

# I. 生理学・生化学分科会

## シンポジウム 1

3月30日(日) 9:00~12:00 第8会場

マクロファージ系細胞の多様性

I-S1-1-4

3月30日 9:00-12:00

河南有希子 (大阪府大)

I-S1-1 マクロファージの発生・分化と多様性

竹屋元裕<sup>1</sup>

(<sup>1</sup>熊本大・医・第二病理)

I-S1-2 破骨細胞の分化と機能の制御メカニズム

米田俊之<sup>1</sup>

(<sup>1</sup>阪大・歯・生化学)

I-S1-3 消化管運動と腸管常在型マクロファージ

尾崎博<sup>1</sup>、堀正敏<sup>1</sup>、唐木英明<sup>1</sup>

(<sup>1</sup>東大・獣医薬理)

I-S1-4 ミクログリアの機能と中枢神経障害機構への関わり

中村洋一<sup>1</sup>

(<sup>1</sup>大阪府大・農・獣医)

## シンポジウム 2

3月30日(日) 13:00~15:00 第8会場

遺伝子発現のエピジェネティクス制御

I-S2-1-4

3月30日 13:00-15:00

田中智 (東大)

I-S2-1 高等植物のトランスポゾンとエピジェネティクス

飯田滋<sup>1</sup>

(<sup>1</sup>基生研)

I-S2-2 疾患におけるエピジェネティックな制御の異常

久保田健夫<sup>1</sup>

(<sup>1</sup>国立精神神経セ・神経研)

I-S2-3 発がんエピジェネティクス

牛島俊和<sup>1</sup>、金田篤志<sup>1</sup>、若園邦子<sup>1</sup>

(<sup>1</sup>国立がんセ・研・発がん)

I-S2-4 DNAメチル化による細胞分化のエピジェネティクス

塩田邦郎<sup>1</sup>

(<sup>1</sup>東大院・農・細胞生化)

## 一般口演

3月31日(月) 9:00~11:10 第3会場

I-1-13

3月31日 9:00-9:50

渡辺元 (農工大)、森松正美 (岩手大)

I-1 骨軟骨形成不全症ラットの解析: Blast search を用いた contig の作成による物理地図上での原因遺伝子(*ocd*)存在領域の特定

佐々木哲<sup>1</sup>、鈴木浩悦<sup>1</sup>、小笠原慶<sup>1</sup>、斉藤賢一<sup>1</sup>、鈴木勝士<sup>1</sup> (<sup>1</sup>日獣大・獣医生理)

- I-2 性腺形成不全症ラットの解析:生殖腺器官培養系による異常の再現系と物理地図上の原因遺伝子存在領域の決定  
鈴木浩悦<sup>1</sup>、八木美央<sup>1</sup>、小山絵理子<sup>1</sup>、栗原孝宏<sup>1</sup>、斉藤賢一<sup>1</sup>、鈴木勝士<sup>1</sup>  
(<sup>1</sup>日獣大・獣医生理)
- I-3 精巢形成不全症 (*hgn/hgn*) ラットの胎生期病態発生に関する調査  
八木美央<sup>1</sup>、鈴木浩悦<sup>1</sup>、小山絵理子<sup>1</sup>、栗原孝宏<sup>1</sup>、斉藤賢一<sup>1</sup>、鈴木勝士<sup>1</sup>  
(<sup>1</sup>日獣大・獣医生理学教室)
- I-4 LDE(lethal dwarfism with epilepsy)ラットの精巢における病変の内分泌学的評価  
竹中基郎<sup>1</sup>、鈴木浩悦<sup>1</sup>、甘粕晃平<sup>1</sup>、斉藤賢一<sup>1</sup>、鈴木勝士<sup>1</sup> (<sup>1</sup>日獣大・生理)
- I-5 ラット生殖腺の器官培養系におけるトリブチルスズの影響の評価  
小山絵理子<sup>1</sup>、鈴木浩悦<sup>1</sup>、斉藤賢一<sup>1</sup>、鈴木勝士<sup>1</sup> (<sup>1</sup>日獣大・獣医生理)

3月31日 9:50 -10:40

太田光明 (麻布大)、汾陽光盛 (北里大)

- I-6 肝臓由来の血中キチナーゼ:子牛の *Theileria sergenti* 感染に伴う血中キチナーゼの量的変化  
藤本和歌子<sup>1</sup>、岩永敏彦<sup>1</sup>、木村和弘<sup>2</sup>、小沼操<sup>3</sup>、鈴木雅子<sup>4</sup>、首藤文栄<sup>4</sup>  
(<sup>1</sup>北大・解剖、<sup>2</sup>北大・生化学、<sup>3</sup>北大・感染症、<sup>4</sup>岩手大・生理)
- I-7 雌ホルスタイン牛に対する制限給餌によるグレリン、GH、グルコースおよびインシュリン血中濃度への影響  
三浦弘<sup>1</sup>、高橋良治<sup>1</sup>、北條那智<sup>1</sup>、菊池元宏<sup>1</sup>、長谷川喜久<sup>2</sup>、寒川賢治<sup>3</sup>、児島将康<sup>3</sup>、大浪洋二<sup>1</sup>  
(<sup>1</sup>北里大・獣医繁殖学研究室、<sup>2</sup>北里大・実験動物学研究室、ハイテクリサーチセンター、<sup>3</sup>国立循環器病センター)
- I-8 蛍光タンパク遺伝子導入による性腺刺激ホルモン放出ホルモンニューロン可視化ラットの作出  
藤岡仁美<sup>1</sup>、鈴木正寿<sup>1</sup>、山内啓太郎<sup>1</sup>、太田昭彦<sup>2</sup>、長嶋比呂志<sup>2</sup>、加藤昌克<sup>3</sup>、西原真杉<sup>1</sup>  
(<sup>1</sup>東大・獣医生理、<sup>2</sup>明大・農、<sup>3</sup>日医大・第1生理)
- I-9 ウマのセロトニントランスポーター遺伝子の多型同定と気質との関連解析  
桃沢幸秀<sup>1</sup>、楠瀬良<sup>2</sup>、菊水健史<sup>1</sup>、武内ゆかり<sup>1</sup>、森裕司<sup>1</sup>  
(<sup>1</sup>東京大学・獣医動物行動、<sup>2</sup>JRA 総研)
- I-10 イヌにおけるモノアミン酸化酵素 B(MAOB)遺伝子の多型と行動傾向の関連について  
橋爪千恵<sup>1</sup>、増田宏司<sup>1</sup>、菊水健史<sup>1</sup>、武内ゆかり<sup>1</sup>、森裕司<sup>1</sup> (<sup>1</sup>東京大学・獣医動物行動)

3月31日 10:40 -11:10

木村和弘 (北大)

- I-11 血管内皮細胞による LDL およびアセチル化 LDL の取り込みに及ぼすせん断応力の影響  
丹羽光一<sup>1</sup>、角竜憲<sup>1</sup>、狩野猛<sup>1</sup>  
(<sup>1</sup>北大・電子研)
- I-12 殺虫性蛋白質 Cry1Ab がヒト小腸上皮細胞に与える影響  
嶋田伸明<sup>1</sup>、宮本和久<sup>2</sup>、吉岡都<sup>3</sup>、村田英雄<sup>4</sup> (<sup>1</sup>動衛研、<sup>2</sup>生物研、<sup>3</sup>動衛研、<sup>4</sup>動衛研)
- I-13 ヤガN - アセチルグルコサミニダーゼ遺伝子の単離と機能解析  
渡辺聡子<sup>1</sup>、國保健浩<sup>1</sup>、窪田宜之<sup>1</sup>、犬丸茂樹<sup>1</sup>  
(<sup>1</sup>動衛研)

## I-S1-1 マクロファージの発生・分化と多様性

竹屋元裕<sup>1</sup>  
(<sup>1</sup>熊本大・医・第二病理)

マクロファージは貪食を生業とする細胞で、異物や老廃物の処理に活躍するとともに種々の生理活性物質の分泌によって免疫機構にも深く関与する。本細胞の存在は19世紀の中頃に認識され、1892年 Metchnikoff によってマクロファージと命名されたが、その起源を巡っては、今日に至るまで一世紀を越える論争が繰り返された。かつては、Aschoff・清野の細網内皮系学説 (RES) の主要構成細胞とされ、1970年以降には van Furth による単核食細胞系学説 (MPS) によって単球由来の細胞として位置づけられ、これらの学説には種々の矛盾点が指摘された。今日では、マクロファージの発生・分化は RES や MPS で説明されるような単純な分化過程ではなく、造血幹細胞から単球に至る種々の分化段階から派生し多様な分化経路を辿るものと考えられる。マクロファージは分化段階や分布する臓器・組織の違いによって、様々な表現形質を示す。クラス A スカベンジャー受容体 (CD204) は修飾 LDL を認識し、動脈硬化におけるマクロファージの泡沫細胞化に関わる受容体であるが、幅広いリガンド特異性を示し、種々の異物や老廃物の処理に重要な役割を果たしている。CD204 は骨髄前駆細胞や単球では殆ど発現がないが、マクロファージへの分化に伴って急激に発現が誘導される。各臓器・組織に分布する多くの在住マクロファージは、CD204 を構成的に発現している。CD204 は単球系細胞の出現以前の胎生マクロファージにも陽性で、胎生期の形態形成におけるアポトーシス細胞の処理に関与すると考えられる。CD204 はマクロファージの機能と深く関連した分化マーカーと考えることが出来る。

## I-S1-3 消化管運動と腸管常在型マクロファージ

尾崎博<sup>1</sup>、堀正敏<sup>1</sup>、唐木英明<sup>1</sup>  
(<sup>1</sup>東大・獣医薬理)

消化管運動をつかさどる筋層には、平滑筋、神経や血管などが混在し、さらに最近ではペースメーカー機能を担うと考えられているカハール介在細胞の存在も明らかになり、注目されている。一方、1985年、米国の Mikkelsen によって、消化管の筋層間にマクロファージがネットワーク状に規則正しく分布することが紹介された。したがって、筋層間の同一平面上に、アウエルパッハ神経叢と上記のカハール介在細胞に加えて、この常在型マクロファージの少なくとも3種類の細胞が互いにネットワーク構造を形成していることになる。生体内におけるマクロファージの形態、性質、機能は極めて多様であり、貪食能以外に分泌細胞として周囲の細胞に影響を与えている可能性が指摘されている。すなわち消化管の蠕動運動の中枢と考えられている筋層間という場においては、神経と ICC という運動系に免疫系が介在している可能性が予想される。ところで、クローン病をはじめとする炎症性腸疾患においては、炎症が筋層にまで及ぶことがあり、また消化管の運動障害がしばしば認められる。この運動障害は内容物の滞留をもたらす、二次的に腸内フローラをも乱すことで、炎症を更に悪化させるが、全身性疾患への移行にもこの運動機能障害が深く関わるといわれている。しかし、この消化管運動機能不全の発症機序に関する知見は驚くほど少ない。本シンポジウムでは、炎症性腸疾患における運動機能障害に、筋層内常在型マクロファージが関与するのではないかと仮説のもとに行った研究の一部を紹介したい。

## I-S1-2 破骨細胞の分化と機能の制御メカニズム

米田俊之<sup>1</sup>  
(<sup>1</sup>阪大・歯・生化学)

骨は生体のカルシウム恒常性と自身の体積を一定量に保つために生理的状況下において絶えず吸収と形成を繰り返している。このような骨のリモデリング(骨改造現象)は破骨細胞による骨吸収によって口火が切られ、続いて起こる骨芽細胞による骨形成の終了により一サイクルが回転する。一方、病的状態においても破骨細胞は骨の吸収、破壊において中心的役割を演じており、骨吸収の亢進を原因とする骨粗鬆症、骨パジェット病や骨転移などの骨疾患の病態に密接に関与している。したがって、破骨細胞の分化および機能を調節する分子メカニズムの解明はこれらの骨疾患の病因解明において貴重な指針を提供する。破骨細胞は骨髄中に存在するマクロファージ系の血液幹細胞の増殖、分化、そして融合の結果形成され、骨吸収を終えるとアポトーシスにより死滅する。破骨細胞がこれら一連のライフサイクルを経る間に、隣接して存在する骨芽細胞との直接接触による相互関連が必須であることが知られている。近年、このような破骨細胞と骨芽細胞とのカップリングに関与するサイトカインとして RANKL が同定された。RANKL は TNF ファミリーに属する膜性サイトカインで、前駆破骨細胞が発現する受容体 RANK に結合し、固有の細胞内シグナル経路を活性化することにより分化および骨吸収を促進する。さらに RANKL の作用を阻害する天然のアンタゴニスト OPG が発見され、これらの三つの分子によって破骨細胞による骨吸収がコントロールされていることが明らかにされた。今回の講演では、破骨細胞の分化および機能の調節に関わるこれらの分子を紹介し、また破骨細胞の選択的阻害薬であるビスホスホネートの有用性についても言及したい。

## I-S1-4 ミクログリアの機能と中枢神経障害機構への関わり

中村洋一<sup>1</sup>  
(<sup>1</sup>大阪府大・農・獣医)

中枢神経系にはニューロンとその数を凌ぐグリア細胞(アストロサイト、オリゴデンドロサイト、ミクログリア)が、血液脳関門により高度な恒常性が維持された環境に存在している。従来はニューロンが何らかの理由で障害された後、普段静かに棲む脳マクロファージであるミクログリアが活性化され、障害されたニューロンを食作用により処理すると理解されてきたが、一過性脳虚血モデルにおいてニューロンの脱落前にミクログリアが活性化されることが明らかとなった。それ以来ミクログリアの異常活性化がニューロン障害の結果ではなくその原因となっている可能性が注目されてきた。ミクログリアには各種神経伝達物質のみならず、種々のサイトカインやケモカインを産生し、またその受容体を持つことが報告され、中枢神経障害の病因にはこれらシグナル分子が深く関与していることが予想される。

我々はラット脳由来の培養ミクログリアを用いて、異常活性化の増強・抑制因子について検索を続けている。PMA 刺激による活性化酸素産生は血清アルブミンにより増強されること、また LPS 刺激による NO 産生は分子量 6 万の血清因子により増強されること等を見出した。病態時に血液脳関門から漏出する各種の血清成分がミクログリアの異常活性化を増強し、神経障害を増悪させている可能性が強く示唆される。一方、一般的に細胞増殖を促す内在性因子とされるポリアミンはミクログリア活性化をアポトーシスにより抑制することを見出した。

活性化を引き起こす分子には、他にも アミロイド蛋白や異常プリオン断片など興味深い分子が報告されている。今後ミクログリア活性化を制御することにより、各種中枢疾患の治療基盤が築かれることを願っている。

## I-S2-1 高等植物のトランスポゾンとエピジェネティックス

飯田滋<sup>1</sup>  
(<sup>1</sup>基生研)

1983年のノーベル医学生理学賞は、トウモロコシの遺伝学に生涯を捧げ、トランスポゾンを発見した Barbara McClintock に授与された。高等植物を扱い、ノーベル医学生理学賞を単独で受賞した唯一の女性としても McClintock はよく知られているが、彼女自身は発見したエレメント（遺伝因子）をトランスポゾン（もしくは Transposable elements）とは呼ばず、常に Controlling elements（調節因子）と呼び通した。事実、1995年以降になって、McClintock はトランスポゾンの発見よりもさらに重大な“エピジェネティックな遺伝子発現制御”の発見者であったと息をいわれるようになった。“エピジェネティックス (Epigenetics)”とは、DNAの塩基配列が変化した突然変異（ジェネティックな変化）は起こってはいないにも拘らず、DNAのメチル化が変化したり、ヒストンのメチル化やアセチル化などが変わってクロマチン構造が変化することにより、あたかも変異が起こったかの様に变化した形質が体細胞分裂を経た娘細胞や減数分裂を経た次世代に伝達される諸現象の総称であり、動植物を問わず、発生分化から進化多様性獲得までの種々の生物現象に係っていることが明らかになってきた。本シンポジウムでは、先ず McClintock が見出したトランスポゾンとエピジェネティックスについて概説し、次いで我国で園芸化されたアサガオの多彩な自然突然変異に係るトランスポゾンを中心に、高等植物のジェネティックスとエピジェネティックスについて紹介する。

## I-S2-3 発がんエピジェネティックス

牛島俊和<sup>1</sup>、金田篤志<sup>1</sup>、若園邦子<sup>1</sup>  
(<sup>1</sup>国立がんセンター 研・発がん)

ヒト及び動物のがんは、遺伝子異常とエピジェネティックな異常とが、多段階に積み重なることにより誘発される。がん抑制遺伝子のプロモーター領域 CpG アイランドのメチル化は、そのまま娘細胞に伝わり、その発現をスイッチオフする。突然変異や欠失と同様、がん抑制遺伝子の不活化機構として働き、多くのがん抑制遺伝子について認められている。我々は、ゲノム全体についてメチル化の違いを探索する methylation-sensitive-representational difference analysis (MS-RDA)法を開発した [PNAS, 94:2284, 1997]。ヒト胃がん細胞株を MS-RDA 法により解析することにより、胃がん細胞株で特異的にメチル化された DNA 断片を分離した。次に、ヒトゲノム配列を利用し、それらの DNA 断片近傍の CpG アイランドを同定した。さらに、9 個の遺伝子 (LOX, HRASLS, bA305P22.2.3, FLNc, HAND1, a homologue of RIKEN 2210016F16, FLJ32130, PGAR, 及び Thrombomodulin) プロモーター領域の CpG アイランドが、胃がん細胞株で異常にメチル化されていることを確認、さらに、これら 9 個の遺伝子の発現消失も認めた。脱メチル化剤 5-aza-2'-deoxycytidine により、これら 9 個の遺伝子発現は誘導することが可能であり、プロモーター領域の CpG アイランドの異常なメチル化が、発現低下の原因であると結論された。9 個のうち、5 個については、胃がん原発巣でもメチル化異常を 29-41%と高頻度に認めた [Cancer Res., 62:6645, 2002]。現在、これらの遺伝子の発がんにおける役割を検討している。エピジェネティックな異常は、がんだけではなく、腸上皮化生のような分化異常を主徴とする状態でも認められる。エピジェネティックな異常の様々な疾患における重要性が高まっている。

## I-S2-2 疾患におけるエピジェネティックな制御の異常

久保田健夫<sup>1</sup>  
(<sup>1</sup>国立精神神経センター 神経研)

ゲノムプロジェクトの進展とともに、遺伝子変異が疾患の発症原因であることが明らかにされてきた。一方で疾患は遺伝子変異すなわち DNA の構造異常だけで決まるものではなく、遺伝子を外部から修飾しその機能を決定づけている因子（エピジェネティック制御因子）の異常によっても発症しうることがわかってきた。これまでわれわれはいくつかの疾患においてエピジェネティック制御機構の異常、とくに DNA メチレーションの異常を明らかにしてきた。具体的には、常染色体の不活化に関わるメチル化パターンの異常に起因するインプリンティング疾患、X 染色体の不活化に関わるメチル化パターンの異常に起因する X 不活化不全症や X 連鎖遺伝病の女性発症、DNA メチル化酵素の異常に起因する免疫不全症、および正常なゲノムのメチル化パターンの破綻に起因する癌、血液分化過程のダイナミックなメチル化変化とその異常に起因する白血病である。また現在途上ではあるが、メチル化 DNA 結合蛋白の異常に起因する神経精神疾患の病態解明研究についても紹介する。当初は稀な先天異常症の発症要因として考えられていたエピジェネティック制御異常も、ここにきて多数が罹患する癌や精神疾患など後天的な疾患の原因になりうることが明らかにされてきた。またヒトの患者で見られたものと同様、パイオロジー技術の成果ともいわれるクローン動物において正規の発生過程を経ていないことにより X 不活化不全が生じ、これが多数のクローンが死亡する要因となっていることも最近明らかにされた。本講演により獣医学会の先生方がエピジェネティックスを身近なものに感じ、動物の疾患との関係を考えるきっかけとしていただければ幸いである。

## I-S2-4 DNA メチル化による細胞分化のエピジェネティックス

塩田邦郎<sup>1</sup>  
(<sup>1</sup>東大院・農・細胞生)

私たちの体は、約 200 種類の細胞から構成されている。1 個の受精卵から分裂と分化を繰り返して、様々な細胞が生じるが、細胞の種類に特有の形質は遺伝子発現で制御されているにもかかわらず、細胞のゲノム DNA の塩基配列は全く同じである。エピジェネティックス (Epigenetics) とは、古くは epigenesis (後生説) から派生した語で、現在では「DNA の塩基配列の変化を伴わず細胞分裂後も継承される遺伝子機能」研究領域の意味である。DNA のメチル化は、多くの場合、遺伝子活性の抑制と関連しており、それを通じた制御は Epigenetic 機構の重要な要因の一つとなっている。哺乳類では DNA メチル化は、CG 配列を持つシトシンに限られており、分化した細胞では DNA メチル化パターンは次世代の細胞に継承されることが知られている。さて、哺乳類のゲノムには、CG 配列が密に存在している CpG アイランドが存在している。CpG アイランドは、ハウスキーピング遺伝子や組織特異遺伝子などの調節域やその近傍に存在していることが知られ、近年まで、メチル化されない領域と考えられてきた。しかし、最近のゲノムワイドの解析で、組織依存的にメチル化される領域を有する CpG アイランドが多数存在することが明らかになってきた。多分化能を持った ES 細胞から神経細胞を含む様々な最終分化した細胞まで、それぞれ特有の DNA メチル化パターンを形成しているのである。DNA メチル化の変化は、組織の不可逆的な遺伝子発現の変化を誘導するので、様々ないわゆる生活習慣病との関連も重要である。

## I-1 骨軟骨形成不全症ラットの解析：Blast searchを用いた contig の作成による物理地図上での原因遺伝子(*ocd*)存在領域の特定

佐々木哲<sup>1</sup>、鈴木浩悦<sup>1</sup>、小笠原慶<sup>1</sup>、斉藤賢一<sup>1</sup>、鈴木勝士<sup>1</sup>  
(<sup>1</sup>日獣大・獣医生理)

【目的】ラットの骨軟骨形成不全症は、1984年に当教室で発見された常染色体性単純劣性の致死性の矮小症である。発症個体(*ocd/ocd*)は全身性皮下水腫、四肢、体軀、頭頸部、および尾の短縮、突舌、口蓋裂、椎骨および肋骨の癒合などの異常を呈し、生後数時間で呼吸困難で死亡する。以前の研究で、我々は *ocd* 遺伝子座を第 11 染色体上にマッピングし、*ocd* と連鎖するマイクロサテライトが OCD 系統内で多型性を保持していることを発見した。さらに、*ocd* 周辺の多型マーカーの並びを Radiation Hybrid Panel で多型解析を行った。さらに、得られたリンケージマップを基に、*ocd* 周辺のマーカーに関してラット BAC クローンをサーチして、*ocd* 存在領域にラット BAC クローンのコンテイングを作製した。整理したクローンの中に、*ocd* 存在領域と相同なマウス第 16 染色体上の遺伝子を同定し、マウス染色体上での *ocd* 遺伝子座存在領域を特定した。【結果】*ocd* 遺伝子座がラットの物理地図上で約 2.6Mbp、マウスで約 2.4Mbp の範囲にあることが判明し、現状で約 40 個の機能的と考えられる遺伝子が存在している。現在、*ocd* 領域に含まれるラット BAC クローンの配列の中から新たな多型マーカーを作製し、*ocd* 存在領域を絞り込むことを試みている。

## I-3 精巣形成不全症 (*hgn/hgn*) ラットの胎生期病態発生に関する調査

八木美央<sup>1</sup>、鈴木浩悦<sup>1</sup>、小山絵里子<sup>1</sup>、栗原孝宏<sup>1</sup>、  
斉藤賢一<sup>1</sup>、鈴木勝士<sup>1</sup>  
(<sup>1</sup>日獣大・獣医生理学教室)

【目的】精巣形成不全症 (*hgn/hgn*) ラットは精巣形成不全による雄性不妊、腎低形成による腎不全、体成長の遅延を示し、原因遺伝子はラット第 10 染色体上に位置している。発症 (*hgn/hgn*) の精巣および腎臓の重量は正常と比較して有意に低下しており、精巣では精細管の成長障害、腎臓ではネフロン形成を示す。これらの異常は胎生後期に既に存在している (第 130 回獣医学会)。今回の実験では、胎生中期に遡って調査することにより、*hgn* 遺伝子の胎仔発生に及ぼす影響を調べた。【方法】外交配 F<sub>1</sub> の雄 (HGN × BN; +/*hgn*) に戻し交配された雌の *hgn/hgn* を妊娠 13.5 - 21.5 日の各日で解剖し、胎仔を得た。得られた全ての胎胞、胎仔および胎盤重量を測定し、*hgn* と完全連鎖する多型マーカーの *D10Rat69* で遺伝子型を判定した。胎齢 17.5 日以降の腎臓重量および 19.5 日以降の精巣重量を測定し、組織をブアン液で固定した後パラフィン包埋切片を作製した。【結果】*hgn/hgn* では胎齢 15.5 日で既に、+/*hgn* より胎仔重量が低下していた。胎齢 18.5 日の雌を除いて、*hgn/hgn* では胎齢 17.5 日以降の腎臓重量が低下していた。胎齢 19.5 日の *hgn/hgn* の精巣では出生時に見られるのと同様なセルトリ細胞の不規則な配列および生殖細胞が精細管内腔に充満する像が観察された。胎齢 17.5 および 18.5 日の *hgn/hgn* の精巣ではセルトリ細胞数が少ない傾向があったが、13.5 - 16.5 日では明瞭な差異は認められなかった。【総括】*hgn/hgn* の精巣で組織学的な差異が観察されるのは胎齢 17.5 日以降であるが、胎齢 15.5 日ですでに *hgn/hgn* の胎仔重量が減少していることから、*hgn* の正常遺伝子は胎齢のより早期に発現し、腎臓と生殖腺を含む全身の成長に影響を及ぼしている可能性がある。

## I-2 性腺形成不全症ラットの解析：生殖腺器官培養系による異常の再現系と物理地図上の原因遺伝子存在領域の決定

鈴木浩悦<sup>1</sup>、八木美央<sup>1</sup>、小山絵里子<sup>1</sup>、栗原孝宏<sup>1</sup>、  
斉藤賢一<sup>1</sup>、鈴木勝士<sup>1</sup>  
(<sup>1</sup>日獣大・獣医生理)

【目的】ラット精巣形成不全症は、第 10 染色体上の単一劣性遺伝子 *hgn* により引き起こされ、雄で精巣形成不全による不妊、雌で卵巣低形成による早期不妊、両性で腎低形成による腎不全を呈する。我々はこれまでに本症ラットの病態解析と遺伝解析を行ってきた。今回は生殖腺と腎臓における原因遺伝子の発現時期の特定と機能解析を目的に、器官培養での異常の再現系を開発した。また最新のマウスラットゲノム情報をもとに、物理地図上での *hgn* 存在領域を決定した。【器官培養実験】*hgn/hgn* 雌と BN 系統雄との交配で得られた F<sub>1</sub> 雄を *hgn/hgn* の雌に交配し、妊娠 16 日に胎児を摘出した。胎児の生殖腺と腎臓を摘出し、フィルター上で 4 日間培養した。胎児の遺伝子型判定は多型マーカーにより行った。培養中に +/*hgn* では精細管の伸張と数の増加が見られたが、*hgn/hgn* ではそれらが見られなかった。腎臓も培養期間中に正常では明らかな成長が見られたが、発症では小さいままであった。【遺伝解析】これまでに作製した 565 個体のバッククロスでのリンケージ解析により特定した *hgn* 存在領域は 0.36cM である。周辺のマーカーに関して、ラットの BAC クローンをサーチし、*hgn* 存在領域を網羅するコンテイングを作製した。さらに、その領域内の繰り返し配列に関して新たなマーカーを作製し、バッククロスの組換え体をタイピングすることで、*hgn* 存在領域をマウス第 11 染色体上の約 120kbp の範囲に絞り込んだ。【総括】器官培養実験から、*hgn* の正常遺伝子が精細管の成長を支持する因子であることが示された。120kbp の領域には 6 個の既知の遺伝子と 2 個の未知の遺伝子が存在している。今後、それらを単離および配列決定し、胎生期での発現動態や器官培養系での機能解析を行う必要がある。

## I-4 LDE(lethal dwarfism with epilepsy)ラットの精巣における病変の内分分泌学的評価

竹中基郎<sup>1</sup>、鈴木浩悦<sup>1</sup>、甘粕晃平<sup>1</sup>、斉藤賢一<sup>1</sup>、鈴木勝士<sup>1</sup>  
(<sup>1</sup>日獣大・生理)

【目的】LDE ラットは、1989年に当教室で維持していた Wistar-Imamichi ラットクローズドコロニーの近交化の過程で、著しい成長障害およびてんかん発作などを示すミュータントラットとして発見された。これまでの病態解析により、本症が常染色体性単純劣性で遺伝し、発症ラットでは哺育期早期から明らかな体成長の遅延を示し、てんかん発作、歩行様式の異常などの神経症状を伴い早期に死亡することが判明している。また、28 日齢の雄の発症ラットの精巣では精細管の径が細く、生殖細胞およびセルトリ細胞数が減少しており、精細管内のアポトーシス細胞が増加していた。本研究では、この精巣病変が、下垂体前葉からのホルモン分泌異常によるものか、精巣原発性の異常によるものかを明らかにするため、血漿 FSH および LH 濃度を測定した。【方法】21、28、35、および 42 日齢以降の各日齢において精巣の組織検索を行い、21 および 28 日齢では ELISA による血漿 FSH および LH 濃度の測定を行った。【結果】各日齢での体重、精巣重量共に正常ラットと比較して発症ラットで小さく、精巣病変は各日齢で 28 日齢と同様な所見が得られたが、それらの異常は 28 日齢で最も重篤であった。また 42 日齢以降の精巣では一部の精細管に精子形成が見られた。血漿 FSH および LH 濃度は 28 日齢で有意に低かった。【考察】今回の結果から、28 日齢の発症ラットで見られる精巣の病変は、下垂体前葉からの FSH および LH 分泌の低下によるものであると考えられる。しかし、より後期の日齢まで生存した動物では日齢と共にこれらのホルモンレベルが精子形成が可能となるレベルまで増加する可能性がある。従って、28 日齢以降においてこれらのホルモンレベルの変化を調査する予定である。

## I-5 ラット生殖腺の器官培養系におけるトリブチルスズの影響の評価

小山絵理子<sup>1</sup>、鈴木浩悦<sup>1</sup>、斉藤賢一<sup>1</sup>、鈴木勝士<sup>1</sup>  
(<sup>1</sup>日獣大・獣医生理)

【目的】近年、内分泌攪乱物質による人や動物の生殖への影響が懸念されている。トリブチルスズ(TBT)は、船底塗料として世界的に用いられ、その暴露によってイボシなどの貝類にインボセックスを引き起こし、雌の産卵能力を障害する。作用機序に関してはアロマトラーゼの阻害が示唆されているが、哺乳動物の生殖器官形成に対して、どのような影響があるのかは明らかにされていない。そこで本実験では、ラットの中醫・生殖腺の器官培養系を用いてTBTの影響を調査した。【方法】動物は、Wistar Imamichi ラット近交系を用いた。交配翌日を胎齢 0.5 日として、胎齢 15.5 日で帝王切開し、胎児を摘出した。これらの胎児を実体顕微鏡下で解剖し、中醫と生殖腺を摘出し、CMRL 培地のフィルター上で培養した。TBT(50nM-1 $\mu$ M)、テストステロン(T: 2 $\mu$ M)、アロマトラーゼ阻害剤(F: 100nM-10 $\mu$ M)をそれぞれ培地に加え、4 日間培養し、その影響を調べた。培養後、各器官は Bouin 液で固定し、組織検索を行った。【結果】TBT 暴露によって、雄の精巢の発達には明らかな影響は見られなかったが、用量依存性にウォルフ管の先端が著しく膨化した。雌ではウォルフ管が後期まで残存した。T および F の暴露では、ウォルフ管の膨化は見られなかったが、雌では TBT と同様に後期までウォルフ管が残存していた。【考察】今回の調査で、TBT はラットの生殖器官形成期において、アロマトラーゼ阻害作用を示す可能性が示唆された。また、雄で見られたウォルフ管の膨化は、TBT に特異的な機序によって生じている可能性がある。TBT は生殖への影響が懸念されているが、それを評価できる系が存在しないため、今回開発した器官培養系は TBT の作用機序を明らかにするための有効なツールになるであろう。

## I-7 雌ホルスタイン牛に対する制限給餌によるグレリン、GH、グルコースおよびインシュリン血中濃度への影響

三浦弘<sup>1</sup>、高橋良治<sup>1</sup>、北條那智<sup>1</sup>、菊池元宏<sup>1</sup>、長谷川喜久<sup>2</sup>、寒川賢治<sup>3</sup>、児島将康<sup>3</sup>、大津洋二<sup>1</sup>  
(<sup>1</sup>北里大・獣医繁殖学研究室、<sup>2</sup>北里大・実験動物学研究室、<sup>3</sup>国立循環器病センター)

【目的】グレリンは胃から分泌されるペプチドホルモンであり、摂食や GH 制御などに重要な役割を果たすと考えられている。また山羊や羊における実験から、反芻類においても同様に分泌され、また情動などの精神的な要素によって制御されていることが示されている。本実験においては制限給餌された牛においてグレリンと GH の血中濃度変化を測定し、また栄養条件との関連を探るためにグルコースとインシュリン濃度を測定した。【方法】8:00 と 16:00 の二回給餌条件によって飼育した正常雌ホルスタインに対して二種類の制限給餌を行い、二時間おきに連続採血して血中グレリン、GH、グルコース、インシュリン濃度を測定した。制限給餌プログラム 1 においては、8:00 および 16:00 の給餌を一日中止した。この時、10:00 から 14:00 にかけて血中グレリン濃度が急激に上昇し、制限給餌前の 2-3 倍の値で推移したが、これに伴う GH 濃度の上昇は観察されなかった。インシュリン濃度は減少し、グルコース濃度の変化は見られなかった。制限給餌プログラム 2 においては、測定 4 日前から給餌量を漸減し、実験日には給餌しなかった。この時、血中グレリン濃度はプログラム 1 の時よりもわずかに上昇せず、血中 GH 濃度の変化も見られなかった。インシュリンは同様に減少傾向を示し、グルコース濃度の変化は観察されなかった。【結論】牛における血中グレリン濃度は急激な給餌の制限によって大きく上昇したが、給餌量を漸減した場合はわずかな上昇しか示さなかった。またこの上昇に伴う GH 濃度の変化も観察されなかった。グルコース濃度はこの条件では変化せず、インシュリン濃度はグレリン濃度変化と相反する動きを示した。

## I-6 肝臓由来の血中キチナーゼ：子牛の Theileria sergenti 感染に伴う血中キチナーゼの量的変化

藤本和歌子<sup>1</sup>、岩永敏彦<sup>1</sup>、木村研昭<sup>2</sup>、小沼操<sup>3</sup>、鈴木雅子<sup>4</sup>、首藤文栄<sup>4</sup>  
(<sup>1</sup>北大・解剖、<sup>2</sup>北大・生化学、<sup>3</sup>北大・感染症、<sup>4</sup>岩手大・生理)

消化管キチナーゼは、マウスでは唾液腺と胃で産生され消化酵素として働くと考えられているが、ウシでは肝臓で産生され、血中に放出される。本研究では、抗ウシキチナーゼ抗体のウェスタンブロット解析によりウシ血中キチナーゼの濃度変化を T. sergenti を実験的に感染させた子牛および、大腸菌由来の LPS 投与により急性炎症状態を誘導した雌成牛の血漿を用いて検討した。また、消化管キチナーゼがウシ以外の動物の血中にも存在する可能性をヒツジ、ヤギ、ウマ、モルモット、ラット、ヒトおよびニワトリの血漿で同様の方法を用いて検索した。【結果】子牛を用いた T. sergenti 感染実験では感染に伴い、血中キチナーゼの増加(3.24-23.92 倍)が認められた。一方、雌成牛での LPS 投与による量的変動は見られなかった。ところが正常コントロールの子牛と雌成牛の血中キチナーゼ濃度を比較すると子牛では 0.1-6.6 mg/ml、雌成牛では 8.5-30.7 mg/ml と後者で上昇しており、T. sergenti 感染に伴う血中キチナーゼの増加は発育による影響を受けていると思われる。しかし、硫酸化キチンにより原虫の赤血球への進入が阻害されることや、子牛は成牛よりも T. sergenti に対する感受性が高いことを考えると血中キチナーゼがタイレリア感染に関わる可能性は否定できない。ウシ以外の動物ではウマとモルモットの血漿においてやや強い免疫反応物が、ヒツジ、ヤギ、ラットおよびヒトでも、反応は弱いが同様の免疫活性が検出された。しかし、ニワトリでは反応物は認められなかった。ウシ以外の動物でも血中キチナーゼが存在することが示唆されるが、それらが肝臓で産生されたものかは定かではない。

## I-8 蛍光タンパク遺伝子導入による性腺刺激ホルモン放出ホルモンニューロン可視化ラットの作出

藤岡仁美<sup>1</sup>、鈴木正寿<sup>1</sup>、山内啓太郎<sup>1</sup>、太田昭彦<sup>2</sup>、長嶋比呂志<sup>3</sup>、加藤昌克<sup>3</sup>、西原真杉<sup>1</sup>  
(<sup>1</sup>東大・獣医生理、<sup>2</sup>明大・農、<sup>3</sup>日医大・第 1 生理)

視床下部に存在する性腺刺激ホルモン放出ホルモン(GnRH)ニューロンは、生殖機能の中枢制御において中心的な役割を果たしている。しかし、細胞数が極めて少ないこと、特定の神経核に集中することなく散在していること、形態的特徴が乏しいことなどが GnRH ニューロンの同定を困難にし、その神経生物学的解析の隘路となっていた。そこで、GnRH ニューロンの生細胞条件下での同定を可能とするため、GnRH ニューロンで蛍光タンパク(EGFP)を発現するトランスジェニックラットの作出を試みた。ラット GnRH 遺伝子の 5'端転写制御領域に EGFP 遺伝子を繋いだ組換え DNA を作出し、株化 GnRH 細胞で EGFP の発現を確認した。この組換え DNA を顕微注射した 115 個の受精卵を仮親に移植した結果、31 匹の産仔を得た。これらの産仔のうち、PCR 法及び、サザンハイブリダイゼーション法によるスクリーニングにより、1 匹において外来遺伝子が組込まれていることが示された。この個体の子孫を継代し、導入遺伝子をホモで持つ個体を用いて EGFP タンパクの発現を組織学的に調べるとともに、抗 GnRH 抗体を用いた免疫染色を行い、蛍光顕微鏡下で EGFP タンパク発現細胞との一致について検討した。その結果、視床下部において、GnRH 陽性細胞の約 80%の細胞で EGFP タンパクの発現が観察され、EGFP タンパクが GnRH ニューロン特異的に発現していることが確認された。なお、脳以外の組織では EGFP タンパクの発現は観察されなかった。本実験で作出した GnRH ニューロンを可視化できるトランスジェニックラットは、GnRH ニューロンの解析を進める上で有用なモデル動物となりうることを期待される。

## I-9 ウマのセロトニントランスポーター遺伝子の多型同定と気質との関連解析

桃沢幸秀<sup>1</sup>、楠瀬良<sup>2</sup>、菊水健史<sup>1</sup>、武内ゆかり<sup>1</sup>、森裕司<sup>1</sup>  
(<sup>1</sup> 東京大学・獣医動物行動、<sup>2</sup> JRA 総研)

【背景・目的】ウマ (*Equus caballus*) の気質形成にも遺伝的要因の関与が推察されており、特に不安傾向は管理・調教時に問題となるだけでなく競技・競走成績にも影響を与え得ることより、その関連遺伝子の解明が期待されている。本研究では、他の動物種で不安傾向との関連が示されているセロトニントランスポーター (5HTT) 遺伝子に着目してまずその配列を決定し、9頭のウマ脳由来の cDNA を用いて多型部位を探索した。次に JRA 日高育成牧場で飼われているサラブレッド 2 歳馬 69 頭を用い、各馬の管理者 3 人に対して行った 20 項目からなる質問から得られた気質評価の結果と、各馬の血液から抽出したゲノム DNA を元に決定した 5HTT 遺伝子型を比較検討し、5HTT 多型が気質にどのように影響しているかを調べた。【結果】ウマの 5HTT 遺伝子の翻訳領域を含む約 2600 塩基の配列を決定した。他の哺乳類と同様 630 個のアミノ酸から構成されており、アミノ酸レベルで 90% 以上の相同性が認められた。また、開始コドンから 1615 と 1616 番目の塩基が AC から GT に変わることによってスレオニンがバリンに変わる連続した SNP があることが判明した。69 頭のウマについて同部位の遺伝子型と気質に関するアンケート結果の関係を調べたところ、GT アレルを持つ個体は持たない個体に比べ「精神的自立」(群れから離れても嫌がらない) のスコアが有意に高いことが明らかとなった。【考察】因子分析により「精神的自立」は「神経質」や「興奮性」といった不安に関わる因子とは異なる因子に現れてきていることより、ウマでは他の哺乳動物で報告されているものとは異なる 5HTT 機能の存在が示唆された。

## I-11 血管内皮細胞による LDL およびアセチル化 LDL の取り込みに及ぼすせん断応力の影響

丹羽光一<sup>1</sup>、角竜憲<sup>1</sup>、狩野猛<sup>1</sup>  
(<sup>1</sup> 北大・電子研)

【目的】血管内皮細胞 (EC) による低密度リポ蛋白 (LDL) の取り込みがせん断応力によって影響を受けることが知られているが、化学的に修飾された酸化 LDL やアセチル化 LDL (Ac-LDL) の取り込みがせん断応力により影響を受けるか否かは不明である。本研究では、培養した EC を用いてせん断応力が Ac-LDL の取り込みに及ぼす影響を検討した。【方法】ウシ大動脈由来 EC を直径 35mm の培養皿に継代培養した。細胞にせん断応力を負荷するために、直流モーターに直径 32 mm、厚さ 2.0 mm のステンレス製回転円盤を取りつけた回転円盤装置を作製し、半径の中心部における壁せん断応力が 10 dynes/cm<sup>2</sup> となるように円盤の回転数を設定した。EC を播種した培養皿に、DiI-LDL あるいは DiI-Ac-LDL を含む培養液を 2 mL 加え、EC にせん断応力を負荷した状態で 2 時間培養した。その後、細胞を Triton-X100 で溶解し、蛍光強度を測定した。【結果】せん断応力の負荷により EC による LDL の取り込みが増加した。一方、Ac-LDL の取り込みは、せん断応力の負荷により減少した。スカベンジャー受容体の阻害剤である硫酸デキストラン (5 mg/mL) を添加すると、対照群では Ac-LDL の取り込み量は 25% に減少し、せん断応力を負荷すると Ac-LDL の取り込みは増加した。【結論】せん断応力は EC による LDL の取り込みを増加させるが、Ac-LDL の取り込みを減少させる。この Ac-LDL の取り込みの減少はスカベンジャー受容体を介した Ac-LDL の細胞内への移動がせん断応力によって抑制されることによるものと考えられる。

## I-10 イヌにおけるモノアミン酸化酵素 B (MAOB) 遺伝子の多型と行動傾向の関連について

橋爪千恵<sup>1</sup>、増田宏司<sup>1</sup>、菊水健史<sup>1</sup>、武内ゆかり<sup>1</sup>、森裕司<sup>1</sup>  
(<sup>1</sup> 東京大学・獣医動物行動)

【目的】脳内モノアミンを酸化分解するモノアミン酸化酵素 B (MAOB) は、高齢犬の認知障害治療薬のターゲットとされたり、MAOB 遺伝子イントロン部位のマイクロサテライト多型がヒトのパーキンソン病の発症に関連があるという報告もなされるなど、行動学的疾患との関連が示唆されている。本研究では、イヌの行動特性の犬種差に果たす MAOB 遺伝子の役割について解析する目的で、MAOB 遺伝子多型と行動特性との関連について検討した。【材料と方法】先の研究より MAOB cDNA の塩基配列が得られたため (橋爪ら、第 134 回獣医学会)、イヌ脳 (n=11) より抽出した RNA を元に RT-PCR を行って塩基配列を比較したところ、アミノ酸置換を伴う一塩基多型 (T199C) を同定した。そこで PCR-RFLP 法を用い、イヌ 208 頭 (ラブラドル 45、ゴールデン 57、マルチーズ 38、ミニチュアシュナウザー 25、シバ 43) の血液よりゲノム DNA を抽出し T199C 遺伝子型を判定した。同時に、飼主へのアンケートを実施し各個体の行動評価を行い、得られた MAOB の T199C 遺伝子型と行動傾向との関連について解析した。【結果】T199C のアレル C の発現頻度において犬種間に偏りが見られた。5 犬種を統合した場合 (TC ヘテロ個体を除く)、「飼主への攻撃」「見知らぬ人に怯える」および「飼主の外出前に震える」の各項目について C アレルを持つ群が有意に高い評価値を示した。それぞれの項目について犬種別に比較すると「飼主への攻撃」ではラブラドル、マルチーズおよびシバにおいて同様の傾向が見られ、他の 2 項目についてはラブラドルとマルチーズで同様の傾向が認められた。これらより今回見出された MAOB 遺伝子の一塩基多型が、特定犬種における飼主への攻撃性に何らかの関連を持つ可能性が示された。

## I-12 殺虫性蛋白質 Cry1Ab がヒト小腸上皮細胞に与える影響

嶋田伸明<sup>1</sup>、宮本和久<sup>2</sup>、吉岡都<sup>3</sup>、村田英雄<sup>4</sup>  
(<sup>1</sup> 動衛研、<sup>2</sup> 生物研、<sup>3</sup> 動衛研、<sup>4</sup> 動衛研)

【背景と目的】*Bacillus thuringiensis* が産生する Cry 毒素は、各種昆虫の中腸細胞を破壊することにより、殺虫効果を発揮する。この特性を利用して、農業や遺伝子組換え農作物に利用されているが、Cry 毒素の哺乳動物細胞に与える影響について解析した報告は数少ない。我々は第 132 回学会において、Cry 毒素のウシ初代培養肝細胞に与える影響について報告した。本研究においては、昆虫における Cry 毒素の標的細胞が中腸細胞であることから、ヒト小腸上皮細胞に与える影響について解析した。【材料と方法】Cry 毒素の 1 つである Cry1Ab を組換え大腸菌に産生させ、所定の方法で抽出後、トリプシン処理により活性化したものをを用いた。ヒト小腸上皮細胞は Applied Cell Biology Research Institute より入手し、昆虫中腸細胞は垂中腸からコラゲナーゼ処理により調整したものをを用いた。Cry1Ab を最終濃度 2000ng/ml で昆虫中腸細胞、ヒト小腸上皮細胞に添加し、昆虫中腸細胞については形態変化と膜電位変化、ヒト小腸上皮細胞については形態変化、細胞数、LDH 遊離率及び膜電位変化について観察・測定した。【結果と考察】昆虫中腸細胞においては、Cry1Ab による細胞膨満、膜電位変化が認められた。しかし、ヒト小腸上皮細胞においては、いずれの検索指標においても、Cry1Ab 添加による有意な変化は認められなかった。以上の結果から、Cry1Ab は昆虫中腸細胞に対して示すような毒性をヒト小腸上皮細胞に対しては示さないと考えられた。

## I-13 ヤガN - アセチルグルコサミニダーゼ遺伝子の単離と機能解析

渡辺聡子<sup>1</sup>、國保健浩<sup>1</sup>、窪田宜之<sup>1</sup>、犬丸茂樹<sup>1</sup>  
(<sup>1</sup>動衛研)

【背景と目的】バキュロウイルス遺伝子発現系を用いて生産される糖タンパク質のほとんどは、哺乳動物の糖タンパク質に見られるコンプレックス型糖鎖とは異なり、トリマンノシルコア型と呼ばれる昆虫特有の構造をもつ糖鎖の修飾を受ける。N - アセチルグルコサミニダーゼ (NAG) 活性を阻害することにより昆虫細胞においてもコンプレックス型糖鎖の合成が見られることから、昆虫細胞では糖鎖合成における NAG の関与が示唆される。そこで本研究ではバキュロウイルス遺伝子発現系で汎用されるヤガ (*Trichoplusia ni*) 由来細胞株 (TN5) の NAG 遺伝子の単離とその生理学的意義について検討した。【材料と方法】カイコ NAG の活性部位と思われる領域の塩基配列を基にプライマーを設計し、TN5 の mRNA を用いて RT-PCR を行った。得られた遺伝子産物の塩基配列を決定し、カイコ NAG 遺伝子との相同性を確認した。これをプローブとして TN5 の cDNA ライブラリーのスクリーニングを行い、ヤガ NAG 遺伝子の全長をコードする cDNA を単離した。【結果と考察】TN5 由来のヤガ NAG は 596 アミノ酸からなり、カイコとは 75.8% の相同性を有していた。ヤガ NAG には分泌シグナルと思われる領域が認められたが、膜結合領域を欠き、マンノシダーゼ II などの一連の糖鎖合成酵素とは明らかに異なる構造を有していた。現在、当該酵素が昆虫細胞におけるトリマンノシル型糖鎖合成に関与しているかどうかの検討を行っている。