及びペプチド(VIP)性神経とリンパ管との関係を形態学的に検討した。【材料及び方法】ウイスターラットの1週~12週齢の凍結切片または whole mount 標本を作製し、5'-nucleotidase (5'-Nase)でリンパ管を、alkaline phosphatase (ALPase)で血管を染色した。ペプチド性神経は、vasoactive intestinal peptide (VIP)抗体で A B C 法により免疫染色した。【結果と考察】伸展標本による観察では、肛門直腸リンパ節を経たリンパ管は、直腸下部(肛門管起始部)の外膜内に入り密な網工を形成し、筋層内を不規則な網目状に外肛門括約筋方向に下降していた。筋層内を通過したリンパ管は、粘膜下組織内で疎なリンパ管網を形成し、粘膜上皮で盲端状に膨らみを形成していた。血管の分布はリンパ管よりも更に密な格子状の分布を示し、毛細血管は粘膜上皮下にリンパ管と交差するように更に密に分布していた。VIP 性神経線維は特に内肛門括約筋部で密な分布を示し、大部分のものは血管に伴走し、一部のものはリンパ管に近接して観察された。以上の結果より、ラット肛門管のリンパ管の分布は、粘膜上皮下に盲端状に発生し、粘膜下組織内で疎なリンパ管網を形成し、更に筋層を通過したリンパ管は外膜内で密なリンパ管網に集合し、肛門直腸リンパ節を経て大動脈腰リンパ節に至ると考えられた。

A-42 整備環境下で維持された SPF C57BL/6Cr マウスの腎臓の加齢による形態変化

矢吹映¹、鈴木秀作²、松元光春¹、西中川駿¹
(¹鹿児島大・農・家畜解剖、²鹿児島大・生命科学資源開発研究センター)

本研究は、整備環境下で長期飼育された近交系 SPF マウス腎臓の形態における加齢変化を明らかにし、従来の一般環境飼育での変化と比較することを目的として行った。【材料および方法】生後 3, 5, 12, 15, 24 および 27 ヶ月齢の雄の SPF C57BL/6Cr Slc マウスを使用した。マウスは、一方向気流飼育室(温度: 22 \pm 1 度, 湿度: 55 \pm 10%, 明暗周期: 12 時間, 換気: 12 回/h)で飼育した。ケージ, 床敷, 飼料は高圧蒸気滅菌した。各々の月齢のマウスは、塩酸メテミジンと塩酸ケタミンの混合麻酔下で放血安楽死させた後、腎臓を採取した。腎重量を測定後、常法に従いパラフィン切片を作製し、光顕観察および組織計測を行った。また、27 ヶ月齢では透過電子顕微鏡観察も行った。【結果】腎重量には加齢変化はみられなかった。腎小体は単位面積当たりの数が 27 ヶ月齢で上昇したが、直径に変化はみられなかった。糸球体包外壁の立方上皮の出現率は、24 および 27 ヶ月齢で低値を示した。糸球体障害のスコア値は 5 から 27 ヶ月齢まで上昇した。尿細管では、近位曲尿細管上皮に著明な変化が認められ、空胞化が 12 ヶ月齢から、萎縮および単位面積当たりの核数の増加が 24 および 27 ヶ月齢で認められた。また、アミロイド沈着が 27 ヶ月齢の腎乳頭に、巣状性細胞浸潤が 24 および 27 ヶ月齢の血管周囲に、瘢痕収縮が 27 ヶ月齢の皮質に観察された。27 ヶ月齢の電子顕微鏡観察では、糸球体にメサンギウム基質の拡張と足細胞足突起の癒合が、近位曲尿細管上皮に脂質の蓄積した大型のリソゾームが観察された。以上の変化には一般環境飼育での報告と異なる点が多く、マウス腎臓の加齢による形態変化には環境要因が影響することが示唆された。

A-44 ヤギ臍臓における NOS 免疫反応陽性神経細胞の形態学的解析

平松浩二¹、下田暁子¹、大島浩二¹
(¹信州大・農)

ヤギ臍臓神経節における Nitric Oxide Synthase (以下 NOS) 含有神経細胞について、免疫組織化学法及び形態計測法を用いて解析を行った。【材料・方法】シバヤギ(n=7、雌雄、BW18-36kg)及びトカラヤギ(n=1、雄、BW33kg)を用いた。麻酔下頸動脈より放血屠殺後、臍臓を摘出し材料とした。細切組織をブアン液に 24 時間浸漬固定後、定法に従い厚さ 5 μ m のパラフィン切片(一部ミラー切片)を作製した。HRP 標識ストレプトアビジンピオチン法により、NOS または神経細胞の標識として Neuron Specific Enolase (NSE) を検出した。なおウサギ抗 NOS 血清 (Alexis 社、210-501-R205、1:2000)またはウサギ抗 NSE 血清 (Affiniti Research 社、NA1237、1:2000)を一次抗体として用いた。染色された神経細胞の内、核を明確に識別できるものについて画像解析装置 (ZEISS、KS400)を用いて断面積及び直径(最大径と最小径の平均)を計測した。【結果】NOS に強い免疫陽性反応を示す細胞体が神経節内に観察された。また免疫反応陰性細胞体の周縁に点状に陽性反応が認められた。ミラー切片で比較すると NOS 免疫反応陽性細胞は、NSE にも免疫反応陽性であった。NSE 免疫陽性細胞の断面積及び直径は各々 553.5 μ m² 及び 27.4 μ m であるのに対して、NOS 免疫陽性細胞では各々 394.4 μ m² 及び 23.3 μ m であった。以上の結果より、ヤギ臍臓内の NOS 含有神経細胞は小型の神経細胞で、NOS を含まない他の大型神経細胞に終末すると思われる。

A-45 シバヤギ網膜における神経節細胞の分布について

宍井里依¹、青山真人¹、杉田昭栄¹

(¹宇都宮大院・機能形態)

【目的】動物の visual streak の形成様式、網膜神経節細胞の分布様式は、視覚機能と密に関連すると考えられている。網膜の特性については、実験動物では広く行われているものの、ヤギについて詳細な研究はあまり見られない。そこで本研究は、ヤギ網膜の神経節細胞の分布について明らかにし、ヤギの視覚機能を考察する基礎データを確立することを目的とした。【材料と方法】成シバヤギ 4 頭の両眼を、深麻酔後採材し、10%ホルマリンに浸漬固定した。網膜の背腹等を確認後、whole mount 標本を作製し、常法に従い Nissle 染色を施した。網膜を 2×2mm の正方眼にマスキングし、網膜各領域の細胞の分布様式を調べた。【結果】ヤギ網膜の visual streak は、視神経乳頭の高さを含むもののその大部分は、その腹側に鼻 - 頭頂側の水平と、頭頂側に背 - 腹側の垂直を示した。それに加え、水平 visual streak の側頭側に神経節細胞の最高密度域(2697個/mm²)が存在し同鼻側部にもそれよりは低い高密度域(1962 個/mm²)が存在した。密度は周辺の最低平均 203 個/mm² から、最高密度域の 3081 個/mm²(n = 7)に及んだ。【結論】ヤギの神経節細胞分布はこれまでに研究されていたウシ、ウマ、ブタ、ヒツジ等と、visual streak の形成様式が異なっていることが明らかとなった。