
 研究会だより

第19回岡山実験動物研究会報告

平成2年6月30日(土)午後2時から岡山大学農学部第5講義室において開催された。

はじめに、会長の猪貴義教授から開会の御挨拶があり、その後、一般講演に移った。

一般講演は全部で6題が取り上げられた。演題「1」は山下摂氏(岡山大・農学部)らの「近交系シリアンハムスターにおける多型性の有無の検討—mtDNA 制限酵素切断型を用いて—」, 演題「2」は安藤秀樹氏(岡山大学・理学部)の「線虫 *C. elegans* 麻酔剤応答異常に関わる遺伝子群」であった。演題「1」「2」の座長は内藤一郎先生(重井医学研究所), 浅田伸彦先生(岡山理科大学)がそれぞれ担当された。この2題の講演終了後約20分間休憩をとった。休憩後、事務局から会務報告があった。その内容を要約すると、①平成元年度の会計監査が高橋正侑先生(監事)によってなされ、承認されたこと。②欠員になっていた監事に湯原正高先生(岡山大学・農学部)が理事会で推薦されたこと。③次期(第20回)の研究会の開催は11月下旬から12月上旬にかけて行ない、その内容は特別講演を予定していること。④本日の講演者は講演要旨を800字程度にまとめていただくこと、などであった。

以上の会務報告後、直ちに、一般講演を続けた。演題「3」は片山泰人先生(岡山大・医学部)の「C58マウスのけいれんについて」, 演題「4」は花谷利春氏ら(林原生物化学研究所)の「ハムスター出産日のコントロールによる出産仔利用率の向上」, 演題「5」は中永征太郎先生(ノートルダム清心女子・家政学部)の「白ネズミにおける食餌のBulkと摂取量」, 演題「6」は三谷恵一先生(岡山大・文学部)の「F344/DuCrjラットにおける円または三角形刺激の後期分化的知覚学習の効果(2) —円刺激または三角形刺激の単側提示検査の結果—」であった。上記の一般講演の座長は、演題「3」が初鹿了先生(川崎医科大), 演題「4」が山本敏男先生(岡山大・歯学部), 演題「5」が坂口英先生(岡山大・農学部), 演題「6」が佐

藤芳範先生(林原生物化学研究所)がそれぞれ担当された。

会の終了後、ささやかな懇親会が持たれ、会員相互の親睦を深めた。

一般講演の要旨は以下の通りである。

1. 近交系シリアンハムスターにおける多型性の有無の検討—mtDNA 制限酵素切断型を用いて—

山下 摂・猪 貴義・米田嘉重郎*

(岡山大・農学部, *東京医大・動物実験センター)

実験動物としての近交系シリアンハムスターは、実験動物化への基礎集団が非常に小さいことから、近交系間の遺伝的変異性が少ないものと予想されていた。しかし近年、血清エステラーゼアイソザイムにおける系統間差が確認されるなど、遺伝的変異の存在が明らかにされつつある。そこで本研究では、マウス・ラットなどの遺伝的モニタリングや系統の起源等の検索に用いられているミトコンドリアDNA(mtDNA)の制限酵素切断型について、近交系シリアンハムスター間における遺伝的変異の有無を検討したので報告する。

材料と方法

近交系シリアンハムスターは、APG, ACN, LSH, MHA, MYH(B10 14.6)の5系統を用いた。mtDNAは肝臓及び腎臓からミトコンドリアを画分し、フェノール・クロロホルム沈澱法によって回収した後、塩化セシウム密度勾配遠心法を用いて精製した。得られたmtDNAを、4種類の4塩基対認識酵素と13種類の6塩基対認識酵素で消化し、0.9~1.0%アガロースゲルで電気泳動を行い、EtBr染色によって切断型を検出した。

結果と考察

近交系シリアンハムスター5系統についてmtDNAの制限酵素切断型を調べた結果、Taq I(4塩基対認識酵素)で消化した場合のみ、MHA系統に他の4系統とは異なる明かな変異が認められた。その他の制限酵素(HaeIII, HpaII, HhaI, EcoRI, SalI, HindIII, DraI, HincII, BglII, PstI, XhoI, AvaI, KpnI, BamHI, PvuII)については、切断型に近交系間の変異

は認められなかった。

以上の結果より、確立された近交系シリアンハムスター間に、mtDNA レベルでの遺伝的変異の存在することが明かとなった。今後さらに、系統数と制限酵素の数を増やし詳細な検討を行っていくことによって、複数の新たな遺伝的変異が発見される可能性もあると考えられる。

2. 線虫 *C. エレガンス* 麻酔剤応答異常に関わる遺伝子群

安藤 秀樹

(岡山大学・理学部・生物学教室)

我々は、脊椎動物に作用をもつ薬剤の作用機序を単純な *C. エレガンス* の筋神経系を用いて明らかにすることを目的としている。中でも不明な点が多い筋肉の興奮から収縮までの過程については、体壁筋収縮を指標とした *C. エレガンス* の実験系が分子レベルでの具体像を与えてくれるものと期待される。

脊椎動物のニコチン性アセチルコリン受容体アゴニストは *C. エレガンス* 体壁筋を収縮させる。私は野生型カットワーム（切断個体）を用いた薬剤溶液へのバス・アプリケーション分析でコリン性阻害剤以外に麻酔剤ケタミンがニコチン性物質の作用を効果的に阻害することを見出した。ケタミンは一般にコリン性阻害剤が無効な、イオンポンプ阻害剤であるウアバインの筋収縮作用も同様に阻害した。ケタミンの作用機序を具体的に調べるため、突然変異誘発剤 EMS 処理によりケタミン応答性異常 (KRA) 株を16系統確立した。遺伝解析の結果、KRA 株には筋収縮制御系で働く蛋白質をコードする *unc-22* と、新しく同定された *kra-1* の遺伝子変異を持つものが含まれていた。*kra-1* 産物の機能を調べるため、その変異株である kh30株個体に対し薬剤応答性を観察した。kh30株はコリン性、カテコールアミン性を含めた薬剤の中からケタミンに選択的に応答異常（けいれん発作）を発現した。また kh30株のカットワームの体壁筋は、ニコチン性アゴニストとウアバインの両方に野生株より低い感受性を示した。しかし偏光顕微鏡観察では筋肉構造に異常はみられなかった。

コリン性競合的阻害剤（ツボクラリン、ヘキサメトニウム）はケタミンの筋弛緩作用をある程度阻害した。以上の結果は、次に示す可能性を示唆する。①ケタミンはコリン受容系とは異なる作用部位を持つ。②ケタミン作用部位と kh30株の変異部位は共通の過程に関わる。③両部位は筋フィラメント構造以外の、コリン受容系と連関した過程に位置する。以上を総合した結果、*kra-1* 産物は *C. エレガンス* 体壁筋の興奮から収縮に至るシグナル伝達過程に関与するケタミン受容体の性質を持つ蛋白質であると推察される。

3. C58マウスのけいれんについて

片山 泰人

(岡山大学・医学部)

放り上げなどの簡単な体位変換刺激によりけいれん発作を惹起するマウスに E1 マウスがいる。本マウスはわが国で発見された自然発症てんかんモデルマウスであり、多くの研究がなされている。今回、C58マウスも E1 マウス同様けいれん素因を有することを見出したので、発作様式ならびに発時脳波について報告する。なお、本マウスはすでに発表したけいれん素因を有する AKR マウス同様リンパ性白血病モデルマウスである。本マウスの発作様式は E1 マウスのそれと類似しているが、けいれん末期に反弓緊張が見られず、ランニングフィットを呈し、さらにけいれん終了後に長期にわたる自動症が認められる。発作は顔面けいれん、すなわちひげをびくびくさせ、顔面を左右に頻繁に動かすことより開始され、やがて後肢と尾とで立ち上り、前肢を顔面でさかんに動かすボクシング様姿勢を呈する。その後、体位保持不能となり後転するが、再び同様の姿勢をとる。数分間にわたってこのような発作をくり返し、やがて回復する。けいれん準備性獲得に至る日数は 4～6 週間で、その発症率はほぼ 100% であるが、生後 9～10 ヶ月を経るとけいれん発作は起こらなくなる。遺伝様式は不明である。けいれん準備性を獲得した個体は、安静時においても散発性スパイクが認められ、けいれん発作に一致して高振幅多棘波バーストが出現し、けいれん終了後は基礎波

の平端化について、発作後自動症に対応する高振幅徐波が認められた。

4. ハムスター出産日のコントロールによる出産仔利用率の向上

花谷 利春, 杉本 純夫, 田中 恵美, 滝本 晃
 斎藤 聡, 杉本 利行, 栗本 雅司
 (林原生物化学研究所 藤崎研究所)

我々は、ハムスターを利用した『林原ヒト細胞 in vivo 増殖法』と呼ばれるヒト細胞大量増殖技術の工業化に成功した。この方法は、新生仔にヒト細胞を移植するので、細胞移植日に合わせて出産させることが、我々にとって、作業上、重要な課題である。

そこで、出産日をコントロールする方法について検討した。その結果、以下の条件を組み合わせれば、必要に応じて出産日のコントロールを行なえることが明かとなった。

1. 4日周期で安定に発情を繰り返す。
2. 妊娠期間は16日である。
3. 交尾は通常夕方から起こるといわれているが12時～17時の間でも起こる。
4. 4日間交配を行なえば、出産は4日間で起こり、交配期間を3日にすれば、出産も3日で起こる。
5. 授乳中のハムスターでは、離乳によって、性周期をそろえて回帰させられる。
6. 離乳4日後に最初の発情が起こる。
7. 離乳コントロールを行なうのには、離乳時の仔が19日齢以下、離乳時の仔数が6仔以上が必要である。

実際に、この条件を用いて出産日のコントロールを行うことで、約70%以上の確率で目的の日に出産を集中させることが可能となり、全体の交配数を40%減少させることができた。交配数に対する利用率は、2倍に上昇した。

今後の課題としては、未経産ハムスターの出産をいかにコントロールするかである。

5. 白ネズミにおける食餌の Bulk と摂取量

中永征太郎, 彌益 あや, 佐藤 孜郎
 (ノートルダム清心女子・家政学部)

白ネズミが、食餌の質の低下に対して、どのような対応を示すかを知るために、セルロース粉末を基礎飼料 (Fiber free diet: 対照) に、5%, 10%, 20%, 30% 添加し、白ネズミに給餌した。そして、それぞれの供試飼料について、食餌の Bulk が食餌摂取量、飼料効率、飼料のエネルギー利用率にどのような影響を及ぼすかについて検討した。

その方法として、SD 系白ネズミの雄30匹 (9週齢) を用い、上記のセルロース添加食を4週間与えて、代謝試験を行った。

その結果、

- 1) 飼料摂取量は5%セルロース添加では変化せず、10%以上のセルロースの存在により飼料摂取量の増加が認められた。また、体重はセルロース10%・20%食群において対照群と比較して常に高値を示し、30%食群は逆に低値となった。
- 2) 飼料効率は20%以上のセルロース添加により、統計的に有意な低下が認められた ($p < 0.05$)。
- 3) 摂取エネルギーと、糞便からの排泄エネルギーより求めた可消化エネルギー含量は、5%セルロース添加によりすでに有意な低下がみられた。しかし、セルロース添加により摂食量が増加したために、可消化の摂取エネルギー量はセルロース20%食群まではほぼ同程度のレベルを維持した。

以上の結果から、食餌中の Bulk 量の差異は摂食量の増減に関与しており、体重、飼料効率、エネルギー利用率、摂取エネルギー量等に影響を及ぼすことが示された。

(岡山実験動物研究会報, 第7号, pp. 33—36論文掲載)

6. F344/DuCrj ラットにおける円または三角形刺激の後期分化的知覚学習の効果(2)―円刺激または三角形刺激の単側提示検査の結果―

三 谷 恵 一

(岡山大学・文学部・心理学講座)

生後220日のF344/DuCrj ラットの雄12匹と雌11匹を、4壁面は白く天井はスリガラスで覆われた外径70×40×30cmの知覚学習(PL: perceptual learning)箱に入れ、毎日12時間照明して生後685日までの後期465日の間分化的知覚学習させた。「三角形 PL 群(N=8)」の1壁面には黒い一辺14.758cmの小正三角形を提示し、「円 PL 群(N=8)」には同外周の半径7.05cmの黒い円を長期に提示した。「空白群(N=7)」は視覚的パターンは何も提示されなかった。685日からは天井も窓も覆われた準暗個室に入れて飼育し、その他のパターン知覚を極力排除した。

分化的 PL の視覚的パターンへの反応のテストでは、70×40×30cmの白い検査箱を白壁で左右の部屋に折半し、幅10cmの切れめから出入りできるようにした。黒円左条件の場合は、PL で使用したのと同じ黒い円を左の部屋の左奥壁面の中央部に提示した。黒円右条件、三角形左条件、三角形右条件も同様であった。1日1条件とし、1匹10分ずつビデオタイマーも動員して一旦録画した上で分析した。

結 果

①「成長曲線」は、正三角形 PL 群が著しかった。すなわち、生後220日ではほぼ等しくされていた体重も、生後685日で正三角形 PL 群雄(N=4)の平均は422.25gであるのに対して、円 PL 群雄(N=4)は391.38g、空白群雄(N=3)は401.0gと少なかった。雌の場合も同様であり三角形 PL 群雌(N=4)は253.75gであるのに対して、円 PL 群雌(N=4)は243.0g、空白群雌(N=3)は233.3gと少なかった。

②「死亡率」は、最終的には三角形 PL 群の場合は0%であったのに対して、円 PL 群の場合は12.5%(突然死1)、空白群の場合は57.14%(突然死4)であった。この結果は、曲線図形 PL 群と空白群に死亡個体が多くなるという F344ラット

を用いて得た実験27, 28, 29, 30の結果が、比較的死亡率が少ないと思われる F344/DuCrj の場合であっても、長期におよぶ後期の黒円と空白の PL によって生じることが明らかになった。

③「視覚的パターン提示室平均滞在時間比率」
“左部屋黒円条件”では、三角形 PL 群: 50.29%, 円 PL 群: 28.67%, 空白群: 26.87%であった。

“左部屋黒三角形条件”では、三角形 PL 群: 45.10%, 円 PL 群: 33.46%, 空白群: 45.97%であった。

④「視覚的パターン平均注視時間」

▲ 黒三角形に対する反応

a. 三角形 PL 群の動物は、黒三角形を平均12.38秒注視し最長となる。三角形の頂点を一時に18秒間凝視(fixation)したり、37秒間走査(scanning)したり凝視したりする行動がしばしば観察された。b. 円 PL 群の動物は、黒三角を注視したり凝視したりする能力が著しく妨害され阻害される。平均注視時間は7.38秒と最短となり空白群の10.2秒にも劣った生活体となる。

● 黒円に対する反応

a. 三角形 PL 群の動物は、黒円を平均11.31秒注視し最長となる。但しその注視行動は、円の左外周を身体を動かしながら走査していて、円に対する凝視というものは観察されない。6.5秒間円を正視しているように見える場合でも、身を動かしながら、つまり目を動かしながら見ていることが明らかとなった。b. 円 PL 群の動物は、黒円を注視したり凝視したりする能力が著しく妨害され阻害される。平均注視したり凝視したりする能力が著しく妨害され阻害される。平均注視時間は3.31秒と最短となり、空白群の4.9秒にも劣った生活体となる。黒円に対する知覚学習(PL)は全く効果が無いばかりか、黒円の場合には潜在制止(LI: latent inhibition)すら出現することも見だされた。一方、黒三角に対する LI は無い。c. 空白群の動物は、黒円を4.9秒しか注視しないが、黒三角は10.2秒も注視する。

結 論

視覚的パターンが動物の身体と精神に及ぼす効果には、知覚学習という経験の問題のみでなく、パターンに特有の生得的差異があることが示唆さ

れる。三角形とは心理学的には全く異なったパターンであることが判明した。ゲシュタルト心理学は、三角形よりも円を“よい (good)”形として来たが (koffka, 1935, p. 151), 真実は逆である可能性が示唆されて来た。

参考文献

三谷恵一 初期学習における経験と発達のメカニズム—潜在学習・知覚学習・潜在制止—, 1989, 岡山大学文学部研究叢書 3

第20回岡山実験動物研究会

平成2年12月1日(土)午後2時からまきび会館において開催された。

はじめに、会長の猪貴義教授から開会の御挨拶があった。この挨拶の中で、各分野で御活躍されている3名の講師の先生方をお招きしたことなどがお話された。その後、直ちに特別講演に移った。特別講演「1」は「動物実験における腎症候性出血熱の発生と終息」と題して元大阪大学微生物病研究所教授の山之内孝尚先生が講演された。この司会は猪貴義先生(岡山大・農学部)が担当された。

わが国での動物実験に伴う腎症候性出血熱(HFRS)患者の発生から終息に至る経過、発症要因などについて詳細なデータに基づいてお話された。このお話から、先生の長年の御苦勞が偲ばれ、また動物実験を行なう際の汚染予防の重大性をあらためて認識することができた。

特別講演「1」の終了後、約20分間休憩をとった。休憩後、事務局から会務報告があった。その内容を要約すると、①次期(平成3年度以降)の研究会長に田坂賢二教授(岡山大・薬学部)が選出されたこと。②研究会会則の改正がなされたこと。③監事の高橋正侑先生に代って中永征太郎先生(ノートルダム清心女子大)が推薦されたこと。④次期(第21回)研究会の開催は来年5~6月頃行なう予定であること。⑤会員数は129名、本日の入会が2名で計131名である、などであった。

会務報告後、特別講演(2題)を続行した。

特別講演「2」は「神経細胞の雑種形成」と題して京都大学ウィルス研究所の石井一宏先生が講

演された。この司会は片山泰人先生(岡山大・医学部)が担当された。

分子生物学・神経工学の手法による神経機能解析、特に細胞培養系を用いた先生の最近の研究について詳細にお話され、大変印象深い内容でした。

特別講演「3」は「アセチルコリンおよびヒスタミン吸入に対する気道感受性を異にするモルモット二系統の選抜育種」と題して日本臓器製薬株式会社、生物活性科学研究所の三上博輝氏が講演された。

近年アレルギー患者数は急増し、大きな社会問題となっている。お話の内容はまさに時を得たものであり、選抜育種によって作出された系統(アレルギー高・低感受系)は今後アレルギーの研究にとって価値の高いものになるものとみられ、大変興味深く拝聴した。

会には80名以上の参加者があり、盛会のうちに終了した。会終了後、懇親会が同会場で持たれた。この会では久しぶりにカラオケも登場し、なごやかな雰囲気の中で会員相互の親睦を深めた。

上記の特別講演の要旨は以下に示しているが、本誌の特別講演要旨(2~23ページ)にさらにくわしく掲載されているので、参照して下さい。

1. 動物実験における腎症候性出血熱の発生と終息

山之内 孝 尚

(元大阪大学微生物病研究所教授)

わが国での教育研究機関での動物実験に伴う腎症候性出血熱(HFRS)が確認されたのは昭和53年後半であるが、本症の発症状況の調査、病原体の分離、検査体制の確立を通じて本症の予防制圧、汚染動物の排除を研究の目標として文部省科研費特定研究班が緊急発足し、臨時国立大学動物施設長会議と併せて、第1回の班会議が東大学士会館分館で開催されたのは12月12日であった。以後研究目標は総合研究A班に引きつがれ、研究が展開されたが、昭和59年末以降1名の本症患者発生も見ず、目標を達成し総合研究を昭和63年度をもって終了した。動物実験に伴うHFRS患者発生から終息に至る経過と発症要因、予防の基本対策について班研究で得られた知見を基に略述する。