

氏名(本籍)	まさおかとしお 政岡俊夫(高知県)
学位の種類	獣医学博士
学位記番号	乙第225号
学位授与の要件	学位規則第3条第2項該当
学位論文題名	実験動物としての系統ウサギ(JW-NIBSを中心として)の生理・薬理的 特性に関する研究
論文審査委員	(主査) 教授 赤堀文昭 (副査) 教授 中村経紀 教授 藤岡富士夫

論文内容の要旨

獣医学、医学および薬学領域における動物実験は、生命科学の進歩とともにそこに使用される実験動物においても、より厳格な基準が要求されてきている。すなわち、実験材料として用いられる実験用動物は均一化され、規格化されることによって、研究成果の信頼性をさらに高めることができると考えるからである。

しかし、今日なお、その大部分は実験動物としての条件を十分そなえたものは極めて少なく、わずかマウスおよびラットにおいてみられるのみである。マウスおよびラット以外の実験用動物の多くは、家畜からの転用あるいは捕獲野生動物が使われており、これらの動物の遺伝的および環境的な統御はほとんどなされていない。このことは、このような動物を用いて得られるデータがバラツキの大きなものとなり、将来にわたっての信頼できるデータとしては疑問視せざるを得ない状況となっている。それ故、マウスおよびラット以外の実験動物においても、実験動物としての観点からその特性が浮き彫りにされ、使用されなければならないと考える。そうすることにより、医薬品および農薬などをはじめとする化学物質の効果ならびに安全性の評価において、より精度の高い動物実験へと進めることができるからである。

したがって、このような立場から実験用動物として用いられているウサギを顧りみた場合、古くから生理学、薬理学、免疫学および毒性学などの分野において汎用されてきているにも拘わらず、未だ遺伝的ならびに環境的に統御されておらず、実験動物ウサギとしての条件は不十分であると言わざるを得ない。近年、外国において2~3の系統化あるいは均一化されたウサギが作出されており、一方、わが国においても遺伝的純化のかなり進んだウサギの作出をみるに至っている。

そこで、本研究は獣医学分野における実験用動物の使用者側の立場から、系統、性別、年齢および環境などの一定性を生理学的ならびに薬理的に比較検討することにより、ウサギの実験動物としての特性を把握し、その特徴を浮き彫りにすることをこの研究の目的とした。

本論文では

- 1章 ウサギの実験用動物としての歴史
- 2章 系統ウサギの比較生理学的研究

Japanese White-Nippon Institute for Biological Science (JW-NIBS), New Zealand
White-Nippon Institute for Biological Science (NZW-NIBS), Dutch-Nippon Institute

for Biological Science (D-NIBS) および Japanese White (JW) や New Zealand White (NZW) の cross-breeding における生理値の年齢差, 性差, 系統差, 環境差ならびに血清 Pre-albumin Esterase の Phenotype によるコロニー均一性の検討

3章 系統ウサギの比較薬理学的研究

系統ウサギ JW-NIBS 又は NZW-NIBS における麻酔方法の検討, 自律神経薬に対する反応および有機リン系農薬 Rangado の体内代謝性・残留性の年齢差および性差ならびに Atropinesterase (AE) 存在有無の差による薬物反応性の検討

以上の観点から実験動物としてのウサギの生理学的ならびに薬理学的特性を実験成績にもとづいて論述した。

1章 ウサギの実験動物としての歴史

- 1) ウサギが実験用動物として使用されてきた国内, 外の状況について比較し,
- 2) わが国におけるウサギの純化(実験動物化)の状況について, 外国のそれと比較考察した。
- 3) ウサギの実験動物としての有用性および実験動物化による将来への展望を論述した。

2章 系統ウサギの比較生理学的研究

実験動物としての観点からウサギの特徴を把握するために, 純化の程度の高いウサギコロニーを選び, これら系統ウサギの生理学的特性を追求した。わが国における純化の程度の高いウサギとして, 日本生物科学研究所 Nippon Institute for Biological Science (NIBS) の作出したもの(表-1)を選び, この他 JW-NIBS のそれと比較する意味で, 市販されている日本白色種 Japanese White および New Zealand White 種の crossbreeding (育成コロニーの不明確なもので JW および NZW と略す)を研究の対象とし, 体重, 体温, 心拍数, 呼吸数, 心電図ならびに血圧などについて検討するとともに血清 Pre-albumine Esterase の Phenotype による均一性や Atropinesterase の存在の有無について比較検討した。

表-1 研究対象のウサギコロニー

系 統	特 徴
JW-NIBS	1965年よりクローズドコロニーで飼育繁殖
JW-NIBS/Y	1980年近交系 F20代 (99.5%)
NZW-NIBS	1967年 Jackson Lab. より系統名Ⅲ 血縁係数(R) 77%で導入 現在 F19代 (F11~13代を生体生理・血圧実験に, また, F19代を血清学的実験に使用)
Dutch-NIBS	1968年 Jackson Lab. より系統名 AccR (3) 血縁係数(R) 96%で導入した雄と舟橋農場から導入した ACEP(3) F3代の雌を交配し, 生まれた F ₁ 雌に雄 (AccR(3)) をバッククロスして確立したウィンナ白 (劣性青眼・白色) 現在 F17代 (生体生理実験には F9代を, 血清学的実験には F17代を使用)
JW	育成コロニーの不明確なもの (雑種)
NZW	同 上

1) JW-NIBS ウサギの年齢推移にともなう生理学的特性を把握するために生後1か月齢から5年齢までの生理値、とくに体重、体温、心拍数、呼吸数、心電図および血圧を測定した結果は表-2、3のとおりである。

表-2 JW-NIBS ウサギの生理学的特性

	体重	心拍数	体温	呼吸数	血圧
平均値	28-30	240-280	38°C台	>100	92-108
性差	⊖	⊖	⊖	?	
年齢差	7-9月令より→	8-9週令より→	3週令より→	?	⊖ Ach, At, Hisなど⊖
環境差	⊖	⊖	26-29°Cで高体温	?	
麻酔法の差(ウレタンとフェノバルビタール)		ウ:5hrまで著変なし フ:経時的減少		ウ:著変なし フ:直後より減少	ウ:120分まで著変なし 3hrより下降 フ:著変なし

表-3 JW-NIBS ウサギの血圧値

Blood Pressure of Inbred Strain JW-NIBS Rabbits

Age (month)	Mean Blood Pressure		Systolic Blood Pressure		Diastolic Blood Pressure	
	Male	Female	Male	Female	Male	Female
2	99 ± 2.9	111 ± 3.3	136 ± 4.0	158 ± 5.5	80 ± 3.5	95 ± 3.9
4	97 ± 3.1	102 ± 2.0	130 ± 4.0	150 ± 3.4	81 ± 2.9	86 ± 2.8
6	107 ± 4.0	101 ± 2.2	145 ± 6.0	149 ± 3.4	87 ± 3.2	86 ± 2.6
8	92 ± 4.0	98 ± 2.8	121 ± 4.1	135 ± 4.8	77 ± 3.5	80 ± 2.3
12	107 ± 3.3	107 ± 3.1	147 ± 5.5	137 ± 3.0	88 ± 2.5	91 ± 1.3
32		101 ± 5.8		145 ± 7.3		79 ± 5.2
58-83	97 ± 6.1		128 ± 7.6		79 ± 6.4	
42-83		106 ± 2.0		144 ± 4.1		86 ± 2.0

$\bar{x} \pm SE(\text{mmHg})$

- i) 体重の増加曲線は雄、雌とも7~9か月齢で2.8~3.0kgとなりプラトーになる。
- ii) 体温は両性とも3週齢以降38.0°C台の値を示す。
- iii) 心拍数は両性とも8~9週齢(2か月齢)より240~280回/分と安定する。
- iv) 呼吸数は両性とも毎分100回以上の値を示し、保定の影響が著しい。
- v) 心電図波形はRs type が約90%を占め最も多い。また年齢別および性別によりこの割合が著しく異なることはない。
- vi) 血圧は両性とも平均値で収縮期血圧は121~146mmHg, 拡張期血圧は77~91mmHg, 平均血圧は91~107mmHgの値を示しているが、32か月齢(雌)および58~83か月齢(雄)では個体間のバラツキが大きくなってきている。

以上の結果に基づき JW-NIBS の特性を整理すると

- a) 体重7~9か月齢よりプラトーとなる。
- b) 心拍数は2か月齢より安定する。

- c) 呼吸数は保定の影響が大きい
 d) 心電図波形の判読が容易であり、同一パターンが多く出現するので心電図の検索に適している。
 e) 血圧は2か月齢から12か月齢ではあまり大きな変化がみられないものの高齢(生後約3年以上)に達したウサギでは個体間のバラツキが大きくなっている。とくに80か月齢の雄ウサギでは低血圧を示した。

2) JW - NIBS ウサギの生理値に関する環境差(飼料を含む)を検討した結果は、

- i) 呼吸数および心拍数では各月齢ならびに両性とも、とくに環境差はみられないもの的高温環下ではやゝ測定値にバラツキが大きい。
 ii) 体温は環境温度26°C以上で影響を受ける。

以上の成績からウサギに適した環境温度は25°C以下であり、日本薬局方ならびに日本抗生物質医薬品基準に規定されている発熱性物質試験法には、「試験中20~27°Cでなるべく恒温恒室に保つ」とあるのは適当でないと考える。

3) NZW - NIBS ウサギの生理学的特性は表-4, 5のとおりである。

表-4 NZW - NIBS ウサギの血圧値

Blood Pressure of Inbred Strain NW-NIBS Rabbits						
Age (month)	Mean Blood Pressure		Systolic Blood Pressure		Diastolic Blood Pressure	
	Male	Female	Male	Female	Male	Female
2	81 ± 1.3	80 ± 1.5	106 ± 2.6	107 ± 3.0	70 ± 1.1	71 ± 1.5
4	80 ± 1.7	85 ± 1.0	101 ± 2.3	106 ± 2.0	71 ± 1.4	74 ± 1.7
6	90 ± 2.2	88 ± 2.3	127 ± 3.0	124 ± 5.0	77 ± 2.3	77 ± 2.0
8	95 ± 2.5	96 ± 1.3	132 ± 3.6	136 ± 2.5	79 ± 2.2	79 ± 1.8

X̄ ± SE(mmHg)

表-5 NZW - NIBS ウサギの体重, 心拍数, 呼吸数および体温

B.W, H.R, R.R and B.T of Inbred Strain NW-NIBS Rabbits								
Age (month)	Body weight (g)		Heart Rate (nos./min.)		Respiratory Rate (nos./min.)		Body Temperature (°C)	
	Male	Female	Male	Female	Male	Female	Male	Female
2	1128±44.3	1138±50.6	260±15.6	260± 8.5	100±11.8	140±35.0	39.5±0.07	39.8±0.12
4	1800±48.1	1836±60.3	243±18.0	239±21.0	178±18.6	169±16.7	39.6±0.18	39.7±0.16
6	2480±74.3	2510±71.3	256±13.6	242±12.9	186±17.3	213±12.4	39.7±0.14	39.8±0.12
8	2548±37.8	2623±62.0	258± 9.2	240±10.2	195±24.0	235±15.4	39.6±0.13	39.7±0.09

X̄ ± SE

- i) 体重は6か月齢において2.5~2.6kgに達する。
 ii) 心拍数は両性とも2か月齢から8か月齢において200~260回/分であった。
 iii) 呼吸数は100~230回/分と両性とも各月齢により、かなりの変動があり保定による影響が大であった。

IV) 体温は両性とも39°C台を示すものが大多数であった。

V) 血圧は両性とも加齢に伴い平均血圧, 収縮期血圧および拡張期血圧で高くなる傾向を示した。

4) JW-NIBS, NZW-NIBS, JW および Dutch-NIBS における生理値の系統差を検討した結果は表-6, 7のとおりである。

表-6 系統ウサギの心電図波形のパターンおよび測定値

ECG type \ Strain	JW-NIBS	NZW-NIBS	Dutch-NIBS	J W
Rs	90.8 %	58.3 %	16.8 %	45.4 %
RS	7.2 %	27.6 %	45.5 %	26.9 %
rS	2.0 %	14.1 %	37.7 %	27.7 %
Interval (sec.)				
P P	0.250±0.017	0.249±0.020	0.178±0.022	0.220±0.015
P Q	0.063±0.0015	0.063±0.0025	0.057±0.0036	0.065±0.0015
Q T	0.150±0.0032	0.149±0.0028	0.130±0.0076	0.138±0.0042
Duration (sec.)				
P	0.045±0.0035	0.045±0.0041	0.034±0.0033	0.038±0.0032
QRS	0.031±0.0035	0.040±0.0030	0.042±0.0032	0.037±0.0032
T	0.085±0.0034	0.085±0.0028	0.068±0.0058	0.076±0.0042
Amplitude (mV)				
P	0.195±0.016	0.210±0.015	0.258±0.022	0.275±0.021
R	0.886±0.063	0.430±0.060	0.478±0.071	0.962±0.062
S	0.290±0.065	0.280±0.063	0.680±0.094	1.00 ± 0.068
T	0.345±0.034	0.189±0.029	0.320±0.081	0.441±0.042

$\bar{x} \pm SE$

表-7 JW-NIBS, NZW-NIBS および JW の直腸体温

Sex \ Strain	J W (6 month)	JW-NIBS (6 month)	NZW-NIBS (6 month)
Male	39.1 ± 0.42 (n=18)	38.5 ± 0.35 (n=25)	39.7 ± 0.36 (n=10)
Female	39.0 ± 0.32 (n=25)	38.5 ± 0.42 (n=20)	39.8 ± 0.24 (n=10)

$\bar{x} \pm SD$ (°C)

- i) JW-NIBS ウサギの体温は38°C台を示すもの 927例中 660例 (71.2%), 39°C台を示すもの 927例中 169例 (18.2%) であり, JW に比べ発熱性試験用に適している。
- ii) ウサギ系統別の代表的心電図パターンは JW-NIBS (約90%), NZW-NIBS (約60%) および JW (約45%) では Rs タイプであり, Dutch-NIBS では RS タイプ (約45%) および rS タイプ (約40%) である。
- iii) JW-NIBS では同一パターンが最も多く出現し, R 棘は大きく波形の判読が容易なことから, ウサギを用いて心電図を検討する実験には, JW-NIBS が最も適している。
- iv) Dutch-NIBS では心電図の相対的心室筋興奮時間が他のウサギに比べて長く, Dutch-NIBS の特徴といえる。
- v) JW-NIBS と JW の心電図棘波の測定値の比較では, その成長に伴う傾向的变化には違いは認められない。また, 両性とも発育過程において個々の心電図パターンのタイプが変わることはなかった。
- 5) Prealbumin Esterase の Phenotype による各種ウサギコロニーの均一性および Atropinesterase の保有率を検討した結果は表-8, 9のとおりである。

表-8 系統ウサギの血清プレアルブミンエステラーゼのフェノタイプ

Distribution of the Prealbumin Esterase Phenotypes in Six Strains of Rabbits

Strain	Number of rabbits	Phenotypes									
		I	II	III	III ^{F'}	IV	IV ^{F'}	V	V ^{F'}	V ^f	VI
JW	53		4	6	2			14	10		17
JW-NIBS	138		2	12				10			114
JW-NIBS/Y	30							2			28
NW	20	8	2	1		7					2
NW-NIBS	79							79			
Dutch-NIBS	15								15		

表-9 系統ウサギのアトロピンエステラーゼ

The Frequency of Atropinesterase-positive in Six Strains of Rabbits

Strain	Number of rabbits	Atropinesterase		Positive %
		Positive	Negative	
JW	53	12	41	22.7
JW-NIBS	138	14	124	10.1
JW-NIBS/Y	30	0	30	0
NW	20	18	2	90.0
NW-NIBS	79	0	79	0
Dutch-NIBS	15	0	15	0

- i) 血清プレアルブミンエステラーゼは JW ウサギでは 6 種類のタイプ、また、NZW ウサギでは 5 種類、JW-NIBS ウサギにおいては 4 種類、JW-NIBS/Y ウサギでは 2 種類、また、NZW-NIBS および Dutch-NIBS ウサギにおいてはいずれも 1 種類のフェノタイプが確認された。
- ii) Atropinesterase はコロニーの不明確な JW ウサギや NZW ウサギではそれぞれ 22.7% および 90% の保有率であった。また、純化の程度の高いウサギ、JW-NIBS においては 10.1% の AE 保有率であった。一方、NZW-NIBS や Dutch-NIBS および近交系 JW-NIBS/Y ウサギでは AE 保有ウサギはこれらのコロニーには存在しなかった。
- iii) クローズドコロニーあるいは系統化されたウサギではコロニー不明確なウサギに比べ AE 保有率は低下するか、あるいは AE 陰性となる。また、Phenotype による分類においてもこれらのウサギは均一化される。

以上の実験成績から純化の程度の高いウサギは、これまで実験用動物として用いられてきたウサギ (JW) に比べ、その生理値は極めてバラツキが小さく、実験目的にあったウサギとして効率よく使用できることを指摘した。

さらに、ウサギを用いる動物実験においては、ウサギの実験動物化は必要かつ有用であることを強調し、各系統ウサギの性別ならびに年齢別での生理的特性を浮き彫りにするとともに、日本で現在使用されている実験用ウサギについてそのコロニーの違いにより、血清プレアルブミンエステラーゼの Phenotype から遺伝的均一化の状態を検索し、また、AE 保有率のコロニー間の差を検討したところ、クローズドコロニーならびに系統化されたウサギでは AE 保有率の小さくなることおよび遺伝的に均一化されてくることなどが明らかになった。

また、環境による影響 (環境温度は 25°C 以下) を考慮しなければならないことを指摘した。

3 章 系統ウサギの比較薬理学的研究

系統ウサギの特性を浮き彫りにすることにより、実験動物としての系統ウサギの価値は高くなるものと考え、これらの特徴をさらに深く把握するために、比較薬理学立場から系統、性別、年齢などの一定性を追跡した。すなわち、薬理学実験における JW-NIBS ウサギの麻酔方法の再検討、さらに数種の自律神経薬に対する JW-NIBS ウサギおよび NZW-NIBS ウサギの血圧反応差について、それぞれ年齢ならびに性別で比較検討し、また有機リン系農薬 Rangado (2-Chloro-1-(2,4-dichlorophenyl) vinyl dimethyl phosphate) の代謝性・残留性の追求および AE 有無による薬物反応差の検討をすることにより、系統ウサギの薬理学的特性を吟味した。

その結果は次のように要約できる。

1) ウサギの麻酔方法について再検討した結果

- i) JW-NIBS ウサギの血圧などの生体現象を対象とする薬理学実験においては、2 時間以内の実験なら、比較的安定した測定値の得られる Urethane 麻酔、すなわち Urethane 1,800 mg/kg を毎分当り 1 ml (30% 溶液) 静脈内に投与する麻酔方法が適当といえる。
- ii) Urethane 麻酔下での成熟 JW-NIBS ウサギの血圧、心拍数および呼吸数の変動には、性差および年齢差は認められない。
- iii) JW-NIBS ウサギと JW ウサギにおける Urethane 麻酔下での血圧の変動の比較では両者間に

純化の程度による差は認められない。

- 2) JW-NIBS ウサギの自律神経薬に対する血圧反応について年齢差ならびに性差を検討した結果
 - i) Epinephrine, Norepinephrine, Isoproterenol, Acetylcholine, Atropine および Histamine に対する JW-NIBS ウサギの血圧の反応は各月齢 (2, 4, 6, 8 および 12 か月齢) とも同様の反応を示し、とくに年齢差は認められない。
 - ii) Epinephrine, Norepinephrine, Isoproterenol, Acetylcholine, Atropine および Histamine に対する JW-NIBS の血圧反応には、とくに性による反応差は認められない。
- 3) NZW-NIBS ウサギの自律神経薬に対する血圧反応について年齢差ならびに性差を検討した結果
 - i) JW-NIBS と同じ自律神経薬を適用した時の血圧反応は各月齢とも同様の反応を示し、とくに年齢差は認められない。
 - ii) NZW-NIBS でも雌雄とも自律神経薬に対し血圧反応は同様の反応を示し、性による差は認められない。
- 4) 有機リン系農薬 Rangado の体内代謝性ならび残留性について
 - i) 有機リン系農薬 Rangado の代謝については雌雄とも同様の排泄パターンを示し、すみやかに排泄されて、性差は認められない。
 - ii) 雌雄とも Rangado が適用後 1 時間で血中に出現し、12 時間後には消失した。
 - iii) 臓器においては Rangado および代謝物のいずれについても検出限界以下であった。
 - iv) 尿および糞中には未変化の Rangado は検出されず代謝物として Desmethyl Rangado (尿中 23%, 糞中 4%), 1-(2,4-Dichlorophenyl) ethanol (尿, 糞とも 1% 以下) および大量のグロクロンサン抱合体 1-(2,4-Dichlorophenyl) ethanol glucuronide (尿中のみ 75%) が検出された。
 - v) 代謝物の排出は 24 時間以内に 95% がさらに残りが 72 時間以内に主として尿中に排泄され、これらに性差、年齢差は認められなかった。
- 5) Atropinesterase (AE) 保有ウサギおよび AE 非保有ウサギの薬物に対する生体反応差を検討した結果は

- i) Atropinesterase 陽性ウサギと陰性ウサギにおけるアトロピンおよび PHMB (化学名 Poly (biguanide-1,5-dihexamethylene hydrochloride)) の適用は呼吸において両群間に反応の差 ($P \leq 0.05$) を認めた。しかし PHMB では有意の差として検出できなかった。

以上の実験成績からウサギの麻酔方法はウレタン 1,800 mg/kg を毎分当り 1 ml (30% 溶液) 静脈内投与することにより、各生理値は比較安定した測定値を得ることができる。生後 2 か月齢から 12 か月齢の純化の程度の高いウサギにおいては薬物に対する反応に月齢差および性差がないことが示唆された。それ故、AE 存在の有無が対象薬物によってはその成績に影響を与えることから、JW や NZW のような純化の程度の低いコロニーのウサギを使用すると反応性に大きなバラツキの生じる恐れがあるのに対し、純化の程度の高い JW-NIBS や NZW-NIBS ではその危険性が低くなるといえる。

しかしながら、AE 保有率や Prealbumin Esterase の Phenotype から考えると JW-NIBS においては、さらに純化を進める必要性があると考えられる。また、一方では AE 保有あるいは AE 非保有ウサギの系統化ならびに Prealbumin Esterase の Phenotype による均質化へと各種ウサギの系統化が進められること

により、実験目的にかなった系統ウサギを使用することが可能となり、その結果、より精度の高い動物実験をおこなうことができることを明らかにした。

論文審査の結果の要旨

実験動物としてのウサギは、獣医学、薬学および医学をはじめとする生命科学の進歩にともない、マウスやラットについて、数多く使用されるようになった。また、これら実験動物は、医学生物学の発展にともない、重要な役割をはたすとともに、その品質にもより厳格な基準が要求されてきた。すなわち、実験素材の向上が、実験精度の向上につながり、ひいては研究結果の信頼性をより高めることができるからである。このような観点から実験動物を顧りみたま時、マウスやラットは実験動物としての条件を十分そなえているといえるが、ウサギについては、マウスやラットに比較しいまだ十分とはいえない。しかし、ウサギについても諸外国では、早くから開発が進み、近年、遺伝的、環境的、微生物学的に統御された品質の高いウサギが作出され、毒性試験や薬理試験などの動物実験に使用されている。

一方、我が国では、ウサギは古くから生理学、薬理学、免疫学および毒性学などの分野において汎用されてきているにもかかわらず、これらのほとんど全ては家畜より転用されたものにすぎない。我が国でのウサギの開発は、家兎として主に毛皮用に改良されてきたものが「日本白色ウサギ」として固定され、実験用動物として用いられてきている。この事実は「動物実験が科学的であること」に反するといっても過言ではない。すなわち、動物実験の結果が再現性をうるためには、動物自身ならびに環境について十分統御されていなければならない。

このことが重要である理由は適切な動物実験を遂行することで、不必要な実験をさけ、動物の犠牲を少なくすることにつながるからである。したがって、著者は実験動物の使用者側の立場からウサギの改良、開発の必要性を主張してきたが、まだ遺伝的純化の高いウサギや系統化されたウサギは皆無に等しく、加えて基礎的データも十分とはいえないのが我が国の現状である。

このような状況の中で、日本生物科学研究所では20年ほど前から日本白色ウサギを起源として系統ウサギ JW-NIBS (Japanese White-Nippon Institute for Biological Science) の開発を始め、現在その途にある。そこで、著者は日本生物科学研究所と協同研究を進めながら、とくに獣医学分野における実験動物の使用者側の立場から系統、性別、年齢および環境などの一定性を、生理学的ならびに薬理的に比較検討してきた。その結果、系統ウサギの実験動物としての特性を把握し、その特徴を浮き彫りにした著者のこの研究は、今後、ウサギを用いた動物実験のための基礎的データとして、おおいに貢献し得るものである。

本論文の内容は、次のとおりである。

第1章ではウサギの実験用動物としての歴史、使用状況および将来への展望を論述しており、第2章では系統ウサギの比較生理学的特性について究明している。すなわち、この研究は、日本白色ウサギを起源とし、1965年よりクローズドコロニーで維持されている JW-NIBS ウサギを中心に、1980年に近交系ウサギとして確立された JW-NIBS/Y や現在近交化が進められている NZW-NIBS ウサギおよび Dutch-NIBS ウサギを研究の対象とし、体重、体温、心拍数、呼吸数、心電図ならびに血圧などについて、電気生理学的な手法によりこれら系統ウサギの特徴を把握するとともに、血清 Prealbumin Esterase の phenotype や Atropinesterase をも検索し、生化学的な面からも検討を加えている。また、現在なお数多く実験用ウサギ

として用いられているコロニー不明確な日本白色種 (JW) や New Zealand White 種 (NZW) の生理値を系統ウサギの場合と同じ方法で観察し、対比させることにより、さらに一層系統ウサギの特性を明確にしている。

1. JW-NIBS ウサギの Aging にともなう生理値の変化

Aging にともなう生理学的特性を把握するため、生後1週齢から5年齢までの生理値を観察した結果は次の通りであった。

- 1) 体重の増加曲線は雄、雌とも7～9か月齢でプラトーとなり2.8～3.0 kgであった。
- 2) 体温は両性とも3週齢以降38.0℃台の値を示した。
- 3) 心拍数は両性とも8～9週齢(2ヶ月齢)より240～280回/分と安定した。
- 4) 呼吸数は雄、雌とも毎分100回以上の値を示し、保定の影響が著しく認められた。
- 5) 心電図波形はRsタイプが約90%を占め最も多く出現し、この割合が年齢別および性別により著しく異なることはなかった。
- 6) 血圧は2か月齢から12か月齢の間では、両性とも平均値で収縮期血圧121～146 mmHg、拡張期血圧は77～91 mmHg、平均血圧91～107 mmHgの値を示しているが、高年齢ウサギ(生後約3年齢以上に達したもの)では、雄、雌とも個体間のバラツキが大きくなってきている。とくに雄では顕著にみられるが、これは80か月齢のウサギが低血圧を示していることによる。

これらの成績からJW-NIBSの特性を整理すれば、体重は7～9か月齢でプラトーとなり、心拍数は2か月齢より安定するが、呼吸数は保定の影響を強く受ける。また、心電図波形は同一パターン(Rsタイプ)が多く出現し、しかも判読が容易であるので心電図の検索に適している。一方、血圧にはあまり大きな変化がみられないものが高年齢(80か月齢)に達した雄ウサギでは低血圧を示すことが明らかとなった。

2. JW-NIBS ウサギの環境差による生理値の変動

JW-NIBS ウサギの生理値(心拍数、呼吸数、体温)における環境差を検討した結果は次のとおりである。

- 1) 呼吸数および心拍数では各月齢ならびに雄、雌とも、とくに環境差はみとめられないものの、高温環境下ではやや測定値のバラツキが大きい。
- 2) 体温は環境温度26℃以上で影響を受ける。

この成績からウサギに適した環境温度は25℃以下であり、日本薬局方や日本抗生物質医薬品基準に規定されている発熱性物質試験法では、「試験環境温度を20～27℃でなるべく恒温恒湿に保つ」と定められているが、この条件は適当でないと指摘することができる。

3. NZW-NIBS ウサギの生理学的特性

NZW-NIBS ウサギの生理学的特性としては、

- 1) 体重は両性とも6か月齢以降、その増加度合はプラトーとなり、2.5～2.6 kgであった。
- 2) 心拍数は雄、雌とも2か月齢から8か月齢において200～260回/分と比較的安定した値を示した。また、呼吸数は100～230回/分と大きな値と大きなバラツキを示し、両性とも各月齢の時点での測定値に保定による影響が著しく関与していた。一方、性差に関係なく体温はほとんどの個体が39℃台

を示し、また、血圧は加齢に伴い高くなる傾向を示していた。

4. JW-NIBS ウサギと他系統ウサギとの生理学的特性の差

1) JW-NIBS, NZW-NIBS, Dutch- および JW ウサギにおける心電図波形のパターンおよび測定値の結果を比較すれば、心電図では、JW-NIBS は前述したように同一パターンを示す割合が最も多く (Rs タイプ)、他の系統のウサギに比べ R 棘は大きく、波形の判読が容易なことから、ウサギを用いて心電図を検討する実験には、JW-NIBS が最も適しているといえる。また、Dutch-NIBS は相対的心室筋興奮時間が他のウサギに比べて長いのが特徴といえる。

2) 体温 (直腸温) における系統差

6 か月齢の系統ウサギ (JW-NIBS, NZW-NIBS) と同年齢の JW ウサギの直腸温を比較した結果は、JW-NIBS においてのみ 38°C 台を示し、JW および NZW-NIBS では 39°C 台と高い値であった。なお、この研究に用いた JW-NIBS では、使用した 927 例中、38°C 台の体温を示すものが 660 例 (71.2%) あり、多くのウサギが比較的安定した体温を示していることが JW-NIBS の特徴といえる。このことから発熱性試験には JW-NIBS が最も適しているといえよう。

5. JW-NIBS ウサギと他系統ウサギにおける血清生化学的的特性の差

1) 各種系統ウサギの純化の程度を比較検討するため、血清 Prealbumin Esterase の Phenotype を検索した結果は次表の通りである。

Distribution of the Prealbumin Esterase Phenotypes in Six Strains of Rabbits

Strain	Number of rabbits	Phenotypes									
		I	II	III	III ^{F'}	IV	IV ^{F'}	V	V ^{F'}	V ^f	VI
JW	53		4	6	2			14	10		17
JW-NIBS	138		2	12				10			114
JW-NIBS/Y	30							2			28
NW	20	8	2	1		7					2
NW-NIBS	79							79			
Dutch-NIBS	15								15		

2) 各種系統ウサギにおける Atropinesterase 保有率を検索した結果は次表の通りである。

The Frequency of Atropinesterase-positive in Six Strains of Rabbits

Strain	Number of rabbits	Atropinesterase		Positive %
		Positive	Negative	
JW	53	12	41	22.7
JW-NIBS	138	14	124	10.1
JW-NIBS/Y	30	0	30	0
NW	20	18	2	90.0
NW-NIBS	79	0	79	0
Dutch-NIBS	15	0	15	0

このように Prealbumin Esterase の Phenotype を分類することにより、系統化されたウサギおよびクローズドコロニーのウサギではコロニーの不明確なウサギに比べ純化の程度がより進んでいることが判明した。また、同時に Prealbumin Esterase の Phenotype を検索することは、そのウサギコロニーの純化の程度を知るマーカーとなり得ることが証明された。一方、クローズドコロニーあるいは系統化されたウサギでは、コロニー不明確なウサギに比べ Atropinesterase の保有率は低くなるか、あるいは陰性となることが明らかとなった。

以上の成績から、著者はウサギを用いる動物実験において、ウサギの実験動物化は必要かつ有用であることを強調し、さらに各系統ウサギの性別ならびに年齢別の生理学的特性を浮き彫りにすることで、実験目的にあったウサギの開発を主張している。また、現在用いられている実験用ウサギについて、Prealbumin の Phenotype から系統ウサギや各コロニーウサギの純化の程度を明らかにし、この Phenotype を検討することで系統ウサギやウサギコロニーの純化の程度を知るマーカーとなり得ることを示唆した。さらに純化の程度の高いウサギは、これまで実験用動物として用いられてきたコロニー不明確なウサギに比べ、その生理値は極めてバラツキが小さく、より実験目的にあったウサギとして効率よく使用できることも指摘した。

第3章 系統ウサギの比較薬理学的研究

系統ウサギの特徴をさらに深く浮き彫りにするため、比較薬理学的立場から系統、性別、年齢などの一定性を追求した。すなわち、

1. 薬理学実験における JW-NIBS ウサギの麻酔方法の再検討
2. 数種の自律神経薬に対する各系統ウサギの血圧反応差の比較
3. JW-NIBS ウサギにおける有機リン系農薬 Rangado の代謝性ならびに残留性の比較研究
4. Atropinesterase 存在有無による薬物反応差などを比較検討した。

その結果は次のように要約できる。

(1) ウサギの麻酔方法の再検討

- 1) Urethane 1,800 mg/kg の静脈麻酔は、血圧などの生体現象を対象とする薬理学実験において、観察時間 2 時間以内の実験なら、比較的安定した測定値が得られた。但し、この場合の Urethane の濃度および注射速度は、30分溶液のものを毎分 1 ml の割合で注射する方法が適切であった。
- 2) Urethane 麻酔下での JW-NIBS ウサギの血圧、心拍数および呼吸数の変動には、性差および年齢差は認められなかった。
- 3) Urethane 麻酔下での血圧の変動は成熟 JW-NIBS ウサギと成熟 JW ウサギにおける両者間にとくに差は認められなかった。

(2) 自律神経薬に対する各系統ウサギの血圧反応差の比較

JW-NIBS ウサギおよび NZW-NIBS ウサギの自律神経薬に対する血圧反応の差を年齢別ならびに性別に比較検討した結果は次の通りである。

- 1) Epinephrine, Norepinephrine, Isoproterenol, Acetylcholine, Atropin および Histamine に対する JW-NIBS および NZW-NIBS ウサギの血圧の反応は、各月齢、各性とも同様の反応を示した。すなわち、同一系統ウサギでは年齢差ならびに性差は認められず、また、年齢差、性差は系統間により、差が認められなかった。

(3) JW-NIBS ウサギにおける有機リン系農薬の代謝性ならびに残留性の比較（年齢差および性差）

JW-NIBS ウサギにおける有機リン系農薬 Rangado (2-Chloro-1-(2,4-dichlorophenyl) vinyl dimethylphosphate) の代謝ならびに残留性について年齢差および性差を比較検討した結果は次の通りである。

- 1) Rangado の代謝については、雌・雄とも同様の代謝パターンを示した。すなわち、Rangado はすみやかに Desmethyl Rangado, 1-(2,4-Dichlorophenyl) ethanol および 1-(2,4-Dichlorophenyl) ethanol のグルクロン酸抱合体に代謝され主として尿中に排泄された。しかもこの代謝排泄パターンには2か月齢と10か月齢のウサギにおける年齢差は認められなかった。
- 2) 代謝物の排泄は24時間以内に95%が、さらに残りが72時間以内に排泄された。
- 3) 尿および糞中には未変化の Rangado は検出限界以下であった。
- 4) 肝・腎および肺中の Rangado およびその代謝物は、いずれの測定時点においても検出限界以下であった。

(4) Atropinesterase (AE) 存在有無による薬物反応差

AE 陽性ウサギおよび陰性ウサギの薬物に対する生体の反応差を検討した結果は次の通りである。

- 1) Atropinesterase 陽性ウサギと陰性ウサギにおける Atropine および PHMB (化学名, poly (biguanide-1,5-diylhexamethylene hydrochloride)) の適用の結果, Atropine では AE 陰性ウサギ群において呼吸数の増加および持続が AE 陽性ウサギ群に比べ有意 ($P \leq 0.05$) に強く観察された。しかし, PHMB では両群のウサギに同様の変化が認められたものの有意の差として検出できなかった。

以上の実験成績から、ウサギの麻酔方法は Urethane 1,800mg/kg の静脈投与 (30%溶液, 1ml/mm) により、各生理値は比較的安定した測定値を得ることができる。また、生後2か月齢から12か月齢の純化の程度の高いウサギにおいては薬物に対する反応に月齢差および性差のないことが確認された。しかし AE 存在の有無により、対象薬物によっては、その成績に影響を与えることが示唆されたことから、先に述べた純化の程度の低いコロニーのウサギを使用することは、コロニーにより高い AE 保有率を示したり、また、AE 保有率が区々であったりすることから、反応性に大きなバラツキを生じる恐れがあるといえる。これに反し純化の程度より進んだ JW-NIBS/Y や NZW-NIBS ではその危険性が低くなるといえる。

以上述べたように著者は、実験動物としての系統ウサギを、使用者側の立場から (比較生理学および比較薬理的に) 検討を加え、ウサギの実験動物としての開発の必要性を強調し、系統ウサギの特性を浮き彫りにした。

著者のこの研究成績は、今後、ウサギを用いる研究者にとって、有益かつ貴重な基礎的データとなりうるものと確信する。しかし、系統ウサギの研究も緒に就いたばかりであり、数多くの問題をかかえている。また、実験動物の系統化は、ウサギを用いる研究の目的が極めて複雑多岐である以上、かなりの困難性をかかえているといえよう。それ故、このような複雑多岐の問題の解決には、獣医学全分野において究明していく必要があると考える。その意味においては、著者のような薬理学専門研究者の立場から追求したこの研究成果は、大きな意義をもつものであり、今後の研究を期待して止まない。また、著者は総合考察でも述べてい

るように、研究の目的にあったウサギを開発し、使用していかねばならないとしているが、その場合、必要最小限の動物を犠牲にすべきであって、動物実験の基礎的研究においては、でき得る限り、実験動物の代替の可能性とその開発をしなければならないことを訴えている。この倫理は動物実験を遂行するにあたり、研究者として最も重要なことからであり、著者は、この倫理を踏まえつつウサギの実験動物化（系統化）をこの研究を通して強調している。このように著者の研究成果や思想は現学位授与の目的に合致するものであり、さらに今後の研究促進に大きく期待できることから、本研究論文に対し獣医学博士の学位を授与することは妥当と認める。