

第33回岡山実験動物研究会

平成9年7月12日(土)午後1時15分から岡山大学農学部において岡山県新技術振興財団との共催で開催された。

はじめに会長の佐藤(岡山大・農学部)から開会の挨拶があり、その後、一般講演に移った。

一般講演(1)は「マウスAnti-mullerian hormone receptor遺伝子の染色体マッピング」と題して岡山大学農学部の小鹿泉女士が講演した。この司会は内藤一郎先生(重井医学研究所)が担当された。

一般講演(2)は「小型熱帯魚グッピーの放射線生物学」と題して岡山大学理学部の大原弘教授が講演された。この司会は河田哲典先生(岡山大・教育学部)が担当された。

一般講演(3)は「コカイン反復投与によるマウスの痙攣感受性亢進におけるポリアミンの役割」と題して川崎医科大学の霧里和朗先生が講演された。この司会は大森齊教授(岡山大・工学部)が担当された。

一般講演(4)は「ウサギのケージ内における行動学的観察—特に在来型FRPケージとSCANBERケージとの比較について」と題して岡山大学医学部の倉林謙先生が講演された。この司会は佐藤芳範先生(樹林原生物化学研究所・応用センター)が担当された。

4題の一般講演が終了し、休憩をとった後、事務局から会務報告があった。その内容は①平成8年度の活動報告(第31回研究会は6月29日、第32回研究会は11月29日に開催し、第13号の研究会報は9月に発行したこと、役員を選任は10月29日に行ったこと、理事会は2回、常務理事会は3回開催したこと、②平成8年度の会計収支決算報告及び監事によって会計監査が5月27日になされたこと、③平成9年度の活動としては、特別講演会が3月6日に開催され、また第33回研究会は岡山県新技術振興財団との共催で現在岡山大学農学部で開催していること、④第34回研究会は創立15周年記念に相応しい企画を行い、岡山県新技術振興財団との共催で11月下旬から12月上旬に公共施設で開催を予定していること、⑤第14号の研究会報の発行を進めていること、などであった。なお、上記の内容については、研究会に先立って開催された平成9年度第1回の理事会で報告、審議され、了承された。

会務報告後、特別講演が行われた。

特別講演は「ヒトWilson病モデル、肝癌モデル、免疫不全モデルとしてのLECラット」と題して徳島大学医学部の松本耕三先生が講演された。この司会は岡山大学農学部の国枝哲夫が担当した。この会に

は約50名の参加者があった。研究会終了後、農学部の中会議室でささやかな懇親会を行い、講師の先生と会員相互の親睦を深めた。

一般講演(1)

マウスAnti-mullerian hormone receptor 遺伝子の染色体マッピング

小鹿 泉・国枝哲夫(岡山大・農学部)

<目的>雄の発生において胎児精巢のセルトリ細胞から分泌されるAnti-mullerian hormone (AMH)は、ミューラー管の成長、分化を抑制する。雌ではAMHが分泌されないのでミューラー管は輸卵管や子宮へと分化する。最近マウスにおいてAMHのレセプター(AMHR)遺伝子がクローニングされたが染色体上での正確な位置がまだ明らかではない。そこで本研究は連鎖解析によりマウスAMHR遺伝子の染色体上の位置を決定することを目的とした。

<方法>連鎖解析では2系統のマウスMSMとpmaの間の戻し交配によって得られた60個体のDNAを用いた。6週齢のラット卵巣からmRNAを抽出後、RT-PCR法により増幅したAMHR遺伝子cDNAをプローブとしてサザンブロット法を行い、制限酵素*Kpn I*で消化した場合に検出されるRFLP (restriction fragment length polymorphism)によって各個体のAMHR遺伝子座の遺伝子型を調べた。次に、ヒトAMHR遺伝子が位置するヒト第12染色体上の領域と相同性の高いマウス第15染色体上の領域内に存在する3つのマイクロサテライトマーカー遺伝子座(*D15Mit34*, *D15Mit44*, *D15Mit35*)をPCR法によって増幅、電気泳動することにより各個体のタイピングを行った。

<結果>得られたデータからAMHR遺伝子座と各マーカー遺伝子座の連鎖解析を行ったところ、AMHR遺伝子と*D15Mit44*、*D15Mit35*の間の組み換え率は共に $5.08 \pm 2.86\%$ 、*D15Mit44*と*D15Mit35*の間の組み換え率は $6.78 \pm 3.27\%$ となり、AMHR遺伝子は*D15Mit44*から約5.08cMテロメア側、*D15Mit35*から約5.08cMセントロメア側に存在することが明らかとなった。

一般講演(2)

小型熱帯魚グッピーの放射線生物学

大原 弘・鉦山宗利(岡山大・理学部)

胎生メダカ科に属する小型熱帯魚グッピーでは、本邦でも温泉地などに野生する品種はペットとしては商品価値がなくなってしまったが、最近の熱帯魚飼育技術の進歩と普及により、通年の飼育・繁殖が非常に容易で経済的になった。特に、その旺盛な繁殖力と胎生と云う利点はその飼育の容易さ、成長の速さ、経済性と相俟って実験動物としての有用性が

考えられる。そこでこの研究では、これから展開される宇宙生物学、さらには哺乳類ではやり難いと思われる多量の線量と多量の個体を必要とする放射線生物学へ有用性をもとめて、最近開発の著しい巨大加速器から得られる重粒子線(宇宙線の主成分)による生物効果を明らかにすることにより宇宙・放射線生物学への応用を試みた。

実験に用いた重粒子線は放医研の医用重粒子加速器から得られる炭素イオン線(290MeV/n)で、200Gyまで種々の線量を全身照射で与えた各個体群の放射線死を病理組織学的に探索した。魚類は脊椎動物では最も下等になるが、その体制、体構造は本質的に哺乳類と変わらない。実験の結果、グッピーの細胞・組織の放射線に対する反応も哺乳類と同様に低線量域より造血機能の障害、増殖再生組織の不活化、腸上皮細胞の不活化による機能障害、さらには高線量域での中枢神経障害として表現され、照射線量と生存期間の関係は哺乳類のそれと同質であることが明らかになった。すなわち、最も感受性の高い組織は造血および上皮性組織であり、腸障害から神経障害に至るまで放射線死の非線量依存領域が存在することも確かめられた。小型で多数の個体を幅広い線量域の照射実験に利用できること、全身の組織障害検定が1枚の標本で可能なこと等々実験動物としての有用性が認められた。

一般講演(3)

コカイン反復投与によるマウスの痙攣感受性亢進におけるポリアミンの役割

霜里和朗・渡辺 悟・桂 昌司・大熊誠太郎・
斎藤泰一* (川崎医大・薬理学、*川崎医福大・
医療福祉学部・保健看護学)

反復刺激による神経系の可塑的变化は、記憶や薬物依存などに共通するメカニズムであると考えられている。そこで、神経系の可塑的变化のメカニズムを調べるため、可塑性モデルの一つであるコカイン反復投与による痙攣感受性亢進のメカニズムについてddY系雄性マウスを用いて調べた。

コカイン50mg/kgの反復投与は、はじめは痙攣感受性の亢進を引き起こしたが、後に耐性が生じた。NMDA受容体拮抗薬MK-801は用量依存的に痙攣の感受性亢進を抑制した。ドーパミンD1受容体拮抗薬SCH23390は感受性亢進の獲得をやや遅延させたが、ドーパミンD2受容体拮抗薬スルピリドは影響を与えなかった。コカイン処理は、3日目と6日目のプトレシンを生理食塩水処理に比べて3~6倍に増加させ、また6日目における線条体と海馬のスペルミジン、および3日目における小脳のスペルミンを増加させた。これらの結果は、コカイン反復投与による痙攣

の感受性亢進には、NMDA受容体とそのモデュレーターであるポリアミンが関与する可能性を示唆する。

続いて、マウスの脳室内に生理食塩水、プトレシンまたはスペルミジン(1~4 μ mole/10 μ l)を投与しコカインおよびN-Methyl-DL-aspartate (NMDLA、300mg/kg)誘発痙攣に対するポリアミンの影響を調べた。コカイン誘発痙攣は、スペルミジン処理により有意に増強されたが、プトレシン処理には影響を受けなかった。同様にスペルミジン処理マウスでは、NMDLA誘発痙攣の増強が認められたが、プトレシン処理は影響を与えなかった。

以上の結果は、コカイン反復投与による痙攣感受性の亢進にはNMDA受容体のモデュレーターであるスペルミジンの増加が関与することを示唆する。

一般講演(4)

ウサギのケージ内における行動学的観察 —特に在来型FRPケージとSCANBURケージとの 比較について—

倉林 譲・上山和貴・大光宗義
(岡山大・医学部・附属動物実験施設)

<目的>

平成6-7年度において佐藤らが「実験動物のケージサイズに関する検討」(文部省科学研究費補助金総合研究A;課題番号06304055;佐藤班)を組織し、わが国における新しい各実験動物のケージサイズである「4BS」という規準が提唱され、ウサギケージについては従来から施設等で一般的に飼育されていた在来型のケージが小さ過ぎることが指摘された^{1), 2), 3)}。勿論、わが国のみならず欧米においても既にそれぞれ規準値が存在し、最近、米国NIH規準値³⁾にも一部修正が加えられ、特にウサギケージではILAR規準として最低推奨値が新しく盛り込まれた^{4), 5), 6)}。当施設の在来型「FRPブラケットケージ」より約2.6倍のスペースを持つデンマーク製の「SCANBURケージならびに架台」を新規に導入し、行動学的観察を実験的に行い両者のケージにてウサギを飼育した時のウサギの行動を解析した結果、興味ある成績を得たのでここに報告する。

<実験材料ならびに実験方法>

実験材料は、SLC社の日本白色種雄性ウサギ6羽(平均体重3.97 \pm 0.31kg)を観察対象動物とした。実験方法は、SCANBURケージとFRPケージの大きさ・材質・重量等は、SCANBURケージの外寸法は720W \times 720D \times 300Hcm²であるのに対し、FRPケージの外寸法は350W \times 527D \times 350Hcm²であり、それぞれの床面積はSCANBURケージでは3,721cm²およびFRPケージでは1,455cm²であり、SCANBURケージはFRPケージの約2.6倍の面積を有している。また、容積としてはSCANBURケージは137.7Lに対してFRPケージは50.9Lであ

り、SCANBURケージはFRPケージの2.7倍の容積を有する。材質については市販のウサギケージの材質は、金網(ステンレスなど)アルミ板等もあるが、SCANBURケージはFDA基準に許可された特殊樹脂であり、FRPケージはその名の通り強化プラスチック(FRP)である。重量についてはSCANBURケージ本体のみでは、3.6kg(扉+銅箱は架台に附属; 1.4kg)であるのに対し、FRPケージは4.6kgであり、約1kg程度FRPケージの方が重い。なお、販売元はSCANBURケージは(株)夏目製作所であり、FRPケージは日本クレア(株)である。

観察機器にはカラービデオカメラ(SONY SSC-CX21V)4台ならびにタイムラプスビデオカセットリコーダー(SONY SVT-L200)1台を使用して観察した。在来型FRPケージ(小ケージ)にて飼育していたウサギをSCANBURケージ(大ケージ)へ移動し、5日間飼育した後、それぞれの大小逆のケージにウサギを入れ、10日後にはまた元のケージに戻した。すべての観察記録実験が済んでから録画テープを再生し、肉眼的にウサギの行動を解析した。

<実験成績>

1. ウサギの行動特性:

ウサギの行動特性は、長い耳介を有し普通のときには横に寝ているが、緊張する時にはこれを立てる。そしてしばしばリラックスポーズで寝そべることが多く、時に伸び上がる探索行動をとることがある。また、歩行行動以外に後肢の蹴り上げによる跳躍行動をとることもある。また、動物実験施設では一般的には行われていない稲藁を入れれば造巣の習性もある。これらのウサギの行動を列挙すれば次の7項目に大別される。1) Sitting/Lying(座位、伏臥位等にて静止)、2) Wondering(歩行、徘徊等)、3) Jumping/kicking(跳躍、蹴り等)、4) Eating/Drinking(摂餌・摂水等)、5) Grooming(毛づくろい)、6) Sleeping(伏臥位、横臥位で寝る)、7) Others(その他の行動; 例えば排尿、排糞、ケージの噛り等)などの行動が観察される。

2. 大小ケージ別ウサギの行動分析結果:

表1に示す通り、まず、最初の5日間FRPケージ(小)からSCANBUR(大)ケージに入れた場合の行動分析結果(A実験)を、次いで、6日から10日までの5日間SCANBURケージ(大)からFRPケージ(小)にウサギを移しての行動分析結果(B実験)を、最後にFRPケージ(小)からSCANBURケージ(大)に移して11日から15日までの5日間の行動観察(C実験)の分析を行った結果次のような成績を得た。1) 静止行動は、SCANBURケージの方がA実験では観察されたが、B、C実験で徐々に減少傾向が観察された。2) 歩行行動は、FRPケージよりもSCANBURケージの方が多い傾向が認められた。3) 跳躍・蹴り行動は、SCANBURケージの方に観察され、FRPケージでは認められなかった。4)

表1 A実験(小→大)、B実験(大→小)、C実験(小→大)におけるウサギの行動解析結果

行動分類	A実験(小→大)	B実験(大→小)	C実験(小→大)
1. 静止	54,618 (42.8%)	45,002 (35.1%)	26,668 (20.8%)
2. 歩行	2,492 (2.3%)	2,436 (1.9%)	3,718 (2.9%)
3. 跳躍・蹴り	128 (0.1%)	0 (0%)	256 (0.2%)
4. 摂餌・摂水	8,560 (6.7%)	9,359 (7.3%)	12,693 (9.9%)
5. 毛づくろい	20,770 (16.2%)	33,335 (26.0%)	28,078 (21.9%)
6. 睡眠	41,155 (32.1%)	38,078 (29.7%)	56,541 (44.1%)
7. その他(排便・排尿・噛む等)	0 (0%)	0 (0%)	256 (0.2%)
*1+6(静止)	95,773 (74.7%)	83,080 (64.8%)	83,209 (64.9%)
*2+3+4+5+7(活動)	32,437 (25.3%)	45,130 (35.2%)	45,001 (35.1%)

摂餌・摂水行動はA、B、C実験の順で3.2%程度のわずかな上昇が認められたが、大きな変化は認められなかった。5) 毛づくろい行動は、SCANBURケージでは16.2-21.9%しか認められなかったのに対し、FRPケージでは26.0%の行動観察ができた。6) 睡眠は、SCANBURケージに32.1-44.1%の高値で観察されたのに対し、FRPケージでは29.1%の低値で観察された。7) また、その他排便・排尿・ケージの噛り行動はC実験で僅か0.2%に観察されたのみで、A、B実験ではその機会に巡り会えなかったが、基本的には大きな相違がないものと考えられる。

ウサギの在来型FRPケージとSCANBURケージについて、行動学的観察を行って解析したところ、次のような成績を得た。

1. A実験(小→大)では、行動は静止してゆったりと睡眠を取ることが多いが、歩行・跳躍することも多い。
2. B実験(大→小)では毛づくろい行動が約10%ほど増加することが判明した。そして静止・歩行・跳躍・睡眠等の行動が減少する傾向が観察された。毛づくろい行動が狭いFRPケージに多く認められたことは、ストレスのためであり、毛づくろい行動はそれを解消する行動であると推察できる。
3. C実験(小→大)では、歩行・跳躍・睡眠等が増加するが、静止・毛づくろい行動等が減少する傾向が認められた。なお、摂餌・節水・排便・排尿等の行動はやや増加したものの大きな変動は認められなかった。

<結論>

平均3.97kg体重のウサギにとって在来型FRPケージよりSCANBURケージの方が、ウサギの飼育環境としてより良い環境であることが分かった。なお、良いウサギの飼育環境として専らウサギをフィールドに近似した飼育を是とするAnimal Welfare Institute⁷⁾とウサギのスイス規定⁸⁾、飼育ケージそのものを動物環境工学、危険因子、コスト効果ならびに将来像等から検討することも必要なことであると思われる⁹⁾。

<文献>

- 1) 佐藤徳光ら：「実験動物のケージサイズに関する検討」文部省科学研究費補助金(総合研究A)研究成果報告書, 22-24, 1995
- 2) 倉林 謙：ケージサイズの動向について, 岡山実験動物研究会報, 第13号, 19-22, 1996
- 3) 倉林 謙, 上山和貴, 大光宗義：ウサギケージの大きさによる行動学的研究—特に在来型FRPケージとSCANBURケージとの比較について—, 岡山実験動物研究会報, 第14号, pp. 22-26, 1997
- 4) Institute of Laboratory Animal Resources; Laboratory Animal Housing, 1978
- 5) Institute of laboratory animal resources, National research council. Guide for the care and use of laboratory animals. NIH, Maryland, 1985
- 6) Institute of laboratory Animal Resources, National Research council. Guide for the care and use of laboratory animals, National academy press, Washington D. C., 1996
- 7) Animal Welfare Institute: Comfortable Quarters for Laboratory Animals; Rabbits, 74-79, 1979
- 8) Animal Welfare Act and Laboratory Rabbit Care Guideline in Switzerland, 1994
- 9) Council Directive. On the approximation of laws, regulations and administrative provisions of the member state regarding the protection of animals used for experimental and other scientific purposes, 1986

創立15周年記念 第34回岡山実験動物研究会

平成9年11月28日(金)午後1時からメルパルクOKAYAMAで、岡山県新技術振興財団との共催で開催された。

はじめに会長の佐藤(岡山大・農学部)から開会の挨拶があり、その後、記念講演に移った。

記念講演は「ライフサイエンスの展開と実験動物」と題して岡山大学名誉教授、日本実験動物協会副会長の猪貴義先生が講演された。この司会は佐藤(岡山大・農学部)が担当した。

続いて特別講演に移った。

特別講演(1)は「疾患モデル動物の開発とその応用」と題して国立精神・神経センター・モデル動物開発部部長の菊池建機先生が講演された。この司会

は内藤一郎先生(重井医学研究所)が担当された。休憩を取った後、事務局から会務報告があった。その内容は、①平成9年度の研究会は特別講演会が3月6日に、第33回研究会が7月12日に開催され、また創立15周年記念 第34回研究会は岡山県新技術振興財団との共催で、現在メルパルクOKAYAMAで開催されていること、②第14号の研究会報は10月に発行し、11月に送付したこと、③理事会・常務理事会は各々2回開催したこと、④平成9年度の会計収支中間報告(1月1日～11月27日)、などであった。なお、上記の内容については、研究会に先立って開催された平成9年度第2回の理事会で報告、審議、了承された。

会務報告後、特別講演が引き続き行われた。

特別講演(2)「癌の遺伝子治療」と題して岡山大学・医学部・第一外科教授の田中紀章先生が講演された。この司会は栗本雅司先生(株林原生物化学研究所・藤崎研究所長)が担当された。



記念講演中の猪 貴義先生



特別講演中の菊池建機先生



特別講演中の田中紀章先生