

K. 日本実験動物医学会

シンポジウム

4月1日(火) 9:00~12:00 第9会場

実験動物に対する獣医学的診断治療

-小動物を中心に-

K-S-1 - 4

4月1日 9:00-12:00

浦野徹 (熊本大) 阿部敏男 (武田ラビックス)

- K-S-1 実験動物感染症の診断
伊藤豊志雄¹ (1実中研)
- K-S-2 マウス・ラットの緑膿菌感染における治療方法
浦野徹¹ (1熊本大)
- K-S-3 マウスの *Pasteurella pneumotropica* 感染の治療
八神健一¹ (1筑波大)
- K-S-4 イベルメクチンを用いたマウスの蟻虫感染症の治療
末田輝子¹ (1東北大)

ワークショップ

3月31日(月) 9:00~12:00 第9会場

認定獣医師の役割

K-W-1 - 5

3月31日 9:00-12:00

黒澤努 (阪大) 山本博 (富山大)

- K-W-1 認定獣医師制度の歴史
黒澤努¹ (1阪大)
- K-W-2 認定獣医師試験について
安居院高志¹ (1北大)
- K-W-3 大学における教育と認定獣医師制度
吉川泰弘¹ (1東大)
- K-W-4 企業が求める認定獣医師
池田卓也¹ (1グラクソ・スミスクライン)
- K-W-5 医学研究が求める認定獣医師
笠井憲雪¹ (1東北大)

一般口演

4月1日(火) 13:00~14:20 第9会場

K-1 - 8

4月1日 13:00-13:30

国枝哲夫 (岡山大)

- K-1 メダカ組織のテロメア長の測定
畠山仁¹、石井章雄² (1日獣大・比較細胞生物、²都老人研・高齢者臓器)

K-2 白内障を引き起こすアクアポリン-0 遺伝子の機能獲得性変異
岡村匡史¹、三好一郎¹、昆泰寛²、笠井恵雪¹
(¹東北大院・医・動物実験、²北大院・獣医・実験動物)

K-3 Ku70 タンパク質の核外輸送機序および細胞内局在の種差
遠藤大二¹、奥井登代²、関根大介¹、川瀬史郎²、昆泰寛³、林正信¹
(¹酪農大・放射線、²北海道衛研、³北大・実験動物)

4月1日 13:30 -13:50

久和茂 (東大)

K-4 ネコエイズ動物モデルに関する研究 8 MYA-1 細胞における X 線誘発アポトーシス機構との比較解析
山本博¹、佐藤大介²、中田由紀子¹、リフユイ¹、カンリザオ³、足立伊佐雄²、見上彪⁴、近藤隆³
(¹富山医薬大・生命科学実験センター、²同病院薬剤部、³医学部放射線基礎医学、⁴日本大学)

K-5 サルエイズ動物モデルを用いた組換えエイズワクチンの基礎研究
山本博¹、上坂浩実¹、勝山一輝¹、松尾和浩²、染谷健二³、本多三男³
(¹富山医薬大・生命科学実験センター、²科学技術振興事業団、³感染研・エイズ研究センター)

4月1日 13:50 -14:20

三枝順三 (産医研)

K-6 実験用豚のバラ色糞糖疹
木村透¹、土井邦雄²
(¹埼玉第一製薬・研究部、²東大・農・獣医病理)

K-7 5/6 腎臓摘出幼若ラットの残存腎臓に対する蛋白摂取量増減による影響：EGF の局在
三野将城¹、岡田利也¹、森岡宏至¹、森川嘉夫¹
(¹大阪府大・実験動物)

K-8 Experimental studies on non steroidal anti-rheumatic drug (diclofenac sodium) in albino rats
エル-ハマミーマハモッド¹、アブドラオサマ¹、タラートモハメド¹
(¹Dept.Pathology, Fac. Vet. Med., Suez Canal Univ., Egypt)

K-S-1 実験動物感染症の診断

伊藤豊志雄¹
(¹実中研)

実験遂行が困難になる、実験成績の再現性が得られないといった動物実験障害の原因の一つに感染症がある。感染症診断方法の各論あるいは手順は獣医の教科書に記載されている。ここでは家畜やペットの感染症診断との違いを強調しつつ、感染症成立要因、症状、検査方法と問題点ならびに診断検査の実際という構成で、実験小動物、特にマウスやラットの感染症診断の実際を紹介する。

感染症：感染源となる病原体は多様であり、同じ病原体であっても株により病原性が異なるということがある。同じ動物種であっても系統など遺伝的素因、年齢、基礎疾患の有無等の違いによって感染抵抗性が異なることは良く知られている。その上に、宿主としての実験動物は実験処置が加えられる、免疫不全動物の普及等、易感性を示す場合が多い。感染経路を見ると、実験動物として生産・維持されていれば、中間宿主を必要とする寄生虫やその伝播に媒介動物を必要とする病原体は排除できるが、一方では実験動物に固有の感染経路として投与材料中への病原体混入もしばしば経験されている。

症状：感染に伴う組織破壊や宿主の免疫反応によって目に見えるような臨床症状が出る場合を顕性感染と呼ぶ。当然、臨床症状が認められず肉眼的に異常として認識されないような感染も存在し、不顕性感染と呼ばれる。どちらになるかは病原体と宿主との相互関係によって決まるものであり、ある集団に病原体が進入した場合、全ての個体が同じ経過を示すわけではない。症状や経過から病因の推察が可能な場合が多い。

診断方法と問題点：感染症診断法には、人工培地や培養細胞などを用いた培養による細菌やウイルスなど病原体の分離や、寄生虫検査などにより顕微鏡下病原体を確認するなどによる病原体の分離・検出、あるいは病巣部材料の塗抹標本や病理組織標本などの免疫染色による特異的な抗原検出、病巣部などから核酸を抽出、PCR法による病原体に特異的な核酸配列検出など病原体の特異的部位の検出、さらには感染の結果、生体内で産生された血清中の抗体の有無によって感染を間接的に検出する方法とがある。症状や病理組織学的検査によって、特定の疾病に特徴的な臨床所見や病変を見出す非特異的方法もある。このように感染症診断のための検査方法はいろいろあるが、検査を実施してみると、菌同定方法の不統一、特異的方法といっても偽陽性や偽陰性反応の存在等問題が無いわけではない。それぞれの検査方法について、感度や特異性を熟知するとともに、異なる検査方法を準備するといったバックアップシステムの構築も不可欠である。

感染症診断の実際：最後に、実験動物感染症診断の実際ならびに異常動物が見出された場合の対応を紹介する。

K-S-2 マウス・ラットの緑膿菌感染における治療方法

浦野徹¹
(¹熊本大)

緑膿菌はグラム陰性の小桿菌で1本の鞭毛を有し、緑色色素ピオシアニンを産生する細菌で、土壌や河川などの自然界に広く分布しており、また、湿潤な環境から高頻度に検出される。実験動物領域での緑膿菌感染は、かつてはSPFマウス・ラットを中心に高率に発生していた。近年は、SPF動物からの緑膿菌の検出率こそ低下したものの、感染事故例はSPF動物のみならずconventional動物でも相変わらず時々見受けられる。ただし、通常は緑膿菌感染イコール発症ではなく、ごく稀にマウスで旋回病、腎盂腎炎および敗血症、モルモットで肺炎、ウサギで致命的肺炎や皮膚病などの自然発症例が見られる程度で、感染したことが直ちに自然発症に結びつく感染病としてはそれほど問題にはならない。実験動物領域で緑膿菌が忌避される最大の理由は、このような自然発症例ではなく、むしろ本菌感染動物に放射線照射やサイクロフォスファミドなどの免疫抑制剤およびコーチゾンの投与などの実験処置を加えた時に、本菌症が誘発され、時として敗血症死することにある。近年は遺伝子改変マウスにおいて、緑膿菌を初めとする日和見病原体が宿主に与える影響について懸念されているが、このことについては未だ不明であり、本菌感染が遺伝子改変マウスにとって問題であるか否かはわからないが、今後の重要な検討課題であろうと思われる。

マウス・ラットの緑膿菌感染における治療に関しては、各種実験処置により本菌症が誘発される可能性が懸念されることからすれば、個体あるいは動物飼育コロニーからの本菌除去についてが広義の意味での治療と位置づけられる。そこで、今回のシンポジウムでは個体あるいは動物飼育コロニーからの緑膿菌の除去を中心に述べる。

緑膿菌の除去を可能にするためには、まず初めに本菌の伝播経路、個体あるいは動物飼育コロニー内での本菌の分布状態を知ることが重要である。緑膿菌が実験動物領域に感染してくる原因は、恐らく本菌の持っている特性、すなわち自然界に広く分布すること、乾燥したところでも生存できること、栄養分の少ない水の中でも容易に増殖できることなどが影響すると考えられ、このことが、マウス・ラットを飼育するコロニーに容易に感染してくる原因と考えられる。具体的には、ヒトの手指、各種器材等に付着した緑膿菌が飼育コロニー内に侵入し、動物の飲水の中で増殖し、さらにマウス・ラットの主に消化管内へ感染していくと考えられる。その他、飼育室内では飼育棚、床、流し台等の環境、さらに飼育室以外では例えば洗浄室が問題となり、この場合、飼育器材を浸漬しておく水槽、洗浄機、洗浄室床面、洗浄室などを徘徊する昆虫類からも本菌が検出されるから、本菌を除去するためには動物を飼育する建物全域について対策を講じる必要がある。このことが、緑膿菌を除去するためには、動物個体と動物飼育施設全域の大きく二つに分けて考える必要があることの本理でもある。

動物個体からの緑膿菌の除去については、本菌の主たる感染部位が消化管であることから、1) 抗生物質のひとつであるgentamicinを飲水に添加して給与する方法、2) 緑膿菌の消化管での定着を阻止する腸内菌叢をあらかじめ動物の消化管に付与しておく方法が有効である。さらに、3) 体外受精による生殖工学的手法、あるいは4) 帝王切開による手法も有効である。

動物を飼育するコロニーからの緑膿菌の除去については、本菌に有効な消毒薬の使用などによる徹底した衛生管理をおこないながら緑膿菌陽性個体のみを処分することにより可能である。この場合、細心の注意を払いながらの徹底した衛生管理が前提であり、このことなくしては本菌の除去は成立しない。

つぎに、動物間の本菌の伝播経路を遮断する意味から、伝播経路である動物に給与している飲水、さらに飼育管理者等のヒトに焦点を合わせて、飲水をpH2.5～3.0に調整したり、本菌に有効な消毒薬の使用などによる徹底した衛生管理が効果的である。

動物を飼育する施設全体からの緑膿菌除去については、飼育室以外への対策が必要で、そのためには本菌がしばしば検出される洗浄室およびその周辺区域を中心にして、それに係わりをもつヒト、実験動物および昆虫類なども対象にして、消毒薬等の殺菌手段を適材適所に用いることによる本菌の防除が有効である。

以上のように、緑膿菌感染を治療するにあたっては、本菌の病原性、疫学、伝播経路、診断法等を十分に理解した上で、動物個体および動物飼育コロニーを対象にしたきめの細かい対策を講じながら適切な方法でおこなうことが重要である。さらに、本菌が自然界を含めて広く検出されることから、再感染を防止するための予防対策もまた非常に重要であり、注意を払わなければならない。

K-S-3 マウスの *Pasteurella pneumotropica* 感染の治療

八神健一¹
(¹筑波大)

1960～70年代、実験動物（特にマウス・ラット）は感染症発生による壊滅的な打撃を繰り返し受けていた。これに対する根本的な対応策として、帝王切開による SPF 化とバリア飼育の原則が普及し、生産施設に限らず実験施設においても感染症コントロールの基本的な考え方として定着してきた。その過程で、感染症に罹患した実験動物を治療することは、感染拡大のリスクや実験成績への影響の点からもタブー視されてきた。確かに、病原性や伝染性の高い微生物に対して姑息的な対応は禁忌であり、汚染の可能性のある動物を全て淘汰する方法が感染症の拡大を防止するうえで極めて重要であることに変わりはない。一方、1960～70年代に比較すれば、飼育装置の改良は目覚ましく、また、病原性や発症機構、抗菌剤の作用機序等の知見も深まり、感染症拡大のリスクと実験の継続のニーズを考慮した対応策の選択が可能となっている。さらに、実験動物の犠牲を減少させるべきとの社会通念への配慮も必要である。病原性や伝染性の低い病原体に汚染した場合の対応策として、集団中の全動物を直ちに淘汰すべきかどうか、見直されるべきであろう。

そこで、実験動物の感染症治療の1例として、*Pasteurella pneumotropica* (*P. pneumotropica*) 汚染マウスの抗菌剤治療による菌の駆除について紹介するとともに、感染症対策として、淘汰ではなく治療を行う際の必要条件について提案したい。

【*P. pneumotropica* 汚染マウスの抗菌剤治療】fluoroquinolone 系の抗生物質である Enrofloxacin の投与による *P. pneumotropica* の駆除について紹介する。この方法は、飲水による投与であるため、多数のマウスに対して一斉に処置することが可能である。マウス1頭あたり約25mg/kg/dayとなるよう、水道水に Enrofloxacin (パイトリル 2.5%注射液) を170mg/lとなるように添加し、2週間にわたり給水びんで自由摂取させた。2週間の投薬の後、2週間の投薬休止期間を置き、2回目の投薬を同様に行った。この間、ケージの交換は週1回、給水びんの交換は4～5日ごとに実施した。通常、1回目の投薬でほとんどのマウスから菌の駆除が出来るが、大規模な集団ではわずかながら陽性例が残る懸念があるため、2回目の投薬を行う。

【実験動物の抗菌剤治療の条件】実験動物を抗菌剤治療することは、感染症拡大のリスクと実験の継続のニーズを考慮したうえで選択すべき対応策のひとつと考えられる。リスク評価の項目として、病原体の病原性や伝染性の程度、副作用や合併症の可能性（菌交替症や耐性菌の出現の可能性を含む）が重要であり、実験動物医学関連の知識と総合的判断力が必要となる。実験実施者においては、研究に支障のない限り実験の継続を希望するであろう。実験への支障は、病原性の発現機構や抗菌剤の作用機構を理解したうえで判断するべきである。また、抗菌剤治療を行う場合、当該微生物、副作用の症状あるいは耐性菌の出現などをモニタリングする方法も同時に考慮すべきであろう。

実験動物の感染症治療は、病原性や伝染性の程度の低い微生物を対象とし、適切なリスク評価とモニタリング体制を持ち、実験動物医学的な判断のもとに実施されるべきであろう。

K-S-4 イベルメクチンを用いたマウスの蟻虫感染症の治療

末田輝子¹
(¹東北大)

マウスの蟻虫感染症は、世界中の動物実験施設で頻発しているが、実験を行う上で重要な障害にならないことからこれまであまり重要視されてこなかった。しかし、1980年のトランスジェニックマウスの登場以来、遺伝子操作マウスの授受が激増し、その感染力の強さから蟻虫（ネズミ大腸蟻虫、ネズミ盲腸蟻虫）の存在が動物授受の障害となっている。この「やっかいな寄生虫」の治療は古くから研究されており、駆虫剤としてピペラジン化合物、パモ酸ピルビニウム、サイアベンダゾール、パモ酸ピランテルなどが知られており、これらの薬剤を餌や水に混ぜて投与する方法はある程度の効果が認められている。一方、1991年に Le Blanc らは広い抗寄生虫スペクトラムを有するイベルメクチンをマウスに直接噴霧する駆虫方法を発表した。日本ではマウスの蟻虫駆除における本薬剤の使用経験はあまりなく、また、副作用としてのマウスの繁殖に及ぼす影響についてはまだ十分に検討されていない。私は経済性と簡便性からこの方法に注目をし、追試実験を行い、その駆虫効果の高さを確認し、さらに本薬剤のネズミ盲腸蟻虫とネズミ大腸蟻虫のそれぞれに対する駆虫効果と副作用の面から妊娠マウスや新生仔に及ぼす影響について検討を行った。

・投与方法：イベルメクチン注射液（1%）をスプレー瓶に入れ、蒸留水で10倍に希釈し、よく攪拌する。そして、通常のケージ交換作業後にマウスを含むケージ全体に、希釈した薬剤を1回噴霧する。1回の噴霧で約1ml、イベルメクチン量で1mg投与することになる。噴霧は週に1回、3週連続で行なう。

結果（1）イベルメクチンを1、2回噴霧することで両蟻虫の虫卵は検出されなくなり、さらに剖検により完全駆除を確認した。マウスの異常は見られなかった。

結果（2）妊娠した BALB/c および C57BL/6 マウスの薬剤噴霧群と蒸留水噴霧群において、産仔数、離乳数、離乳率に有意差は見られなかった（ともに $p > 0.05$ ）。また、妊娠マウスや新生仔の死亡や奇形などの副作用は見られなかった。

これらの結果よりイベルメクチンはマウスの蟻虫感染症の治療に対して優れた効果があり、繁殖を行っているケージに投与しても BALB/c、C57BL/6 の繁殖に大きな影響を与えないとは言えないということが示された。

しかし、繁殖を繰り返している大規模コロニーでは再感染は容易に起こるために先の投与方法を1サイクルのみでは不完全であり、投与量を増やす必要がある。私は2サイクル繰り返すことで、駆虫期間中のケージ交換方法や飼育室内の清掃作業について、従来の作業手順を何一つ変えることなく両蟻虫の根絶を成功させた。一部で、多剤耐性遺伝子のノックアウトマウスに対する副作用が報告されているが、投与量や投与方法を十分に考慮することにより、安全に使用できると思われる。

イベルメクチンは駆虫効果、労力、費用のバランスのとれた駆虫薬であり、今後この治療薬が広く普及されることを期待している。

K-W-1 認定獣医師制度の歴史

黒澤努¹
(¹阪大)

日本実験動物医学会はすでに61名の認定獣医師を認定している。この認定獣医師の必要性に関して各方面からの様々な意見が今後出されるであろうが、そもそもその必要性を考えついた者の一人として、これまでに日本実験動物医学会認定獣医師が誕生するまでの歴史を紹介する。

米国実験動物医学協会(ACLAM)の存在は1985年のNIH指針で既に知っていた。さらに大阪大学医学部附属動物実験施設の概念設計のために留学した米国ミシガン大学医学部のBen Cohen教授の元でその詳細を教えられた。この滞在時は、ACLAM認定試験の直前だったこともあり、数人の受験者が事前勉強でミシガン大学を来訪し、多数のスライドを用いて、Cohen教授等とともに症例検討会が開かれ、一緒に勉強した。またミシガン大学にはACLAMを目指すレジデントがいて、それらの方々とも親交を深め、実地修練の内容を知るにいった。こうしてACLAMの専門医制度を良く理解したが、その後施設の建設が始まりしばらくはACLAMについては考えることが少なかった。

しかし、施設運営の検討を開始し、国際的なレベルの実験動物施設運営のためにNIHの指針さらには実験動物福祉の立場からAALACなどの関連文書を参照すると実験動物医学専門医の話がたびたび出てくることに再度気付いた。すなわち米国では実験動物施設の運営では実験動物の獣医学的careが重要項目となっているが、それらの詳細は専門医によってなされるとの規定となっていたのである。わが国に国際的なレベルを達成できる実験動物施設を設立しようとする、実験動物医学専門医の存在が前提となる。そこで、笠井先生と伊藤(勇夫)先生に声をかけて、実験動物医学の専門家の研究会を作ることとした。早速当時の実験動物会の重鎮であった前島先生、波岡先生、光岡先生に相談を持ちかけたのであった。残念ながら、当時は実験動物医学という概念を日本実験動物学会か日本獣医学会の中に分科会と旗揚げすると良いとされただけで具体的にどのようにしたら、分科会を結成できるのかすら良くわかっていなかった。暗中模索である。

幸い日本獣医学会では分科会制度の見直しを開始したこともあり1993年に日本獣医学会の実験動物分科会として実験動物医学研究会が初代前島会長を選出して結成できた。また1996年には日本実験動物医学会と改称して本格的活動、とりわけ専門医の認定を視野にいれた活動が開始された。こうして日本実験動物医学会認定獣医師が1999年に暫定制度により誕生し、さらに2002年には、本制度における認定獣医師が認定され、総勢61名の認定獣医師が現在活躍することとなったのである。

K-W-2 認定獣医師試験について

安居院高志¹
(¹北大)

日本実験動物医学会(JALAM)認定獣医師制度は1999年度から始まり、最初の3年間は暫定制度として、無試験で経歴・研究歴等の書類審査のみで58名のファウンダー認定獣医師を認定した。2002年度から本制度に移行し、筆記試験による審査を開始したところである。引き続き筆記試験の受験資格としての書類審査は行っているが、経歴・研究歴の基準は緩和された。即ち暫定制度では、認定の必須条件は獣医師であることと5年以上継続してJALAM会員であることであったが、本制度では獣医師であることは当然変わりはないが、学会会員歴は3年に緩和された。また、その他の評点も暫定制度では、個人により違いはあるものの平均的な認定獣医師の場合、実験動物医学分野での経歴が10年以上で研究機関において実験動物医学に関して指導的役割を行っている者で、その他、数本の生命科学論文、数回の実験動物関係での学会報告、数回のJALAM主催研修会への参加等が必要であった。一方、本制度では実験動物医学分野での経験が5年以上、1本以上の生命科学関連論文、2回以上のJALAM主催研修会への出席と言う具合に必須条件が緩和された。その代わりに筆記試験を受け80点以上の得点を取らなければならない。即ちより若い人に認定獣医師となるチャンスが与えられたと言うことである。

さて、試験問題についてであるが、試験は総論50問、各論50問で、計100問からなる。各論はAまたはBからなり、Aは対象動物がげっ歯目、ウサギ目、鳥類、八虫類などいわゆる小動物で、Bはネコ、イヌ、ブタ、サルなどの中・大動物である。専門は小動物または中・大動物だったとしても、現場では認定獣医師はオールマイティーを求められるので、総論では両対象動物に関する基本的事柄を問う問題が出題されている。問題は学問主義に流れることのないよう、あくまで現場で実験動物専門獣医師として活躍するために必要な基礎知識を問うものであることを心掛けている。従って、感染症、麻酔・鎮痛、動物福祉、法規などの問題が中心となっている。しかし、現場では実験動物専門家として実験者から実験動物についての相談を受けたりすることもあるので、解剖、生理、遺伝・育種などでは学問的基礎知識を問う問題も含まれている。問題の作成では、まず認定獣医師に対し公募を行い、集まった問題を更に10人の試験委員で吟味し、最終問題を作成している。問題の作成には数カ月をかけ、メールでの討議、実際に一堂に集まる最終委員会を経て決定されている。この間、問題の適・不適、解答の正しさ(解答が二つあり得ないか、または特殊な例を考慮しても正しいと言えるか)などを徹底的に検証している。問題はJALAMホームページ上に公開されている。これは学会員の批判を受けとめ試験問題の更なる向上を図るためと、認定獣医師・学会員の学力の向上のためである。

K-W-3 大学における教育と認定獣医師制度

吉川泰弘¹
(¹東大)

大学における実験動物の認定獣医師教育について述べよというところであるが、現実には特別にこうした教育は行っていない。そこでもう少し拡大解釈して大学における教育と認定獣医師制度というテーマで考えてみたい。

1、獣医課程における実験動物学教育：東大では6年制の獣医学教育のうち2年生までは一般教養であり、専門の教育はほとんどない。また現在、5年生の前期でほぼ全ての実習と教育を終え、後は各研究室で基礎あるいは臨床の研究をする。従って実質2年半(前後期5学期)で、基礎から臨床まで習うことになる。この中で実験動物学としての講義と実習はそれぞれ1学期(講義は平均13~14回、実習は4週に集中)で、その他に3年生で進学した最初の実習で、実験動物の扱い方を練習する。14回の講義で広範囲にわたる実験動物学の全てを教えることは困難である。またほぼ3分の1は外からの講師を招いて、専門のトピックス的講義をしていただいている。実習も実験動物学と毒性学の混合という形である。最近では高校で生物学を学ばない学生も獣医学に進学するケースが増えており、獣医師国家試験を無視して、基礎生物学(遺伝学、繁殖学、動物学)と応用学(動物実験、福祉、法律、感染症など)を取りまとめて教えることになる。1年生の時から専門教育を受ける場合は、もう少し余裕があると思われるが、どの大学もほぼ似た状況ではないかと思う。

2、認定獣医師の役割：実験動物認定獣医師の役割を考えると、動物実験委員会(実験の評価、管理、情報公開)の主役を引き受けること。動物実験の専門家としてのアドバイス(動物の選択、手技、実験デザイン等)、獣医学的ケア・管理(麻酔、感染症予防等)、その他のソフトウェア(福祉、法律等)の専門知識を保有し、適切な対応をとること・・・と万能性が要求される。これを上述の大学教育として行うことはとても不可能である。

3、実験動物専門獣医師の教育：専門獣医師を育成するには体系的な教育が必要である。しかし、現在の方式のように育成された人間を認定するだけであれば特に教育の必要はない。若い人材を育てるのであれば、6年生終了後集中的に専門教育を行う(大学院修士)あるいは、夏季に集中的な講義・実習を行う(研修制度の)ような体制が必要とされる。実験動物技術者のためには白河研修のような制度が既に確立されている。時間がかかるかも知れないが、こうしたシステムが実験動物専門獣医師育成にも必要ではないかと思う。これは既に認定された専門家にとっても生涯教育としての自己研修の機会を提供することにもなる。

K-W-4 企業が求める認定獣医師

池田卓也¹
(¹グラクソ・スミスクライン)

我国の大多数の企業においては、実験動物施設における獣医師の役割は、必ずしも明確に規定されていない。現実的には多くの企業で、実験動物施設に獣医師を配しているが、実験動物施設の運営管理上の規程等に、獣医師の役割を明確に規程している例は極めてまれである。現在、我国においては特別な場合を除いて、企業の実験動物施設に獣医師の存在が必須不可欠な要件とは、認識されていない。そのため獣医師が存在しない実験動物施設も多数存在するのが、企業の現状である。況や認定獣医師となると、大多数の経営者および実験動物施設が所属する機関の長に、“実験動物施設に認定獣医師が必要である”との認識は、まったくない。そのため日本の企業において、一般論として“企業が求める認定獣医師とは”と言う問いに対して、現状で回答を求めるのは困難であろう。

欧米においては、実験動物施設に獣医師の存在が必須要件である。たとえどんな小さな実験動物施設においても、実験動物施設の維持・運営管理は、獣医師の関与なしには成立しない。もし専任の獣医師を配置できない場合でも、実験動物施設を保有し実験動物の飼育管理をする以上は、パートタイムあるいはコンサルタント獣医師の選任が必要条件となっている。現実的には大半の企業で、実験動物施設に専任の獣医師を常駐させている。特に大規模な研究施設に付属する実験動物施設では、Veterinarian Medicineに代表されるような名称の組織を保有し、複数の獣医師を配している。そこでは、「実験動物の管理と使用に関する指針(ILAR 1996)」に示されている獣医学的管理を統括し、実施している。

このような背景から、認定獣医師制度を最初に確立し、既に長い歴史を持つ米国の認定獣医師の活躍は、日本の認定獣医師が果たす役割について考える上で有用である。特に企業の実験動物施設での活躍を参考にすることは、企業が求める認定獣医師の姿を明らかにする上で、重要であると思われる。今回、研究所の動物管理部門に10人近い獣医師を擁し、そのうち5人が認定獣医師(ACLAM)である、米国の大規模な研究所の実験動物管理部門における例を示し、彼らの日常の活動および役割を紹介する事により、企業における認定獣医師の役割を論じたい。また本事例を参考に、我国の企業における認定獣医師の、今後のあるべき役割を考えてみたい。

K-W-5 医学研究が求める認定獣医師

笠井憲雪¹
(¹東北大)

認定獣医師制度が始まり、今春で5回目の認定を終えた。これまでに62名の方が認定獣医師となり、各方面で活躍している。このうち35名56%の方が医科系大学をその活躍の場としている。おおくは動物実験施設であり、実験動物の飼育管理者さらには動物実験法の指導監督者となっている。さらには総合大学であっても獣医師の数は少なく、認定獣医師がその大学の唯一人の獣医師であることが多く、大学全体の実験動物や動物実験の指導者となっている。近年は医学部や薬学部以外でも動物実験を行っており、例えば東北大学では理学部や工学部、さらには文学部でも行われている。さらに情報科学研究科や電気通信研究所においても動物実験委員会が設置されており、動物実験の多様化が益々進んでいることが伺われる。また、国や県での情報公開法や条例の施行による情報開示請求は、そのほとんどが医科系大学へ向けられたものである。

このような中で医科系大学の認定獣医師が求められていることは動物実験の倫理面での見識と能力である。それは技術的側面と社会科学的側面がある。前者は動愛法や動物実験指針で求められている「苦痛の軽減」のための麻酔法や安楽死法、さらには3Rの実施技術であり、これらについては我々は良く議論している。後者は生命倫理学や動物福祉学さらには法律面での見識であり、これについては苦手な分野であり、携わる認定獣医師は少ない。しかし、今後動物実験の社会的合意を得、研究者への動物実験倫理の教育指導のためには、動物と人間の関係についての歴史的考察や人々の考えの背景にある宗教や倫理、近代的な哲学者や生命倫理学者の動物や動物実験についての考え方、国内外の動物や動物実験についての比較法制などを地球規模で調査研究することが必要になると思われる。それには生命倫理学者や哲学者、そして法学者の助力を得て認定獣医師自らが動物生命倫理学や動物福祉学、関係法学の研究に参画していくことが望まれる。

K-1 メダカ組織のテロメア長の測定

畠山仁¹、石井章雄²

(¹日獣大・比較細胞生物、²都老人研・高齢者臓器)

脊椎動物のテロメアは TTAGGG の 6 塩基の単純な繰り返し配列からなり、染色体の末端に存在し、染色体の変性、再構成、癒合、欠失を防ぎ、染色体の相対的な対合に関連していると考えられている。ヒトをはじめ動物細胞は、培養系において限られた分裂増殖能を示し、ヘイフリックの仮説と称されている。この限られた複製寿命は老化のモデルとして用いられることが多い。この現象は細胞分裂の回数を反映する指標ともいうべきテロメアの長さに関連している。培養系の実験結果から個体においても分裂再生する組織では時間の経過とともに分裂回数が増加するものと考えられ、加齢に伴いテロメアが短縮し、個体の死に至っては、組織を構成する細胞はそのテロメアを消費し尽くしていると考えられるが、データとしては、ヒトでしか存在していない。そこで、生物学的に盛んに研究が行われ、寿命が短いメダカを実験動物として選択し、加齢に伴うテロメアの短縮などを検討する。メダカは年齢ごとに採取し、臓器別にテロメア長を測定した結果を報告する。

K-3 Ku70 タンパク質の核外輸送機序および細胞内局在の種差

遠藤大二¹、奥井登代²、関根大介¹、川瀬史郎²、昆泰寛³、林正信¹

(¹酪農大・放射線、²北海道衛研、³北大・実験動物)

【目的】Ku70 タンパク質は、DNA-PK のサブユニットとして DNA 修復に重要な役割を果たすことが知られている。我々は、正常ラットの線維芽細胞で、70%以上の Ku タンパク質が細胞質に存在し、放射線照射によって核へ移行することを報告した。今回、ラットの Ku タンパク質の核外輸送機序と各種動物の細胞について局在の種差を調べたので報告する。【材料と方法】線維芽細胞として、ヒト、マウスおよびラットについては初代培養細胞を用いた。ミドリザル、犬、チャイニーズハムスター、ハムスターおよびコットンラットについては、株化細胞を用いた。Ku タンパク質の細胞内における局在は、レーザー共焦点顕微鏡を用いて観察された。【結果】遺伝子の塩基配列から、ラット Ku70 タンパク質の 3' 末端に Nuclear Export Signal (NES) motif の存在が予測された。この NES motif を欠損した Ku70 遺伝子を GFP 遺伝子と連結後、Ku70 タンパク質の核局在性を欠損する LEC ラット線維芽細胞に導入したところ、Ku70-GFP 融合タンパク質は核にとどまった。この結果から 3' 末端に存在している NES motif が照射後の核外輸送に関係することが示唆された。続けて、細胞内の局在と放射線照射後の移動を 7 種の動物の細胞について観察した。未照射の状態では、ヒトおよびミドリザルの Ku70 タンパク質は核に局在しており、放射線照射後における細胞内局在の変化は認められなかった。一方、マウス、犬、チャイニーズハムスター、ハムスターおよびコットンラットの細胞では、未照射では Ku70 タンパク質は主として細胞質に局在しており、放射線照射後核へ移動した。Ku70 タンパク質は、いくつかの種の線維芽細胞中で細胞質に局在しており放射線照射後に核に移動する可能性が示された。

K-2 白内障を引き起こすアクアポリン-0 遺伝子の機能獲得性変異

岡村匡史¹、三好一郎¹、昆泰寛²、笠井恵雪¹

(¹東北大院・医・動物実験、²北大院・獣医・実験動物)

Cataract Tohoku (Cat^{Tohoku}) マウスは、小眼を伴う白内障を自然発症し、このマウスの水晶体では、線維細胞の著しい不整列、崩壊像が観察される。交配実験により、この疾患は常染色体上の単一遺伝子によって支配され、優性遺伝することがわかっている。今回我々は、Cat^{Tohoku} マウスの疾患原因遺伝子を同定し、トランスジェニック (Tg) マウスを用いて、白内障発症メカニズムを検討したので報告する。

MSM 系統との戻し交雑群を用いた連鎖解析により、疾患遺伝子は第 10 染色体に位置するマイクロサテライトマーカー *D10Mit103* 近傍にマッピングされた。この領域には水晶体線維細胞特異的に発現するアクアポリン-0 (*Aqp0*) 遺伝子が存在していたため、Cat^{Tohoku} マウスの *Aqp0* 遺伝子を調べたところ、12 塩基の欠損が同定された。次に Cat^{Tohoku} マウスの白内障発症と *Aqp0* 遺伝子変異の関連を調べるため、水晶体に変異 *Aqp0* 遺伝子を発現する Tg マウスを作製しその解析を行った。導入遺伝子を発現していた 3 系統の水晶体を実体顕微鏡で観察したところ、すべての系統の水晶体が白濁していた。さらに導入遺伝子の発現量が多い系統では、眼球重量が約 1/2 に減少し、Cat^{Tohoku} マウス水晶体と類似の病理像が観察された。正常な AQP タンパク質は、線維細胞の細胞膜上に存在しているが、Cat^{Tohoku} および Tg マウスでは、線維細胞の細胞質、特に核周囲に局在していた。Tg マウスの水晶体では、正常な *Aqp0* 遺伝子が発現しているにもかかわらず、線維細胞の崩壊像が観察された。これらのことから、変異 AQP0 は優性ネガティブ効果をもち、細胞膜上に輸送されず核周囲に蓄積することにより、正常な水晶体形成を阻害していることが示唆された。

K-4 ネコエイズ動物モデルに関する研究 8 MYA-1 細胞における X 線誘発アポトーシス機構との比較解析

山本博¹、佐藤大介²、中田由紀子¹、リフエイ¹、カンリザオ³、足立伊佐雄²、見上彪⁴、近藤隆³

(¹富山医薬大・生命科学実験センター、²同病院薬学部、³医学部放射線基礎医学、⁴日本大学)

【目的】ネコ AIDS 動物モデルの感染病態研究の一環として、FIV 感染 MYA-1 細胞のアポトーシス(APO)に関する研究を行ってきた。今回は、X 線照射による APO 誘導を行い、APO シグナルの伝達機構について比較した。特に X 線照射で認められる細胞内 Ca²⁺濃度 ([Ca²⁺]_i) の変化を測定し、APO における Ca²⁺の役割を検討した。

【材料・方法】FIV(kyo-1 株)感染および X 線(5Gy)照射を MYA-1 細胞に行った。APO 阻害剤として、1.抗酸化剤、2.Ca²⁺拮抗剤およびキレート剤、3.Caspase 阻害剤を用いた。また、X 線誘発 APO における Ca²⁺の役割を調べるために、X 線照射後の MYA-1 細胞に Fura-2AM(10 μM)を負荷し、蛍光画像解析法により [Ca²⁺]_i の変動を調べた。[Ca²⁺]_i については、励起波長 340nm および 380nm の蛍光比(Fluorescent ratio)により求めた。

【結果】5Gy の X 線照射による APO を有意に抑制したものは、高い OH ラジカル消去能を示す抗酸化剤の Cimetidine、Ca²⁺拮抗剤の Diltiazem と Verapamil、同キレート剤の BAPTA-AM であった。X 線照射により、[Ca²⁺]_i は上昇したが、Diltiazem(100 μM)や Verapamil(10 μM)の添加で抑制された。FIV 感染 MYA-1 細胞における APO 誘導は Diltiazem や Verapamil では影響されず、Caspase 阻害剤、Ac-IETD-CHO と Ac-DMQD-CHO で有意に抑制された。

【考察・まとめ】[Ca²⁺]_i の上昇が MYA-1 細胞における X 線誘発 APO のシグナル伝達において、大きな役割を担っていることが示唆された。FIV 感染による APO の誘導シグナルには、Caspase3 と Caspase6 または 8 が大きく関与するが、Ca²⁺の寄与は小さいと思われる。

K-5 サルエイズ動物モデルを用いた組換えエイズワクチンの基礎研究

山本博¹、上坂浩実¹、勝山一輝¹、松尾和浩²、染谷健二³、本多三男³
(¹富山医薬大・生命科学実験センター、²科学技術振興事業団、³感染研・エイズ研究センター)

【目的】 HIV ワクチン開発の基礎研究として、組換えワクチンをサルに免疫し、細胞性免疫の誘導能および CTL エピトープについて検討した。

【材料・方法】 SIVmac gag、gag-pol、HIV-1-E-gag 遺伝子をそれぞれ rBCG (東京株) 及び rVV (Dis 株) に組換えて作製した組換えワクチン候補をカニクイザルに接種して抗原特異的細胞性免疫について検討した。実験サル群は以下の如く大きく 3 つに分けられる。(1) SIVmac gag-pol 免疫群：村山群 (rBCG 組換えワクチン免疫後 rVV 組換えワクチンの免疫を行った：rBCG、rVV 以下同様)、筑波 A (rBCG & rVV) 群、筑波 B (rVV & rBCG) 群、(2) DNA ワクチン免疫群 (DNA、rVV)、(3) HIV-1-E-gag 免疫群 (rBCG、rVV) を作製し、種々の組合せで複数回組換えワクチンの接種を行った。

【結果】 村山群では 2 頭に CTL 活性が見られ、Mf3977 サルには gag の CTL エピトープの存在が示唆された。筑波 A 群のサルでは強い CTL 活性はみられなかった。筑波 B 群では 2 頭に SIVgag 特異的 CTL 活性が見られた。筑波 B 群に rBCG (SIVgag-pol) を追加免疫すると、特異的 CTL がさらに 1 頭で検出できた。HIV-E-gag 群免疫サルでは、強い CTL 活性は確認されなかった。DNA ワクチン接種群では、10~20%前後の SIVgag-pol 特異的 CTL 活性の誘導が確認された。

【考察】 今回の検討では、SIV 感染サルに見られるような強い CTL 活性の誘導は見られなかった。今後は、同一の培養 PBMC を抗原特異的 CTL 活性の測定、INF- γ の測定、及び proliferation assay 等に供し、抗原を認識したリンパ球の確認と CTL 活性を同時に検査する事でより明確に特異的免疫の誘導が確認できると思われる。また、CTL エピトープと MHC の関係についての検討も必要である。

K-7 5/6 腎臓摘出幼若ラットの残存腎臓に対する蛋白摂取量増減による影響：EGF の局在

三野将城¹、岡田利也¹、森岡宏至¹、森川嘉夫¹
(¹大阪府大・実験動物)

【目的】 成獣において 5/6 腎臓摘出を行った場合、残存腎臓は腎小体体積の増加、細胞増殖ならびにアポトーシス像を示し、糸球体硬化に陥ることが知られている。さらに、この 5/6 腎臓摘出モデルにおいて蛋白摂取量が腎不全の進行に影響することが報告されている。一方、成長期の動物に 5/6 腎臓摘出を行った場合、その反応は大きく、蛋白摂取量の増減に対する反応も大きいことが推察される。本研究では幼若ラットを用い 5/6 腎臓摘出モデルを作製し、残存腎臓の発達に対する蛋白摂取量の増減による影響を明らかにすることを目的とした。【方法】 3 週齢の Wistar 系雄ラットを用い 5/6 腎臓摘出モデルを作製し、給与飼料の蛋白含有量の違いにより 12%群、20%群および 35%群に分けた。モデル作製日より 4 および 8 週間後に残存腎臓を採取し残存腎臓の重量を測定後、常法により 6 μ m のパラフィン切片を作製し、PAS 染色標本を用いて腎小体の断面積を測定した。また、酵素抗体法により ED-1、PCNA、EGF および EGFR の局在を調べた。さらに TUNEL 法により DNA 断片化細胞の局在を調べた。

【結果】 モデル作製日より 4 および 8 週間後における残存腎臓重量は蛋白摂取量の減少とともに有意に小さくなった。腎小体断面積は蛋白質摂取量の減少とともに小さくなる傾向にあった。腎小体における PCNA 陽性細胞の出現率は蛋白摂取量の増加および時間経過とともに減少する傾向にあった。ED-1 陽性細胞ならびに TUNEL 陽性細胞は蛋白摂取量の増加および時間経過とともに多く認められた。EGF 陽性細胞ならびに EGFR 陽性細胞は蛋白摂取量の増加および時間経過とともに少なくなった。【考察】 幼若期において、蛋白摂取量の増減による腎不全の進行の変化には EGF の減少が関与していると考えられた。

K-6 実験用豚のバラ色靴糠疹

木村透¹、土井邦雄²
(¹埼玉第一製薬・研究部、²東大・農・獣医病理)

【目的】

豚のバラ色靴糠疹は、ヒトの場合とは異なり遺伝性疾患と考えられているが、原因や病態は未だ不明である。我々は、実験用豚 3 頭においてバラ色靴糠疹と診断された皮膚疾患に遭遇した。本疾患の病態の一部を知るために、血液・血清生化学的検査および皮膚病変の病理検査を行った。

【結果】

観察所見：3 頭の豚とも、同一の雄親から生まれたものであった。成長がやや遅延していたが、痒感軽度で、元気・食欲は正常であった。病変は腹部を中心に始まり、小豆大の紅疹が多発し、急速に拡大した。病変部は赤紫色になり、隆起して円形または不整形のリング状を呈した。病変は、腹部から胸部、腰背部、臀部、頭部、四肢へと広がった。このリング状の病変は同心円状に広がり、さらに癒合して幾重もの複雑な輪状模様を示した。

臨床病理学的検査成績：血液および血清生化学的検査では、ほとんど異常は認められなかった。血清蛋白分画で、アルブミンおよび各グロブリン分画にやや低下を見るのみであった。病変部位から皮膚糸状菌は分離されなかった。

病理検査成績：表皮構成細胞は 10 層以上になり、過形成による著しい肥厚を示し、表皮突起も明瞭に観察された。部位により、顕著な痂皮形成も見られた。真皮層では、少数のリンパ球を伴う著しい好酸球浸潤が観察され、特に毛細血管周囲で著明であった。また、毛細血管は拡張および鬱血し、時折内皮細胞に浮腫性変化が認められた。

【考察】

以上の成績から、豚のバラ色靴糠疹は、雄親側の遺伝的要因が強く影響する疾患であることがわかった。本疾患の皮膚病変は、毛細血管の微小循環障害により生じるものと思われた。また、発現には、アレルギー性過敏症が基礎疾患として関与していることが推測された。

K-8 Experimental studies on non steroidal anti-rheumatic drug (diclofenac sodium) in albino rats

エルハマミーハモッド¹、アブダラオサマ¹、タラートモハメド¹
(¹Dept.Pathology, Fac. Vet. Med., Suez Canal Univ., Egypt)

Eighty albino rats were divided into equal groups. The first rats group was injected with diclofenac sodium daily with a dose of 1.35 mg/rat/day. The rats of the second group were injected with diclofenac sodium twice weekly with a dose of 1.35 mg/rat/dose. Two control groups matched the injected group. Samples of blood and organs were collected from the injected rats every one and two weeks for eight weeks. The blood indices showed normocytic normochromic anemia and leucopenia. There was hepatocellular damage manifested by increase in AST, ALT, total, direct and indirect bilirubin was increased in all groups as well as hypoproteinemia, hypoalbuminemia and hypoglobulinemia. Microscopically, the hepatic lesions summarized were either focal or diffuse coagulative necrosis, the intensity of liver lesions increased with the period of administration. There was also renal damage manifested by the increase in creatinine and urea. Tubular nephrosis, focal hemorrhages and focal interstitial nephritis confirmed the results of clinico-biochemical studies. The intestine showed catarrhal enteritis.