

2015年度 麻布大学 附置  
生物学総合研究所紀要

Report of Research Institute of Biosciences

Azabu University

No. 26



# 生物科学総合研究所紀要 26 号

## 目次

<b>生物科学総合研究所概要</b> .....	1
生物科学総合研究所教職員 .....	2
生物科学総合研究所組織図 .....	7
生物科学総合研究所見取図 .....	8
生物科学総合研究所規則 .....	11
生物科学総合研究所紀要投稿規程 .....	14
<b>研究部門の活動状況</b> .....	15
<b>研究総括</b> .....	16
プロジェクト No. P13-40 .....	16
プロジェクト No. P13-41 .....	17
プロジェクト No. P13-42 .....	18
プロジェクト No. P13-43 .....	20
プロジェクト No. P13-44 .....	23
プロジェクト No. P13-45 .....	24
プロジェクト No. P13-47 .....	26
プロジェクト No. P13-48 .....	30
プロジェクト No. P14-01 .....	33
プロジェクト No. P14-02 .....	34
プロジェクト No. P14-03 .....	35
プロジェクト No. P15-01 .....	37
プロジェクト No. P15-02 .....	51
プロジェクト No. P15-03 .....	73
プロジェクト No. P15-04 .....	79
プロジェクト No. P15-05 .....	80
<b>共同利用施設部門</b> .....	87
<b>共同利用各施設部門</b> .....	88
研究部門 .....	88
各施設部門 .....	88
動物実験施設 .....	88
検疫動物飼育施設 .....	88
SPF 動物実験施設 .....	88
Clean 動物飼育施設 .....	89
Conventional 動物飼育施設 .....	89
感染実験施設 .....	89
化学物質毒性実験施設 .....	89
水生生物飼育施設 .....	89
ラジオアイソトープ実験施設 .....	89
組換え DNA 実験施設 .....	89
<b>テーマ別活動状況</b> .....	93
<b>生物研セミナー</b> .....	113



# 生物学総合研究所概要

# 附置生物科学総合研究所教職員

所 長	教 授 (兼務) 獣医学博士	猪股 智夫
	教 授 (兼務) 医学 博士	佐原 弘益
	准教授 (兼務) 獣医学博士	白井 明志
	准教授 獣医学博士	落合 秀治
事 務 室 (学術支援課)	課 長	柳原 聡
	主 査	神藤 昭
	主 査	柳原新太郎

## 【研 究 部 門】

部門長 : 佐原 弘益 (獣医学部 教 授)

### ○プロジェクト No. P13-40

研究テーマ「哺乳動物の癌化形質に関連する遺伝子の解析」

研究期間：平成 25 年 4 月 1 日～平成 28 年 3 月 31 日

プロジェクト班長： 佐原 弘益 (獣医学部 教 授)

### ○プロジェクト No. P13-41

研究テーマ「哺乳動物の抗原提示細胞における提示機構の解析」

研究期間：平成 25 年 4 月 1 日～平成 28 年 3 月 31 日

プロジェクト班長： 佐原 弘益 (獣医学部 教 授)

### ○プロジェクト No. P13-42

研究テーマ「膜輸送体の構造解析による疾病機序の解明」

研究期間：平成 25 年 4 月 1 日～平成 28 年 3 月 31 日

プロジェクト班長： 落合 秀治 (生物科学総合研究所 准教授)

プロジェクト班員： 恩田 賢 (獣医学部 准教授)

プロジェクト班員： 佐藤礼一郎 (獣医学部 講 師)

### ○プロジェクト No. P13-43

研究テーマ「ラットの系統特性を生かした生殖発生毒性評価に関する研究」

研究期間：平成 25 年 4 月 1 日～平成 28 年 3 月 31 日

プロジェクト班長： 代田真理子 (獣医学部 教 授)

プロジェクト班員： 柏崎 直巳 (獣医学部 教 授)

プロジェクト班員： 伊藤 潤哉 (獣医学部 准教授)

プロジェクト班員： 代田 欣二 (獣医学部 教 授)

○プロジェクト No. P13-44

研究テーマ「糖鎖機能の解明に関する基礎的研究」

研究期間：平成 25 年 4 月 1 日～平成 28 年 3 月 31 日

プロジェクト班長： 山下 匡 (獣医学部 教授)

○プロジェクト No. P13-45

研究テーマ

「EL 系統由来けいれん発作感受性 QTL を導入したコンジェニック系統の形質解析」

研究期間：平成 25 年 4 月 1 日～平成 28 年 3 月 31 日

プロジェクト班長： 田中 和明 (獣医学部 准教授)

プロジェクト班員： 滝沢 達也 (獣医学部 教授)

○プロジェクト No. P13-47

研究テーマ「腎系球体疾患の進行と寛解に関する比較病理学研究」

研究期間：平成 25 年 4 月 1 日～平成 28 年 3 月 31 日

プロジェクト班長： 代田 欣二 (獣医学部 教授)

プロジェクト班員： 代田真理子 (獣医学部 教授)

プロジェクト班員： 上家 潤一 (獣医学部 准教授)

○プロジェクト No. P13-48

研究テーマ

「ラットのアルコール性肝障害モデルにおけるプロテオーム解析による新規肝障害マーカータンパク質の検出」

研究期間：平成 25 年 6 月 1 日～平成 28 年 3 月 31 日

プロジェクト班長： 曾川 一幸 (生命・環境科学部 講師)

○プロジェクト No. P14-01

研究テーマ「化学物質の毒性発現機序に関する研究」

研究期間：平成 26 年 4 月 1 日～平成 29 年 3 月 31 日

プロジェクト班長： 和久井 信 (獣医学部 准教授)

プロジェクト班員： 村上 賢 (獣医学部 教授)

プロジェクト班員： 高木 敬彦 (獣医学部 教授)

プロジェクト班員： 浅利 昌男 (獣医学部 教授)

○プロジェクト No. P14-02

研究テーマ

「疾患モデルおよび遺伝子改変動物個体・細胞を用いた受精・発生メカニズムの解明に関する研究」

研究期間：平成26年4月1日～平成29年3月31日

プロジェクト班長： 柏崎 直巳（獣医学部 教授）

プロジェクト班員： 久松 伸（生命・環境科学部 講師）

○プロジェクト No. P14-03

研究テーマ

「EPR・スピントラップ法等を用いた一酸化窒素（NO）産生の解析とNOS遺伝子の発現調節機構の解明」

研究期間：平成26年4月1日～平成29年3月31日

プロジェクト班長： 滝沢 達也（獣医学部 教授）

プロジェクト班員： 田中 和明（獣医学部 准教授）

プロジェクト班員： 宮崎 陽子（獣医学部 講師）

○プロジェクト No. P15-01

研究テーマ「社会緩衝作用における下垂体ホルモンの作用」

研究期間：平成27年4月1日～平成30年3月31日

プロジェクト班長： 菊水 健史（獣医学部 教授）

プロジェクト班員： 茂木 一孝（獣医学部 准教授）

プロジェクト班員： 永澤 美保（獣医学部 講師）

○プロジェクト No. P15-02

研究テーマ「早期離乳ストレスによる行動神経への影響の解析」

研究期間：平成27年4月1日～平成30年3月31日

プロジェクト班長： 菊水 健史（獣医学部 教授）

プロジェクト班員： 茂木 一孝（獣医学部 准教授）

プロジェクト班員： 永澤 美保（獣医学部 講師）

○プロジェクト No. P15-03

研究テーマ「マウスにおける社会認知機構の解明」

研究期間：平成27年4月1日～平成30年3月31日

プロジェクト班長： 菊水 健史（獣医学部 教授）

プロジェクト班員： 茂木 一孝（獣医学部 准教授）

プロジェクト班員： 永澤 美保（獣医学部 講師）

○プロジェクト No. P15-04

研究テーマ「腸内細菌移植による中枢ならびに行動分泌機能の伝播の解析」

研究期間：平成27年4月1日～平成30年3月31日

プロジェクト班長： 菊水 健史（獣医学部 教授）

プロジェクト班員： 茂木 一孝（獣医学部 准教授）

プロジェクト班員： 永澤 美保（獣医学部 講師）

○プロジェクト No. P15-05

研究テーマ「マウスにおける情動伝染の分子調整機構の解明」

研究期間：平成27年4月1日～平成30年3月31日

プロジェクト班長： 菊水 健史（獣医学部 教授）

プロジェクト班員： 茂木 一孝（獣医学部 准教授）

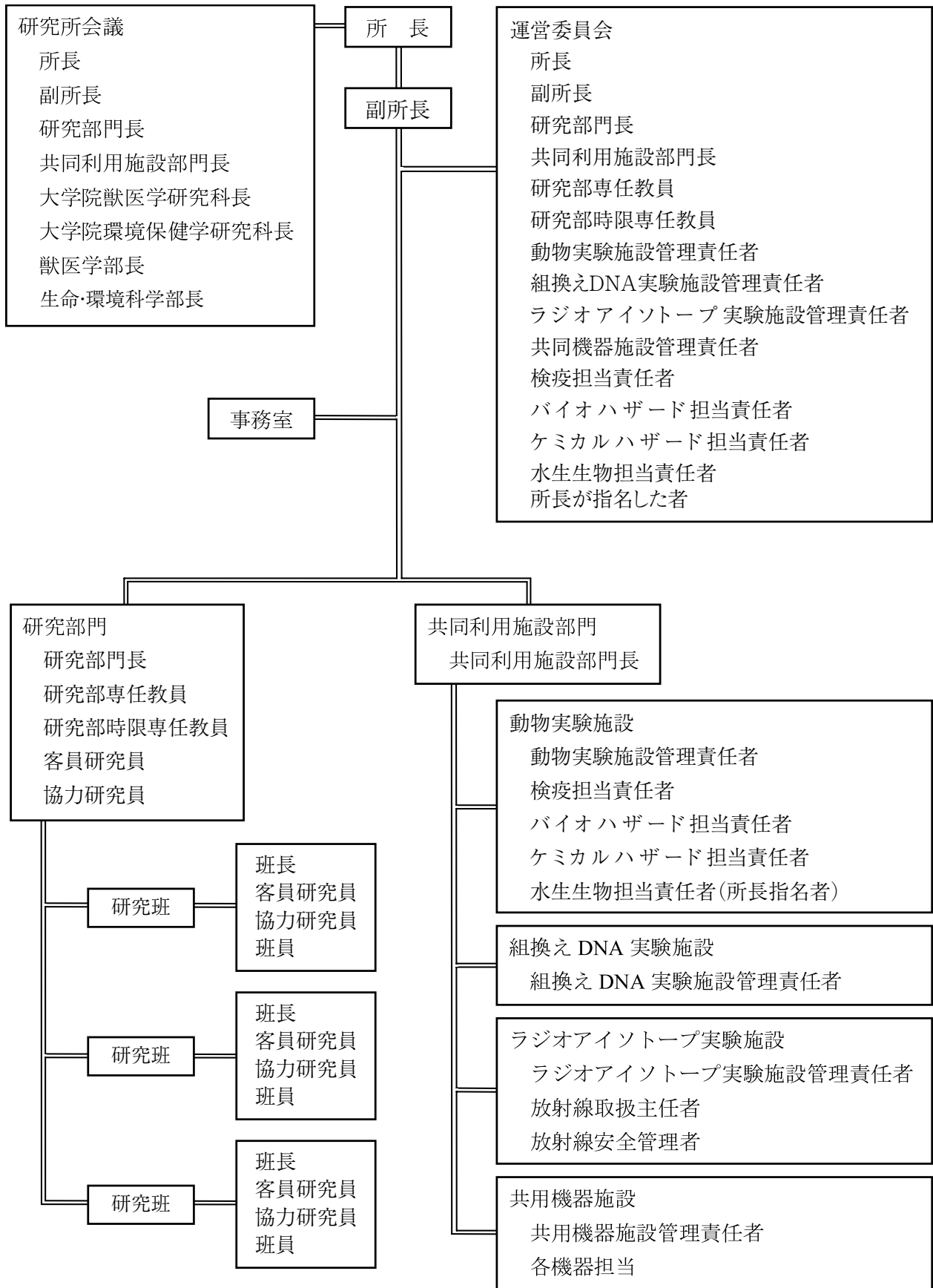
プロジェクト班員： 永澤 美保（獣医学部 講師）



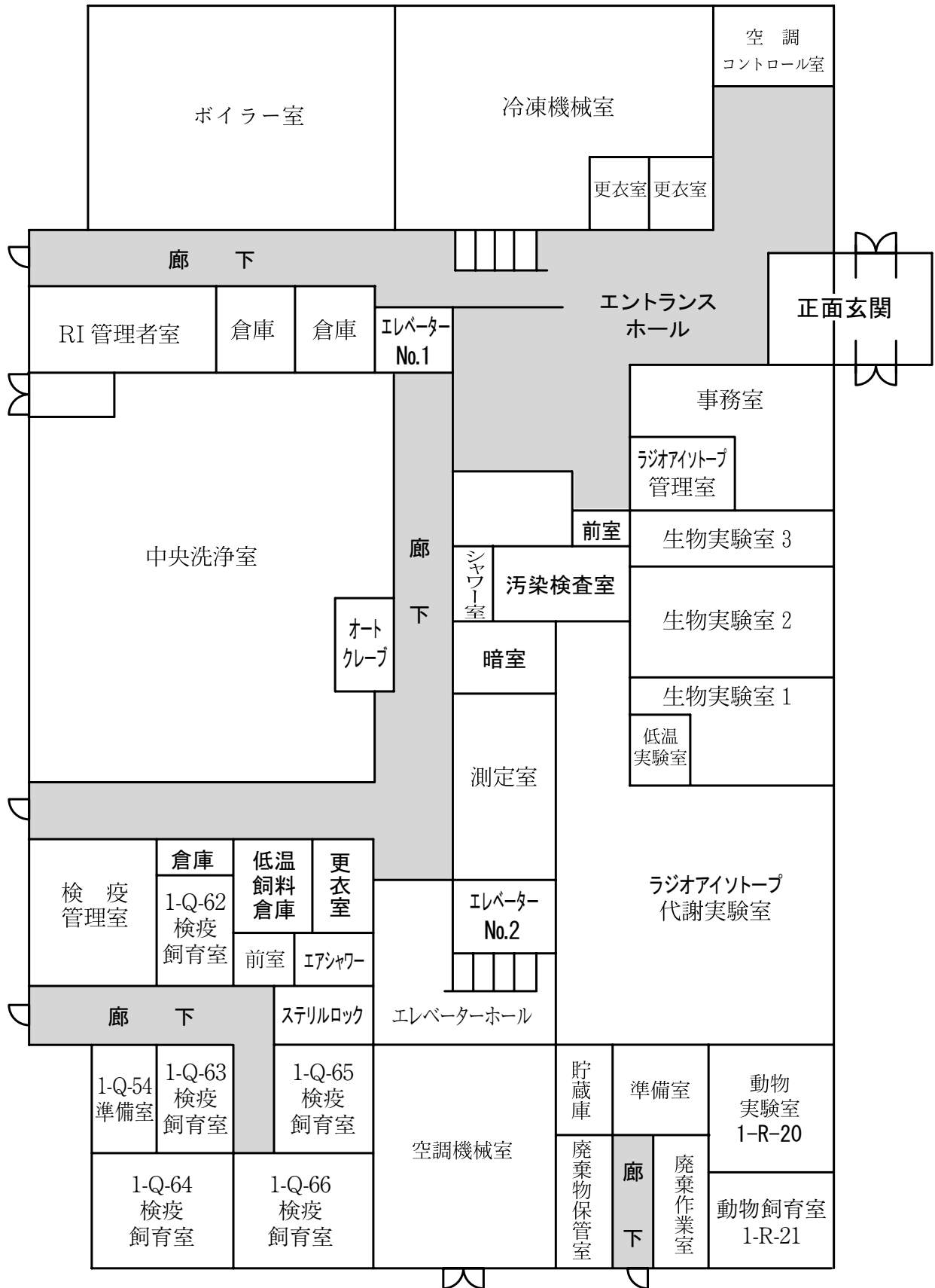
【 共 同 利 用 施 設 】

共同利用施設	氏 名	職 名
<b>共同利用施設部門</b> 共同利用施設部門長	白井 明志	獣 医 学 部 准教授
<b>動物実験施設</b> 動物実験施設管理責任者 動物実験施設管理者 検疫担当者 バイオハザード担当者  ケミカルハザード担当者 水生生物担当者	須永 藤子 田原口智士 土屋 亮 平 健介 須永 藤子 白井 明志 松井 久実	獣 医 学 部 准教授 獣 医 学 部 教 授 獣 医 学 部 教 授 獣 医 学 部 准教授 獣 医 学 部 准教授 獣 医 学 部 准教授 獣 医 学 部 講 師
<b>組換え DNA 実験施設</b> 組換え DNA 実験施設管理責任者	村山 洋	生命・環境科学部 准教授
<b>ラジオアイソトープ実験施設</b> ラジオアイソトープ実験施設管理責任者 放射線取扱主任者 放射線安全管理者	三田 明弘 落合 秀治 落合 秀治	生命・環境科学部 准教授 生物科学総合研究所 准教授 生物科学総合研究所 准教授
<b>共用機器施設</b> 共用機器施設管理責任者	栗林 尚志	生命・環境科学部 准教授

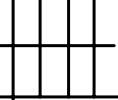
# 生物科学総合研究所組織図



# 生物科学総合研究所見取図 1階



## 生物科学総合研究所見取図 2階

		2-S-2 飼育室	前室	空調機械室				前室	前室	2-A-32 飼育室
前室		2-S-4 飼育室	前室					前室		前室
廊 下		2-S-7 飼育室	前室					前室	前室	2-A-40 飼育室
		2-S-9 飼育室	前室					エレベーター No.1	エレベーター ホール	
		2-S-11 飼育室	前室	ステリルロック	2-A-42 飼育室					
		2-S-13 飼育室	前室	2-A-44 飼育室		前室	2-A-45 実験室			
		2-S-15 飼育室	前室	2-A-36 飼育室		前室				
		2-S-17 飼育室		前室	2-A-38 飼育室		前室			
				更衣室	飼料倉庫		解剖室		処置室	
オートクレーブ		ステリル ロック	更衣室	エレベーター ホール				2-A-49 準備室		
作業室			エレベーター No.2					2-A-50 飼育室		
倉庫			空調機械室				前室		2-A-51 飼育室	

# 生物科学総合研究所見取図 3階

3-T-7 高温 飼育室	3-T-8 低温 飼育室	前室	廊 下	空調機械室		3-I-31 飼育室	
3-T-4 飼育室		前室					
3-T-6 飼育室		前室		3-I-35 飼育室	3-I-34 飼育室		
3-T-10 飼育室		前室		エレベーター No.1	エレベーター ホール	3-I-37 飼育室	3-I-36 飼育室
実験 前室	3-T-11A 原子吸光 設置室	3-T-11C GCSM 設置室	ステリル ロック	廊 下	3-I-39 飼育室	3-I-38 実験室	
3-T-13 実験室		3-T-12 電子スピ ン共鳴装 置設置室	オート クレーブ		更衣室	3-I-41 飼育室	3-I-40 飼育室
秤量 室	3-T-14 準備室		更衣室	廊 下	3-I-43 飼育室	3-I-42 飼育室	
3-T-16 高分解能 ガスクロマトグラフ 質量分析計 設置室		3-T-15 クローズ キャビネット 設置室	更衣室		更衣室	洗浄室	
3-T-18 飼育室		前室	更衣室	更衣室	3-I-49 飼育室		
3-T-20 飼育室		前室	更衣室	廊 下	3-I-51 飼育室	倉庫	
3-T-21 飼育室			更衣室		更衣室	3-I-53 飼育室	3-I-57 飼育室
3-T-21 飼育室			更衣室	更衣室	3-I-55 飼育室		

# 麻布大学生物科学総合研究所規則

( 昭和 63 年 11 月 24 日 )  
制 定

改正 平成 4 年 12 月 8 日 平成 8 年 1 月 24 日  
平成 9 年 2 月 19 日 平成 9 年 7 月 23 日  
平成 10 年 3 月 18 日 平成 11 年 4 月 21 日  
平成 15 年 2 月 26 日 平成 19 年 3 月 20 日  
平成 20 年 3 月 5 日

## (総則)

- 第 1 条 麻布大学学則第 5 条の規定するところにより、麻布大学生物科学総合研究所（以下「研究所」という。）を設置する。
- 2 研究所の国際公称は Azabu University Research Institute of Biosciences とし、その略称を AURIB とする。

## (目的)

- 第 2 条 研究所は、生物科学及びこれに関連する学術分野に関する総合的な研究機能を果たとともに教育の充実を図り、あわせて国内外における当該分野での学術交流の発展に寄与することを目的とする。

## (組織及び体制)

- 第 3 条 研究所に、次の部門を置く。

### (1) 研究部門

研究部門は、時限課題研究（原則として 5 年以内）を遂行する 3～5 の研究班（研究プロジェクト）により構成される。各研究班（研究プロジェクト）は、次の教員により構成され、研究班のリーダーは原則として専任教員又は時限専任教員とする。

#### ア. 専任教員

専任教員は、研究班の構成員となる他、研究部門長及び共同利用施設部門長を補佐する。専任教員は学部教授会構成員とする。

#### イ. 時限専任教員

時限専任教員の任期は、時限付研究プロジェクト期間（5 年以内）中とし、時限専任教員は学部研究室兼務とするが、任期中は原則として研究所専任とし、学部教授会構成員とする。

#### ウ. 研究班員

研究班員は、学部教授会構成員とし、研究所を兼務する。研究班（研究プロジェクト）に時限で参加する。

#### エ. 研究班友

研究班友は、学部教授会構成員とし、研究所兼務ではなく随時研究班に参加する者とする。

#### オ. 客員研究員及び協力研究員

研究部門には、必要に応じて客員研究員及び協力研究員を置くことができる。客員研究員及び協力研究員に関する規定は別に定める。

### (2) 共同利用施設部門

共同利用施設部門は、次の施設から構成される。

#### ア. 動物実験施設

動物実験施設には、生理機能試験、代謝試験、感染試験、毒性試験及び水生生物試験等が行えるエリアを設置する。

また、動物実験施設の管理・運営のため、動物実験施設管理責任者を置き、その下に検疫担当者、バイオハザード担当者、ケミカルハザード担当者、水生生物担当者を置く。

#### イ. ラジオアイソトープ実験施設

ラジオアイソトープ実験施設には、ラジオアイソトープを用いた実験を管理・統括するため、ラジオアイソトープ実験施設管理責任者を置く。

また、ラジオアイソトープの安全管理には、放射線取扱主任者及び放射線安全管理者が参画する。

#### ウ. 組換え DNA 実験施設

組換え DNA 実験施設には、組換え DNA 実験を管理・統括するため、組換え DNA 実験施設管理責任者を置く。

#### エ. 共用機器施設

生物科学総合研究所に共用機器施設を置く。共用機器の保守管理、利用者へのサービス業務を行うため、施設に共用機器施設管理責任者、各機器担当者を置く。

### 2 部門に関する細則は、別に定める。

#### (研究所長)

第4条 研究所に所長を置く。

- 2 所長は、学長の命を受け、研究所の管理・運営の責に任ずる。
- 3 所長は、教授の職にある者をもって充てる。

#### (研究所副所長)

第5条 研究所に副所長を置くことができる。

- 2 副所長は、所長を助け、各部門の運営について協力し、調整する。
- 3 副所長は、教授の職にある者をもって充てる。

#### (研究部門長)

第6条 研究部門に研究部門長を置く。

- 2 研究部門長は、各研究班（研究プロジェクト）における研究活動を調整、統括する。
- 3 研究部門長は、教授又は准教授の職にある者をもって充てる。

#### (共同利用施設部門長)

第7条 共同利用施設部門に共同利用施設部門長を置く。

- 2 共同利用施設部門長は、各施設の運営を調整、統括する。
- 3 共同利用施設部門長は、教授又は准教授の職にある者をもって充てる。

#### (事務室)

第8条 研究所に事務室を置く。

- 2 事務室に関する細則は、別に定める。

#### (運営委員会)

第9条 研究所に運営委員会を置き、次の事項を審議する。

- (1) 研究部門の運営に関連する事項

- (2) 研究部門の運営費予算の立案及び執行計画に関する事項
  - (3) 各施設の管理及び運営に関連する事項
  - (4) 各施設の運営費予算の立案及び執行計画に関する事項
  - (5) その他研究部門及び共同利用施設にかかる重要な事項
- 2 運営委員会は、所長、副所長、研究部門長、研究部専任教員、研究部時限専任教員並びに共同利用施設部門長、各施設管理責任者及び所長が指名した者をもって組織する。
- 3 運営委員会は、所長が招集し、議長となる。

(研究所会議)

第10条 研究所に研究所会議を置き、研究所の運営に関する重要事項を審議する。

- 2 研究所会議は、所長、副所長、研究部門長、共同利用施設部門長、獣医学部長、生命・環境科学部長、大学院両研究科長をもって組織する。
- 3 研究所会議は、所長が招集し、議長となる。
- 4 研究所会議の規則は、別に定める。

(規則の改廃手続き)

第11条 規則の改廃手続きは、運営委員会の議を経た後、研究所会議において審議する。

(その他)

第12条 この規則に定めるもののほか、必要な事項は、別に定める。

附則

この規則は、昭和63年11月24日から施行する。

附則

この規則は、平成4年12月8日に改正し、平成5年4月1日から施行する。

附則

この規則は、平成7年1月24日に改正し、平成8年4月1日から施行する。

附則

この規則は、平成9年2月19日に改正し、平成9年4月1日から施行する。

附則

この規則は、平成9年7月23日に改正し、平成9年7月1日から適用する。

附則

この規則は、平成10年3月18日に改正し、平成10年4月1日から施行する。

附則

この規則は、平成11年4月21日に改正し、平成11年4月1日から適用する。

附則

この規則は、平成15年2月26日に改正し、平成15年4月1日から施行する。

附則

この規則は、平成19年3月20日に改正し、平成19年4月1日から施行する。

附則

この規則は、平成20年3月5日に改正し、平成20年4月1日から施行する。



# 「麻布大学生物科学総合研究所紀要」投稿規程

## 第1条（趣旨）

麻布大学生物科学総合研究所における学術研究の促進並びに教育への奇与を目的として、麻布大学生物科学総合研究所紀要を発行する。

## 第2条（発行及び編集）

本誌の編集及び発行は、麻布大学生物科学総合研究所紀要編集委員会（以下「編集委員会」という）が行う。

## 第3条（発行時期）

本誌は、原則として年1回発行とする。

## 第4条（原稿執筆者）

本誌に執筆出来る者は、麻布大学生物科学総合研究所プロジェクト研究班長、麻布大学生物科学総合研究所施設利用者並びに編集委員会が執筆を依頼する者とする

## 第5条（掲載記事）

掲載記事は麻布大学生物科学総合研究所を用いて生まれた成果内容を中心とする。

しかし、その研究成果が知的財産として申請予定の場合はその旨明らかにした場合掲載を免除する。また、麻布大学生物科学総合研究所が主体となって開催した講演会及び研究プロジェクト報告や教育啓発活動を記事として掲載する。

## 第6条（転載の禁止）

他の雑誌等に掲載された総説、原著論文、研究ノート、記録、報告、翻訳及び書評は、掲載しない。

## 第7条（原稿の形式・送付先）

原稿は原則として編集委員会が定めるフォーマットにしたがい日本語若しくは英語とし、事務局まで提出する。

執筆要項は別に定める。

提出先：〒 252-5201

神奈川県相模原市中央区淵野辺 1-17-71

麻布大学内

麻布大学生物科学総合研究所紀要編集委員会事務局

電話 042-754-7111

## 第8条（著作権）

本誌に掲載された論文・記事の著作権は、全て編集委員会に帰するものとする。

## 附則

- 1 この規程は、平成25年10月15日から施行する。

## 研究部門の活動状況

## 研究総括

生物科学総合研究所・研究プロジェクト 16 件の研究テーマについて、平成 26 年度の研究成果ならびにプロジェクトの概要を報告する。

### ○プロジェクト No. P 13 - 40

#### 研究テーマ

#### RNA ヘリカーゼ YTHDC2 の転写制御と癌細胞における役割について

研究期間：平成 25 年 4 月 1 日～平成 28 年 3 月 31 日

プロジェクト班長：佐原弘益（獣医学部基礎教育研究室・教授）

#### 【研究概要】

我々は RNA ヘリカーゼ、YTHDC2 の癌細胞転移に関わる役割を調べた。YTHDC2 を RNA 干渉法によって発現が抑制されたヒト大腸癌細胞株を作成し、ヌードマウスに移植したところ、有意に転移が抑制された。その原因として、YTHDC2 は癌細胞転移に重要な役割を果たす低酸素誘導因子（HIF1 $\alpha$ ）と Twist1 の翻訳に関与していることが、明らかとなった。すなわち、YTHDC2 は固形癌の成長に伴って生まれる微小環境における低酸素によって、癌細胞転移に必要な上皮間葉系転換形質を誘導する転写因子 HIF1 $\alpha$  と Twist1 の翻訳を効率化させ、転移を促進していると示唆された。

#### 【研究目的】

我々はヒト DExD/H Box 型 RNA ヘリカーゼ YTHDC2 を同定した<sup>1)</sup>。YTHDC2 はヒト癌細胞では高い発現を示すが、正常な組織では発現が低く制御されていた。すなわち、YTHDC2 は癌化に重要な役割を持つことが示唆された。本研究では、癌化形質、特に癌細胞の転移形質に YTHDC2 がどのような役割を果たすかを調べた。

#### 【結果と考察】

small hairpin RNA (shRNA) の導入による RNA 干渉法によって、YTHDC2 の発現を抑制したヒト大腸癌細胞株を樹立した (Y2KD 細胞)。その細胞をヌードマウスに移植したところ、対照区に比べ転移が有意に抑制された。さらには YTHDC2 の作用を抑制するサイクロスポリン A を投与すると、転移が抑制されたことから、YTHDC2 は癌細胞転移に重要な役割を持つことが示唆された。癌細胞が転移する時に、上皮間葉系転換 (EMT) が必要であると報告されている。そして、EMT 誘導には接着因子である E-cadherin の発現を抑制する転写因子 Twist1 や転移が誘導されときの低酸素環境下で必要とされる転写因子 HIF1 $\alpha$  が重要な役割を果たすと報告されている。そこで、我々は Y2KD におけるそれらの分子の発現を調べたところ、それらの分子のタンパク質生成が有意に減少していることが判明した。すなわち Y2KD における転移能力の減衰は、HIF1 $\alpha$  と Twist1 の翻訳効率の低下に起因していることが示唆された<sup>2)</sup>。

#### 引用文献

- 1) Morohashi, K., Sahara, H., Watashi, K., Iwabata, K., Sunoki, T., Kuramochi, K., Takakusagi, K., Miyashita, H., Sato, N., Tanabe, A., Shimotohno, K., Kobayashi, S., Sakaguchi, K., and Sugawara, F. Cyclosporine A associated helicase-like protein facilitates the association of hepatitis C virus RNA polymerase with its cellular cyclophilin B. *PloS one*, 2011, 6: e18285.
- 2) Tanabe A, Tanikawa K, Tsunetomi M, Takai K, Ikeda H, Konno J, Torigoe T, Maeda H, Kutomi G, Okita K, Mori M, Sahara H. RNA helicase YTHDC2 promotes cancer metastasis via the enhancement of the efficiency by which *HIF-1*  $\alpha$   $\mu$ PNA is translated. *Cancer Letters*, 2016. 376: 34-42.

研究テーマ

哺乳動物の移植拒絶抗原遺伝子の提示機構解析

研究期間：平成 25 年 4 月 1 日～平成 28 年 3 月 31 日

プロジェクト班長：佐原弘益（獣医学部基礎教育研究室・教授）

【研究概要】

Major Histocompatibility Complex (MHC) class 2（以下、MHCII）は単球、もしくは B 細胞などのプロフェッショナル抗原提示細胞の膜タンパク質として発現している。マクロファージや樹状細胞などの貪食性抗原提示細胞における MHCII の本質的な機能は、病原微生物を含む外来性抗原の侵入に対して、それらを貪食し、細胞内で消化をし、外来性抗原由来のタンパク質の断片、15 個前後のアミノ酸からなる抗原ペプチドを細胞表面上に提示することである。すなわち、抗原ペプチドと複合体を細胞内で作り、それを T 細胞に提示することで、外来性の抗原の侵襲を知らせる役割である。

一方、MHCII にはそれらの外来性の抗原ばかりでなく、細胞内に存在する自己のタンパク質分子が由来する抗原ペプチドも提示していることが報告されているが、その生物学的な意味は仮説の域をでない。1 つ考えられることは MHCII を認識する CD4 T 細胞が誤って抗原提示細胞を攻撃、もしくは過剰反応しないように、胸腺上皮での Positive/Negative 選択時のように、末梢組織中の抗原提示細胞が自らの防御のために、すなわち自己反応性を示した CD4 T 細胞は死ぬので、胸腺での選抜を抜けた CD4 T 細胞を再チェックの機構に使用されているのでは、と考えられている。

この際の自己抗原の提示機構（経路）は、オートファージによってリソソームで消化された一部が MHCII 小胞と融合して、提示されると報告されている。しかし、I 型糖尿病、慢性関節リウマチ、全身性エリテマトーデスなどの自己免疫疾患では、患者の MHCII のハプロタイプに非依存的に共通の自己抗体が検出され、オートファージによる非特異的な自己の細胞小器官やタンパク質の消化による抗原ペプチドの生成による抗体産生とは考えられない。

MHCII に提示される自己抗原の中に minor histocompatibility antigen (mHAg) があり、実際に骨髄移植による慢性拒絶抗原分子として報告されている。Sahara & Shastri はマウスの mHAg の 1 つで、MHCII に提示されると考えられていた H46 抗原が IL-4 inducible gene 1 (IL4i1) であることを発見した<sup>1</sup>。この MHCII 拘束性自己抗原は小胞体での生成後、ゴルジ体から EpsinR/Vti1b 陽性のクラスリン小胞に内包されて、抗原ペプチドに消化され、MHCII 小胞に融合して、提示されることを明らかとした<sup>2</sup>。そこで重要なことはその輸送経路はライソソームには行かないことであり、すなわちライソソーム内の消化酵素非依存的に抗原ペプチドが生成されることである。これは新しい抗原の提示経路であることが示唆される。そして、その意義は特定の小胞に選抜される何らかのタンパク質上の構造が予想され、しかもそのモチーフ構造が細胞内に存在する膨大な種類のタンパク質の中から、いわゆる抗原性をもつタンパク質、を決定している可能性が示唆される。そこで、本研究では、その小胞体に選抜されるためのカーゴ受容体に結合するためのモチーフ構造を解析した。

その結果、IL4i1 の N 末端 1-130 アミノ酸部位にあるシグナルシーケンス（以下、SS）が EpsinR/Vti1b 陽性小胞に選抜されるのに必要であることが明らかとなった。すなわち、EpsinR/Vti1b 陽性小胞に特異的なカーゴ受容体の存在が示唆された。

【引用文献】

1. Sahara, H. and Shastri, N. Second class minors. Molecular identification of the autosomal H46 histocompatibility locus as a peptide presented by MHC class II molecules. *J. Exp. Med.*, 2003, 197: 375-385.
2. Shishido T, Hachisuka M, Ryuzaki K, Miura Y, Tanabe A, Tamura Y, Kusayanagi T, Takeuchi T, Kamisuki S, Sugawara F, Sahara H. EpsinR, a target for pyrenocine B, role in endogenous MHC-II-restricted antigen presentation. *Eur J Immunol*, 2014. 44 (11): 3220-3231.

## ○プロジェクト No. P 13 — 42

### 研究テーマ

#### 膜輸送体の構造解析による疾病機序の解明

研究期間：平成25年4月1日～平成28年3月31日

プロジェクト班長：落合秀治（生物科学総合研究所）

プロジェクト班員：恩田 賢（獣医学部准教授）

プロジェクト班員：佐藤礼一郎（獣医学部准教授）

#### 【研究概要】

Several amino acids and carnitine transport activities of bovine mammary gland epithelial cells were investigated. Gly, Ala, Gln, Glu, Arg, Leu, cystine and carnitine transport activities at 1  $\mu\text{mol/L}$  substrate concentration were  $24.0 \pm 3.97$ ,  $90.9 \pm 13.4$ ,  $32.5 \pm 9.0$ ,  $14.2 \pm 5.1$ ,  $48.9 \pm 11.4$ ,  $48.8 \pm 5.1$ ,  $22.7 \pm 6.8$  and  $2.56 \pm 0.96$  nmol/mg protein/min, respectively. Na-dependency of transport was observed in Gly, Ala and Gln, but not in Arg, Leu and carnitine. Glu and Cys transport activity without Na condition were reduced to 36%, 63% in Na-free condition, respectively. Carnitine transport activities were low but detectable with or without Na condition. There was no correlation between amino acid transport activities and their concentrations in milk. The data clarified in this paper will be basic data for metabolic analysis of bovine mammary gland.

#### 【背景と目的】

Many amino acid transport systems have been distinguished based on differences in their substrate-selectivity, ion-dependence, pH sensitivity, kinetics and regulatory properties by using membrane vesicle preparations or cultured cells. For example, the amino acid transport system A, N, B<sup>0+</sup> and G were Na-dependent, and system L, b<sup>0+</sup> and y<sup>+</sup> were Na-independent. The mammary gland has a high demand for amino acids requiring their uptake for cell proliferation during pregnancy and for milk protein synthesis during lactation. Nutrient provision to lactating mammary gland includes two factors: blood nutrient concentration and cellular uptake. As the Na content in blood was high compared to intracellular Na owing to Na- K pump, the steep Na-gradient made the Na-dependent transporters active in these cells.

Carnitine (3-hydroxy-4-N-trimethylaminobutyric acid) is a small, water-soluble molecule that has important physiological roles, including involvement in the  $\beta$ -oxidation of fatty acids. It is synthesized endogenously from lysine (carbon backbone) and methionine (methyl group donor) in the liver and/or kidney, and animals being nursed depend on milk for its supply. Notably, bovine milk contains a 0.1 mmol/L order concentration which is the same level as that of amino acid. While amino acids and carnitine in bovine milk are considerably important for calves nutrition, little information is available on the transport activities and their Na-dependency of the mammary gland epithelial cells. Therefore, we investigated the transport activity of several amino acids and carnitine using bovine mammary gland epithelial cells to compare the transport activities and their concentrations in bovine milk.

#### 【材料と方法】

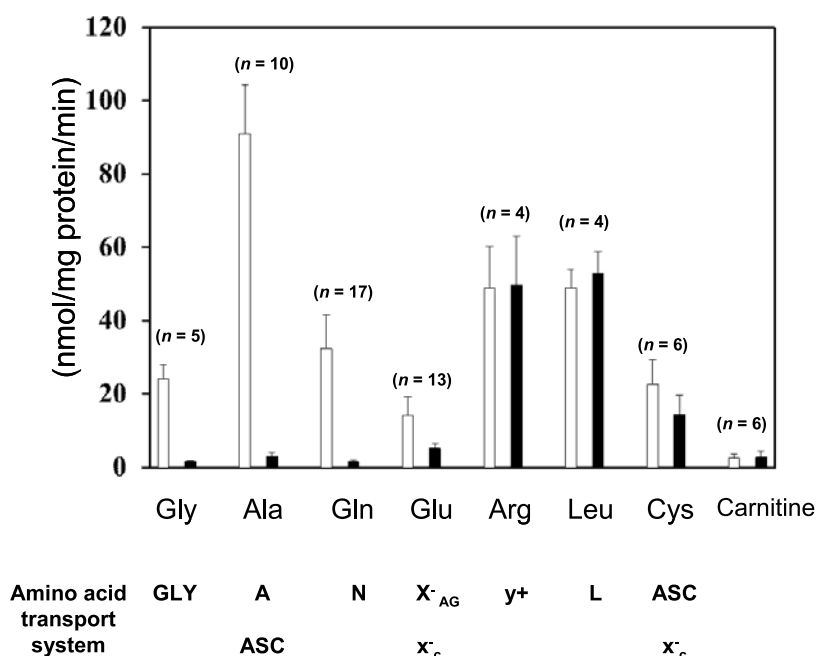
BMGE+H cell line derived from epithelial cells of bovine mammary gland was maintained as described. Radioactive (<sup>3</sup>H- or <sup>14</sup>C-) chemicals were purchased from American Radiolabeled Chemicals (St. Louis, MO, USA). Na-independent amino acid transport activities were measured as described previously. In brief, the cells were plated  $5 \times 10^5$  cells/6-well plate 24 h before the experiment. The cells were washed by buffer containing 130 (mmol/L) NaCl, 5 KCl, 2 MgCl<sub>2</sub>, 10 glucose, 15 Tris/MOPS and 0.1% BSA. All buffers containing Na were replaced with N-methyl-D-glucamine to observe the Na-dependency. After washing the cells, the medium containing 1  $\mu\text{mol/L}$  of each substrate (Gly, Ala, Gln, Glu, Arg, Leu, Cys and carnitine) with a radioisotope was added and incubated at 37°C for 4 min. Uptake was terminated by washing with 2

ml of ice-cold phosphate-buffered saline three times. After solubilizing the cells with 1 ml of 1% SDS, radioactivity of 0.8 ml cell lysis solution was measured with a liquid scintillation counter, and the protein content of aliquot was determined by the Micro BCA Protein Assay kit (Thermo Scientific, Rockford, IL, USA).

### 【結果と考察】

The amino acids and carnitine transport activity of bovine mammary gland epithelial cells with or without a Na condition are indicated in Figure 1. Gly, Ala, Gln, Glu, Arg, Leu, cystine and carnitine activities with Na condition were  $24.0 \pm 4.0$ ,  $90.9 \pm 13.4$ ,  $32.5 \pm 9.0$ ,  $14.2 \pm 5.1$ ,  $48.9 \pm 11.4$ ,  $48.8 \pm 5.1$ ,  $22.7 \pm 6.8$  and  $2.6 \pm 1.0$  nmol/mg protein min, respectively. The order of transport potency was Ala > Arg, Leu > Gly, Gln > Cys > Glu > carnitine. On the other hand, the order of amino acid concentration in milk from the greatest downward was Glu (0.18 mmol/L) > Gln (0.06), Gly (0.05), Ala (0.04) > Arg (0.02), Leu (0.01). Therefore, there was no correlation between activities of amino acid transport in epithelial cells of bovine mammary gland and amino acid concentrations in bovine milk. This discrepancy may be in part due to biosynthesis of each nutrient in epithelial cells. Na-dependency was observed in Gly, Ala and Gln, but was not observed in Arg, Leu and carnitine. Glu and Cys transport activity without Na condition were reduced to 36% and 63%, respectively. The ambiguity of Na-dependency in Glu and Cys transports could be possibly due to the system  $x_c^-$ , Na-independent cystine/glutamate exchanger. Predicted amino acid transport systems were indicated (Figure 1).

Carnitine transport activities were low but detectable both with or without Na condition. Carnitine deficiency causes severe pathological symptoms such as cardiomyopathy and muscle weakness in human. In addition, carnitine infusion effectively decreased liver lipid accumulation in cow as the result of a greater capacity for hepatic fatty acid oxidation, and carnitine supplementation improved glucose status and diminished the risk of developing metabolic disorders during early lactation. It was reported that there were several carnitine transporters. As the carnitine transporter in bovine mammary gland was not Na-dependent, Solute carrier family 22A16 (SLC22A16), Na-independent organic cation transporter, is the candidate of this carnitine transporter in mammary gland.



**Figure 1.** Amino acid transport activity of epithelial cells of bovine mammary gland with (open column) or without (closed column) Na condition. Values represent the means and SE of separate experiments. “n” above the column is the number of 6-well plates examined (upper). Predicted amino acid transport systems were indicated (bottom).

## ○プロジェクト No. P 13－43

### 研究テーマ

#### ラットの系統特性を生かした生殖発生毒性評価に関する研究

研究期間：平成25年4月1日～平成28年3月31日

プロジェクト班長：代田眞理子（獣医学部）

プロジェクト班員：柏崎直巳（獣医学部 動物繁殖学研究室）

プロジェクト班員：代田欣二（獣医学部 病理学研究室）

プロジェクト班員：伊藤潤哉（獣医学部 動物繁殖学研究室）

本研究プロジェクトにおいて主として以下のテーマについて研究を行った。

#### 1) 化学物質の生殖発生毒性評価法の開発に関する研究

##### 【目的】

げっ歯類を用いる生殖発生毒性試験において、出生仔の発育、身体的分化および機能的発達は出生仔に対する化学物質の影響評価における重要な指標となっている。出生仔の発育、身体的分化および機能的な発達には母動物から受ける母性行動や母動物の泌乳量が影響を及ぼしているとされている。マウスやラットでは早期離乳や母仔分離、化学物質投与などの操作を行う事で母性行動の発現頻度が減少することが知られており、その影響について多くの研究が行われている。本研究では通常飼育下において母性行動や泌乳量の差によって出生仔の離乳までの体重推移に系統差が認められている近交系の Hatano ラット 2つの亜系統（HAA および LAA）を用い、これらのバックグラウンドである Sprague-Dawley (SD) 系ラットと養母交換を行って通常飼育下において、出生前および出生後の成育環境変化が母性行動に影響を及ぼすかどうかを検証した。

##### 【方法】

HAA と SD、LAA と SD あるいは同系統間で出生0日齢に養母交換を行った。その後飼育室にビデオカメラを設置し1日齢から6日齢まで母動物の行動を撮影し、母性行動及び母性行動以外の行動に分けて、それらに費やす時間を測定した。生後21日に離乳後、性成熟を観察し、同系列の雌雄を交配し妊娠、出産させた母動物について、1日齢から6日齢まで母動物の行動を撮影し、母性行動及び母性行動以外の行動に分けて、それらに費やす時間を測定した。また、仔の回集時間、ならびに泌乳量を測定した。得られたデータを、遺伝的背景および成育環境のそれぞれについて解析した。

##### 【結果および考察】

乳仔の発育は養母に関係なく SD が最も良好であった。HAA 養母はリッキング行動の持続時間が短い一方、回数が多いため総時間も長いことが明らかとなった。また、SD 養母は1回のリッキング行動が長く、回数が少ない事が明らかとなり、これらの養母に哺育されることで成育環境の異なる動物を得ることができた。成育環境が異なる母動物の母性行動を比較すると、LAA のような明らかに母性行動頻度が低い母動物に対して成育環境は影響を及ぼしたが、それ以外では遺伝的要因が母性行動の発現に重要である事が示唆された。

##### 【参考文献等】

長谷川雄太「哺育期の成育環境がラット母性行動に及ぼす影響に関する研究」平成27年度麻布大学大学院獣医学研究科 修士課程論文

#### 2) 内分泌攪乱化学物質による臨界期曝露が卵巣機能の消長に及ぼす影響に関する研究

##### 【目的】

主要な器官の形成が終わった胎児期から新生児期までは、ヒトにおいても動物においても高次機能が分化発達する重要な時期といえる。我々は、この時期の化学物質曝露の影響とそのメカニズムを明らかにするために、エストロゲン活性評価の陽性対照物質として用いられているエチニルエストラジオール (EE) をモデル化学物質に選定し、脳の性分化臨界期であり原始卵胞形成期にあたる新生雌ラットに EE を経口投与してその影響を検討している。これまでの研究が

ら EE 投与は原始卵胞の消長に影響を及ぼさないが、性周期の回帰停止をはじめとする遅発影響が出現するまでの期間は EE の用量に逆比例し、成熟雌ラットではエストロゲンの生理的変動幅に相当すると考えられる血中 EE 濃度で、春機発動の遅延が認められ、さらに基底レベル以下のエストロゲンに相当すると考えられる血中 EE 濃度でも、性成熟後の性周期回帰停止の促進あるいは乳腺の過形成などの不可逆的な影響が認められることを明らかにした。本研究ではリスク評価に資することを目的として遅発影響の閾値を探索（実験 1）し、さらに最小影響量を投与した動物について現行の評価方法（生殖能力試験）で遅発影響を検出し得るのかどうかを、検討した（実験 2）。

#### 【材料および方法】

日本チャールスリバー株式会社から購入した Sprague-Dawley (SD) 系妊娠ラットあるいは、同系の雄と交配させた SD 系妊娠ラットを自然分娩させて、実験に供した。実験 1 では、不可逆的影響が認められた用量の 1/5 の用量を最高用量に設定し、以下公比 5 で除して 3 用量の EE を 1 日齢から 5 日間反復経口投与した。実験 2 では実験 1 の最高用量を同様に投与した。実験 1 および 2 ともに対照群の動物にはコーン油を投与した。いずれの実験においても動物は生後 21 日まで養母による哺育下に置き、離乳後は陰開口の日齢を調べ、8 週齢から 4 週間に 1 回、毎回 2 週間ずつ性周期を観察した。実験 1 では 25 週齢まで性周期を観察し、その後は剖検日とした発情期まで観察を継続した。実験 2 では、10 週齢から生殖能力が確認されている雄と交配させ、膣垢に精子が確認された日を妊娠 0 日とし、妊娠 20 日に帝王切開を行った。実験 1 の剖検では卵巣および子宮を採取し、重量を測定した。採取した卵巣はブアン固定後常法に従ってパラフィン包埋し、連続切片として卵巣組織の観察に供した。

実験 2 では卵巣を採取して妊娠黄体数を計測するとともに、着床状態を観察し、生存胎児は、外表および性別を観察したのち、Dowson 法によるアリザリン赤 S 透明骨格標本として、骨格観察ならびに骨化の進行度を調べた。

#### 【結果および考察】

実験 1 において性周期は週齢の進行に伴い最高用量群で不規則な変化を示す動物が増加の傾向を示したが、回帰を停止する動物は認められなかった。剖検で採取した卵巣について連続切片を作製して、嚢胞状卵胞および黄体の保有状況を調べた結果、嚢胞状卵胞を有する動物がこの用量で増加したが、それ以下の用量では対照群と同等であった。従って、実験 1 における最高用量が新生期 EE 投与による最小影響量と考えられた。実験 2 において EE 投与による生殖能力への影響は認められなかった。生殖能力は多くの毒性試験ガイドラインで実験 2 のように 10 週齢前後に確認されることから、従来の生殖発生毒性試験では最小影響量による遅発影響を必ずしも検出できないことが示唆された。実験 1 および 2 のいずれも体重増加に投与の影響は認められなかったが、妊娠末期の母体重に増加抑制が認められた一方、胎児体重および骨化は促進され、EE 投与群では胎児の発育が促進されていた可能性が示唆された。

[本研究の一部は厚生労働科学研究費補助金「化学物質リスク研究事業」の補助を受けて行われた]

#### 【参考文献等】

1. Shirota M, Kawashima J, Ogawa Y, Kamiie J, Yasuno K, Shirota K, Yoshida M. 2012. Delayed Effects of Single Neonatal Subcutaneous Exposure of Low-Dose  $17\alpha$ -Ethinylestradiol on Reproductive Function in Female Rats. *Journal of Toxicological Sciences* 37: 681-689.
2. Shiota M, Kawashima J, Nakamura T, Kamiie J, Shirota K, Yoshida M. 2015. Dose-dependent acceleration in the delayed effects of neonatal oral exposure to low-dose  $17\alpha$ -ethinylestradiol on reproductive functions in female Sprague-Dawley rats. *Journal of Toxicological Sciences* 40: 727-738.
3. 田中 恵「新生児期エチニルエストラジオール曝露による早期影響が視床下部性腺刺激ホルモン放出ホルモン分泌制御機構に及ぼす影響に関する研究」平成 27 年度麻布大学大学院獣医学研究科修士課程論文
4. 代田真理子、吉田 緑「幼若動物を用いた毒性評価において認識すべき発達期の繁殖生物学の特徴」（第 42 回日本毒性学会シンポジウム、2015 年 6 月、金沢市）
5. 田中 恵、川嶋 潤、高川奈帆、高山尚大、林 美貴成、森 雅史、立河紗紀、代田真理子「嚢胞状卵胞形成における新生期エチニルエストラジオール経口曝露量と子宮肥大試験の検出感度」（第 42 回日本毒性学会、2015 年 6 月、金沢市）
6. 田中 恵、古澤理沙、吉河佑莉、川嶋 潤、代田真理子「新生児期エチニルエストラジオール (EE) 曝露による遅発影響に関わる初発影響の探索—視床下部におけるエストロゲン受容体 (ER) 及び Kisspeptin (KP) シグナル伝



### 3) 化学物質の卵巣毒性に関する比較毒性学的研究

#### 【目的】

化学物質の卵巣毒性の中でも卵胞発育に及ぼす影響は、生殖能力のみならず内分泌機能もかく乱することから女性の健康に対して深刻な影響を及ぼす要因となる。生理的には卵胞は成長因子などによるオートクラインあるいはパラクラインにより発育が刺激され発育を始めるが、発育が進むと視床下部からの性腺刺激ホルモン放出ホルモン (GnRH) の刺激によって下垂体前葉から分泌される性腺刺激ホルモン (GTH) が卵胞発育に不可欠となることから、化学物質は複雑なメカニズムで卵胞発育に影響を及ぼしていると考えられる。これまで、胞状卵胞の発育には GTH が不可欠であると考えられてきた。しかし、GnRH 分泌を上位から直接制御しているキスペプチンをコードする *Kiss1* 遺伝子のノックアウトにより血中 GTH 濃度が検出限界以下になったラット (*Kiss1KO*) の卵巣においても初期段階の胞状卵胞は少数存在することが先行研究で認められ、GTH に依存しない胞状卵胞への発育が示唆された。卵胞発育に及ぼす化学物質の影響を正確に評価するためには性腺刺激ホルモンに依存している発育段階を明らかにする必要がある。そこで本研究では、*Kiss1KO* および野生型との間で卵胞発育が日齢を追って進行する幼若期の卵巣について、卵胞発育、GTH 受容体遺伝子発現および血中 GTH 濃度を比較検討した。

#### 【方法】

*Kiss1KO* 及び対照の野生型ラットは 10 日齢あるいは 23 日齢に安楽殺し卵巣を採取した。10 日齢では腹大動脈から採血し、血清を得た。得られた血清は共同研究者である名古屋大学農学部東村博子教授の研究室で黄体形成ホルモン (LH) および卵胞刺激ホルモン (FSH) 濃度を測定した。採取した卵巣はブアン固定あるいは急速凍結した。ブアン固定した卵巣は常法に従いパラフィン包埋し、4  $\mu\text{m}$  厚の連続切片とし、hematoxylin-eosin 染色して、発育段階ごとに卵胞数を数えた。急速凍結した卵巣は総 RNA を抽出し、cDNA を合成して、real-time RT-PCR により GTH 受容体 (*LHR*、*FSHR*) mRNA の定量解析に供した。

#### 【結果】

10 日齢の *Kiss1KO* 卵巣は野生型と比べて小さかった。総卵胞数に著差はなかったが、野生型では前胞状卵胞の中でも最も発育が進んだ 4 層以上の顆粒層細胞を有する卵胞が観察されたが、*Kiss1KO* の卵巣には 3 層以上の顆粒層細胞を有する前胞状卵胞は認められなかった。23 日齢の *Kiss1KO* 卵巣は 10 日齢と比べてサイズも大きく、初期胞状卵胞も認められた。しかし、野生型に比べると全体のサイズが小さく、胞状卵胞の認められた野生型と比べ、発育の遅滞が見られた。10 日齢の血中 GTH レベルは野生型で高値を示したが、*Kiss1KO* では多くが検出限界以下であった。一方、GTH 受容体遺伝子は *Kiss1KO* でも発現が認められ、*LHR* mRNA レベルはやや低かったが、*FSHR* mRNA はほぼ同程度だった。以上のことから、GTH が低値でも初期段階の胞状卵胞まで発育できるが、前胞状卵胞を含む卵胞の発育促進には GTH が関与していることが示唆された。

#### 【参考文献等】

1. 鈴木美帆「幼若雌ラットの卵胞発育における性腺刺激ホルモンの役割に関する研究」平成 27 年度麻布大学大学院獣医学研究科修士課程論文
2. 鈴木美帆、田中啓陽、田中 恵、長谷川雄太、末岡花菜子、上野山賀久、東村博子、井上直子、中村 翔、前多敬一郎、代田真理子「*Kiss1* 遺伝子ノックアウト雌ラットの幼若期における卵胞発育」(第 107 回日本繁殖生物学会大会、2015 年 9 月、宮崎市)

○プロジェクト No. P 13－44

研究テーマ

糖鎖機能の解明に関する基礎的研究

研 究 期 間 ：平成 25 年 4 月 1 日～平成 28 年 3 月 31 日

プロジェクト班長：山下 匡（獣医学部 教授）

知的財産登録検討中であるため、次号にて報告予定

## ○プロジェクト No. P 13 — 45

### 研究テーマ

#### EL 系統由来けいれん発作感受性 QTL を導入したコンジュニック系統の形質解析

研究期間：平成 25 年 4 月 1 日～平成 28 年 3 月 31 日

プロジェクト班長：田中和明（獣医学部 准教授）

プロジェクト班員：滝沢達也（獣医学部 教授）

#### 【研究概要】

我々は、ヒトの多因子性てんかんの自然発症モデルマウスである EL 系統の 2 番および 9 番染色体上に存在する QTL を C57BL/6J 系統（以後 B6）に導入したコンジュニック系統を確立した。本研究では、これらの系統を用いて、けいれん発作の原因遺伝子の特定と発作原性獲得の過程の解明を試みた。その結果、2 番染色体の *D2Mit397* の近傍約動原体より 54cM から 60cM の位置で極めて有意な連鎖を示す LOD 値 10.1 をもつ QTL の存在が示された。この区間に存在する発作原性に関わる候補遺伝子として、シナプトソームの関連タンパク質 25 (*Snap25*)、電位依存性カリウムチャネル関連タンパク質 3 (*Kcnp3*) および Na/K/2Cl 共輸送体 (*Slc12a1*) 遺伝子が存在していた。そこで、これらの遺伝子における B6 系統と [B6.EL-(D2Mit365-D2Mit280)/Azab] 系統の海馬における m RNA の発現量および遺伝子の塩基配列の決定を行った。EL 系統と B6 系統のアレル間に複数の多型の存在を確認できたが機能に与える影響の解析は年度内に実行できなかった。

#### 【背景と目的】

EL 系統は、ヒトの多因子性特発性全般てんかんの疾患モデルとして広く利用されている (Suzuki, 2004)。EL 系統のてんかん発作に関与する主要な量的遺伝子座 (QTLs) が、2 番および 9 番染色体に連鎖していると報告がされている (Rise et al., 1991)。しかし、高精度な連鎖解析が実施されていないため、QTL の詳細な位置は明らかにされていない。我々は、生物研プロジェクト研究 (No.XII) において、C57BL/6J (以後 B 6) 系統を背景として、EL 系統 2 番染色体 D2Mit365-D2Mit280 間の約 118.3Mb の領域を持つ [B6.EL-(D2Mit365-D2Mit280)/Azab] 系統、D2Mit156-D2Mit266 間の約 124.8Mb の領域を持つ [B6.EL - (D2Mit156-D2Mit266) /Azab] および、9 番染色体の D9Mit89-D9Mit182 間の約 71.2Mb 領域保持する [B6.EL- (D9Mit89 - D9Mit182)/Azab] を確立することができた。また、これらのコンジュニック系統は、B6 に比べて、放り上げ刺激誘発けいれん発作をおこし易いことを明らかにした。各コンジュニック系統は、保有する EL 系統由来のゲノム領域が異なることから、個々の QTL の表現型に与える影響を鋭敏に評価できるものと期待される。

本研究は、3つのコンジュニック系統に対する詳細な形質測定を行い保有する QTL の違いにより発作原性獲得の過程にどのような差があるかを調査する。また、コンジュニック系統を用いた連鎖解析によって、QTL の詳細な位置を決定し、責任遺伝子の特定、および、複数の QTL 間の相互作用を明らかにすることを目的とする。

#### 【材料と方法】

コンジュニック系統の中で最も発症率の高い B6.EL- (D2Mit365-D2Mit280) 系統と B6 系統を用いて、生後 4 週到達時から、3～4 日間隔で 1 セット当たり 20 回の放り上げを 10 週齢に至るまで負荷した。また比較対象として放り上げ刺激を負荷していない両系統を用いた。10 週齢時に、ペントバルビタールの過剰投下で脳を摘出した。海馬は、Hagihara ら (2009) に従って分離した。分離した海馬は、RNA Later (Thermo Fisher Scientific) に浸漬し RNA 抽出まで保存した。総 RNA の抽出は、ISOGENE II (日本ジーン) を用いた。抽出した総 RNA を鋳型として、逆転写酵素 SuperScriptIII (Thermo Fisher Scientific) を用いて cDNA を合成した。合成した c DNA を用いて *Snap25*、*Kcnp3*、*Slc12a1* のコーディング配列 (CDS) を PCR 増幅した。次に増幅した DNA 断片を精製し、BigDye Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit (Thermo Fisher Scientific) と Applied Biosystems 3130xl Genetic Analyzer (Thermo Fisher Scientific) を用いて塩基配列の決定を行った。

## 【結果と考察】

平成 27 年度は、遺伝子発現量の解析のための実験群（7 個体×4 群）を作成し、海馬から RNA を抽出し cDNA の合成を完了した。しかし、定量的 RT-PCR による発現量の測定まで実験を進めることができなかった。mRNA の発現量の解析に先立って *Snap25*、*Kcnp3*、*Slc12a1* 遺伝子の CDS 配列の決定を行った。*Snap25* 遺伝子では 206 個のアミノ酸を指定している全長 621bp の配列を決定することができた。*Snap25* 遺伝子の CDS 配列は、EL 系統と B6 系統の間に変異は存在しなかった。ヒトでは SNAP25 の 48 番目のアミノ酸がフェニルアラニンからバリンに置換する変異が、特発性てんかんに関与することが報告されている。しかし、EL 系統には、*Snap25* タンパク質の構造変化は存在しないことが示された。*Kcnp3* 遺伝子では、771bp の配列を決定した。EL 系統と B6 系統間に 1 か所の多型を検出したが同義置換であった。*Slc12a1* 遺伝子においては、スプライスバリエント 2 に由来する全長 3288bp の CDS を含む DNA 断片の増幅を行い、部分的に塩基配列を決定した。EL 系統と B6 系統間に 2 か所以上の多型の存在が示されたが、配列全体の決定には至らなかった。今後、配列の決定を完了する予定である。また、これら 3 遺伝子を対象に定量的 RT-PCR により、放り上げ刺激負荷の有無による発現レベルの変化に系統差あるかどうかを検証する。

本研究の成果は、小竹航平、小林千寿、場崎恵太、滝沢達也、田中和明の共同で、第 62 回日本実験動物学会総会（京都府民総合交流プラザ）において演題「コンジェニック系統を用いた EL マウス 2 番染色体のてんかん形質 QTL の連鎖解析」のポスター発表を行った。また、コンジェニック系統の受精卵を、本学と秋田大学の間で「研究開発成果としての有体物提供」に関する契約を締結したうえで、共同研究目的に提供を行った。

## 【引用文献】

- Frankel WF, Coffin JM, Dietrich WF, Johnson EW, Lutz CM, Valenzuela A. 1995a. New seizure frequency QTL and the complex genetics of epilepsy. *Mammalian Genome*. 6: 830-838.
- Frankel WN, Johnson EW, Lutz CM. 1995b. Congenic strains reveal effects of the epilepsy quantitative trait locus, El2, separate from other El loci. *Mammalian Genome*. 6: 839-843.
- Hagihara, H., Toyama, K., Yamasaki, N., Miyakawa, T. (2009). Dissection of Hippocampal Dentate Gyrus from Adult Mouse. *J. Vis. Exp.* (33), e1543.
- Rise ML, Frankel WN, Coffin JM, Seyfried TN. 1991. Genes for epilepsy mapped in the mouse. *Science*. 253: 669-673.
- Rohena L, Neidich J, Truitt Cho M, Gonzalez KD, Tang S, Devinsky O, Chung WK. . 2013 Mutation in SNAP25 as a novel genetic cause of epilepsy and intellectual disability. *Rare Dis Sep 5; 1: e26314*. Erratum in: *Rare Dis*. 2015; 3(1): e1037119.
- Rossi PG, Parmeggiani A, Bach V, Santucci M, Visconti P. (1995) EEG features and epilepsy in patients with autism. *Brain and Development* 17: 11-17.
- Suzuki J. 2004. Investigations of epilepsy with a mutant animal (EL mouse) model. *Epilepsia* 45: 2-5.

## ○プロジェクト No. P 13—47

### 研究テーマ

#### 腎糸球体疾患の進行と寛解に関する比較病理学研究

研究期間：平成 25 年 4 月 1 日～平成 28 年 3 月 31 日

プロジェクト班長：代田欣二（獣医学部 教授）

プロジェクト班員：代田眞理子（獣医学部 教授）

プロジェクト班員：上家潤一（獣医学部 准教授）

研究協力者：諫山友香、安野恭平、峰重隆幸、菅原 豪、向谷伶実、小坂 唱

### 緒言

Osborne-Mendel (OM) ラットは軽度の高血圧と高脂血症を特徴とし、オスでは他系統のラットと比較して早期に蛋白尿を伴う糸球体障害が発現し、ヒトの巣状分節性糸球体硬化 (focal segmental glomerular sclerosis, FSGS) に類似した病変に進行する。我々は本プロジェクトにおいて本ラットの進行性腎症の病理発生機序の解明に取り組み、これまでの実験的研究から OM ラットの糸球体足細胞におけるアンジオテンシン II type 1 受容体 (AT1R) の高発現量が糸球体足細胞傷害のトリIGGERであり、これが進行性糸球体障害の一次的原因である可能性を示唆した。一方、足細胞と同様に糸球体固有細胞の一つであるメサンギウム細胞にも AT1R が存在し、アンジオテンシン II (Ang II) の刺激により速やかに収縮し糸球体内圧や濾過面積の調整に重要な役割を担っていることが知られているが、OM ラットではメサンギウム細胞においても AT1R が高発現しているのか、Ang II に対する感受性が高いかどうかは不明であり、OM ラットのメサンギウム細胞における AT1R の発現と進行性糸球体障害の病態への関与は明らかではない。そこで本研究では、F344 ラットを対照とし OM ラットのメサンギウム細胞における AT1R 発現量や Ang II に対する感受性を比較検討した。さらに、両系統の全身臓器における AT1R 発現量を比較し、AT1R の過剰発現が足細胞特異的であるのかを検索した。

### 材料と方法

#### 【実験の概要】

7 週齢のオスの OM ラットと対照とした F344 ラットから Sieving 法により糸球体を単離し、メサンギウム細胞を培養した。免疫組織化学的検索及び real-time RT-PCR 法により、両系統の培養メサンギウム細胞における AT1R の発現を検索した。また、両系統の培養メサンギウム細胞に  $1 \times 10^{-10} \sim 1 \times 10^{-6}$  mol/L の Ang II (Sigma Aldrich Chemicals, Saint Louis, MO, USA) を添加し、ファロイジン染色にて、5～20 分後のメサンギウム細胞におけるアクチン細胞骨格の変化を観察し、細胞面積収縮率を測定した。さらに両系統のメサンギウム細胞に  $1 \times 10^{-7}$  mol/L の濃度の Ang II を添加し、real-time RT-PCR 法によりメサンギウム細胞の活性化マーカーである  $\alpha$ -平滑筋アクチン ( $\alpha$ -SMA) の mRNA 発現を評価した。培養細胞は 3～5 継代培養したものをを用いた。

また、両系統における AT1R の発現量を比較するため、心臓、血管平滑筋、肺、肝臓、腎臓、脳の 6 臓器において、real-time RT-PCR 法により AT1aR の mRNA 発現量を検索した。

#### 【実験動物】

OM (Om/NSLc) ラットは静岡実験動物株式会社 (日本 SLC) より譲渡を受け、本学生物科学総合研究所動物飼育室内で自家繁殖して得られた 7 週齢のオスを実験に用いた。動物には固形飼料 (CE-2、日本クレア、Tokyo) および水道水を自由摂取させた。対照とした F344 ラットも日本 SLC より購入し使用した。

#### 【剖検】

ラットは体重測定後、ペントバルビタール (60 mg/kg) 麻酔下で腹大動脈より全採血し、安楽死させた。その後直ちに両側の腎臓を取り出し、パラフィン切片作成用、凍結切片作成用組織を採材した。Total RNA 抽出試料として、心臓、血管平滑筋、脾臓、肺、肝臓、腎臓、脳、副腎を採材した。また、培養用には別固体の腎臓を使用した。

#### 【免疫組織化学的検索】

培養メサンギウム細胞を同定するために、メサンギウム細胞に特異な Thy-1 と Vimentin の免疫組織化学的検索を行っ

た。また、OM ラットと F344 ラットのメサンギウム細胞における AT1R の発現量および分布を比較するため、AT1R の免疫組織化学的検索を行った。一次抗体にはそれぞれ mouse anti-thy-1 (Abcam, Cambridge, UK)、mouse anti-vimentin (DAKO, Copenhagen, Denmark) および Rabbit anti-AT<sub>1</sub> (N10) (Santa Cruz Biotechnology, California, USA) を使用し、二次抗体にはそれぞれ FITC-conjugated anti mouse IgG (EY Laboratories Inc., San Mateo, California, USA)、FITC-conjugated anti mouse IgG および FITC-conjugated anti rabbit IgG (Cappel Laboratories, Aorora, Ohio, USA) を用い、蛍光顕微鏡 (FSX100; Olympus, Tokyo) ないし共焦点レーザー顕微鏡 (Leica-Microsystems, Tokyo, Japan) を用いて観察した。

#### 【F-actin の免疫組織化学的検索および面積減少率の測定】

OM ラットと F344 ラットの培養メサンギウム細胞の Ang II 添加後のアクチン細胞骨格および面積の変化を検索するため、ファロイジン染色を行い F-アクチンの評価を行った。染色は fluorescent phallootoxins (Alexa flour® 488 phalloidin; invitrogen) を用い、反応後蛍光顕微鏡で観察した。Ang II 添加後のメサンギウム細胞の収縮率を計測は中倍率 (×200) で、チャンバースライドの一区画でランダムに 30 枚撮影し、画像解析ソフト ImageJ (Rasband, NIH) を用いてランダムに選んだ 100 個のメサンギウム細胞の面積を計測した。一区画ごとに細胞面積の平均を算出し、Ang II 添加前の平均面積を 100 として、メサンギウム細胞の面積減少率を計算した。

#### 【Total RNA の抽出および逆転写と real-time PCR】

両系統の培養メサンギウム細胞から total RNA を抽出し、real-time PCR 法により、AT1aR、 $\alpha$ -SMA、 $\beta$ -actin の遺伝子発現量を定量した。PCR の増幅は各サンプルで正副 2 通りに行つて平均値を算出し、それぞれの mRNA 発現量を AT1aR mRNA 発現量 /  $\beta$ -actin mRNA 発現量比、 $\alpha$ -SMA mRNA 発現量 /  $\beta$ -actin mRNA 発現量比として求めた。

#### 【全身臓器の Total RNA の抽出および逆転写 real-time PCR】

両系統の心臓、肺、血管平滑筋、肝臓、腎臓、副腎、脳から total RNA を抽出、cDNA を作製し、real-time PCR により AT1aR mRNA 発現量を検索した。PCR の増幅は各サンプルで正副 2 通りに行つて平均値を算出し、それぞれの mRNA 発現量を AT1aR mRNA 発現量 /  $\beta$ -actin mRNA 発現量比として求めた。

#### 【光学顕微鏡的検索】

採取した腎臓を 10% 中性緩衝ホルマリンで固定し、3  $\mu$ m のパラフィン切片を作製した。ヘマトキシリン・エオジン (HE) 染色を施した切片を用いて、糸球体の形態学的評価を行った。

#### 【免疫組織化学的検索】

採取した腎臓より常法に従い 3  $\mu$ m の凍結切片を作製し、一次抗体として Rabbit anti-AT1、二次抗体には FITC-conjugated anti rabbit IgG を用いた間接蛍光抗体法を行い、蛍光顕微鏡で観察した。

#### 【統計学的処理】

統計処理は Prism (GraphPad Software, California, USA) を用いて行った。

#### 【動物実験委員会による承諾】

本研究は麻布大学動物実験委員会に計画を申請し、大学長より承認されたものである (承認番号: 150417-8)。

## 結果

#### 【培養メサンギウム細胞】

Shieving 法により、糸球体は両腎から一匹あたりおよそ 1,000 個収集された。糸球体を培養系に移し、10 日以降に細胞質内に豊富なアクチンを含有するメサンギウム細胞由来の細胞が増殖し、28 日に増殖ピークを迎えた。

#### 【培養メサンギウムおよびの腎糸球体の免疫組織化学的検索】

培養細胞はメサンギウム細胞のマーカーである thy-1 と vimentin に陽性であり、両系統間において、細胞の性状や免疫染色の染色性に差異は認められなかった。

AT1R は細胞膜に発現しており、細胞を形どるように辺縁が染まっているものと、点状のものが確認できた。凍結切片による in vivo における AT1R の蛍光免疫染色においては、両系統において、糸球体内のメサンギウム領域で陽性を示した。いずれにおいても、両系統間において、AT1R の免疫染色の染色性に差異は認められなかった。

### 【培養メサンギウム細胞の AT1R の発現量の検索】

両系統の培養メサンギウム細胞における AT1aR の mRNA 発現量は F344 ラットのほうが OM ラットよりも有意に高い値を示した。

### 【Ang II 添加後の培養メサンギウム細胞の $\alpha$ -SMA 発現量の検索】

両系統において、Ang II 添加 6 時間後の  $\alpha$ -SMA mRNA の発現量は、非添加コントロール群と比較して増加傾向を示した。また、Ang II 添加 24 時間後の  $\alpha$ -SMA mRNA 発現量もコントロール群と比較して増加傾向にあった。しかし、両系統において、Ang II 添加後の  $\alpha$ -SMA mRNA 発現量は、それぞれのコントロール群と比較して増加傾向にあるものの有意差は認められなかった。さらに、両系統間においても、Ang II 添加後の  $\alpha$ -SMA mRNA 発現量に有意差は認められなかった。

### 【Ang II 添加後の培養メサンギウム細胞内の F-actin の変化】

両系統のメサンギウム細胞に Ang II を添加すると、10 分後に最大収縮を示し、アクチン線維の重合化によるストレスファイバー形成が観察されたが、両系統間で差は認められなかった。

### 【培養メサンギウム細胞の面積に対する Ang II の効果】

添加 Ang II の各濃度 ( $10^{-10} \sim 10^{-6}$  mol/L) においても、メサンギウム細胞の面積減少率は添加後 10 分で最大減少率が認められた。また、最大収縮は F344 ラットのメサンギウム細胞において  $10^{-6}$  M Ang II 添加 10 分後にみられ、面積減少率として 55% に達した。さらに、メサンギウム細胞面積は、Ang II 濃度依存性に収縮したが、面積収縮率は、両系統間で顕著な差は認められなかった。

### 【全身臓器の AT1aR の発現量の比較】

OM ラットと F344 ラットの各 8 臓器において、AT1aR に特異的なバンドが検出されたが脳ではほとんどバンドが検出されなかった。AT1aR の mRNA 発現量は両系統とも肝臓での発現量が多く、心臓、肺、腎臓では肝臓に比較して AT1aR mRNA の発現量が少なかった。OM ラットと F344 ラットを比較すると、心臓、腎臓では AT1aR mRNA の発現量に大きな差は認められなかったが、肺においては、OM ラットでの発現量が多く、肝臓では F344 の方が多かった。

## 考察

今回の結果から、OM ラットの培養メサンギウム細胞における AT1R の遺伝子発現は、足細胞とは異なり F344 ラットと比較して有意に低いことが示された。また、*in vitro* においては、Ang II に対する OM ラットのメサンギウム細胞の収縮反応は F344 のそれと差がなく、さらに、Ang II 添加後のアクチン細胞骨格の変化および  $\alpha$ -SMA 遺伝子発現にも 2 系統間で有意差は認められなかった。また、主要臓器における AT1R の遺伝子発現の比較から、OM ラットにおける AT1R の遺伝子高発現は足細胞特異的な現象であると考えられた。

メサンギウム細胞は Ang II 刺激により収縮し、隣接する毛細血管系蹄の内径を変化させ、濾過面積および濾過係数 (Kf) を減少させて糸球体内の血行動態を調節するといった重要な役割を担っている。つまり、メサンギウム細胞が収縮すると毛細血管径は減少し、糸球体の濾過面積は低下して GFR は下がることになる。今回の結果では、OM ラットのメサンギウム細胞では AT1R の mRNA の発現量が F344 ラットのそれに比べ低いという結果が得られ、OM ラットのメサンギウム細胞の収縮機能が F344 ラットよりも低く、糸球体濾過機構におけるメサンギウム細胞の機能的な脆弱性が糸球体障害の発生機序に関与している可能性が考えられた。すなわち *in vivo* において AT1R の発現量が少なく過剰濾過が是正されず、また糸球体系蹄の拡大が生じやすいとすれば、その結果として持続性蛋白尿が生じやすく、さらに二次的な足細胞へのメカニカルなストレスが足細胞傷害、尿細管・間質傷害を助長する可能性がある。しかし、今回は両系統間のメサンギウム細胞における AT1R の遺伝子発現量は、およそ 2 倍程度の差しかなく、この差がタンパク質レベル、機能レベルでどの程度の影響を及ぼすかは今回の研究では明らかでなく、さらに *in vitro* における Ang II への反応性には今回の実験条件では F344 と比較して有意な差が無かったため、今後より詳細な細胞機能の検討が必要である。また、Ang II はメサンギウム細胞において細胞内のカルシウムイオンの変動をもたらし、これにより細胞内の収縮機構が働く。今回は *in vitro* において Ang II 刺激後のメサンギウム細胞内へのカルシウムイオンの influx について検討できなかったが、今後、より詳細にメサンギウム細胞の機能を比較するためにはさらに細胞内のカルシウムイオンの変動も検討する必要がある。

## **補遺**

OM ラットのメサングウム細胞に関する研究の途中経過は下記のように第 157 回日本獣医学会学術集会（2014 年 9 月、札幌）にて発表した。

諫山友香、安野恭平、峰重隆幸、菅原豪、向谷伶実、小坂唱、上家潤一、代田欣二：Osborne-Mendel ラットのメサングウム細胞の性状に関する研究



## ○プロジェクト No. P 13－48

### 研究テーマ

#### ラットのアルコール性肝障害モデルにおけるプロテオーム解析による新規肝障害マーカータンパク質の検出

研究期間：平成25年6月1日～平成28年3月31日

プロジェクト班長：曾川一幸（生命・環境科学部 講師）

#### 【研究概要】

常習飲酒は、肝炎ウイルスと並ぶ肝臓病の主要な要因の1つである。欧米においては肝臓病の約80%が、本邦では少なくとも約10-20%が常習飲酒に起因するアルコール性肝障害が考えられる。我が国における飲酒人口、大量飲酒者数は依然として増加傾向を示し、肝臓病の原因としてのアルコールの比率は、今後ますます高くなると予測される。

アルコール性肝障害の発症機序の中でも酸化ストレスは重要である。アルコールは主にCYP2E1によって代謝されるが、その際に活性酸素種（reactive oxygen species：ROS）が産生される。酸化ストレスがアルコール性肝障害へと病態を進展させること、また抗酸化剤が病態改善に有効であることが動物モデルを中心に明らかにされている。抗酸化作用を持つビタミンCは生体内に発生したROSによる酸化障害を防ぎ、過酸化脂質を除去する作用をもつ。本研究では、Lieber-DeCarliの手法を用い、ビタミンCを豊富に含んでいるレモンと一緒に給餌させることにより、酸化ストレス抑制効果による肝障害の予防・緩和を目的として行った。

#### 【背景と目的】

常習飲酒は、肝炎ウイルスと並ぶ肝臓病の主要な要因の1つである。欧米においては肝臓病の約80%が、本邦では少なくとも約10-20%が常習飲酒に起因するアルコール性肝障害が考えられる。我が国における飲酒人口、大量飲酒者数は依然として増加傾向を示し、肝臓病の原因としてのアルコールの比率は、今後ますます高くなると予測される。

適度のアルコール摂取は、HDLの増加につながり、冠動脈疾患での死亡率を低下させることが知られている。1980年代に行われた疫学研究により、適度の飲酒者はアルコールをまったく飲まない人よりも死亡率の低いことが示され、アルコール摂取量と死亡率との関係はU字カーブを描くことが明らかになっている<sup>1)</sup>。しかし、アルコール多量飲酒は高血圧、脂質異常症、糖尿病、脂肪肝などさまざまな生活習慣病の重大な危険因子である。

アルコール性肝障害の発症機序の中でも酸化ストレスは重要である。アルコールは主にCYP2E1によって代謝されるが、その際に活性酸素種（reactive oxygen species：ROS）が産生される<sup>2)</sup>。また、ミトコンドリア内のグルタチオン低下も酸化ストレス増加の一機序として考えられている<sup>3)</sup>。

酸化ストレスがアルコール性肝障害へと病態を進展させること、また抗酸化剤が病態改善に有効であることが動物モデルを中心に明らかにされている。抗酸化作用を持つビタミンCは生体内に発生したROSによる酸化障害を防ぎ、過酸化脂質を除去する作用をもつ。その他、血行促進、ホルモン分泌調整、抗血栓作用があり、一般的に栄養補助剤として広く使用されている<sup>4)</sup>。

本研究では、Lieber-DeCarliの手法<sup>5)</sup>を用い、ビタミンCを豊富に含んでいるアーモンドと一緒に給餌させることにより、酸化ストレス抑制効果による肝障害の予防・緩和を目的として行った。

#### 【材料と方法】

##### 実験動物の作成とサンプル採取

4週齢のSD系雄性ラット（Charles River Japan, Inc.）20匹をLieber-DeCarliの手法<sup>5)</sup>により、アルコール含有液体飼料（オリエンタル酵母工業）あるいはその等カロリーを炭化水素で置換した液体飼料で4週間のpair-feedingを行った。5%アルコール含有液体飼料給餌（n=4：アルコール群）、コントロール液体飼料給餌（n=4：コントロール群）、0.25%レモン汁+5%アルコール含有液体飼料給餌（n=4：0.25%レモン群）、0.5%レモン汁+5%アルコール含有液体飼料給餌（n=4：0.5%レモン群）、1.0%レモン汁+5%アルコール含有液体飼料給餌（n=4：1.0%レモン群）の計5群を作成した。アルコール群及びレモン群は、まず3%アルコール含有液体飼料を与え、2日後4%に移行し、翌日に通常の

5% アルコール含有液体飼料又は5% アルコール及びレモン含有液体飼料をそれぞれ4週間与えた。各群のラットはエタノール麻酔後、心採血を施行した。開腹後すぐに肝臓を摘出し、SOD 活性測定用に左葉の一部を-80℃に保管し、残りを病理組織学的検査用に4%パラホルマリン液による固定処理を行った。

### 病理組織学的検討

肝臓の組織切片を作成した。HE 染色を行った後に光学顕微鏡で観察し、肝障害の程度を組織学的に評価した。

### 血中の Alanineaminotransferase (ALT)、Aspartate transaminase (AST)、Triglyceride (TG) 測定

ALT、AST 及び TG の測定にはそれぞれ、Lタイプワコー ALT・J2 (和光純薬工業株式会社) 試薬、Lタイプワコー AST・J2 (和光純薬工業株式会社) 試薬及びLタイプワコー TG・M (和光純薬工業株式会社) 試薬を用い、JCA-BM8040 自動分析装置 (日本電子) で測定した。

### Superoxide dismutase (SOD) 活性の測定

肝組織を50 mg チューブに入れ、ホモジナイザーでホモジネイトした後、Extraction Buffer を1 ml 加え、遠心分離をし、肝臓のタンパク質濃度を Nano Drop で測定し、濃度を合わせた。次に、TM-PEK 膜タンパク質抽出キット (和光純薬工業株式会社) を用いて細胞質タンパク質画分を抽出し、SOD 活性測定キット (SOD assay kit; 同仁化学研究所) によって肝臓組織中の SOD 活性量を測定した。

### 【結果】

#### 病理組織学的検討

左葉の一部使って4週間給餌後ラットの病理標本を作成した。

肝脂肪滴がエタノール群と0.25%レモン群で観察されたが、0.5%レモン群、1.0%レモン群、コントロール群には観察されなかった。

### 血中の Alanineaminotransferase (ALT)、Aspartate transaminase (AST)、Triglyceride (TG) 測定

AST、ALT、TG はそれぞれコントロール群では142 U/L, 51 U/L, 24 mg/dL、0.25%レモン群では204 U/L, 56 U/L, 35 mg/dL、0.5%レモン群では159 U/L, 52 U/L, 20 mg/dL、1.0%レモン群では169 U/L, 59 U/L, 26 mg/dL、アルコール群では222 U/L, 65 U/L, 38 mg/dLであった。

### Superoxide dismutase (SOD) 活性

肝組織 (1 mg) 中の SOD 活性の測定結果、コントロール群が  $299.2 \pm 250.1$  U/mg、アルコール群が  $750.4 \pm 624.6$  U/mg、0.25%レモン群が  $166.0 \pm 77.5$  U/mg、0.5%レモン群が  $166.0 \pm 15.0$  U/mg、1.0%レモン群が  $145.9 \pm 12.9$  U/mg であった。アルコール群と0.25%レモン群、0.5%レモン群、1.0%レモン群の減少率はそれぞれ79.0%、77.9%、80.6%であった。

### 【考察】

アルコール性肝障害の発症機序の中で酸化ストレスは重要な要因の1つである。アルコールは主にCYP2E1によって代謝されるが、その際に活性酸素種 (reactive oxygen species: ROS) が産生される。酸化ストレスがアルコール性肝障害へと病態を進展させること、また抗酸化剤が病態改善に有効であることが動物モデルを中心に明らかにされている。加賀谷らはアルコール性肝障害モデルで胡麻に含まれるセサミンを0.2%とアルコール濃度32%を同時投与すると8週間後ではALT、ASTはそれぞれアルコール群で  $404 \pm 61$  U/L,  $159 \pm 22$  U/L、アルコール-セサミン群で  $216 \pm 25$  U/L,  $62 \pm 5$  U/L であり、0.2%含有量のセサミンを同時投与することにより、ALT、ASTが有意に低下したことを報告している<sup>6)</sup>。SuzukiらはLieber-DeCarliモデルでココアポリフェノールを1.4 g/Lの割合で5%アルコール飼料と同時給餌すると8週間後ではTGはアルコール群で  $25.9 \pm 3.9$  mg/g of liver、アルコール-ココア群で  $14.7 \pm 2.8$  mg/g of liver であ

り、ココアポリフェノールを同時給餌することにより、TGが有意に低下したことを報告している<sup>7)</sup>。Lieber-DeCarliモデルでレモン汁を0.5%、1.0%の割合で5%アルコール飼料と同時給餌すると4週間後ではALT、AST、TGはそれぞれアルコール群で222 U/L、65 U/L、38 mg/dL、0.5%レモン群では159 U/L、52 U/L、20 mg/dL、1.0%レモン群では169 U/L、59 U/L、26 mg/dLであり、0.5%以上のレモン汁を同時給餌することにより、ALT、AST、TGが有意に低下した。また、酸化ストレスマーカーであるSODは、アルコール群が750.4 ± 624.6 U/mg、0.25%レモン群が166.0 ± 77.5 U/mg、0.5%レモン群が166.0 ± 15.0 U/mg、1.0%レモン群が145.9 ± 12.9 U/mgで、レモン群で75%以上の減少が認められた。レモンに含まれているビタミンCの抗酸化作用により、ROSが低下したため、SODが低下したと示唆される。

病理学組織学的所見からコントロール群とアルコール群を比べるとアルコール群には丸い白く抜けて見える脂肪滴が観察された。また、0.5%レモン群及び1.0%レモン群で脂肪滴は観察されなかったことから、レモンの影響により、脂肪滴ができたことは考えにくい。0.5%以上のレモン群で脂肪滴が観察されなかったことから、レモンに含まれる成分が脂肪沈着の抑制効果があることが示唆された。

人体でのビタミンCは、水溶性の抗酸化物質として、多方面にその役割が確認されているが、脂溶性の細胞分画の活動には間接的にしか参加できないことや、生体内で分解されやすく、効果を上げるのに大量摂取が必要など、欠点が多い一方で、脂溶性抗酸化物質の代表で、過酸化脂質の反応の歯止め役になっているビタミンEは、酸化され抗酸化力を失った際、ビタミンCの力により回復する為、ビタミンCの抗酸化作用の一部はビタミンEによって代行されているとの報告もある<sup>8)</sup>。

肝障害や脂肪沈着の低下にビタミンCの効果が示唆されることから、今後、ビタミンCを5%エタノール飼料と同時給餌させることにより効果を確認する。

#### 【参考文献】

1. Marmot MG, Rose G, Shipley MJ, Thomas BJ. Alcohol and mortality: A u-shaped curve. *Lancet* 1: 580-583, 1981.
2. Dey A, Cederbaum AI. Alcohol and oxidative liver injury. *Hepatology* 43 (2 Suppl 1): S63-S74, 2006.
3. Lluís JM, Colell A, Garcia-Ruiz C, Kaplowitz N, Fernández-Checa JC. Acetaldehyde impairs mitochondrial glutathione transport in HepG2 cells through endoplasmic reticulum stress. *Gastroenterology* 124: 708-724, 2003.
4. 鈴木通博. 脂肪肝の治療. *臨床と研究* 84: 63-68, 2007.
5. Lieber CS and DeCarli LM. Liquid diet technique of ethanol administration: 1989 update. *Alcohol Alcohol*. 24:197-211, 1989.
6. 加賀谷みえ子、飯塚佳恵、大澤俊彦、山下かなへ. アルコール性脂肪肝に及ぼすゴマリグナン物質の予防効果. *日本家政学会誌* 50: 807-812, 1999.
7. Suzuki Koichiro, Nakagawa Kiyotaka, Miyazawa Taiki, Kato Shunji, Kimura Fumiko, Kamei Masanori, Miyazawa Teruo. Oxidative Stress during Development of Alcoholic Fatty Liver: Therapeutic Potential of Cacao Polyphenol. *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry* 77:1792-1794, 2013.
8. ニ木鋭雄、島崎弘幸、美濃真. 抗酸化物質—フリーラジカルと生体防御. 学会出版センター. 1994.

○プロジェクト No. P 14－01

研究テーマ

化学物質の毒性発現機序に関する研究

研 究 期 間 ：平成 26 年 4 月 1 日～平成 29 年 3 月 31 日

プロジェクト班長：和久井信（獣医学部 准教授）

プロジェクト班員：村上 賢（獣医学部 教授）

プロジェクト班員：高木敬彦（獣医学部 教授）

プロジェクト班員：浅利昌男（獣医学部 教授）

知的財産登録検討中であるため、次号にて報告予定

## ○プロジェクト No. P 14－02

### 研究テーマ

疾患モデルおよび遺伝子改変動物個体・細胞を用いた受精・発生メカニズムの解明に関する研究

研究期間：平成26年4月1日～平成29年3月31日

プロジェクト班長：柏崎直巳（獣医学部 教授）

プロジェクト班員：久松 伸（生命・環境科学部 講師）

### 【要旨】

Embryo cryopreservation is one of the important technologies in various basic researches and clinical areas. Very recently, carboxylated  $\epsilon$ -poly-L-lysine (COOH-PLL) has been developed as a new cryoprotective reagent (CPA) and we previously demonstrated that combined treatment of COOH-PLL with ethylene glycol (EG) which is a commonly used CPA, is effective for vitrification of unfertilized mouse oocytes and pronuclear (PN) embryos. Some previous studies reported different protocol is used for vitrification of different embryonic stages because sensitivity to physical and physiological stress caused by vitrification seems to depend on embryonic stages. In this study, we tried to use the same vitrification protocol using COOH-PLL for vitrification of mouse embryos beyond the 2-cell stage as well as oocytes and PN embryos.

PN, 2 cell, 4 cell, 8 cell, morulae and blastocysts were treated with 7.5% (v/v) EG and 7.5% (v/v) COOH-PLL for 3 min and then vitrified with 15% EG (v/v) and 15% (v/v) COOH-PLL (E15P15) for 1 min by Minimal Volume Cooling (MVC) method. The embryos except for PN showed low rates of survival, blastocyst and hatched blastocysts. To improve the survival and developmental ability of the vitrified embryos, blastocysts were vitrified with different concentrations of COOH-PLL. At the results, the survival and developmental rates of vitrified blastocyst in E20P10 group were higher ( $98.0 \pm 2.5\%$  and  $93.3 \pm 4.0\%$ ) than those of E30, E25P5 and E15P15 groups. When 2 cell, 4 cell, 8 cell embryos or morulae were vitrified with E20P10, survival, blastocyst and hatched blastocyst rates were dramatically improved (more than 86.0%). Taken together, vitrification with 20% COOH-PLL and 10% EG is available for vitrification of mouse pre-implantation embryos at the different stages.

### 【研究成果】

1. Fujiwara K, Kamoshita M, Kato T, Ito J, Kashiwazaki N (2017).

Generation of rats from vitrified oocytes with surrounding cumulus cells via in vitro fertilization with cryopreserved sperm. *Anim Sci J* 88: 180-184.

## ○プロジェクト No. P 14－03

### 研究テーマ

#### EPR・スピントラップ法等を用いた一酸化窒素（NO）産生の解析と NOS 遺伝子の発現調節機構の解明

研究期間：平成 26 年 4 月 1 日～平成 29 年 3 月 31 日

プロジェクト班長：滝沢達也（獣医学部 教授）

プロジェクト班員：田中和明（獣医学部 准教授）

プロジェクト班員：宮崎陽子（獣医学部 講師）

### 【研究概要】

子宮における胚の受容には、一酸化窒素（NO）による環状グアノシン一リン酸（cyclic Guanosine Monophosphate：cGMP）産生を介した、子宮平滑筋の弛緩が重要であることが知られている。近年、子宮筋層の弛緩に及ぼす cGMP 非依存的な経路として、様々なタンパク質のシステイン残基のフリーのチオール基を NO が S- ニトロシル（SNO）化し、タンパク質を修飾する SNO 化の経路が報告されている。一方、過剰な SNO 化が生じると、細胞にストレスとなり、そのストレスに抵抗する機構として脱ニトロシル化がある。SNO 化タンパク質を脱ニトロシル化する主要な因子はチオレドキシニン（Trx）であり、Trx はマウス大動脈において、脱ニトロシル化を介して血管の恒常性を維持するという。

これらの背景から、cGMP に非依存的な子宮筋層の弛緩機序の有無を検討し、次いで、NO により生じる子宮筋層の弛緩に SNO 化や脱ニトロシル化が関与しているかを明らかにすることを目的とした。まず、ビオチンスイッチ法によりラット子宮筋層における SNO 化タンパク質の有無を検討し、さらに同定を行った。

Wistar ラットを用い、交配翌朝膈スミア内に精子が認められた日を妊娠 0 日として起算した。妊娠 10、13、17、21 日のラットから得た子宮筋層のタンパク質の SNO 化をビオチンスイッチ法により検出すると、いずれの妊娠日齢においても 20 kDa 以下から 220 kDa 以上の広い範囲で、強いシグナルのバンドが約 20 個認められた。さらに、SNO 化タンパク質をアビジン結合磁気ビーズにより精製し MALDI-TOF-MASS（matrix assisted laser desorption/ionization-time of flight mass spectrometry）により解析すると、エネルギー産生やシャペロン、平滑筋収縮に関するタンパク質を含む 18 個のタンパク質が新たに同定された。

以上のことより、妊娠中に子宮で産生される NO は cGMP のみならず、SNO 化を介したシグナル伝達に関与している可能性が示された。

### 【背景と目的】

子宮は胚を受容した後、胚発生と胎児発達を保持するため、長期にわたりその機能を維持する必要がある。子宮平滑筋は胎児を受容するために、妊娠中は弛緩状態を維持し、妊娠末期に近づくにつれて徐々に活動を始め、分娩時には強く収縮して胎児を分娩する。妊娠は、妊娠維持機構と陣痛発来機構のバランスによって制御されているが、どちらのメカニズムも詳細には明らかになっておらず、そのアンバランスが引き起こす早産のメカニズムも未だ十分に明らかではない。そのため、妊娠維持及び分娩に関連した子宮筋層の収縮弛緩機構と妊娠による子宮筋層の機能変化に関する知見が重要となる。

以前から、一酸化窒素（NO）は環状グアノシン一リン酸（cyclic Guanosine Monophosphate：cGMP）産生を介して、血管などの平滑筋を弛緩させる作用を持つことが知られている。Suzuki と Takizawa ら（2009）は、スピントラップ・電子常磁性共鳴吸収法を用いて、妊娠中のラット子宮では大量の NO が産生されていることを報告している。また、ラット子宮において NO-cGMP 経路の存在が確認され（Momohara et al., 2004）、NO ドナーにより子宮収縮が抑制されることから、NO は子宮平滑筋を弛緩させる作用を持ち、早産の回避に働いていると考えられている（Izumi et al., 1995; Kaya et al., 1998）。しかし、可溶性グアニリルシクラーゼ（soluble guanylyl cyclase：sGC）の阻害により cGMP 産生を抑制しても NO による弛緩反応が検出される（Ulrich et al., 2013）ことから、子宮の静止状態の維持や分娩開始のメカニズムは完全には明らかではない。近年では、子宮筋層の弛緩に及ぼす cGMP 非依存的な経路として、NO が様々なタンパク質のシステイン残基のフリーのチオール基を S- ニトロシル（SNO）化し、タンパク質を修飾する SNO 化経路の

関与が報告されている。タンパク質はSNO化によって構造や電荷が変化し機能が修飾される。現在では100種類以上のタンパク質が、SNO化により機能が修飾されることが報告されている。一方、過剰なSNO化が生じると、細胞に対してストレスとなり、そのストレスに抵抗する機構として脱ニトロシル化がある。チオレドキシン (Trx) は細胞内の酸化還元状態に関わる酵素であり、SNO化タンパク質を脱ニトロシル化する主要因子である。Trxはチオレドキシン還元酵素 (TrxR) やチオレドキシン結合タンパク質 (Tbp-2) と共に Trx システムを構成し、TrxRはNADPHと共役してTrxの還元能を維持し、Tbp-2はTrxに結合してその活性を抑制している。実際、Trxはマウス大動脈において、脱ニトロシル化を介して血管の恒常性を維持していることも報告されている (Choi et al., 2011)。

これらの背景から、本研究ではラット子宮におけるSNO化タンパク質と脱ニトロシル化に及ぼすTrxの影響を明らかにすることを目的とした。まず、ラット子宮筋層では、cGMPに非依存的な子宮筋層の弛緩機序を解明するため、NOにより生じる子宮筋層の弛緩にSNO化や脱ニトロシル化が関与しているかを明らかにすることを目的とし、ビオチンスイッチ法によりラット子宮筋層におけるSNO化タンパク質の有無を検討し、さらに同定を行った。

### 【材料と方法】

Wistarラットを用い、交配翌朝陰スメア内に精子が認められた日を妊娠0日として起算した。妊娠10、13、17、21日から得た子宮筋層のタンパク質のSNO化をビオチンスイッチ法により検出した。また、SNO化タンパク質をアビジン結合磁気ビーズにより精製し、MALDI-TOF-MASS (matrix assisted laser desorption/ionization-time of flight mass spectrometry) により解析し、SNO化タンパク質を同定した。

### 【結果と考察】

妊娠10、13、17、21日から得た子宮筋層のSNO化タンパク質をビオチンスイッチ法により検出すると、いずれの妊娠日齢においても20kDa以下から220kDa以上の広い範囲で、強いシグナルを示すSNO化タンパク質が約20個認められた。さらに、このSNO化タンパク質をアビジン結合磁気ビーズにより精製し、MALDI-TOF-MASSにより解析すると、エネルギー産生やシャペロン、平滑筋収縮などに関するタンパク質を含む18個のSNO化タンパク質が新たに同定された。これらの結果から、妊娠中に子宮で産生されているNOはcGMPのみならず、SNO化を介したシグナル伝達に関与している可能性が示された。今後は、検出されたSNO化タンパク質について検討する予定である。

## ○プロジェクト No. P 15－01

### 研究テーマ

#### 社会緩衝作用における下垂体ホルモンの作用

研究期間：平成27年4月1日～平成30年3月31日

プロジェクト班長：菊水健史（獣医学部）

プロジェクト班員：茂木一孝（獣医学部）

プロジェクト班員：永澤美保（獣医学部）

### Abstract

**Background:** Parental behavior in mammals is innate and facilitated by social experience, specifically positive interactions between the parent and infant. Oxytocin (OT) plays an important role in mediating parental behavior. However, little is known about how OT modulates the facilitating effects of social experience on parental behavior.

**Methods:** To investigate the facilitating effects of parental experience in mice, the latencies of retrieving behaviors were measured after acquisition of social experience. Expression of c-Fos in the medial preoptic area (MPOA)—a central region involved in parental behavior—OT neurons, and OT receptor expression neurons was investigated. Additionally, the concentration of OT in the MPOA and the inhibiting effect of an OT receptor antagonist (OTA) on the facilitating effect of social experience were measured.

**Results:** Social experience with pups shortened retrieving latencies, and the percentage of OT neuron expressing c-Fos significantly increased in the paraventricular nucleus and supraoptic nucleus. The number of c-Fos positive neurons and the concentration of OT significantly increased in the MPOA. Furthermore, the percentage of OT receptor expressing neurons expressing c-Fos in the lateral preoptic area (LPO) significantly increased following social experience. Finally, infusion of OTA into the MPOA blocked the facilitating effects of social experience on retrieving behavior.

**Conclusions:** The results of our study demonstrate that facilitating effects of social experience with pups on retrieving behavior occurred via activation of OT neural systems. Understanding the neural mechanisms of the OT system may lead to a possible treatment for preservation of neglect.

### Introduction

Parental neglect, such as physical and/or emotional neglect, is a critical issue with serious long-term effects on child health and development (1-3). Understanding biological mechanisms that facilitate parental behavior is necessary to prevent neglect. Animal studies have shown that various social experiences and hormones facilitate parental behavior (4-10). Based on these results, we previously proposed that a positive-loop exists between the mother and infant (11). Specifically, when a parent interacts with an infant, the parent shows increased parental behavior, and when the infant receives parental attention, they show increased attachment behavior, which further enhances the parental behavior. When this positive-loop is disrupted, the bonding between parents and infants is not well established, leading to neglect. Defining the neural mechanisms involved in the facilitation of parental behavior via the positive-loop could potentially inform a solution to parental neglect. However, the complete biological mechanisms that modulate the facilitating effects of social experience in the parent-infant dyad remain unknown.

The medial preoptic area (MPOA) has been shown to be critical parental behavior. Destruction or inactivation of the MPOA disrupts the onset and establishment of parental behavior (12-18). The action of several hormones, including oxytocin (OT), on the MPOA has been shown to facilitate parental behavior (19-22). The MPOA contains several subregions, and these systems contribute to the regulation of parental behavior. However, the role of the MPOA subregions and other neuronal populations, such as the OT system, in triggering the positive-loop and enhancing parental behavior is not clear.



OT is a neuropeptide hormone that is synthesized in the hypothalamic paraventricular nuclei (PVN) and supraoptic nuclei (SON) (23). OT is also centrally released from the OT neurons of the PVN and SON (24). The magnocellular OT neurons project to the neurohypophysis and are released into general circulation. Centrally released OT acts on OT receptors (OTR), and OTRs are distributed in various brain regions involved in MPOA (25). OT contributes to the milk-ejection reflex, parturition, stress energy metabolism, and parental behavior (26–29). As mentioned above, inter- and intra-species bonding occurs through the positive-loop, which consists of affective interactions between individuals, via OT systems (30, 31). These findings suggest that OT has an important role in the onset and maintenance of parental behavior via the positive-loop.

In this study, we clarify the role of OT neural systems in facilitating the effects of social experience via the positive-loop by examining the neural responses of the MPOA, PVN, and SON to social experiences with pups. Additionally, we investigated the neuronal activation of OTR expressing neurons in the MPOA to clarify the direct role of OT in facilitating parental behavior via MPOA neurons.

## **Methods and Materials**

### **Animals and Housing**

C57BL/6J (B6) mice were obtained from Japan Clea Co. Ltd. (Yokohama, Japan) and bred in our laboratory. Food and water were provided ad libitum, and animals were kept under a standard 12-hr light-dark cycle (lights on at 0600) in a cage (17.5 cm × 25.5 cm × 12.5 cm). The environment was maintained at a constant temperature ( $24 \pm 1^\circ\text{C}$ ) and humidity ( $50 \pm 5\%$ ). The study was approved by the Ethics Committee of Azabu University, Japan. Female mice were paired with male mice for 2 weeks and allowed to care for their litter. At 28-days-old, litters were weaned, and 3 to 5 mice were housed together in same-sex groups. Female mice (7–16 weeks old) were used in the current experiment.

Oxytr<sup>Venus/+</sup> female mice (7–16 weeks old), a knockin mouse strain expressing an enhanced variant of yellow fluorescent protein (venus) under the control of the endogenous regulatory region of the gene encoding the OTR (25), were used to evaluate the distribution of OTR in the MPOA. The breeding protocol for these mice was the same as for B6 mice.

### **Facilitation of retrieving behavior by social experience with pups**

Subjects were individually moved from the breeding cage to a test cage. After a habituation period of 2 days, subjects were assigned to one of two groups: a low-experience group ( $n = 14$ ), in which positive-loop experience was limited to one cycle, and a high-experience group ( $n = 13$ ), in which positive-loop experience equaled 6 cycles. In both groups, three 4- to 5-day-old pups were placed in separate corners of the test cage over a 20-min period, and the latencies of retrieving the first and last pup were measured. In the high-experience group, subjects were additionally exposed to the same three pups 5 times for 20 min total, with a maximum of 3-min intervals. These exposure cycles defined as the “initial exposure term.” After the initial exposure term, pups were removed, and the subjects were left alone in the test cage. Four days after the initial exposure term, the retrieving test was conducted again. Three 4- to 5-day old pups were placed in separate corners again. Retrieving latencies were measured for 20 min, and this term was defined as the “re-exposure term.” The latencies of retrieving the first and last pup were compared between the initial and re-exposure terms for both groups. If the subjects attacked a pup, all pups were removed, and the latencies were assigned a value of 1200 sec.

### **Preparation of brain section for immunohistochemistry (IHC) or in situ hybridization (ISH) combined with IHC**

Another set of subjects was used to separately analyze brain activity. Subjects were sacrificed 1.5 h after the last stimuli. Subjects were anesthetized with sodium pentobarbital (50 mg/kg, intraperitoneally), and then perfused with 4% paraformaldehyde (PFA) in 0.1 M sodium phosphate buffer (PB) at a pH of 7.4. The brain was removed and immersed in the same fixative overnight at  $4^\circ\text{C}$  and then in 0.1 M PB saline (PBS) containing 30% sucrose at  $4^\circ\text{C}$  until it sank. The brains were cut in the coronal plane at  $30\ \mu\text{m}$  for IHC, or  $40\ \mu\text{m}$  for ISH combined with IHC on the freezing microtome. Every third section from the serial sections were processed for IHC for c-Fos, OT, and OTR, and for ISH combined with IHC for OTR mRNA and c-Fos (see Supplemental Methods and Materials for details). The sampling protocol is described

below.

### **To investigate the expression of c-Fos in the MPOA**

Subjects were assigned to one of three groups: the non-experience group was habituated in a test cage for 2 days (n = 8), the low experience group was exposed to three 4- to 5-day-old pups once for 20 min (n = 8), and the high-experience group was repeatedly exposed to pups for 20 min 6 times (n = 7). After the initial exposure term, subjects were perfused. In addition, to investigate c-Fos expression after the re-exposure term, another set of B6 female mice were assigned to 3 groups: non-experience (n = 5), low-experience (n = 10), and high-experience (n = 10) groups. Subjects in all groups were exposed to three 4- to 5-day old pups for 5 min, 4 days after the initial exposure term. After the re-exposure term, subjects were perfused.

### **To investigate the double expression of c-Fos and oxytocin in the PVN and SON**

Subjects were assigned to one of three groups in the same way as described above: non-experience (n = 6), low-experience (n = 10), and high-experience (n = 10) groups. In addition to observation in the PVN and SON, the number of c-Fos expression neurons in the MPOA was also observed within the same three groups. After the initial exposure term, subjects were perfused.

### **To investigate the double expression of c-Fos and OTR-Venus in the MPOA**

Oxytr<sup>Venus/+</sup> female mice were assigned to one of three groups in same way as the B6 mice described above: non-experience (n = 6), low-experience (n = 8), and high-experience (n = 8) groups. After the initial exposure term, subjects were perfused. To examine the effect of estrous cycle on the expression of OTR-venus, another set of Oxytr<sup>Venus/+</sup> female mice was used (see Supplement 1).

### **To investigate the double expression of c-Fos and OTR mRNA in the MPOA**

To clarify the expression pattern of double labeled c-Fos and OT mRNA in the initial exposure term, another set of B6 mice were examined in the same way as described above: non-experience (n = 5), low-experience (n = 7), and high-experience (n = 7) groups. After the initial exposure term, subjects were perfused.

### **Measurement of oxytocin concentration in the MPOA**

Eight non-experience, 16 low-experience, and 13 high-experience mice were used for enzyme immunoassay (EIA). In the non-experience group, mice were kept in a test cage for 2 days, and then their brains were removed. In the low- and high-experience groups, brains were removed 20 min after exposure to the last pup in the initial exposure term. The bilateral MPOA (approximately anteroposterior (AP) 0.25 mm to -0.14 mm, mediolateral (ML) 0.6 mm, dorsoventral (DV) 2.2 mm to the bregma) were punched out using an internal diameter needle (1 mm in diameter, Muromahci, Japan). After collection, brain tissue was homogenized in PBS and the protease inhibitor. Determination of OT concentration was performed using a 96-plate commercial OT-enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) kit (Enzo Life Science, Farmingdale, NY, USA) following the manufacturer's instructions.

### **Stereotaxic surgery for injection of an oxytocin antagonist into the MPOA**

Subjects were inhalant anesthetized using isoflurane and stereotaxically implanted with a 26-gauge bilateral guide cannula (1.2 mm long, Plastic One, Roanoke, VA, USA) aimed 2.2 mm above the MPOA (AP -0.14 mm, ML 0.6 mm, DV 2.2 mm to the bregma brain surface). Animals were housed individually for approximately 1 week to recover. After the recovery period, subjects were injected with either an OT antagonist [OTA group, n = 13; (d(CH<sub>2</sub>)<sub>5</sub>)<sup>1</sup>, Tyr(Me)<sup>2</sup>, Thr<sup>4</sup>, Orn<sup>8</sup>, Tyr-NH<sub>2</sub><sup>9</sup>]-vasotocin trifluoroacetate salt], dissolved in saline at a concentration of 0.5 μg/μl (Bachem, Torrance, CA) or saline (saline group, n = 17) into the MPOA. Injections of 0.1 μl were given using a 33-gauge bilateral microinjector (Plastic One), which extended 2 mm below the end of the guide cannula. Thirty min after the microinjection, subjects were exposed to three pups and the latencies of retrieving the first and last pups were measured. Subjects were additionally exposed to the same three pups for 20 min, 5 times (i.e., the initial exposure term). Four days after the initial exposure term, a retrieving test was conducted using three 4- to 5-day old pups (i.e., the re-exposure term). The latencies of retrieving the first and last pups were compared between the initial and re-exposure terms

for each group. To clarify the effect of an OTA in the re-exposure term, another set of mice were used. Cannulas were inserted into mice, and then they were exposed to three pups for 20 min, 6 times. Four days after the initial exposure term, mice were infused with an OTA or saline in same way as described above (OTA group,  $n = 9$ ; saline group,  $n = 5$ ). Thirty min after the injection, subjects were re-exposed to three pups, and the latencies of retrieving the first and last pups were measured. The position of the injector was verified after all experiments (Figure S4 in Supplement 1).

### Statistical analysis

From the behavioral tests, mean retrieving latencies were analyzed using paired t-tests. Data on the number of c-Fos-immunoreactivity (ir) neurons, percentages of double labeled c-Fos and OT, c-Fos and OTR venus, and c-Fos and OTR mRNA were analyzed using one-way analysis of variance (ANOVA) followed by the post hoc Bonferroni procedure. The MPOA was divided into three subregions: medial preoptic nucleus, medial (MPOM), medial part of MPOA (mMPOA), and lateral preoptic area (LPO). Correlations between the number of c-Fos and the percentages of double labeled c-Fos and OT were calculated using Pearson's correlation coefficient.

### Results

#### The effects of social experience with pups on retrieving behavior

The latencies of retrieval of the first and last pups were significantly shorter in the re-exposure term versus the initial exposure term in the high-experience group but not in the low-experience group [Figure 1A, latency of retrieving the first pup: low-experience group  $t(13) = 1.198$ ,  $p = 0.252$ ; high-experience group  $t(12) = 3.257$ ,  $p < 0.01$ ; Figure 1B, latency of retrieving the last pup: low-experience group  $t(13) = 1.088$ ,  $p = 0.296$ ; high-experience group  $t(12) = 4.165$ ,  $p < 0.01$ ].

#### The expression of c-Fos-ir neurons in the MPOA after either the initial exposure term or the re-exposure term

There was a significant effect of group on the number of c-Fos-ir neurons in all regions [medial preoptic nucleus, medial (MPOM):  $F(2, 20) = 21.933$ ,  $p < 0.01$ ; mMPOA (medial part of MPOA):  $F(2, 20) = 37.566$ ,  $p < 0.01$ ; LPO (lateral preoptic area):  $F(2, 20) = 15.303$ ,  $p < 0.01$ ]. In the MPOM, the number of c-Fos-ir neurons was higher in the low and high-experience groups compared to the non-experience group (Figure 2C,  $p < 0.01$ ). In the mMPOA and LPO, the number of c-Fos-ir neurons was higher in the low-experience group compared to the non-experience group (Figure 2C, mMPOA:  $p < 0.01$ ; LPO:  $p < 0.05$ ). In addition, the number of c-Fos-ir neurons was also higher in the high-experience group compared to the other two groups (Figure 2C, mMPOA:  $p < 0.01$ ; LPO: versus non-experience,  $p < 0.01$ ; versus low experience,  $p < 0.05$ ).

There was a significant effect of group on the number of c-Fos-ir neurons in the mMPOA [ $F(2, 22) = 6.107$ ,  $p < 0.01$ ] and LPO [ $F(2, 22) = 7.651$ ,  $p < 0.01$ ]. In both the mMPOA and LPO, the number of c-Fos-ir neurons was higher in the high-experience group compared to the low and non-experience groups (Figure 3C, MPA:  $p < 0.05$ ; LPO: non-experience group,  $p < 0.05$ ; versus low-experience group,  $p < 0.01$ ). In the MPOM, there were no significant differences [ $F(2, 22) = 0.08$ ,  $p = 0.923$ ].

#### The effect of social experience with pups on oxytocin neurons

There was a significant effect of group on the percentage of double labeled c-Fos and OT in the PVN [ $F(2, 23) = 22.662$ ,  $p < 0.01$ ] and SON [ $F(2, 23) = 4.233$ ,  $p < 0.05$ ]. In the PVN, the percentage of double-ir neurons was higher in the high-experience group compared to the low and non-experience groups (Figure 4B,  $p < 0.01$ ). In the SON, the percentage of double-ir neurons was higher in the high-experience group compared to the non-experience group (Figure 4B,  $p < 0.05$ ). In both regions, the number of c-Fos-ir neurons was also higher in the high-experience group (Figure S1 in Supplement 1). However, the number of OT-ir neurons did not differ between experience groups in either region (Figure S1 in Supplement 1).

Moreover, there was a strong correlation between the number of c-Fos-ir neurons in the MPOA and the percentage of double-ir neurons in the PVN (Figure 4C, upper figure: MPOM,  $R = 0.55$ ,  $p < 0.01$ ; mMPOA,  $R = 0.723$ ,  $p < 0.01$ ; LPO,  $R = 0.777$ ,  $p < 0.01$ ) and SON (Figure 4C, lower figure: mMPOA,  $R = 0.519$ ,  $p < 0.01$ ; LPO,  $R = 0.558$ ,  $p < 0.01$ ). When

cutting the brain sections, one sample from the high exposure group was accidentally damaged in the MPOA. Therefore, correlations were conducted using only 25 samples total.

There was a significant effect of group on the concentration of OT in the MPOA [ $F(2, 34) = 4.822, p < 0.05$ ], and the concentration of OT was higher in the high and low-experience groups compared to the non-experience group (Figure 4D,  $p < 0.05$ ).

#### **The effect of social experience with pups on OTR expressing neurons**

There was a significant effect of group on the percentage of double labeled c-Fos and OTR-venus in the MPOM [ $F(2, 19) = 12.616, p < 0.01$ ], mMPOA [ $F(2, 19) = 13.186, p < 0.01$ ], and LPO [ $F(2, 19) = 26.655, p < 0.01$ ]. In the MPOM, mMPOA, and LPO, the percentage of double-ir neurons was higher in the high-experience group compared to the other two groups (Figure 5D, MPOM and LPO: high-experience group versus low- and non-experience group,  $p < 0.01$ ; mMPOA: high-experience group versus low-experience group,  $p < 0.05$ , high-experience group versus non-experience group,  $p < 0.01$ ). The number of c-Fos-ir neurons in each area was higher in the high-experience group than the other two groups, and the number in the low-experience group was higher than the non-experience group. There was no significant difference in the number of OTR-venus-ir neurons in each area (Figure S2 in Supplemental 1). In addition, there was no significant effect of estrous cycle on the expression of OTR-venus-ir neurons (Figure S3 in Supplemental 1). Therefore, increasing the percentage of double-ir neurons is dependent on activated LPO neurons but not on changing the number of OTR expression neurons.

One-way ANOVA revealed that there was a significant effect of group on the percentage of double labeled c-Fos and OTR mRNA in the mMPOA [ $F(2, 16) = 28.590, p < 0.01$ ], and LPO [ $F(2, 16) = 27.620, p < 0.01$ ]. In the mMPOA and LPO, the percentage of double-ir neurons was higher in the high-experience group compared to the other two groups (Figure 5E,  $p < 0.01$ ).

#### **The effect of an oxytocin antagonist on the facilitating effect of social experience on retrieving behavior**

The latencies of retrieving behaviors in the re-exposure term were significantly shorter compared to the initial exposure term in the saline group [Figure 6B, latency of retrieving first pup: saline:  $t(16) = 5.804, p < 0.01$ ; latency of retrieving last pup:  $t(16) = 5.375, p < 0.01$ ]. Conversely, the latencies of retrieving the first pup in the OTA group were significantly increased in the re-exposure term compared to the initial exposure term [Figure 6B,  $t(12) = -4.768, p < 0.01$ ]. In addition, the latencies of retrieving the last pup in the OTA group did not change [Figure 6B,  $t(12) = -0.78, p = 0.45$ ].

An OTA was also injected before the re-exposure term. The latencies of retrieving the first pup in both the OTA and saline group were decreased in the re-exposure term compared to the initial exposure term [Figure 6D, OTA:  $t(8) = 2.89, p < 0.05$ ; saline:  $t(4) = 2.82, p < 0.05$ ]. In addition, the latencies of retrieving the last pup in the saline group showed a decreased trend in the re-exposure term [Figure 6D,  $t(4) = 2.748, p = 0.051$ ]. However, in the OTA group, there were no significant differences in the latencies of retrieving the last pup between the initial and re-exposure terms [Figure 6D,  $t(8) = 1.577, p = 0.153$ ].

#### **Discussion**

Neglect of infants is a crucial issue that needs to be addressed not only in human society but also in animal management. We recently proposed there is a positive-loop that exists between a parent and an infant, such that social and affiliative interactions within the parent–infant dyad facilitate bonding between them, resulting in more frequent parental behavior (11). Better understanding of the neural mechanisms involved in the positive-loop that facilitate parenting behavior could potentially be useful in identifying a solution to neglect. With this aim, the present study revealed the influence of OT on the MPOA in facilitating parental behavior.

Through the acquisition of social experience with pups, latencies of parental retrieving behaviors were reduced. In addition, more social experience with pups also resulted in higher density of c-Fos expression in the MPOA. These results suggest that behavioral and neural changes in the MPOA increased and depended on the amount of social experience

with pups. Interestingly, in the re-exposure term, when the high-experience group showed increased retrieving behavior, increased neural activity was also observed in the mMPOA and LPO, but not in the MPOM. This result suggests that there were regional differences with respect to retrieving behavior control, and is supported by literature that shows the distribution of c-Fos expressing neurons differs between subregions during maternal behavior (32, 33). For example, postpartum mice, which may have increased parental motivation, showed a high density of c-Fos-ir neurons in the lateral area of the POA following exposure to pups (34). Moreover, lesion of the lateral part of the POA has been shown to disrupt maternal behavior in rats (16). Furthermore, in contrast to LPO, the central part of the MPOA (cMPOA), a region that may be involved in the mMPOA in our study, has been shown to suppress infanticidal behavior (34, 35). It is possible that the cMPOA controls aggressive motivation toward pups, while the LPO facilitates and/or maintains parental motivation. Several studies have used the optogenetic method to control for specific neurons in the MPOA (36, 37). This type of procedure could be useful to further clarify the roles of subregions in parental behavior.

This study further showed that OT systems are key mechanism in the regulation of retrieving behaviors induced by social experience with pups. Changes in retrieving behaviors, c-Fos expression in the MPOA, and the percentage of double positive neurons in the PVN and SON were related. Activation of OT system was increased by social contact, such as vaginocervical stimulation, mating, suckling, and touching (38–44). OT release facilitates affiliative behaviors (45). It is highly likely that repeated pup exposure with direct contact facilitates retrieving responsiveness via OT release from OT neurons. This possibility is confirmed by the increased OT concentration in the MPOA that followed social experience. However, there was some discrepancy in the relationship between the facilitating effect of pup exposure and OT concentration in the MPOA. We expected that the high-experience group would show the highest OT concentration, but the high and low-experience groups did not differ in OT concentration. One possible explanation for unexpected result could be the timing of extraction of brain tissue for EIA. In this experiment, brain tissue was sampled after 20 min from exposure to the last pup. Therefore, there was a large difference in the period of time from the beginning of initial pup exposure to the removal of brain tissue between the high and low-experience groups. Future studies are needed to investigate the time course of OT release using high time resolution methods such as microdialysis or calcium imaging.

It is also known that the actions of OT are mediated by binding to OTRs. Therefore, we additionally examined c-Fos expression in OTR-venus-ir neurons and OTR mRNA-ir neurons in the MPOA. We found the high-experience group showed a higher percentage of double positive neurons particular in the LPO. These results revealed for the first time that social experience with pups activates OTR expressing neurons in specific regions of the MPOA. There are large numbers of OT fibers that project to the pituitary from the PVN, near the LPO (46), and OT can be released somatodendritically from magnocellular OT neurons (47, 48). Therefore, it is possible that OT sensitive neurons in the LPO were activated by OT that diffused from dendrites or from passing fibers. This theory is further supported by the suppression effect of OTA in the MPOA. This result is also supported by previous studies that reported the onset of maternal behavior was facilitated by injection of OT (49) or delayed by injection of an OTA (50). We additionally revealed that the facilitating effect of social experience was blocked by an OTA. Conversely, injection of an OTA before the re-exposure term did not prolong the latency. It is possible that OT is not essential for the established behavior, but rather might be critical in the initial processing or encoding of social cues and behavior (51–53). These results strongly support the idea that OT is an important trigger for facilitating retrieving behavior.

## References

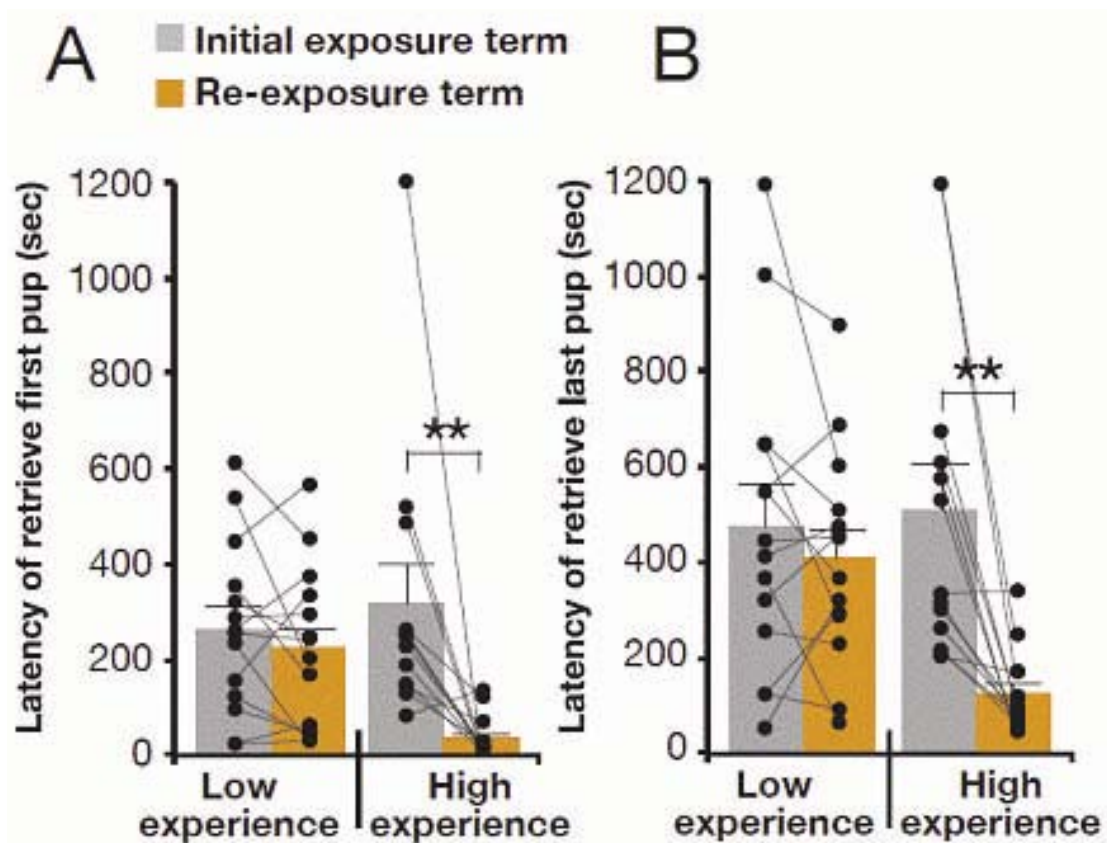
1. Strathearn L, Gray PH, O'Callaghan MJ, Wood DO (2001): Childhood neglect and cognitive development in extremely low birth weight infants: a prospective study. *Pediatrics* 108: 142–151.
2. Kotch JB, Lewis T, Hussey JM, English D, Thompson R, Litrownik AJ, et al. (2008): Importance of early neglect for childhood aggression. *Pediatrics* 121: 725–731.
3. Mills R, Alati R, O'Callaghan M, Najman JM, Williams GM, Bor W, et al. (2011): Child abuse and neglect and cognitive

- function at 14 years of age: findings from a birth cohort. *Pediatrics* 127: 4–10.
4. Gandelman R (1972): Induction of pup killing in female mice by androgenization. *Physiol Behav* 9: 101–102.
  5. Svare B (1979): Steroidal influences on pup-killing behavior in mice. *Horm Behav* 13: 153–164.
  6. Koch M, Ehret G (1989): Estradiol and parental experience, but not prolactin are necessary for ultrasound recognition and pup-retrieving in the mouse. *Physiol Behav* 45: 771–776.
  7. Reburn CJ, Wynne-Edwards KE (1999): Hormonal changes in males of a naturally biparental and a uniparental mammal. *Horm Behav* 35: 163–176.
  8. Lonstein JS, De Vries GJ (2000): Sex differences in the parental behavior of rodents. *Neurosci Biobehav Rev* 24: 669–686.
  9. Okabe S, Nagasawa M, Kihara T, Kato M, Harada T, Koshida N, et al. (2010): The effects of social experience and gonadal hormones on retrieving behavior of mice and their responses to pup ultrasonic vocalizations. *Zoolog Sci* 27: 790–795.
  10. Okabe S, Kitano K, Nagasawa M, Mogi K, Kikusui T (2013): Testosterone inhibits facilitating effects of parenting experience on parental behavior and the oxytocin neural system in mice. *Physiol Behav* 118: 159–164.
  11. Nagasawa M, Okabe S, Mogi K, Kikusui T (2012): Oxytocin and mutual communication in mother-infant bonding. *Front. Hum. Neurosci* 6: 1–9.
  12. Numan M (1974): Medial preoptic area and maternal behavior in the female rat. *J Comp Physiol Psychol* 87: 746–759.
  13. Numan M, Rosenblatt JS, Komisaruk BR (1977): Medial preoptic area and onset of maternal behavior in the rat. *J Comp Physiol Psychol* 91: 146–164.
  14. Jacobson CD, Terkel J, Gorski RA, Sawyer CH (1980): Effects of small medial preoptic area lesions on maternal behavior: retrieving and nest building in the rat. *Brain Res* 194: 471–478.
  15. Fleming AS, Miceli M, Moretto D (1983): Lesions of the medial preoptic area prevent the facilitation of maternal behavior produced by amygdala lesions. *Physiol Behav* 31: 503–510.
  16. Numan M, Corodimas KP, Numan MJ, Factor EM, Piers WD (1988): Axon-sparing lesions of the preoptic region and substantia innominata disrupt maternal behavior in rats. *Behav Neurosci* 102: 381–396.
  17. Arrati PG, Carmona C, Dominguez G, Beyer C, Rosenblatt JS (2006): GABA receptor agonists in the medial preoptic area and maternal behavior in lactating rats. *Physiol Behav* 87: 51–65.
  18. Pereira M, Morrell JI (2009): The changing role of the medial preoptic area in the regulation of maternal behavior across the postpartum period: facilitation followed by inhibition. *Behav Brain Res* 205: 238–248.
  19. Fahrbach SE, Pfaff DW (1986): Effect of preoptic region implants of dilute estradiol on the maternal behavior of ovariectomized, nulliparous rats. *Horm Behav* 20: 354–363.
  20. Bridges RS, Numan M, Ronsheim PM, Mann PE, Lupini CE (1990): Central prolactin infusions stimulate maternal behavior in steroid-treated, nulliparous female rats. *Proc Natl Acad Sci USA* 87: 8003–8007.
  21. Insel TR (1990): Regional changes in brain oxytocin receptors post-partum: time-course and relationship to maternal behavior. *J Neuroendocrinol* 2: 539–545.
  22. Landgraf R, Neumann I, Russell J, Pittman Q (1992): Push-pull perfusion and microdialysis studies of central oxytocin and vasopressin release in freely moving rats during pregnancy, parturition, and lactation. *Ann NY Acad Sci* 652: 326–339.
  23. Zimmerman EA, Nilaver G, Hou-Yu A, Silverman AJ (1984): Vasopressinergic and oxytocinergic pathways in the central nervous system. *Fed Proc* 43: 91–96.
  24. Ludwig M (1998): Dendritic release of vasopressin and oxytocin. *J Neuroendocrinol* 10: 881–895.
  25. Yoshida M, Takayanagi Y, Inoue K, Kimura T, Young LJ, Onaka T, et al. (2009): Evidence that oxytocin exerts anxiolytic effects via oxytocin receptor expressed in serotonergic neurons in mice. *J Neurosci* 29: 2259–2271.
  26. Donaldson ZR, Young LJ (2008): Oxytocin, vasopressin, and the neurogenetics of sociality. *Science* 322: 900–904.

27. Kelly AM, Goodson JL (2014): Social functions of individual vasopressin-oxytocin cell groups in vertebrates: what do we really know? *Front Neuroendocrinol* 35: 512–529.
28. Onaka T, Takayanagi Y, Yoshida M (2012): Roles of oxytocin neurons in the control of stress energy metabolism, and social behaviour. *J Neuroendocrinol* 24: 587–598.
29. Takayanagi Y, Yoshida M, Bielsky IF, Ross HE, Kawamata M, Onaka T, et al. (2005): Pervasive social deficits, but normal parturition, in oxytocin receptor-deficient mice. *Proc Natl Acad Sci USA* 102: 16096–16101.
30. Feldman R, Gordon I, Zagoory-Sharon O (2010): The cross-generation transmission of oxytocin in humans. *Horm Behav* 58: 669–676.
31. Nagasawa M, Mitsui S, En S, Ohtani N, Ohta M, Sakuma Y, et al. (2015): Oxytocin-gaze positive loop and the coevolution of human-dog bonds. *Science* 348: 333–336.
32. Li C, Chen P, Smith MS (1999): Neural populations in the rat forebrain and brainstem activated by the suckling stimulus as demonstrated by cFos expression. *Neuroscience* 94: 117–129.
33. Sheehan TP, Cirrito J, Numan MJ, Numan M (2000): Using c-Fos immunocytochemistry to identify forebrain regions that may inhibit maternal behavior in rats. *Behav Neurosci* 114: 337–352.
34. Tsuneoka Y, Maruyama T, Yoshida S, Nishimori K, Kato T, Numan M, et al. (2013): Functional, anatomical, and neurochemical differentiation of medial preoptic area subregions in relation to maternal behavior in the mouse. *J Comp Neurol* 521: 1633–1663.
35. Tsuneoka Y, Tokita K, Yoshihara C, Amano T, Esposito G, Huang AJ, et al. (2015): Distinct preoptic-BST nuclei dissociate paternal and infanticidal behavior in mice. *EMBO J* 34: 2652–2670.
36. Wu Z, Autry AE, Bergan JF, Watanabe-Uchida M, Dulac G (2014): Galanin neurons in the medial preoptic area govern parental behaviour. *Nature* 509: 325–330.
37. Scott N, Prigge M, Yizhar O, Kimchi T (2015): A sexually dimorphic hypothalamic circuit controls maternal care and oxytocin secretion. *Nature* 525: 519–522.
38. Kendrick KM, Keverne EB, Baldwin BA, Sharman DF (1986): Cerebrospinal fluid levels of acetylcholinesterase, monoamines and oxytocin during labour, parturition, vaginocervical stimulation, lamb separation and suckling in sheep. *Neuroendocrinology* 44: 149–156.
39. Sansone GR, Gerdes CA, Steinman J, Winslow JT, Ottenweller JE, Komisaruk BR, et al. (2002): Vaginocervical stimulation releases oxytocin within the spinal cord in rats. *Neuroendocrinology* 75: 306–315.
40. Waldherr M, Neumann ID (2007): Centrally released oxytocin mediates mating-induced anxiolysis in male rats. *Proc Natl Acad Sci USA* 104: 16681–16684.
41. Neumann I, Russell JA, Landgraf R (1993): Oxytocin and vasopressin release within the supraoptic and paraventricular nuclei of pregnant, parturient and lactating rats: a microdialysis study. *Neuroscience* 53: 63–75.
42. Moos F, Poulain DA, Rodriguez F, Guerné Y, Vincent JD, Richard P (1989): Release of oxytocin within the supraoptic nucleus during the milk ejection reflex in rats. *Exp Brain Res* 76: 593–602.
43. Landgraf R, Neumann ID (2004): Vasopressin and oxytocin release within the brain: a dynamic concept of multiple and variable modes of neuropeptide communication. *Front Neuroendocrinol* 25: 150–176.
44. Okabe S, Yoshida M, Takayanagi Y, Onaka T (2015): Activation of hypothalamic oxytocin neurons following tactile stimuli in rats. *Neurosci Lett* 600: 22–27.
45. Young LJ, Wang Z (2004): The neurobiology of pair bonding. *Nat Neurosci* 7: 1048–1054.
46. Knobloch HS, Grinevich V (2014): Evolution of oxytocin pathways in the brain of vertebrates. *Front Behav Neurosci* 8: 1–13.
47. Landgraf R, Neumann ID (2004): Vasopressin and oxytocin release within the brain: a dynamic concept of multiple and variable modes of neuropeptide communication. *Front Neuroendocrinol* 25: 150–176.
48. Russell J, Leng G, Douglas AJ (2003): The magnocellular oxytocin system, the fount of maternity: adaptations in

pregnancy. *Front Neuroendocrinol* 24: 27–61.

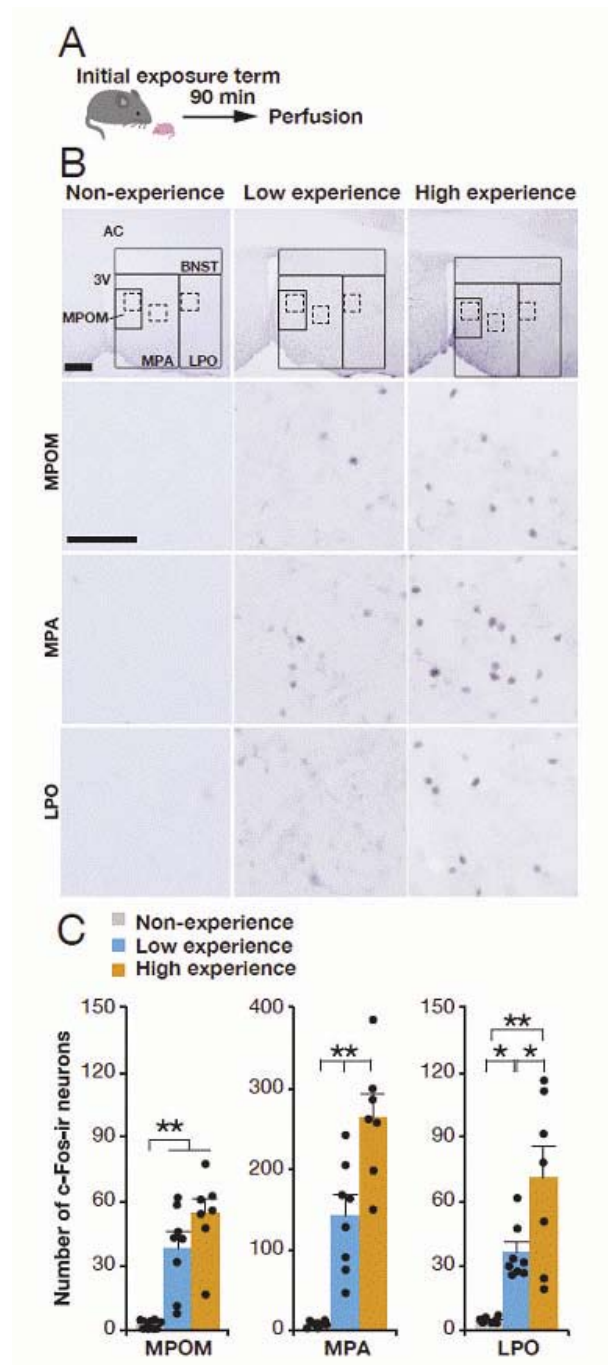
49. Fahrbach SE, Morrell JI, Pfaff DW (1984): Oxytocin induction of short-latency maternal behavior in nulliparous, estrogen-primed female rats. *Horm Behav* 18: 267–286.
50. Pedersen CA, Caldwell JD, Walker C, Ayers G, Mason GA (1994): Oxytocin activates the postpartum onset of rat maternal behavior in the ventral tegmental and medial preoptic areas. *Behav Neurosci* 108: 1163–1171.
51. Fahrbach SE, Morrell JI, Praff DW (1985): Possible role for endogenous oxytocin in estrogen-facilitated maternal behavior in rats. *Neuroendocrinology* 40: 526–532.
52. Ferguson JN, Aldag JM, Insel TR, Young LJ (2001): Oxytocin in the medial amygdala is essential for social recognition in the mouse. *J Neurosci* 21: 8278–8285.
53. Bielsky IF, Young LJ (2004): Oxytocin, vasopressin, and social recognition in mammals. *Peptides* 25: 1565–1574.
54. Feldman R, Weller A, Zagoory-Sharon O, Levine A (2007): Evidence for a neuroendocrinological foundation of human affiliation: plasma oxytocin levels across pregnancy and the postpartum period predict mother-infant bonding. *Psychol Sci* 18: 965–970.



**Figure 1. Social experience with pups shortened retrieving latencies.**

This figure depicts latencies of retrieving the first (A) and last (B) pup in the low- ( $n = 14$ ) and high-experience groups ( $n = 13$ ). In both groups, subjects were exposed to three pups, and the latencies of retrieving the first and last pups were measured. In the high-experience group, subjects were additionally exposed to the same three pups, 5 times. This procedure was defined as the “initial exposure term.” Four days after the initial exposure term, subjects were re-exposed to three pups, and the latencies of retrieving were again measured. This procedure was defined as the “re-exposure term.” The high-experience group, but not the low-experience group, showed significantly shorter retrieving latencies in the re-exposure term compared to the initial exposure term.  $**p < 0.01$ , paired t-tests examined differences between exposure terms. Error bars denote mean  $\pm$  standard error of the mean (SEM).



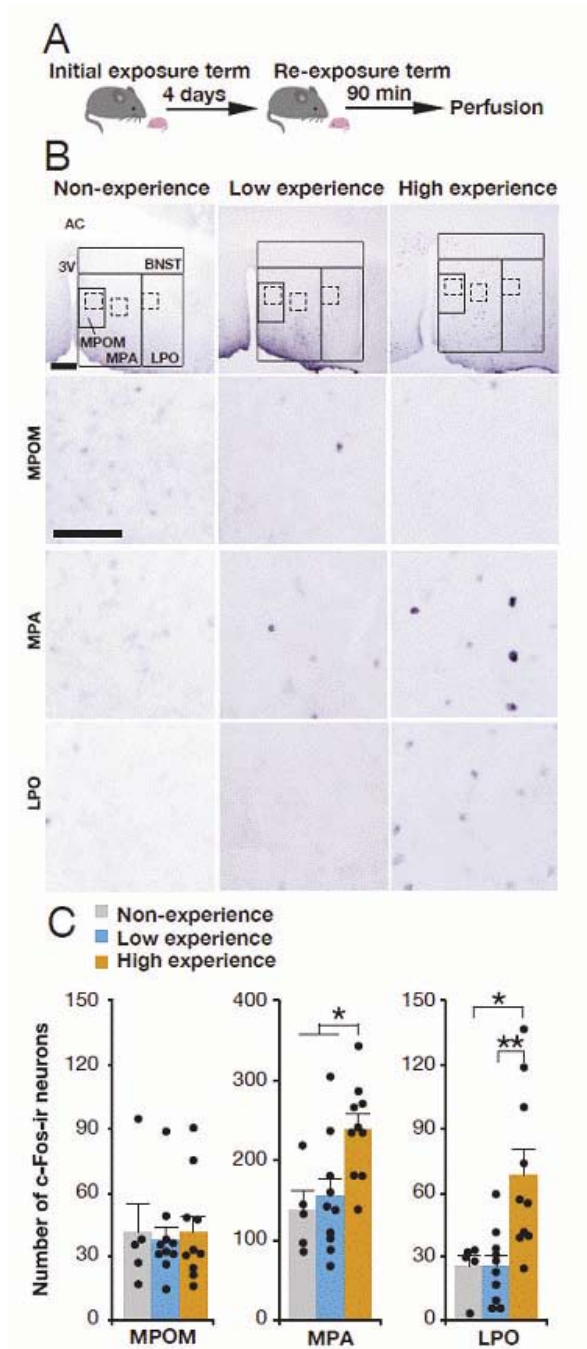


**Figure 2. Social experience with pups induced a high density of c-Fos in the whole medial preoptic area (MPOA).**

(A) In the initial exposure term, the low-experience group ( $n = 8$ ) was exposed to three pups only once for 20 min. The high-experience group ( $n = 7$ ) was additionally exposed to three pups for 20 min, 5 times. The non-experience group ( $n = 8$ ) was not exposed to pups. Ninety min after the initial exposure term, subjects in all three groups were perfused.

(B) Depiction of c-Fos immunohistochemistry in the MPOA after the initial exposure term in the three experimental groups. The MPOA was divided into three subregions based on the brain atlas: medial preoptic nucleus, medial (MPOM), medial part of MPOA (mMPOA), and lateral preoptic area (LPO). Enlarged views of dash square areas are shown below each picture. The scale bar in the wide-angle picture is  $200 \mu\text{m}$ , and in the enlarged picture is  $50 \mu\text{m}$ .

Quantification of the number of c-Fos-immunoreactivity (ir) neurons in the MPOM, mMPOA, and LPO of the non-experience (gray bars), low-experience (blue bars), and high-experience (orange bars) groups. The number of c-Fos-ir neurons in the whole MPOA increased and was dependent on the amount of social experience with pups.  $*p < 0.05$ ,  $**p < 0.01$ , one-way analysis of variance (ANOVA) with post hoc Bonferroni tests. Error bars denote mean  $\pm$  standard error of the mean (SEM).

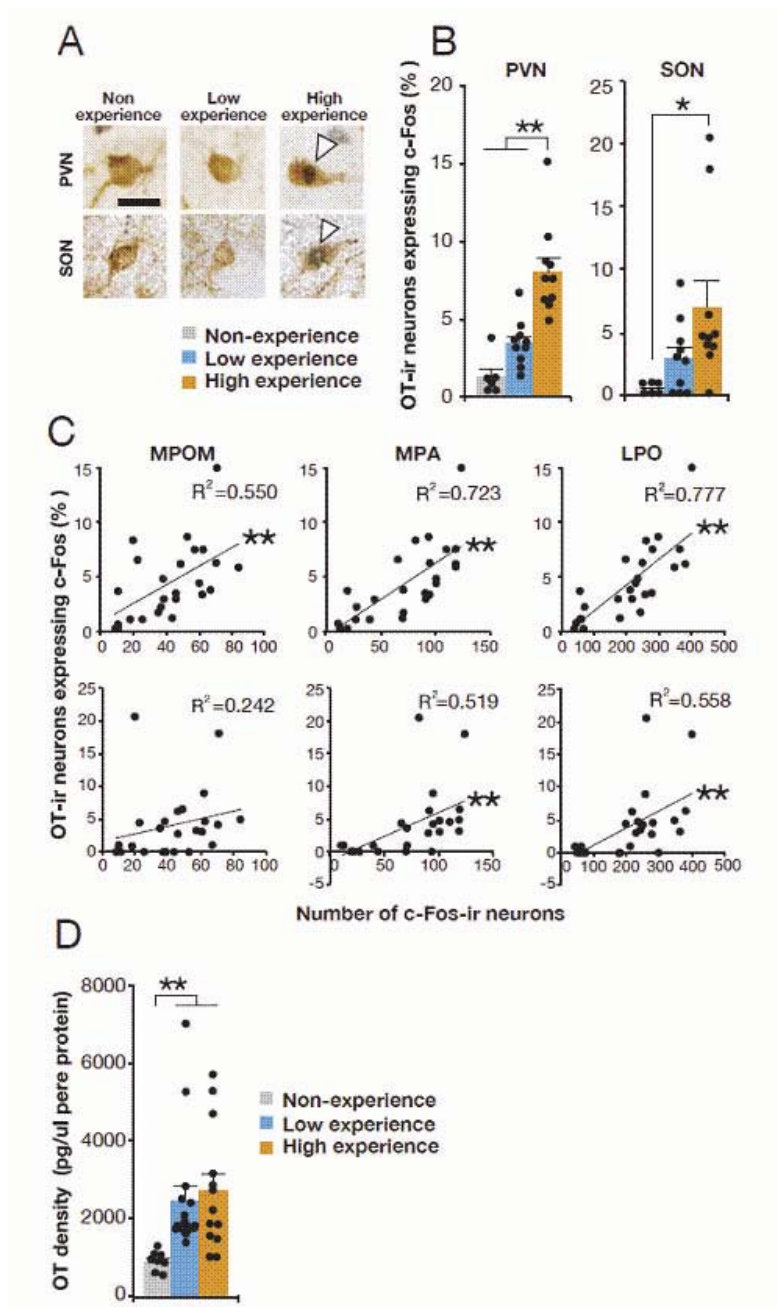


**Figure 3. Social experience with pups induced high density of c-Fos in the medial part of MPOA (mMPOA) and lateral preoptic area (LPO) in the re-exposure term.**

(A) Four days after the initial exposure term, subjects in the non-experience ( $n = 5$ ), low-experience ( $n = 10$ ), and high-experience ( $n = 10$ ) groups were exposed to three pups for 5 min. Ninety min after the re-exposure term, subjects from all three groups were perfused.

(B) c-Fos immunohistochemistry in the MPOA after the re-exposure term in the three experimental groups. Enlarged views of dash square areas are shown below each picture. The scale bar in the wide-angle picture is  $200 \mu\text{m}$ , and in the enlarged picture is  $50 \mu\text{m}$ .

(C) Quantification of the number of c-Fos-immunoreactivity (ir) neurons in the medial preoptic nucleus, medial (MPOM), mMPOA, and LPO of the non-exposure (gray bars), low exposure (blue bars), and high exposure (orange bars) groups. The high-experience group showed a higher number of c-Fos-ir neurons in the mMPOA and LPO, but not in the MPOM.  $*p < 0.05$ ,  $**p < 0.01$ , one-way analysis of variance (ANOVA) with post hoc Bonferroni tests. Error bars denote mean  $\pm$  standard error of the mean (SEM).



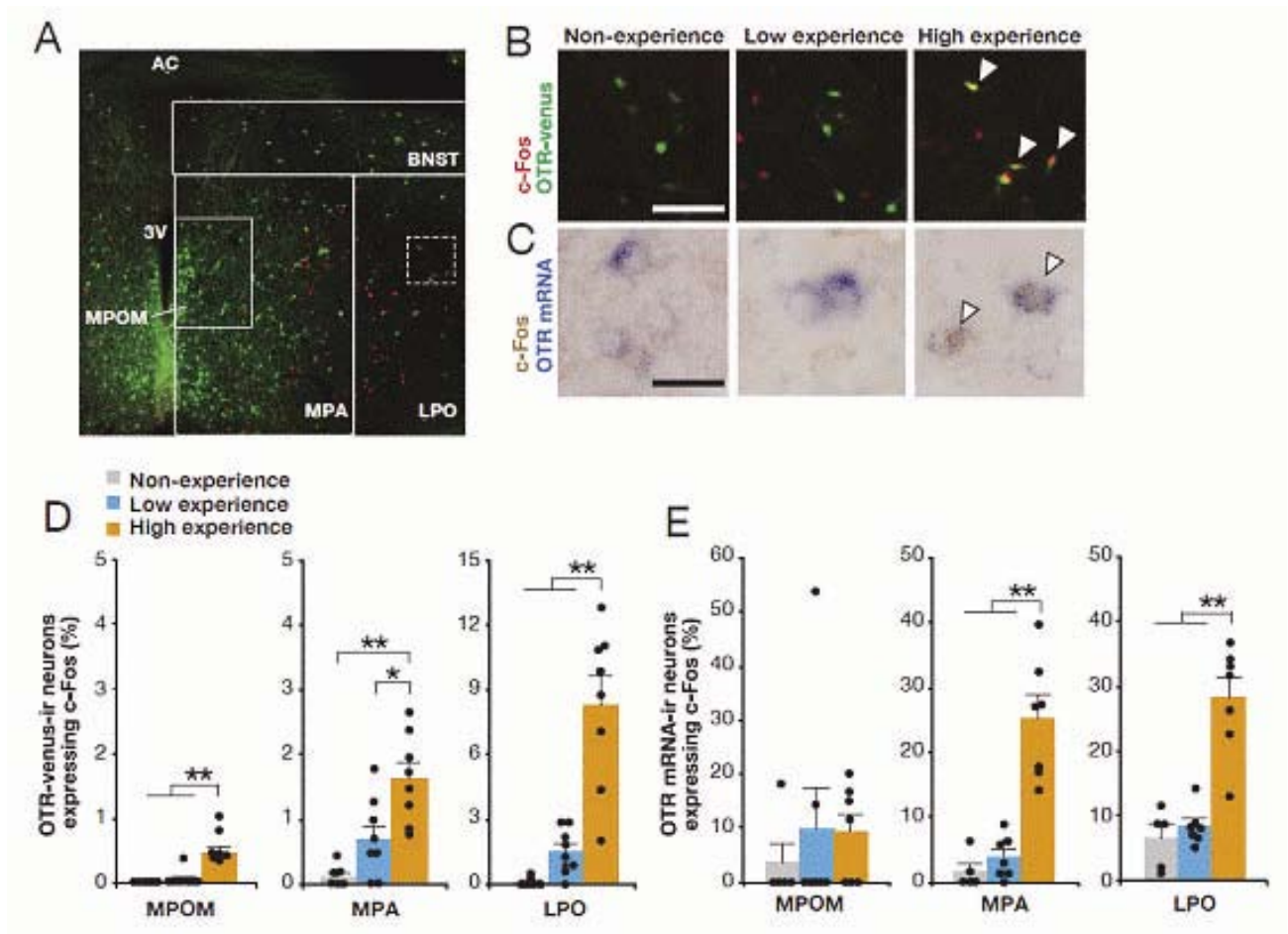
**Figure 4. Social experience with pups induced neural activity in oxytocin (OT) neurons.**

(A) Expression of c-Fos in OT-immunoreactivity (ir) neurons in the paraventricular nuclei (PVN) and supraoptic nuclei (SON) following the initial exposure term in the non-experience, low experience, and high-experience groups. The arrowheads indicate double-labeled neurons. The scale bar is  $12.5 \mu\text{m}$ .

(B) Quantification of the percentage of OT-ir neurons expressing c-Fos in the PVN and SON in the non-experience (gray bars,  $n = 6$ ), low-experience (blue bars,  $n = 10$ ), and high-experience (orange bars,  $n = 10$ ) groups. Social experience with pups activated OT-ir neurons in both regions. \* $p < 0.05$ , \*\* $p < 0.01$ , one-way analysis of variance (ANOVA) with post hoc Bonferroni tests. Error bars denote mean  $\pm$  standard error of the mean (SEM).

(C) Correlations between the number of c-Fos-ir neurons in the medial preoptic area (MPOA) and the percentage of OT-ir neurons expressing c-Fos in the PVN ( $n = 25$ , upper panel) and SON ( $n = 25$ , lower panel). There were positive correlations in both regions. \*\* $p < 0.01$ , Pearson's correlation coefficient.

Quantification of the OT concentration in the MPOA after the initial exposure term in the non-experience (gray bars,  $n = 8$ ), low-experience (blue bars,  $n = 16$ ), and high-experience (orange bars,  $n = 13$ ) groups. Social experience induced a higher concentration of OT in the MPOA. \*\* $p < 0.01$ , one-way ANOVA with post hoc Bonferroni tests. Error bars denote mean  $\pm$  SEM.



**Figure 5. Social experience with pups induced c-Fos in oxytocin receptor (OTR) expressing neurons.**

(A) c-Fos (red) and OTR-venus (green) expression in the medial preoptic area (MPOA) in the high exposure group. The scale bar is 200  $\mu\text{m}$ .

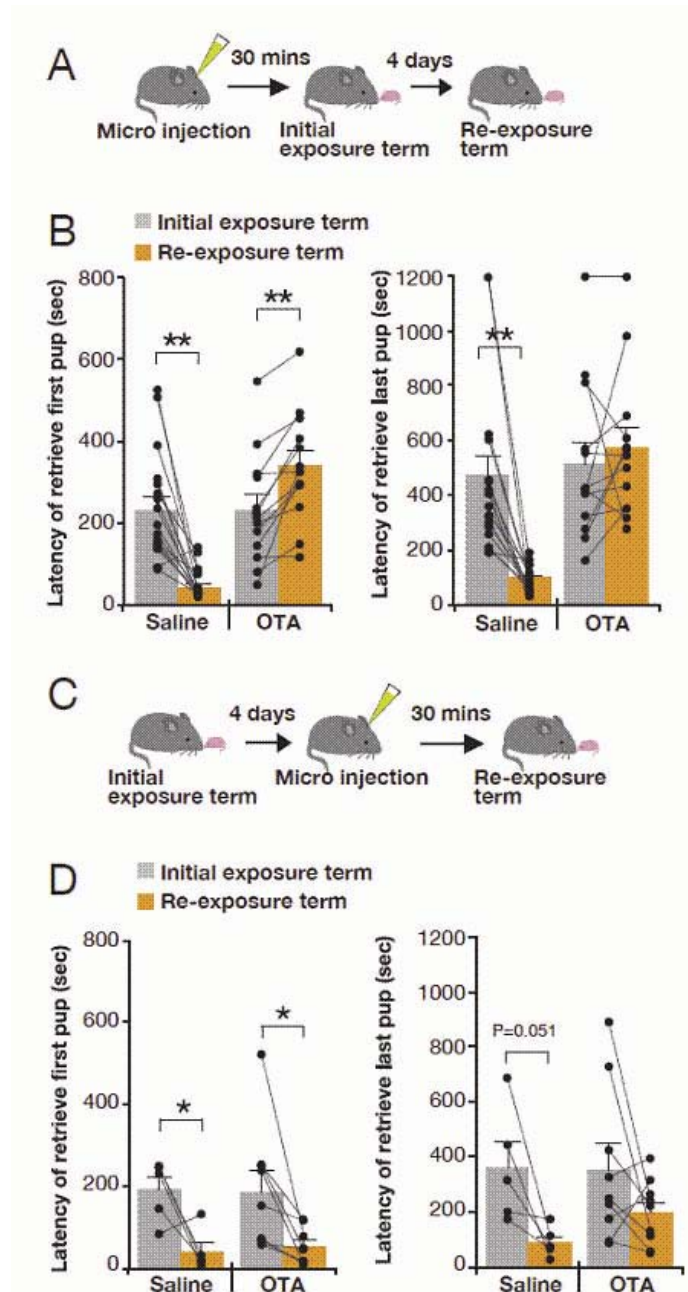
(B) c-Fos (red) and OTR-venus (green) expression in the lateral preoptic area (LPO) in the non-experience, low-experience, and high-experience groups. The picture of the high-experience group was magnified from dashed square areas in (A). The scale bar is 50  $\mu\text{m}$ .

(C) c-Fos (brown) and OTR-messenger ribonucleic acid (mRNA; blue) expression in the LPO in the non-experience, low experience, and high-experience groups. The scale bar is 12.5  $\mu\text{m}$ .

(D) Quantification of the percentage of OTR-venus-immunoreactivity (ir) neurons expressing c-Fos in the medial preoptic nucleus, medial (MPOM), medial part of MPOA (mMPOA), and LPO in the non-experience (gray bars,  $n = 6$ ), low-experience (blue bars,  $n = 8$ ), and high-experience (orange bars,  $n = 8$ ) groups. Social experience with pups activated the OTR-venus expressing neurons.  $*p < 0.05$ ,  $**p < 0.01$ , one-way analysis of variance (ANOVA) with post hoc Bonferroni tests. Error bars denote mean  $\pm$  standard error of the mean (SEM).

(E) Quantification of the percentage of OTR mRNA-ir neurons expressing c-Fos protein in the MPOM, mMPOA, and LPO in the non-experience (gray bars,  $n = 5$ ), low-experience (blue bars,  $n = 7$ ), and high-experience (orange bars,  $n = 7$ ) groups. Social experience with pups activated the OTR mRNA expressing neurons.  $**p < 0.01$ , one-way ANOVA with post hoc Bonferroni tests. Error bars denote mean  $\pm$  SEM.





**Figure 6. An oxytocin antagonist (OTA) suppresses the facilitating effects of social experience with pups on retrieving behavior.**

(A) Subjects were injected with an OTA (OTA,  $n = 13$ ) or control saline (saline,  $n = 17$ ). Thirty min after the injection, subjects were exposed to three pups 6 times similar to the high-experience group. Four days after the initial exposure term, subjects were re-exposed to three pups and latencies of retrieving the first and last pups were measured.

(B) Depiction of the latencies of retrieving the first and last pups in the OTA and saline groups. In the saline group, both latencies of retrieving the first and last pups were significantly shorter in the re-exposure term compared to the initial exposure term. In the OTA group, latencies of retrieving the first pup were significantly longer in the re-exposure term compared to the initial exposure term.  $**p < 0.01$ , paired t-tests assessed differences between exposure terms. Error bars denote mean  $\pm$  standard error of the mean (SEM).

(C) Mice were exposed to three pups 6 times similar to the high-experience group. Four days after the initial exposure term, mice were injected with an OTA ( $n = 9$ ) or saline ( $n = 5$ ). Thirty min after the injection, subjects were exposed to three pups and the latencies of retrieving the first and last pups were measured.

Depiction of the latencies of retrieving the first and last pups in the OTA and saline groups. Both the OTA and saline groups show significantly shorter latencies of retrieving the first pup.  $*p < 0.05$ , paired t-tests examined the differences between exposure terms. Error bars denote mean  $\pm$  SEM.

## ○プロジェクト No. P 15－02

### 研究テーマ

#### 早期離乳ストレスによる行動神経への影響の解析

研究期間：平成27年4月1日～平成30年3月31日

プロジェクト班長：菊水健史（獣医学部）

プロジェクト班員：茂木一孝（獣医学部）

プロジェクト班員：永澤美保（獣医学部）

### 要旨

マウスにおいて、通常の離乳時期よりも早く人為的に離乳すると、離乳後のコルチコステロンの過剰分泌、不安行動の増強、前頭葉のBDNF蛋白質の減少がおきることが明らかとなっている。一方で、早期離乳されたマウスにBDNF蛋白質の脳室内投与を行うと、不安行動が改善されることが認められている。本研究では、BDNF蛋白質と同様の機能をもつ7,8-DHFによって、早期離乳による不安行動の改善が認められるかを調べた。早期離乳操作と同時にマウスの前頭葉に7,8-DHFの薬剤シートを埋め込み、性成熟した後、高架式十字迷路試験による不安行動の評価と、BDNF蛋白質のmRNA量の測定を行った。

その結果13日齢で早期離乳した群において通常離乳群に比べて不安行動が上昇する傾向がみられた。また、7,8-DHF薬剤シートを埋めた群では早期離乳の影響が改善される傾向が認められた。これにより、早期離乳による不安上昇に対して7,8-DHFが改善効果をもつ可能性が示された。

### 緒言

BDNFは、神経可塑性、ニューロン新生、細胞生存、ストレス抵抗性に関わる分泌性蛋白質として明らかにされてきたニューロトロフィンファミリーの一員であり、神経系の発達や記憶、学習、薬物依存のような中枢の可塑性メカニズムにおいて重要な役割を担っている。BDNF蛋白質発現の変化は、うつ病、てんかん、アルツハイマー、ハンチントン症、パーキンソン病などの疾患とも関与している<sup>(1)</sup>。BDNFは、複雑な遺伝子構造と発現調節機構を持ち、マウスでは、最低でも5つのプロモーター領域の存在が知られている。各々のプロモーターは、短い5' noncoding exonから転写され、共通の3' coding exonと組み合わさる。こうして作られた5種類のプロモーター由来BDNF mRNAがBDNF蛋白質をコードすることが明らかになっている。5種類のプロモーター由来BDNF mRNAのうち、プロモーター4由来のBDNF mRNAは、DNAの遺伝情報をRNAに転写する際に関与する転写因子であるcalcium-response factor (CaRF)、methyl-CpG-binding protein 2 (MeCP2)、upstream stimulatory factors (USFs)、そして、calcium/cyclic adenosine monophosphate (cAMP)-responsive element binding protein (CREB)、の結合部位を持つため、BDNF発現調節部位であると考えられている<sup>(2)</sup>。

各々のプライマーに由来するBDNF mRNAは、粗面小胞体においてproBDNF蛋白質へと翻訳され、ゴルジ装置を経て、トランスゴルジネットワーク (TGN) に畳みこまれ、分泌小胞に包まれた状態で、外部刺激に依存する調節性分泌経路に送られる。proBDNF蛋白質を含んだ小胞体は、樹状突起や樹状突起棘、軸索や末端に輸送され、プラスミンなどの細胞外プロテアーゼによって成熟BDNF蛋白質に変換される。proBDNF蛋白質は、アポトーシスの誘発に必要な構造であるデスドメインを有するp75NTRと結合して、アポトーシスに関与する。一方、成熟BDNF蛋白質は、細胞の分裂、分化、形態形成で重要な役割を持つtropomyosin-related kinase B (TrkB) と高親和結合し、細胞生存、神経可塑性などに関与することが分かっている。このように、proBDNF蛋白質と成熟BDNF蛋白質は細胞に対して正反対の作用を有する。しかし、proBDNF蛋白質と成熟BDNF蛋白質を分けて測定することは困難であり、多くの研究では、proBDNF蛋白質と成熟BDNF蛋白質を合わせて測定し、BDNF蛋白質としてみなして効果や機能について解明している<sup>(3)</sup>。

成熟BDNF蛋白質はTrkBと結合することによって、TrkBの二量体化及び自己リン酸化を誘発し、phosphatidylinositol 3-kinase (PI3K) カスケード、extracellular signal-regulated kinase (ERK) カスケード、

Phospholipase C gamma 1 (PLC $\gamma$ ) カスケード以上の計3つのシグナル伝達カスケードを活性化させる。これらのカスケードは、CREBのような転写因子を活性化し、最終的に神経可塑性、ニューロン新生、細胞生存、ストレス抵抗性といったBDNF機能を発揮する<sup>(2,3)</sup>。また、これらのカスケードは、異なる作用を有することが明らかとなっている。PI3KカスケードとERKカスケードは、神経保護および神経生存に関与し、PLC $\gamma$ 経路はCa<sup>2+</sup>濃度の増加を引き起こすと報告されている。BDNFカスケードが活性化するCREBのような転写因子は、BDNFの転写活性も制御するため、BDNFとTrkBの結合や、以後に生じるカスケードの活性化は、正のフィードバックとして作用し、BDNFの増加を導くと考えられる<sup>(2,3)</sup>。

BDNFはうつ病、てんかん、アルツハイマー、ハンチントン症、パーキンソン病などの疾患との関連が指摘されているため、治療での応用が注目を集めている<sup>(1)</sup>。しかし、消化酵素の分解を受ける、半減期が短い、高分子であるため脳血液関門を通過できないなど、運搬に関する薬物動態的な問題をBDNFは有しているため、経口投与や全身性投与が困難であり、実際に臨床実験で望ましい結果は得られていない。近年、BDNFの特異的受容体であるTrkBと高親和性結合をもつ刺激薬として7,8-dihydroxyflavone（以下、7,8-DHF）というフラボン誘導体の一種が報告された<sup>(4)</sup>。7,8-DHFは、BDNFと同様に、TrkBの二量体化形成、自己リン酸化、シグナル伝達カスケードの活性化などを誘発し、細胞生存や神経保護のようなBDNFの機能を有している。また、7,8-DHFは低分子であるために脳血液関門を通過できるなど、BDNFが持つ薬物動態的問題を克服している上、実際に興奮毒性からの神経保護作用、脳卒中やパーキンソン病動物モデルに対する治療効果が認められているため、BDNFに関する疾患の治療薬として期待されている。げっ歯類においては、早期離乳されたマウスに7,8-DHFの全身性投与により外因性BDNF様刺激を与えると、早期離乳による不安行動の増加が改善できることが判明している（未発表データ）。

先行研究から、早期離乳されたオスマウスは、前頭前野においてBDNF mRNA及びBDNF蛋白質の発現が減少することが明らかとなっている<sup>(5)</sup>。これらのことから、早期離乳オスマウスで観察される不安行動の増加に関与する脳部位が前頭前野であると考えられる。本実験では、早期離乳された時点で、早期離乳群あるいは親同居群の仔マウスに7,8-DHFあるいは溶媒の薬剤シートを前頭前野へ局所移植することで、前頭前野局所的に外因性BDNF様刺激を与えた際、成長後の早期離乳への改善を調査した。

## 材料と方法

### 供試動物

供試動物として、日本クレア株式会社より導入され本研究室において繁殖維持されてきたICR系マウス（jcl:ICR,crl:ICR）を用いた。

### 飼育環境

動物は温度23℃、湿度50%、明期12時間、暗期12時間（6時点灯、18時消灯）に調節された動物室内で中ケージ（17.5 cm × 24.5 cm × 12.5 cm）で飼育され、床敷きにはCorn Cob（Shepherds Cob:SHEPHERD）、巣材（パルマス $\alpha$ N：鍋林フジサイエンス株式会社）を用いた。飼育用繁殖用ケージともに、床敷きの交換は原則1週間に1度とした。飼料は、繁殖中には繁殖用固形飼料として、マウス・ラット・ハムスター繁殖用（F-1：オリエンタル酵母株式会社）を使用し、飼育中には飼育用固形飼料として、マウス・ラット・ハムスター繁殖用（MM-3：オリエンタル酵母株式会社）を使用し、給餌した。水は自由摂取とした。

### 繁殖

性成熟以降の雌雄のマウスをペアにして中ケージで飼育し、これを親として用いた。仔マウスは出生日を0日齢（PD0）とした。産仔数が多い場合は1日齢（PD1）までに1胎につき最大10匹（原則オス：メス=1：1）になるように淘汰した。その後は、離乳操作まで親仔ともに同一ケージにて飼育した。

### EVA樹脂シート作成

エバフレックス（三井・デュボン・ポリケミカル株式会社）4粒（約100 mg）を1.5 mlチューブ（TreffLab:大阪薬研株式会社）に取り、70%エタノール（86%Ethanol Me Denaturated:和光純薬工業株式会社を希釈して作成）750  $\mu$ lに浸し、VORTEX（speed2）に固定して30分～1時間ほど洗浄し、implant後に周辺組織が炎症を起ささないように処置をした。洗浄後エタノールのみを捨て、エバフレックスをキムワイブの上に置き、短時間乾燥させた。乾燥したエバフレッ

クスを新しい 1.5 ml チューブ (TreffLab: 大阪薬研株式会社) に入れ、control 用シートには 2% Fast Green FCF 溶液 (DMSO で調節済) 10  $\mu$ l、DMSO 10  $\mu$ l、ジクロロメタン 1 ml を、7,8-DHF 用シートには、2% プリリアントブルー溶液 (DMSO で調節済) 10  $\mu$ l、1M 7,8-DHF (DMSO で調節済) 10  $\mu$ l、ジクロロメタン 1 ml を分注した。VORTEX (speed2) に固定して 1 時間ほど振動させ、完全にエバフレックスを溶かした後、ガラスシャーレに溶液を分注して、 $-80^{\circ}\text{C}$  冷凍庫に 30 分ほど入れ凍結させた。凍結した樹脂を  $-20^{\circ}\text{C}$  に入れ、over night させた。脳へ EVA 樹脂シートを局所移植する前に、0.5 cm  $\times$  0.3 cm ほどの大きさに切りだした。

#### シート移植・早期離乳操作

仔マウスの生後 13 日目または 14 日目 (PD 14 または PD14) に、前頭前野局所移植処置 1 時間以上前にケージを実験室へ移動させ、処置開始 15 分以上前に体重を測定し、脱イオン水 (DW) に溶かした 2,4,6-Trinitrophenol (Picric Acid) (和光純薬工業株式会社) を用いて個体ナンバリングを行った。同胎仔を体重平均の差が少なく性差が約 1:1 になるように、2 群に分け、早期離乳群と通常離乳群、あるいは早期離乳群を 2 群作成した。各群において 7,8-DHF シートあるいはコントロールシートを麻酔後、前頭前野へ局所移植することで、通常離乳したコントロールシート群 (通常離乳 control 群)、通常離乳した 7,8-DHF シート群 (通常離乳 7,8-DHF 群)、早期離乳したコントロールシート群 (早期離乳 control 群)、早期離乳した 7,8-DHF シート群 (早期離乳 7,8-DHF 群) の 4 群を作成した。処置後、早期離乳群は新しい床敷きと巣材を入れた中ケージに移し、繁殖用飼料・飼育用飼料の固形飼料 (F-1 & MM-3: オリエンタル酵母株式会社) を粉末状にしたものを与えた。通常離乳群は元のケージに戻し、通常離乳群仔マウスの処置が全頭終了した時点で親と通常離乳仔マウスを新しい床敷きと巣材を入れた中ケージに移した。

#### 21 日齢 (PD21) 操作

8 週齢まで飼育する場合、出生後 21 日目 (PD21) に早期離乳群を雌雄別に新しい床敷きと巣材を入れた中ケージに移し、通常離乳群を親と別の新しい床敷きと巣材を入れた中ケージに雌雄別に移し、8 週齢まで飼育した。

#### 高架式十字迷路試験

8 週齢に達した仔マウスに高架式十字迷路試験を行った。試験開始の 2 時間以上前に供試動物を行動観察室へ移し、実験室環境へ馴化した。試験は行動観察室 (温度  $23 \pm 2^{\circ}\text{C}$ ) で、明期に赤色灯を点灯して行った。高架式十字迷路は塩化ビニル製で、接触壁のないオープンアーム 2 本 (5 cm  $\times$  25 cm) と高さ 5 cm の接触壁によって囲まれているクローズアーム 2 本 (5 cm  $\times$  25 cm)、これらの中央にある 5  $\times$  5 cm のニュートラルゾーンから構成されている。また、迷路の床面は床から高さ 30 cm となるように設置した。実験開始時には供試動物の頭部がニュートラルゾーンの中央に来るようにオープンアームに向けて静かに置き、行動を 15 分間撮影した。実験中にマウスが落下した場合には、ホームケージに戻し 30 分以上経過してから再び実験を行った。EthovisionTX10 を用いて、録画記録データの仔マウスの各アームへの進入回数、両アーム進入回数の合計、各アームとニュートラルゾーンでの滞在時間、両アームへの進入回数の合計、移動時間、オープンアームへの進入回数率および滞在時間率を解析した。

#### 脳採取・RNA 抽出

早期離乳群、通常離乳群ともに高架式十字迷路終了後 48 時間以上経過した後に脳のサンプリングを行った。1 時間以上実験室で馴化した後、頸椎脱臼により安楽死させ、体重を測定した後断首し、迅速に脳を摘出した。摘出した脳はブレインスライサー (マウス用ブレインスライサー アルミニウム、MB-AL1-C、1 mm コロナル、室町機械株式会社) 上でコロナル切片にした。この作業は脳細胞の破壊を防ぐため氷上で行った。その断面から前頭葉 (PrL) を Sample Corer (2 mm、18035-02、室町機械株式会社) を用いてパンチアウトした。パンチアウトした部位は RNAlater RNA Stabilization Reagent (QIAGEN) を 100  $\sim$  150  $\mu$ l 分注した 1.5 ml チューブ (TreffLab: 大阪薬研株式会社) に入れた。その後は RNeasy Protect Mini Kit (QIAGEN) を用いて、mRNA 抽出を行った。手項は抽出プロトコールに従った。高架式十字迷路終了時点から 48 時間以上経過後に脳採取を行った。実験室で 1 時間以上馴化し、頸椎脱臼により安楽死させた後、断首し迅速に前頭前野を摘出した。摘出した脳部位は、RNAlater RNA Stabilization Reagent (QIAGEN) を 100  $\sim$  150  $\mu$ l 分注した 2 ml チューブ (アズワン株式会社) に入れた。その後、1000  $\mu$ l の TRIzol<sup>®</sup> Reagent (ライフテクノロジー ジャパン株式会社) を分注した Soft tissue homogenizing CK14 (Bertin TECHNOLOGIES) あるいはスクリュウキャップチューブ 2.0 ml コニカル型 滅菌 (ワトソン株式会社) に脳切片のみを入れ、ピース式ホモジナイザー (Precellys24: ネッパジーン株式会社) を用い 6500 rpm, 30 秒, 3cycles (10 秒間隔) の設定で組織を粉砕した。



#### DNase 処理

次に混入ゲノム DNA 除去のために、10 × DNase I Buffer · Recombinant DNase I (RNase-free) · RNase Inhibitor (タカラバイオ株式会社)、Ethachinmate (株式会社ニッポン・ジーン) を用いて DNase 処理を行った。手順は DNase プロトコールに従った。

#### mRNA 濃度測定

DNases 処理した mRNA サンプルの濃度と 260 nm 吸光度 /280 nm 吸光度比は、NanoDrop (サーモフィッシャーサイエンティフィック株式会社) を用いて測定した。基本的には 260 nm 吸光度 /280 nm 吸光度比が 1.5 以上のサンプルを使用した。

#### cDNA 化

mRNA は、分解されやすいため、SuperScript VILO cDNA Synthesis Kit (invitrogen) を用いて、逆転写 (reverse transcription;RT) を行い、各サンプル 0.2 μg/ml ずつの mRNA を cDNA 化した。各サンプルの mRNA と蒸留水 (大塚製薬株式会社) の合計量を 14 μl にし、5X VILO Reaction Mix (Invitrogen) 4 μl と 10X SuperScript Enzyme Mix (Invitrogen) 2 μl を加え、合計 20 μl を 0.2 ml チューブ (BIO-BIK No.T-02: 株式会社イナ・オプティカ) で混和した。サーマルサイクラー (MyCycler バイオ・ラボラトリーズ株式会社) にて、10 分 25℃、60 分 42℃、5 分 85℃ の逆転写反応を行った。cDNA 化されたサンプルは -20℃ で保管した。

#### 定量的 polymerase chain reaction (PCR)

定量的 PCR は Thermal Cycler Dice Real Time System Single TP850 (タカラバイオ株式会社) を用いた。スタンダード・サンプル・Nuclease-free Water (Ambion) · SYBR Premix EX Taq II (タカラバイオ株式会社) · プライマー (HPRT · BDNF1 · BDNF2 · BDNF3 · BDNF4 · BDNF5 · BDNF6) (製造: BDNF3: タカラバイオ株式会社、BDNF1、2、4、5、6、HPRT: 株式会社ニッポン・ジーン) · 8 連チューブ (0.2ml Hi-8-Tude: タカラバイオ株式会社) · 8 連チューブフタ (0.2ml Hi-8-Flat Cap: タカラバイオ株式会社) を用いた。

スタンダードは複数の cDNA サンプルを混ぜて、EASY Dilution (タカラバイオ株式会社) で 1/8、1/16、1/64、1/128 に 4 段階希釈したものをを用いた。まず、4 段階スタンダード (STD) と、cDNA サンプルにおいて、ターゲット遺伝子とする各プライマー由来の BDNF 遺伝子とハウスキーピング遺伝子である HPRT の Ct 値を求めた。その後、ターゲット遺伝子における cDNA サンプルの Ct 値を、ターゲット遺伝子の STD から得た検量線にあてはめることで、サンプルのターゲット遺伝子発現量を算出した。また、ハウスキーピング遺伝子における cDNA サンプルの Ct 値を、ハウスキーピング遺伝子の STD から得た検量線にあてはめ、ハウスキーピング遺伝子発現量を算出した。この STD サンプルにおけるハウスキーピング遺伝子発現量から、増幅率や検量線の傾きを計算し補正した上で、ターゲット遺伝子発現量を算出した。この STD サンプルにおけるハウスキーピング遺伝子発現量から算出された BDNF 遺伝子発現量を利用して、各サンプル内のターゲット遺伝子発現量 /STD サンプルにおけるハウスキーピング遺伝子発現量から算出されたターゲット遺伝子発現量を Relative Quantity とした (図 2-5)。本項では、各胎の傾向を補正するために、同胎内の通常離乳マウスの Relative Quantity 平均で各個体の Relative Quantity を割り、得た値を Normal wean 平均発現量として使用した。cDNA 化したサンプルは蒸留水 (大塚製薬株式会社) を用いて 20 倍希釈して用い、プライマーは、Nuclease-Free Water (Ambion) を用いて 10 μM に調整して使用した。

スタンダードやサンプルは、SYBR Premix EX Taq II 12.5 μl、primar Forward 1.0 μl、primar Reverse 1.0 μl と Nuclease-free Water (Ambion) 9.5 μl、スタンダードあるいはサンプル 1 μl を混和した。PCR 反応は 95℃ 30 秒を 1 cycle、95℃ 5 秒と 60℃ 45 秒を 40 cycles とし、PCR 反応後に Dissociation として 95℃ 15 秒、60℃ 30 秒、95℃ 15 秒を行った。プライマーの性質上、例外として、BDNF1 は、95℃ 30 秒を 1 cycle、95℃ 5 秒と 55℃ 45 秒を 40 cycles とし、BDNF3 は、95℃ 30 秒を 1 cycle、95℃ 5 秒と 60℃ 30 秒を 40 cycle とした。また、遺伝子発現量は各サンプルを Triplicate にて測定したものを平均値とし、その標準偏差 (standard deviation ; SD) が 15% 以上となったものについては、実験結果として用いなかった。

#### 統計解析

データ解析には、SPSS statistics 17.0 (SPSS Japan Inc.) を用い、高架式十字迷路試験、前頭前野の BDNF mRNA 発現量において、雌雄別に、通常離乳した溶媒投与群 (通常離乳 control 群)、早期離乳した溶媒投与群 (早期離乳 control

群)、早期離乳した7,8-DHF投与群(早期離乳7,8-DHF群)の3群間で、一元分散分析(one way ANOVA)を行いその後の検定としてBonferroniを行った。

## 結果

14日齢でシートの移植・早期離乳操作を行ったマウスでは、雌雄ともに通常離乳control群、早期離乳control群、通常離乳7,8-DHF群、早期離乳7,8-DHF群の4群間で高架式十字迷路試験のオープンアーム進入回数、オープンアーム滞在時間、進入回数率、滞在時間率およびそのZ値において有意な差は認められなかった(図1-16)。

13日齢でシートの移植・早期離乳操作を行ったマウスでも14日齢同様に、雌雄ともに有意な差は認められなかった(図17-31)。

8週齢のオスマウスにおける前頭葉BDNFmRNAの発現量を調べた(図33-34)。

14日齢でシートの移植・早期離乳操作を行ったオスマウスでは、通常離乳control群、早期離乳control群、通常離乳7,8-DHF群、早期離乳7,8-DHF群の4群間で前頭葉のBDNF6mRNA発現量において有意な差は認められなかった。

## 考察

高架式十字迷路において、オープンアーム進入回数、滞在時間、進入回数率、滞在時間率は値が小さいほど不安行動が大きいという不安行動の指標となる。

14日齢で実験を行ったマウスでは、オープンアーム進入回数および進入回数率、滞在時間および滞在時間率において、通常離乳control群、早期離乳control群、通常離乳7,8-DHF群、早期離乳7,8-DHF群の4群間で不安行動に差はみられなかった。また、前頭前野BDNF6mRNA発現量についても4群間で差はなかった。この結果は、早期離乳されたオスマウスで成長後に不安行動が増加し、前頭前野のBDNFmRNA発現量が減少するという先行研究<sup>(5)</sup>とは異なる結果となった。

13日齢で実験を行ったオスマウスでは、通常離乳control群・早期離乳control群と比較して早期離乳7,8-DHF群でオープンアーム進入回数率のZ値が増加する傾向が認められた。通常離乳control群と早期離乳control群の間に有意な差は認められなかった。

14日齢で実験を行ったマウスにおいて先行研究と異なる結果となった原因として、本実験で使用したマウスはこれまでのICRと比較して成長が早く、早期離乳の影響を受けにくいことが考えられる。13日齢で実験を行ったマウスでは、通常離乳control群と早期離乳control群の間で統計的に有意な差は得られなかったが、7,8-DHFシートを移植した群で不安行動を改善する傾向は認められた。本実験では、7,8-DHFが早期離乳による影響を改善する効果は認められなかったが、不安行動への改善効果は期待できると考えられる。13日齢での実験の追試により、行動実験において早期離乳control群と通常離乳control群の間に差が得られれば、早期離乳の影響に対する7,8-DHFの改善効果が認められる可能性があると考えられる。

## 文献

1. Castrén E, Kojima M. Brain-derived neurotrophic factor in mood disorders and antidepressant treatments. *Neurobiol Dis.* 2016 Jul 15. pii: S0969-9961(16)30169-3.
2. Karpova NN. Role of BDNF epigenetics in activity-dependent neuronal plasticity. *Neuropharmacology.* 2014 Jan;76 Pt C:709-18.
3. Foltran RB, Diaz SL. BDNF isoforms: a round trip ticket between neurogenesis and serotonin? *J Neurochem.* 2016 Jul; 138(2):204-21.
4. Jang SW, Liu X, Yepes M, Shepherd KR, Miller GW, Liu Y, Wilson WD, Xiao G, Blanchi B, Sun YE, Ye K. A selective TrkB agonist with potent neurotrophic activities by 7,8-dihydroxyflavone. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2010 Feb 9; 107(6):2687-92.
5. Mogi K, Ishida Y, Nagasawa M, Kikusui T. Early weaning impairs fear extinction and decreases brain-derived neurotrophic factor expression in the prefrontal cortex of adult male C57BL/6 mice. *Dev Psychobiol.* 2016 Jun 13.

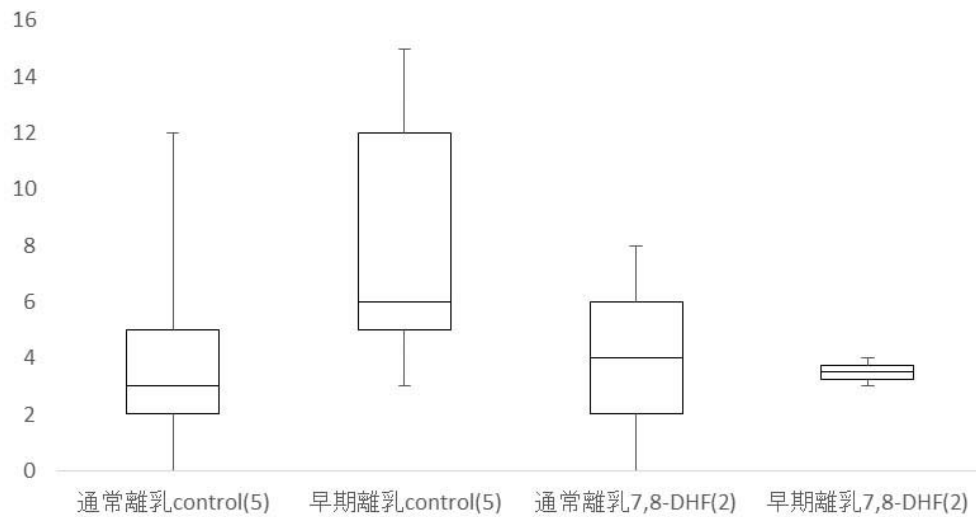


図1 14日齢7,8-DHF局所移植によるオスマウスにおけるオープンアーム進入回数の変化

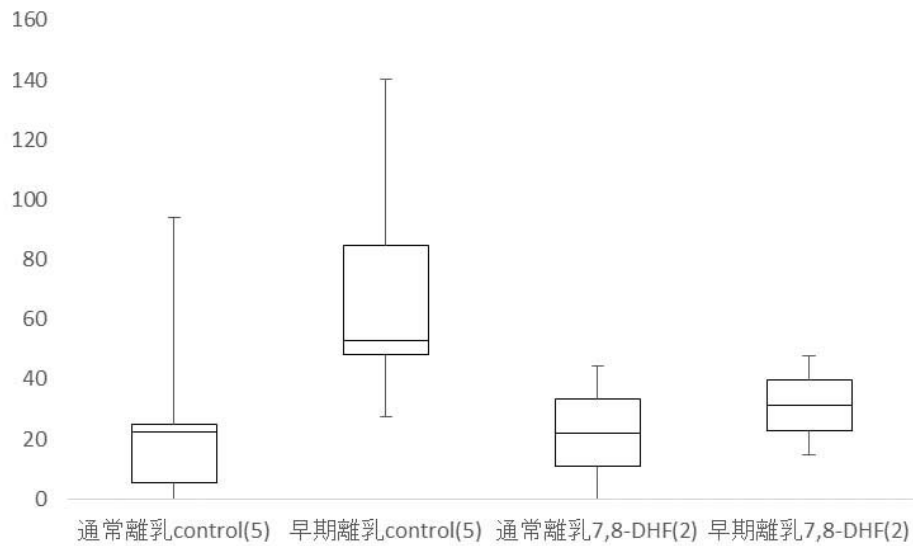


図2 14日齢7,8-DHF局所移植によるオスマウスにおけるオープンアーム滞在時間の変化

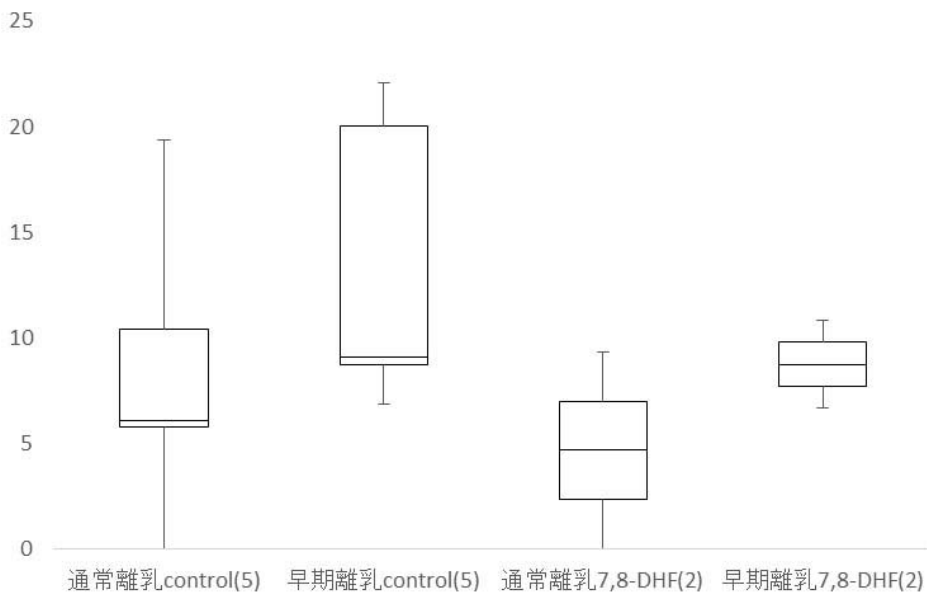


図3 14日齢7,8-DHF局所移植によるオスマウスにおけるオープンアーム進入回数率の変化

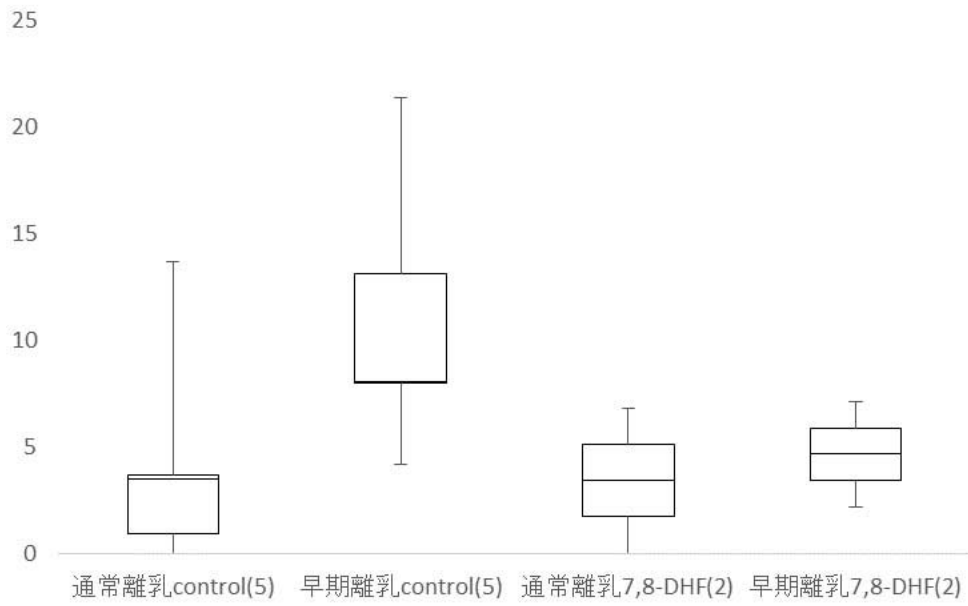


図4 14日齢7,8-DHF局所移植によるオスマウスにおけるオープンアーム滞在時間率の変化

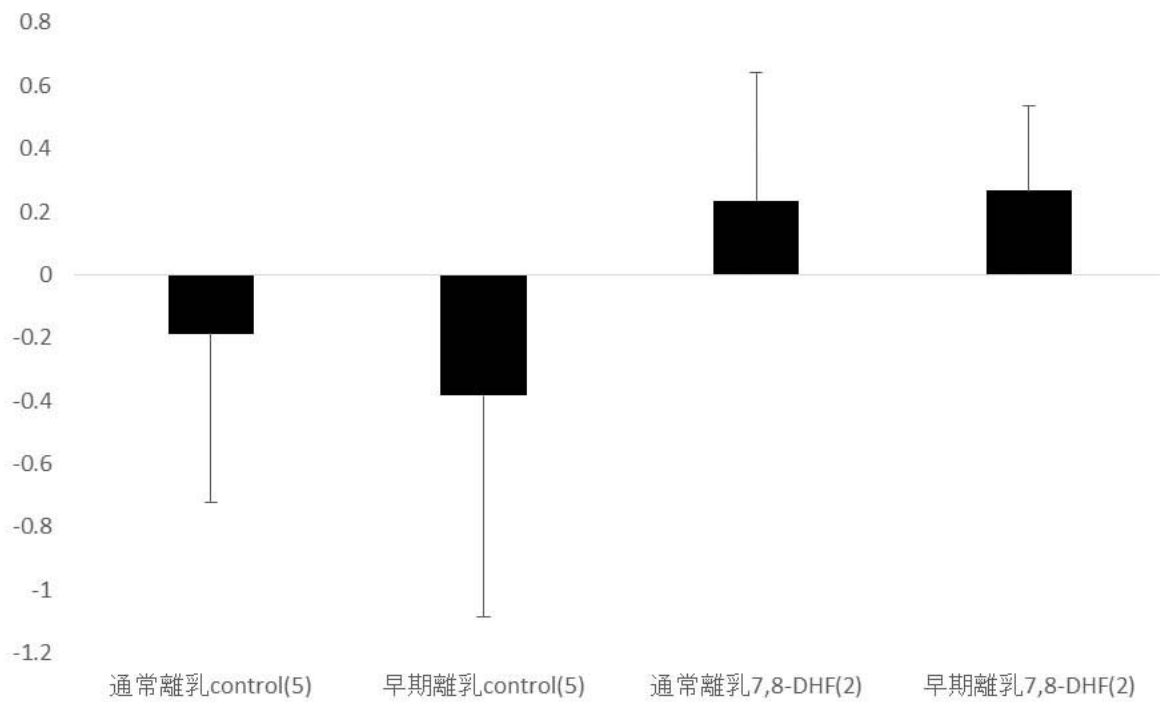


図5 14日齢7,8-DHF局所移植によるオスマウスにおけるオープンアーム進入回数(Z値)の変化

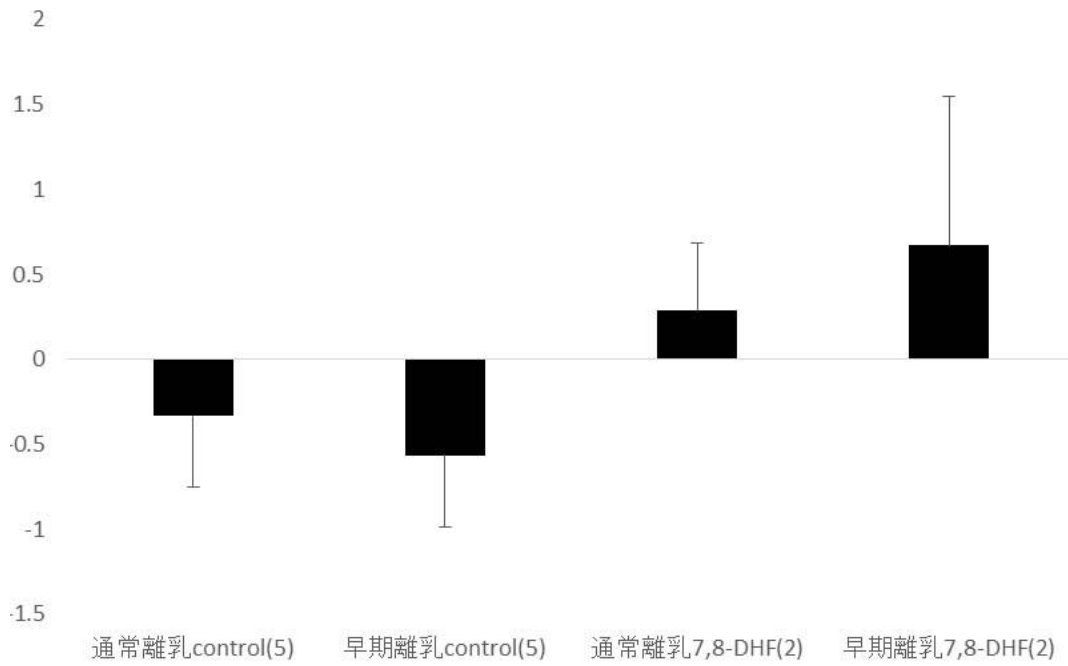


図6 14日齢7,8-DHF局所移植によるオスマウスにおけるオープンアーム滞在時間 (Z 値) の変化

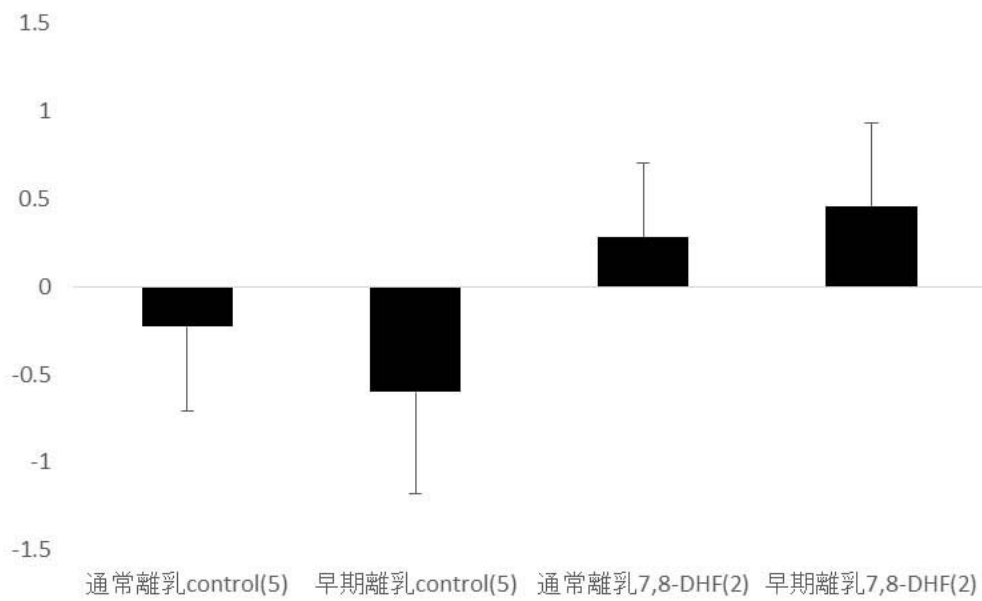


図7 14日齢7,8-DHF局所移植によるオスマウスにおけるオープンアーム進入回数率 (Z 値) の変化

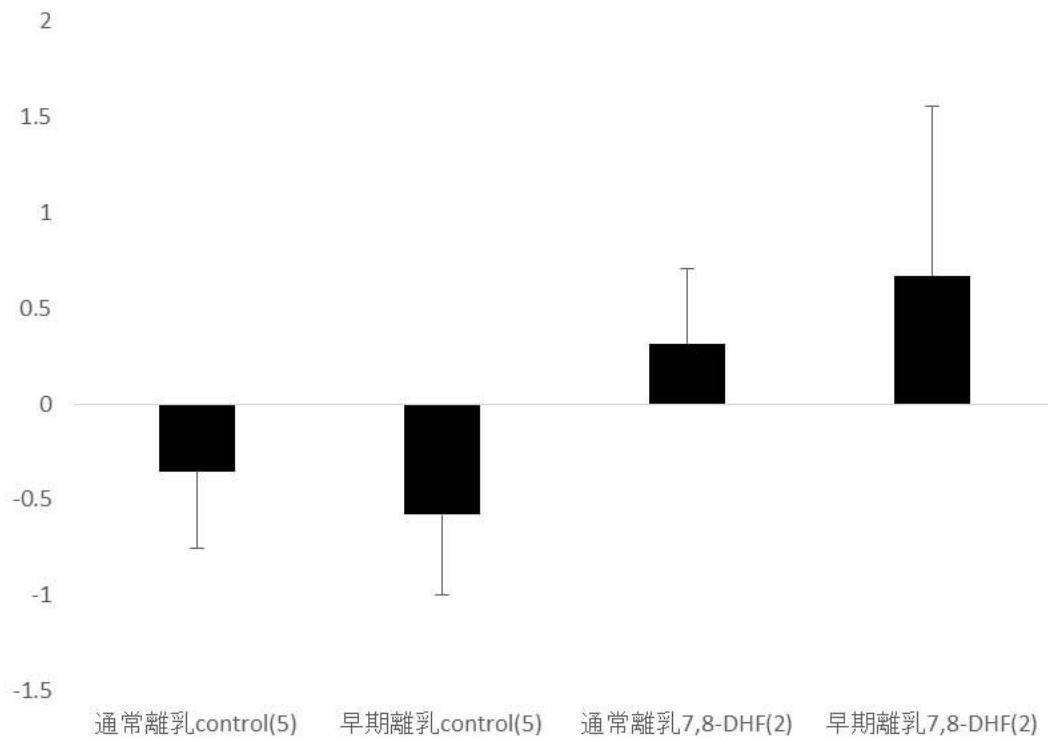


図8 14日齢7,8-DHF局所移植によるオスマウスにおけるオープンアーム滞在時間率 (Z 値) の変化

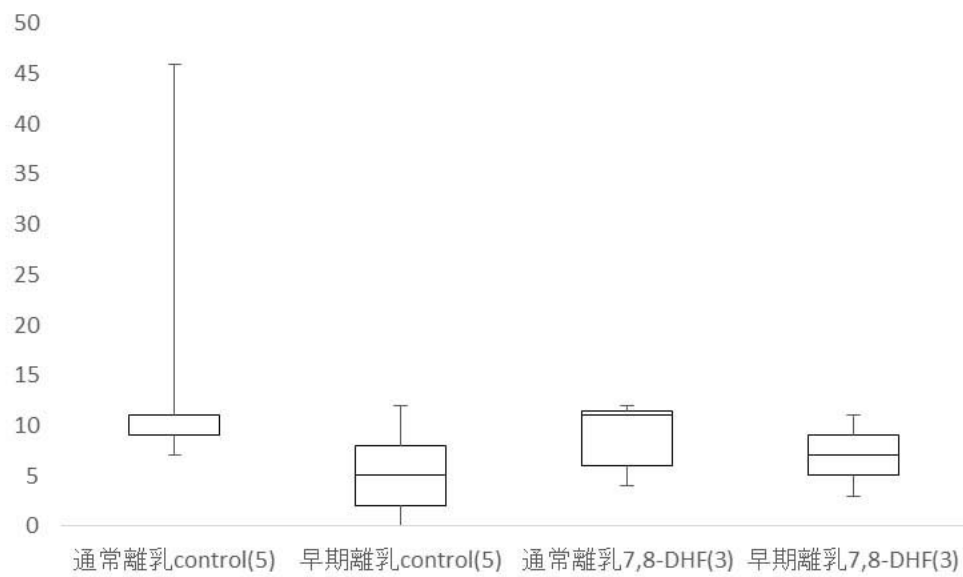


図9 14日齢7,8-DHF局所移植によるメスマウスにおけるオープンアーム進入回数の変化

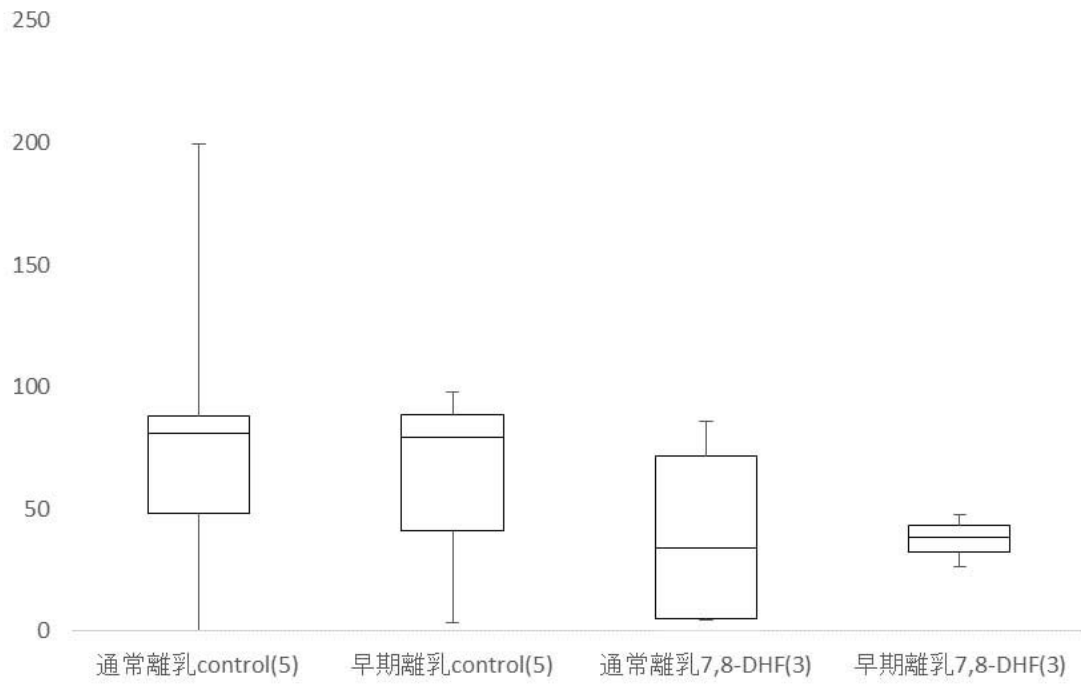


図 10 14 日齢 7,8-DHF 局所移植によるメスマウスにおけるオープンアーム滞在時間の変化

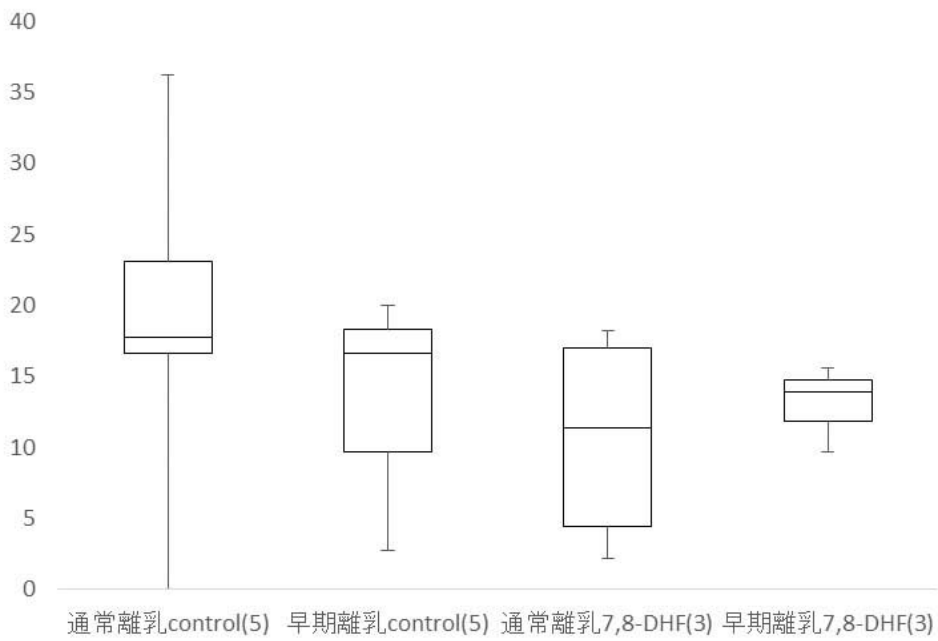


図 11 14 日齢 7,8-DHF 局所移植によるメスマウスにおけるオープンアーム進入回数率の変化

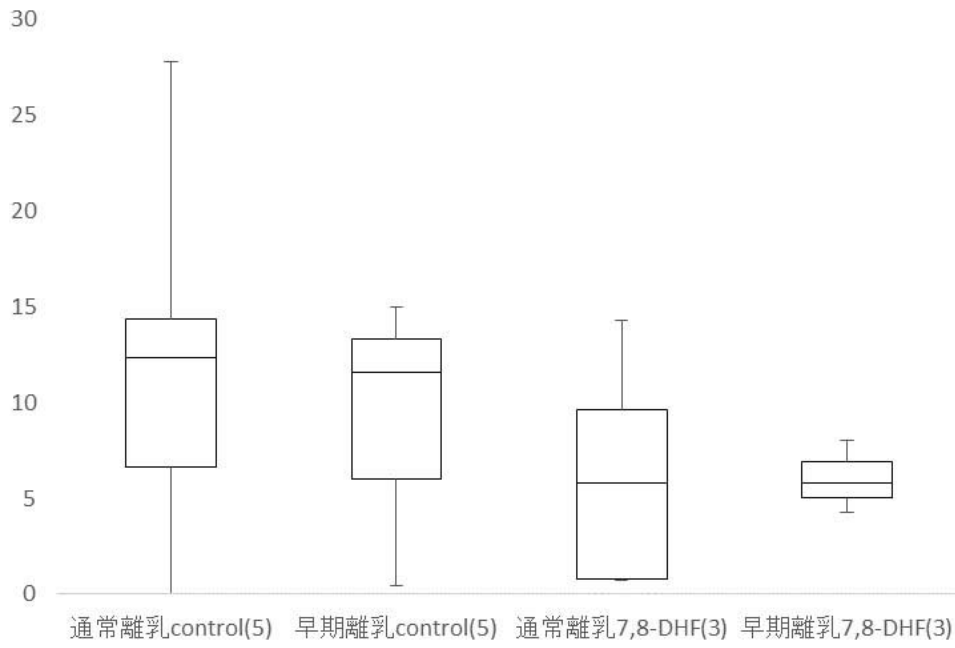


図 12 14 日齢 7,8-DHF 局所移植によるメスマウスにおけるオープンアーム進入回数率の変化

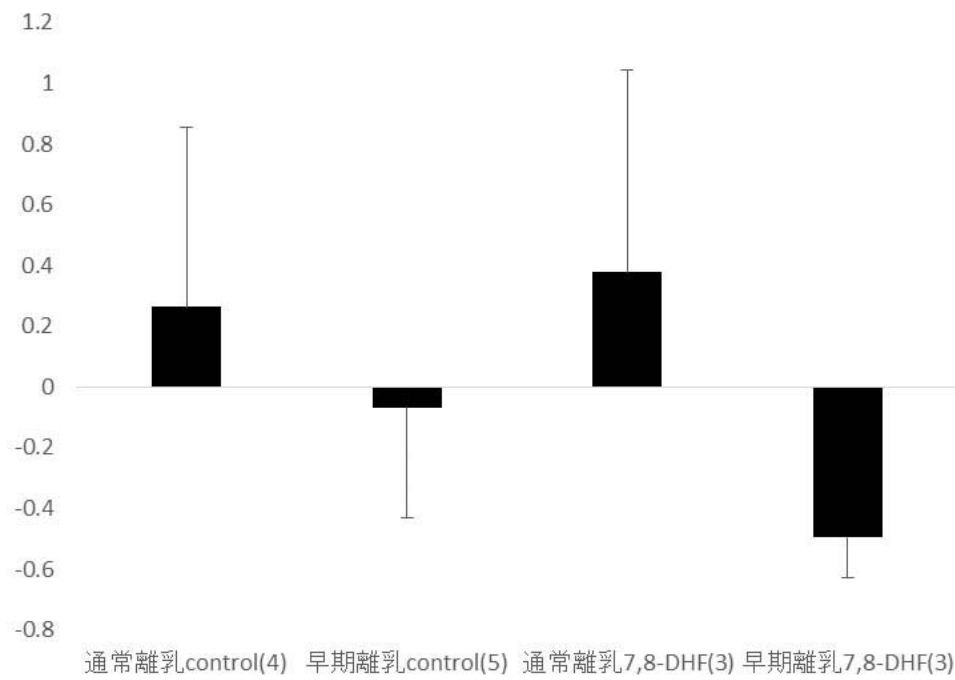


図 13 14 日齢 7,8-DHF 局所移植によるメスマウスにおけるオープンアーム進入回数 (Z 値) の変化



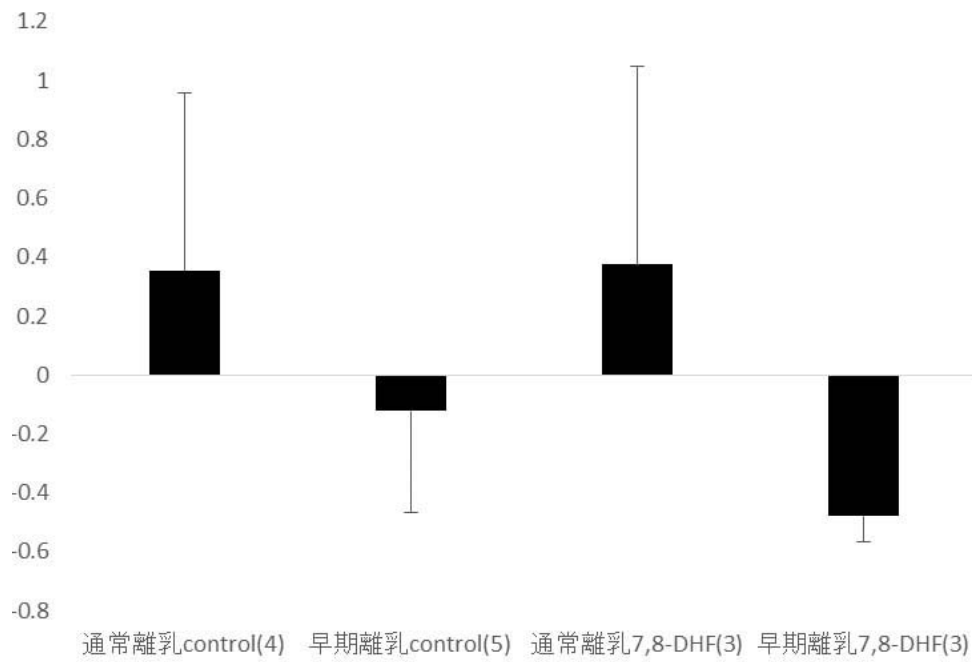


図14 14日齢7,8-DHF局所移植によるメスマウスにおけるオープンアーム滞在時間 (Z 値) の変化

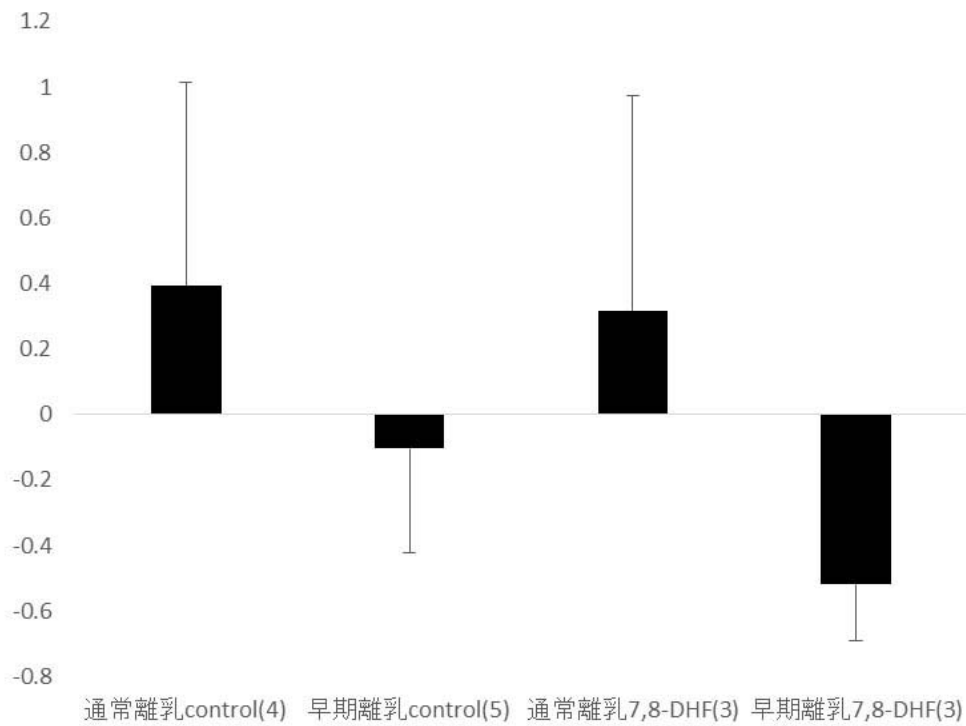


図15 14日齢7,8-DHF局所移植によるメスマウスにおけるオープンアーム進入回数率 (Z 値) の変化

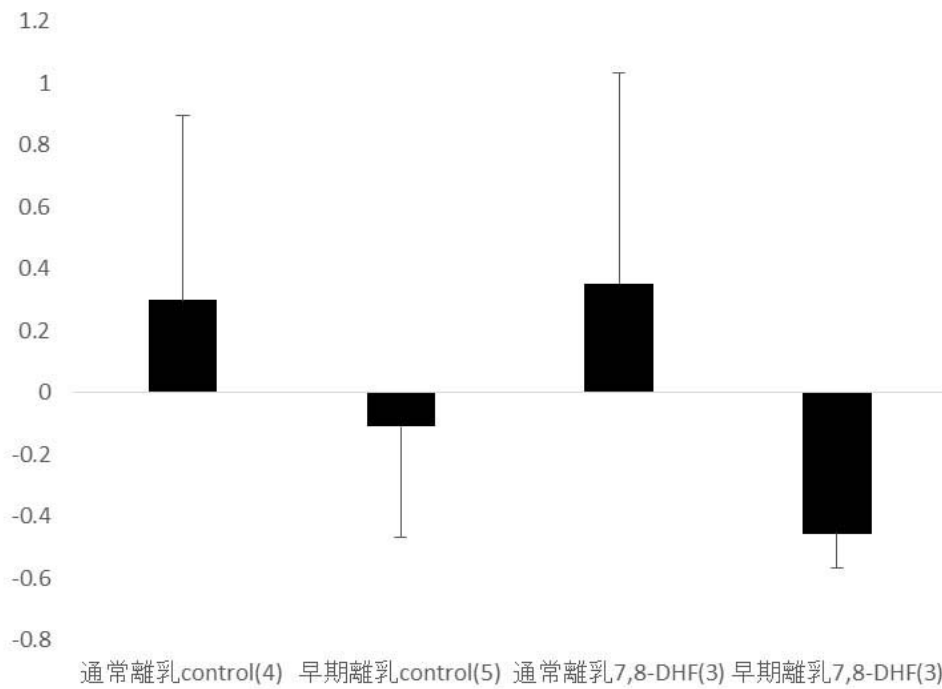


図 16 14 日齢 7,8-DHF 局所移植によるメスマウスにおけるオープンアーム滞在時間率 (Z 値) の変化

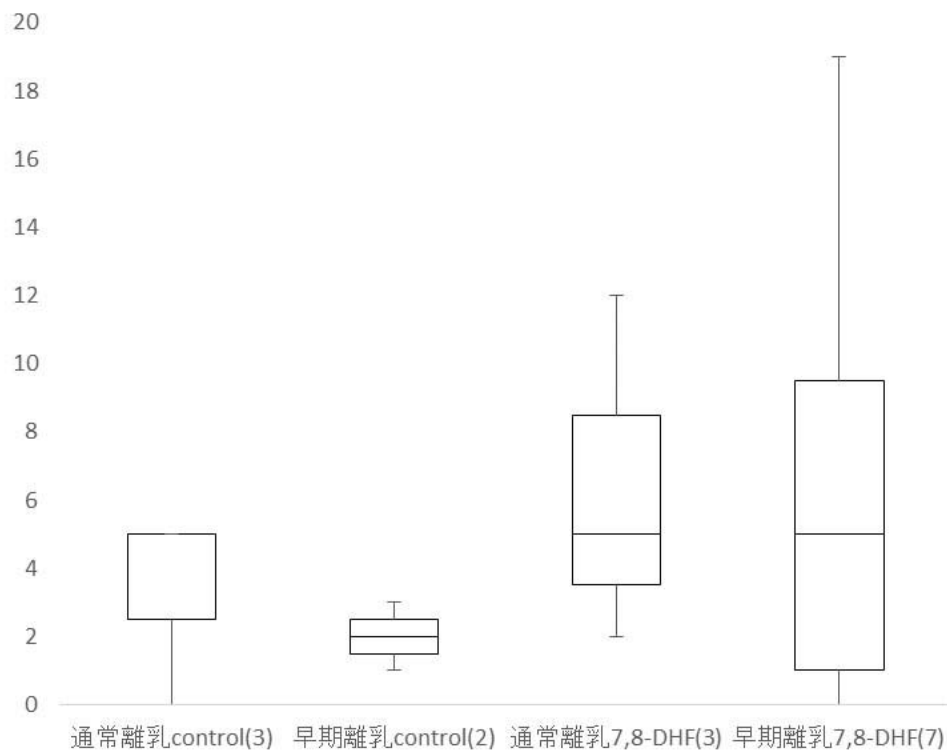


図 17 13 日齢 7,8-DHF 局所移植によるオスマウスにおけるオープンアーム進入回数の変化

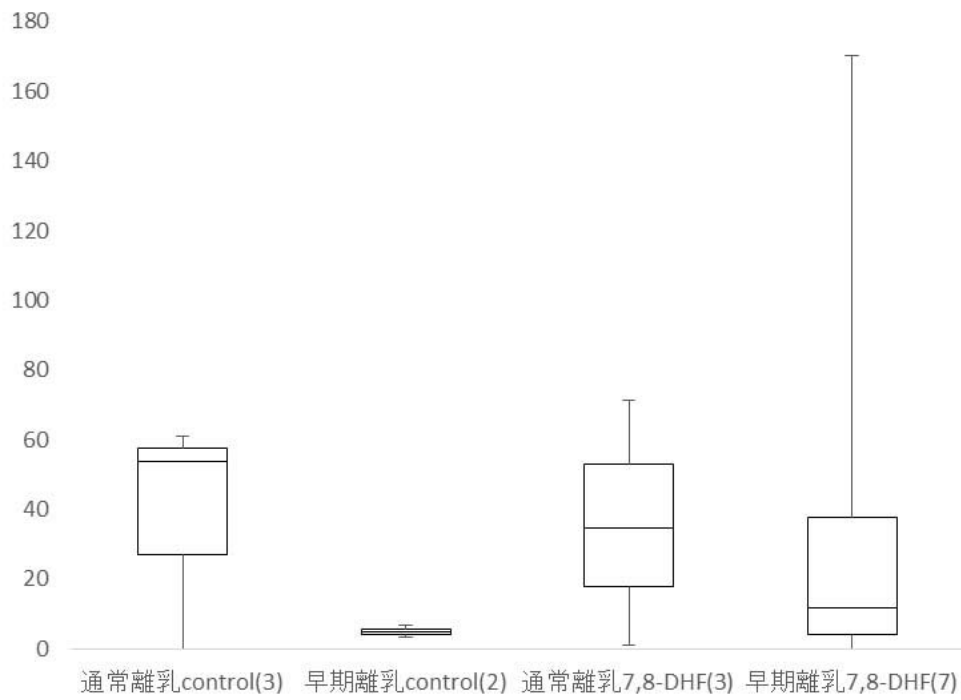


図 18 13日齢7,8-DHF局所移植によるオスマウスにおけるオープンアーム滞在時間の変化

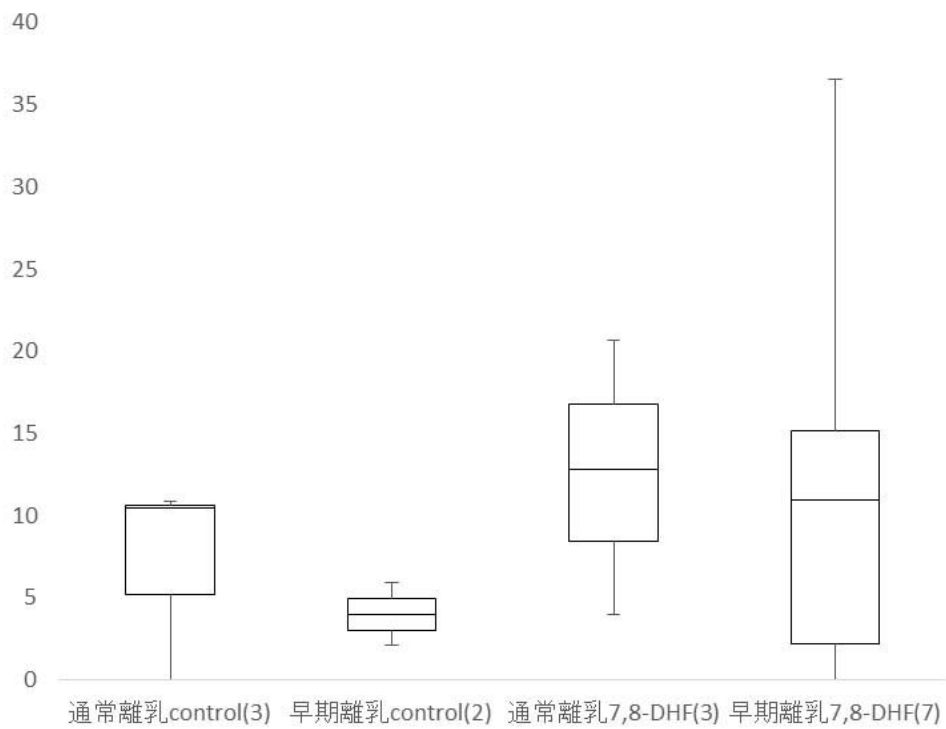


図 19 13日齢7,8-DHF局所移植によるオスマウスにおけるオープンアーム進入回数率の変化

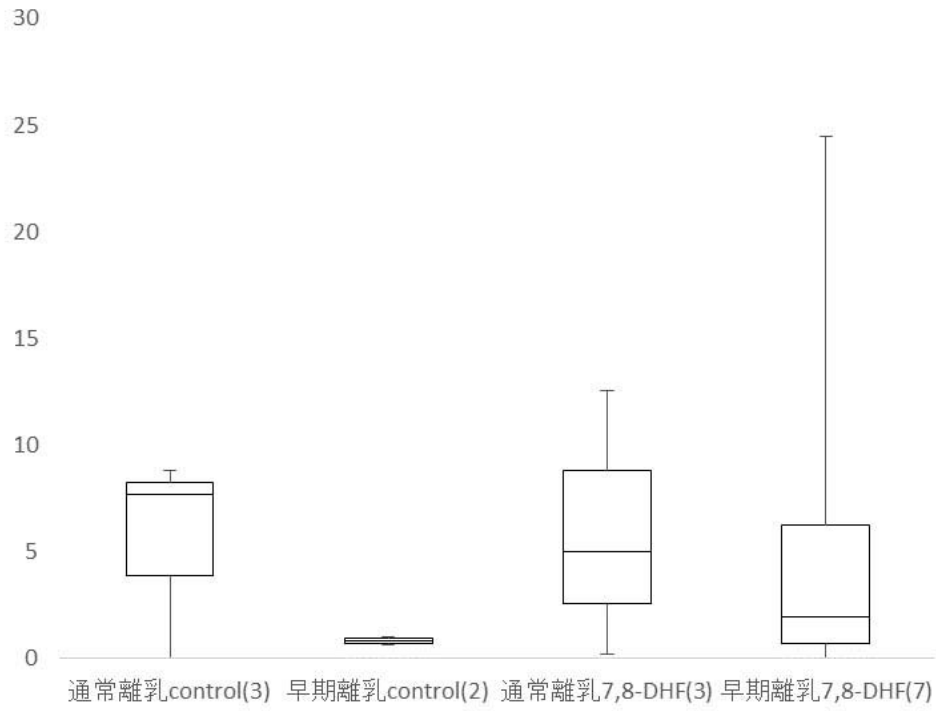


図 20 13日齢7,8-DHF局所移植によるオスマウスにおけるオープンアーム滞在時間率の変化

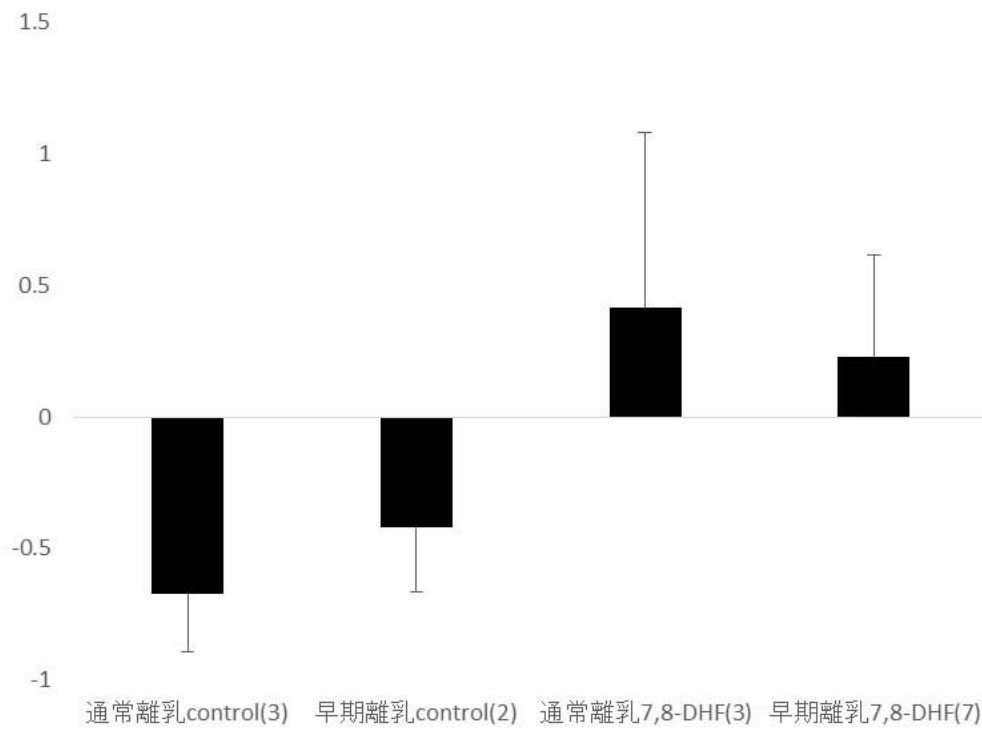


図 21 13日齢7,8-DHF局所移植によるオスマウスにおけるオープンアーム進入回数 (Z 値) の変化

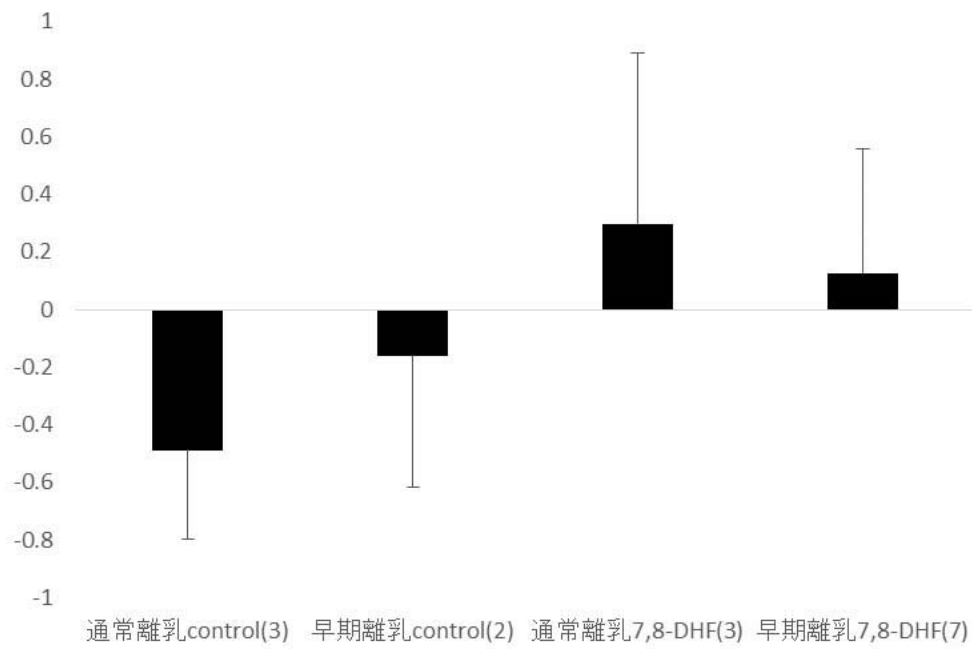


図 22 13日齢7,8-DHF局所移植によるオスマウスにおけるオープンアーム滞在時間 (Z 値) の変化

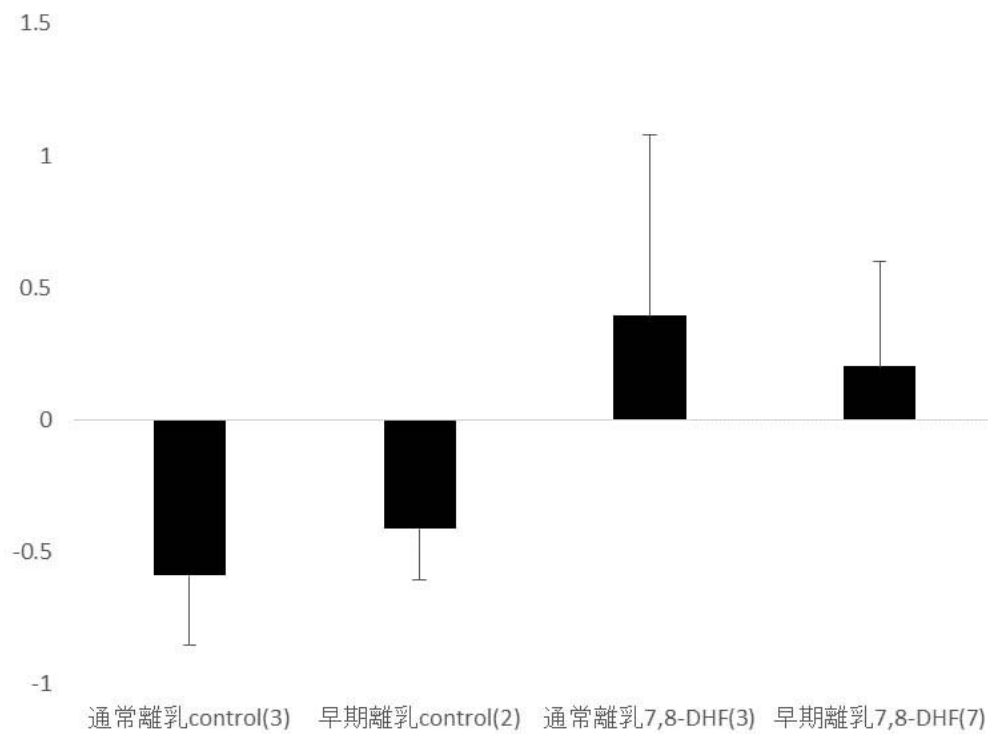


図 23 13日齢7,8-DHF局所移植によるオスマウスにおけるオープンアーム進入回数率 (Z 値) の変化

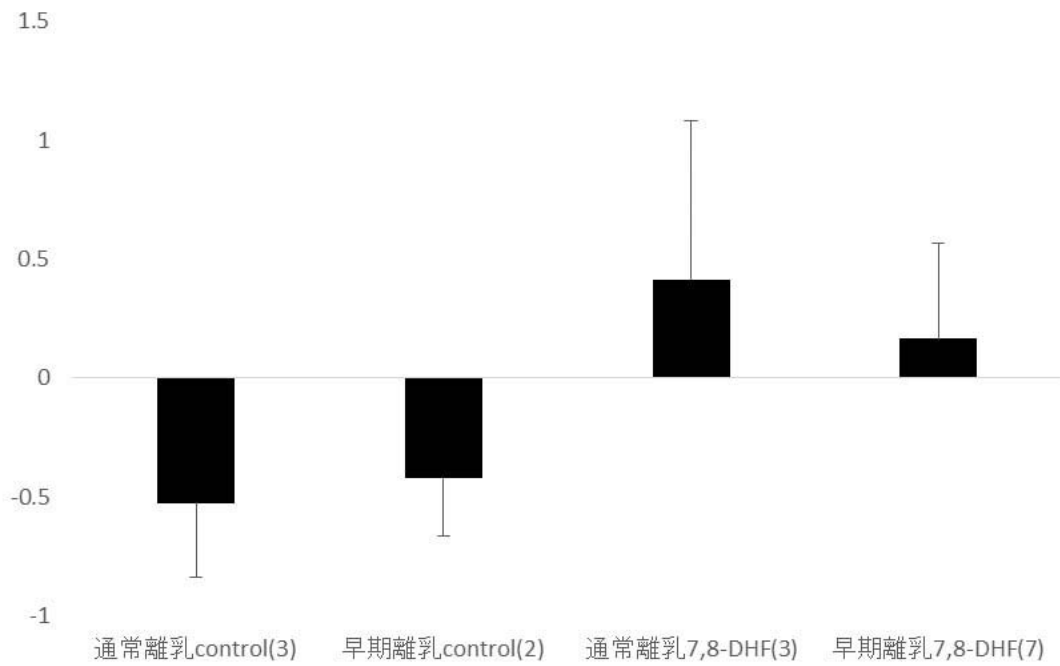


図24 13日齢7,8-DHF局所移植によるオスマウスにおけるオープンアーム滞在時間率（Z値）の変化

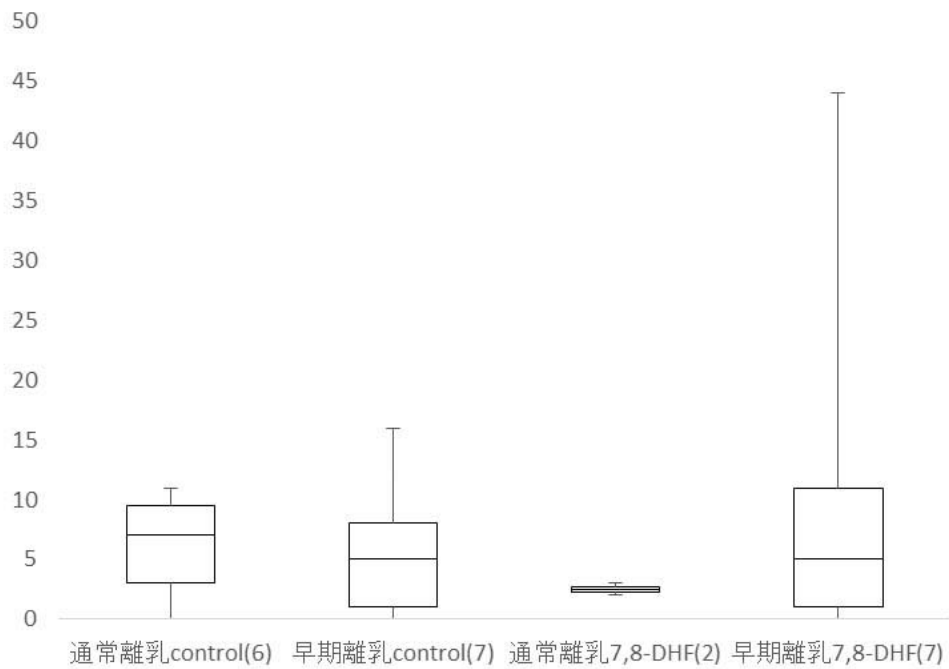


図25 13日齢7,8-DHF局所移植によるメスマウスにおけるオープンアーム進入回数の変化

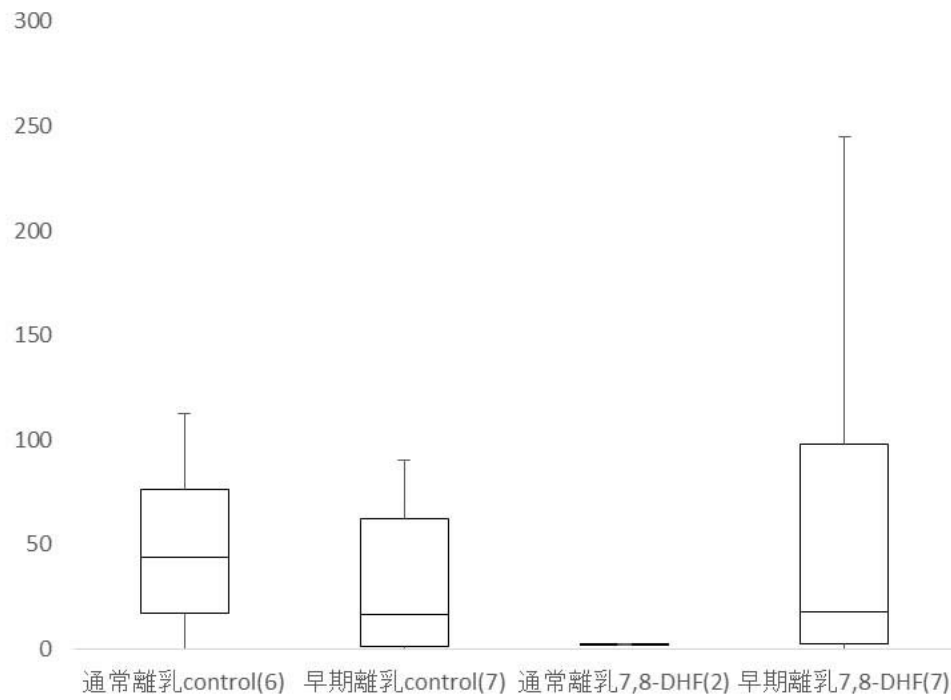


図 26 13 日齢 7,8-DHF 局所移植によるメスマウスにおけるオープンアーム滞在時間の変化

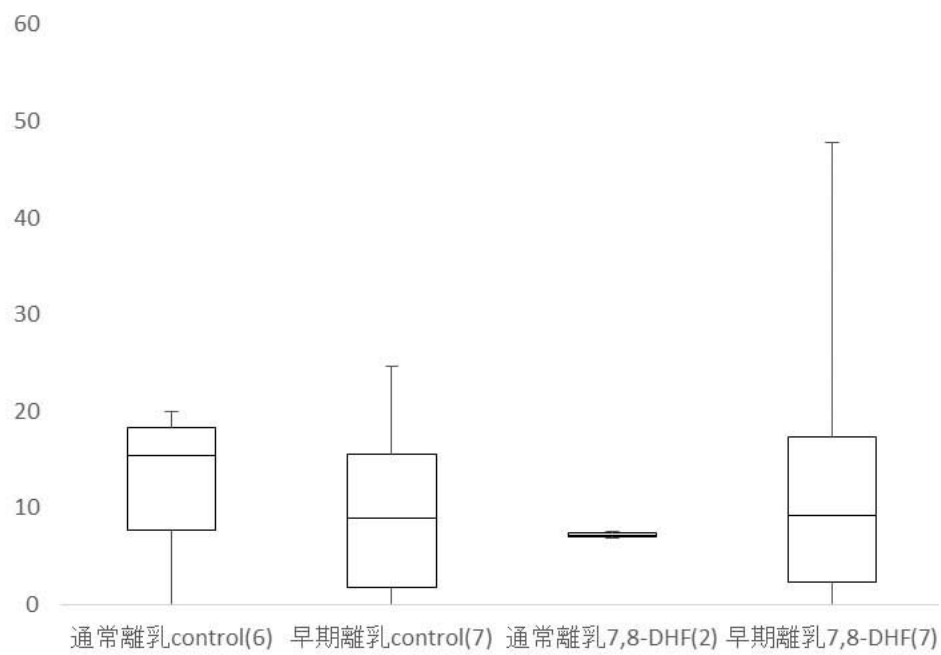


図 27 13 日齢 7,8-DHF 局所移植によるメスマウスにおけるオープンアーム進入回数率の変化

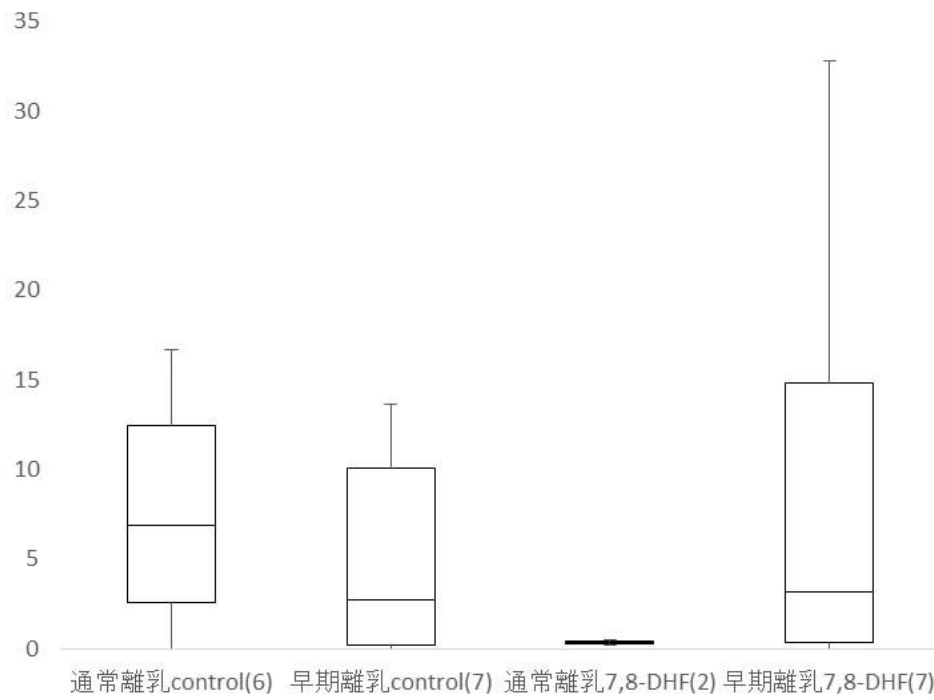


図 28 13 日齢 7,8-DHF 局所移植によるメスマウスにおけるオープンアーム滞在時間率の変化

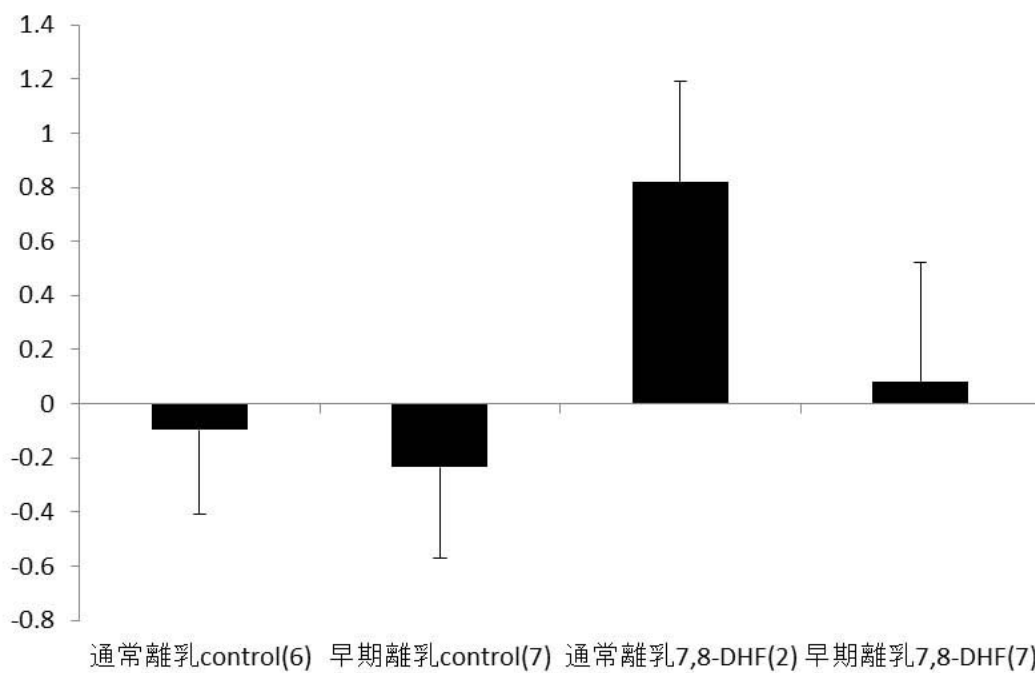


図 28 13 日齢 7,8-DHF 局所移植によるメスマウスにおけるオープンアーム進入回数 (Z 値) の変化



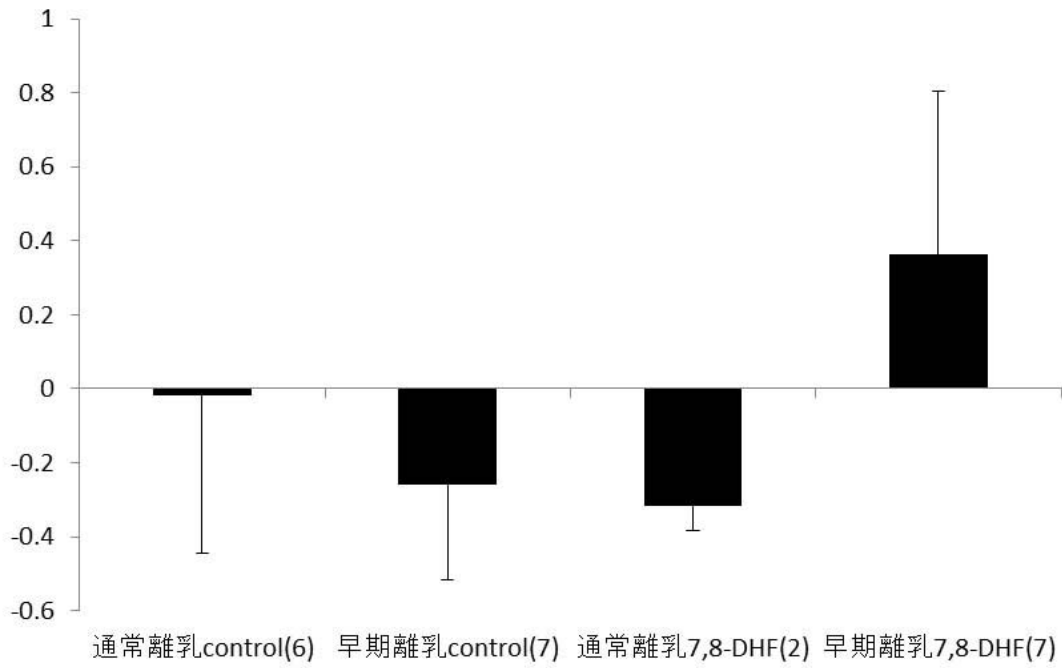


図29 13日齢7,8-DHF局所移植によるメスマウスにおけるオープンアーム滞在時間（Z値）の変化

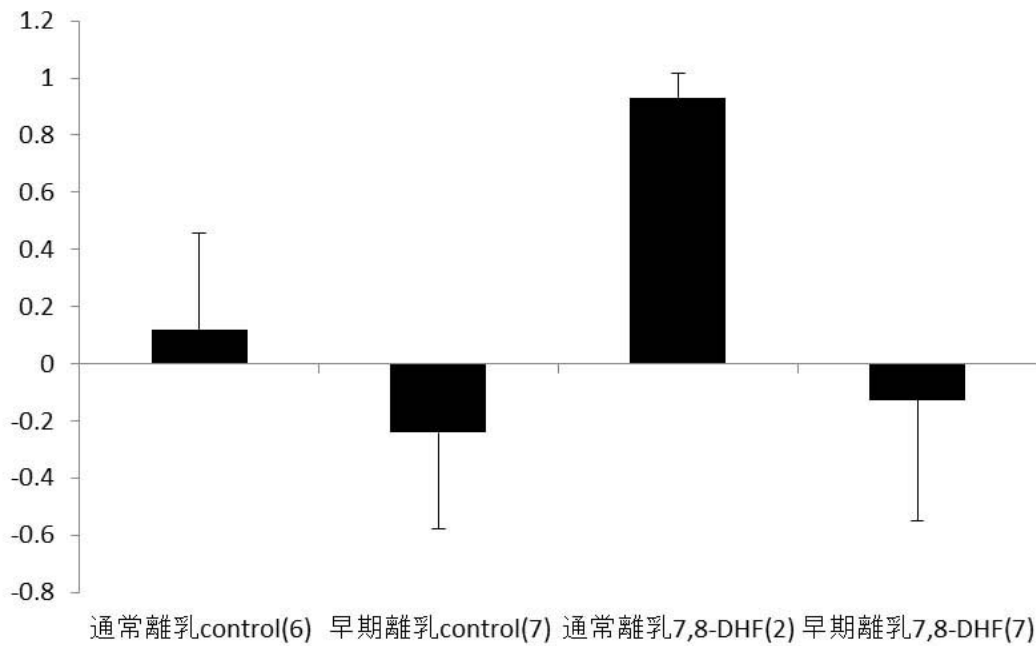


図30 13日齢7,8-DHF局所移植によるメスマウスにおけるオープンアーム進入回数率（Z値）の変化

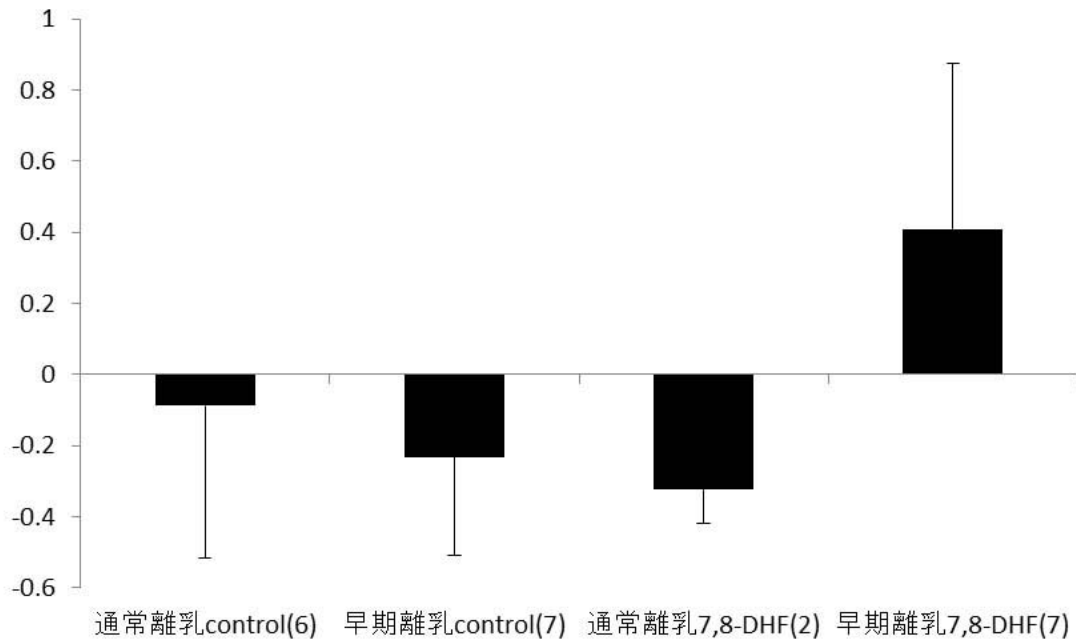


図 31 13日齢7,8-DHF局所移植によるメスマウスにおけるオープンアーム滞在時間率 (Z 値) の変化

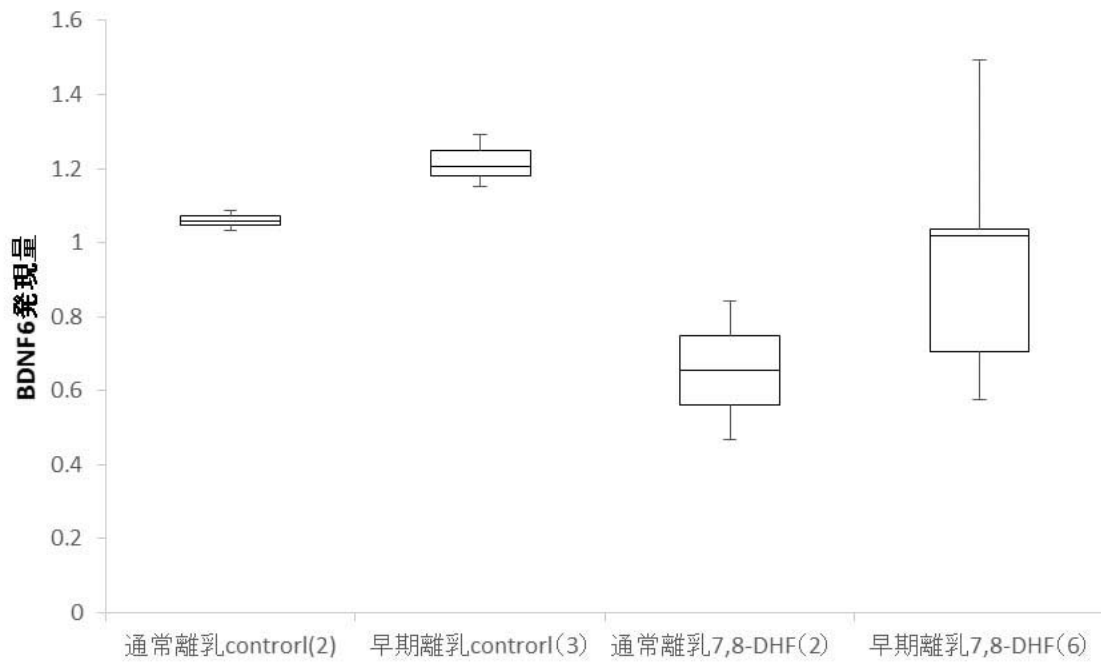


図 32 14日齢7,8-DHF局所移植によるオスマウスにおける前頭葉 BDNF6 発現量の変化

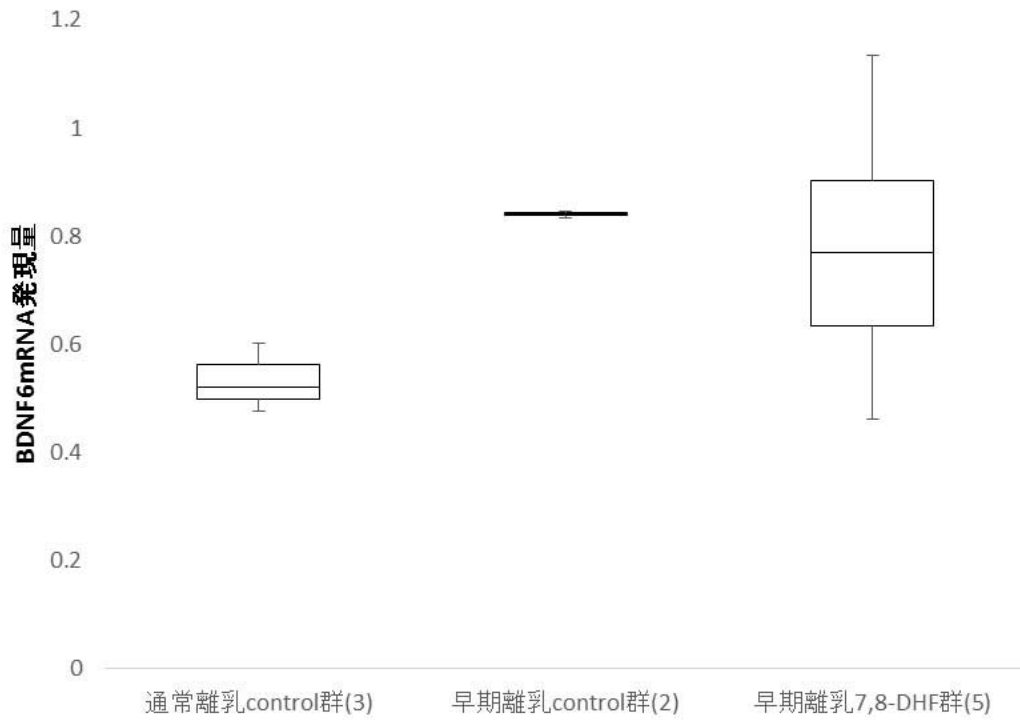


図33 13日齢7,8-DHF局所移植によるオスマウスにおける前頭葉BDNF6発現量の変化

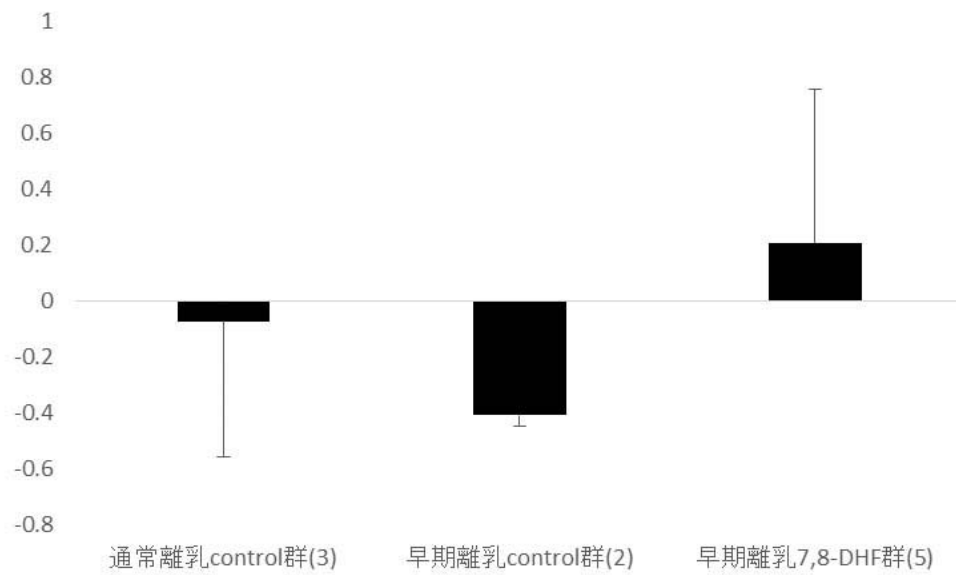


図34 13日齢7,8-DHF局所移植によるオスマウスにおける前頭葉BDNF6発現量 (Z 値) の変化

## ○プロジェクト No. P 15－03

### 研究テーマ

#### マウスにおける社会認知機構の解明

研究期間：平成27年4月1日～平成30年3月31日

プロジェクト班長：菊水健史（伴侶動物学）

プロジェクト班員：茂木一孝（伴侶動物学）

プロジェクト班員：永澤美保（伴侶動物学）

### 概要

近年、自閉症スペクトル障害（ASD）と診断される人の数は150人に1人と言われ、50年前の5～6倍になっている。そのリスクは多岐にわたるが原因遺伝子として Tbx-1 が同定された。このことから本研究では Tbx1 を欠損した仔マウスの母子分離時に観察される音声解析した。仔マウス音声は母マウスを引き寄せる要因を調べるため、ランダム化音声を用いた母マウスの嗜好性実験を行った。母マウスの嗜好性実験では WT の仔マウス音声に比べ Tbx1 欠損仔マウスの音声は有意に探索行動の減少が見られた。これらの結果から、仔マウスの USVs に言語構造に近いものがあることが分かった。

### 緒言

近年、自閉症スペクトル障害（ASD）と診断される人の数は判断基準の拡大も関係しているとはいえ、150人に1人と言われ、50年前の5～6倍になっている。その原因は遺伝や環境因子など様々な可能性が示唆されているが、そのメカニズムは解明されていない。

ASD の患者の網羅的遺伝子解析から Tbx1 という遺伝子の変異が検出され、Tbx1 変異家系において ASD との関連が明らかとなった(1)。Tbx1 はヒト-マウス間においてオルソログ遺伝子であることが分かっている。

ASD の患者では社会認知能力や言語コミュニケーション、共感性において異常が認められている。これらの能力は他個体とのコミュニケーションを成立させるうえで極めて重要である。コミュニケーションは個体が情報を伝達し、それを受容した個体に反応が生じることによって成立する。ヒトを含め、動物は視覚・聴覚・嗅覚・味覚・触覚などの感覚を介して様々な情報をやり取りし、このコミュニケーションを成立させている。一般的に動物における他個体とのコミュニケーションは、身の安全の確保や繁殖相手の選別、食料調達などに役立ち、自らの遺伝情報を後世に伝播するものとして機能していると考えられる。特に音声コミュニケーションにおいてはヒトのみでなく多くの動物種において認められている。音声コミュニケーションには様々な聴覚情報が用いられるが、音として認知できる周波数領域は動物種によって異なる。ヒトが聞くことが可能な音は 20 Hz から 20,000 Hz の周波数領域であり、それ以外の領域の音を聴くことはできない。一般的に 20 Hz から下の音域を超低周波、20,000 Hz よりも上の音域を超音波という。ヒト以外の哺乳類の可聴域は超低周波や超音波に属するものもあり、この音域でコミュニケーションをとる動物もいる。たとえばげっ歯類がコミュニケーションに用いる超音波には周波数が高いため障害物や湿気、埃による減衰が大きく、遠くに届かないという特徴がある。これにより同時に両耳における音圧の差異が明確になりやすく、音源を定位しやすいという特徴もある。このような特性のため定位しやすく天敵に見つかる危険性が低い超音波帯域の音声はげっ歯類のコミュニケーションに使われるようになったと考えられている(2)。

これらの共通点から本実験では Tbx1HT 欠損仔マウス音声及び、その音声に言語的構造が存在するのかの検証のためランダム化音声を用い母マウスの嗜好性を調べた(3)。

### 材料と方法

#### 動物・飼育環境

供試動物として（株）日本クレア（横浜、日本）より導入し、本研究室において繁殖維持された C57BL/6j メスマウス（B6）を使用した。7～13週齢のオスマウスとメスマウスをつがいにして飼育し、メスの妊娠が確認された時点でオス

マウスを隔離し出産させた。生後 28 日で離乳し、その後 1 ケージにつき同性のマウスを 4 – 5 匹で飼育した。すべてのマウスは 12 時間の明暗周期（明期；6:00-18:00, 暗期；18:00-6:00）で、一定の室温（ $24 \pm 1$  °C）、相対湿度（ $45 \pm 5\%$ ）に保たれた動物室で飼育ケージ（17.5 cm × 24.5 cm × 12.5 cm）にて維持した。成熟後（> 生後 8 週齢）にオスマウスとメスマウスをペアにし、メスの妊娠が確認された時点でオスマウスを隔離した。妊娠メスマウスを単独飼育し、出産後 5 ~ 7 日経過した母マウスを実験に使用した。実験時の週齢は 12-16 週齢であった。床敷には Corncob（SHPHERD, 米国）を、巣材にはパルマス  $\mu$ （(株)理科研）を使用した。床敷きの交換は原則 1 週間に 1 度とし、出産したケージでは仔が生後 7 日目以後となってから交換した。固形飼料および水は自由摂取とした。飼料として繁殖用および出生後 21 日以前の動物には繁殖用固形飼料（(株) 船橋農場）を、そのほかの動物には飼育用固形飼料を給餌した。

### 超音波再生装置

超音波の再生には再生機として nc-Si emitter（東京農工大学、越田先生提供）を用いた。Software として RECORDER NI-DAQ mx を利用した。各実験日の実験開始前に専用のマイクを用いて音圧が  $50 \pm 2$  となるよう確認をとった。各機器の設定は下記に準じた。

アンプ：AC 20、Bias 3.0

AD/DA コンバータ：Vol 0.55

マイク：Vol 10 GAIN 7

超音波の再生機器の詳細については以下の通りである。Nc-Si emitter はナノクリスタリンシリコン（nano-crystalline Silicon; nc-Si）とクリスタルシリコンを交互に配置してあり、熱を加えた場合、二つの物質の熱特性により機械的な大きな振動を伴うことなく超音波を発生することができる（Shinoda et al., 1999; Kihara et al., 2006）。このスピーカーを vocalization-analyzer システム（MK-1500、室町機械、東京）の出力端子に接続し、さらに MK-1500 の出力端子にパワーアンプリファイアー（アズビル、神奈川）を接続した。実験の前の超音波音声再生されているかの確認は、超音波マイク（ACO TYPE 7016、ACO）により行った。

### 実験ケージ

飼育ケージと同じ大きさのプラスチックケージを用いた。左右の長壁には穴をあけ（角から 60 mm, 底から 35 mm を中心として直径 40 mm）、さらにケージ内で再生した音声の反響を防ぐためにスリット（角から 1 cm, 底から 1 cm の位置に 4 mm 間隔で  $8 \times 12$  mm）をあけた。それぞれの穴には先端が筒で覆われた筒（内径 36 mm、外径 40 mm、長さ 150 mm）を取り付けた。ケージには新しい床敷を敷き詰めた。

### 防音室および防音箱

実験を行う時は（株）カワイ音響システムの防音室（横 143 cm × 高さ 228 cm × 奥 233 cm）の中に設置してある防音箱（室町機械 横 70.5 cm × 高さ 79.5 cm × 奥 72.5 cm）の中の赤色灯の下で行った。防音箱には音の反響を防ぐために内側の壁にスポンジが取り付けられている。

### 実験手続き

#### 母マウスの pup USVs に対する反応

飼育ケージを防音室に 1 日馴化した。実験当日、母マウスを飼育ケージから防音箱の二者選択課題ケージに移し、赤色灯のもと 30 分間馴化した。馴化後、nc-Si スピーカーを各筒の網のすぐ外側に設置した。馴化の後 CCD カメラで記録を開始し嗅覚刺激は nc-Si emitter と網の間に提示した。両方の筒に侵入したことを確認し、その後 5 分間、刺激音（WT pup USVs or HT pup USVs）をどちらか一方のスピーカーから再生した。刺激音再生中の母マウスの以下の行動を解析した。筒を覗いた回数（peep number）、筒を覗いた時間（peep duration）、筒内侵入回数（enter）、筒内滞在時間（stay）、網への探索時間（search）、侵入潜時（latency）を計測した。計測は eventrecorder（東京大学獣医動物行動学研究室）を用いて行った。試験終了後、母マウスをホームケージに戻した。翌日、同様の手順で刺激音を替え実験を行った。刺激音の提示順序はカウンターバランスをとった。

#### 再生音声 1

本研究室での先行研究により録音された WT pup USVs のうち各 Call Type（Syllable）の発声回数、発声時間が代表的なものを WT pup USVs として使用した。この音声に対し同程度の発生回数、発声時間のものを HT pup USVs として使

用した。

この超音波領域音声の録音は以下の機器を用いた。超音波マイクをアンプリファイアー（UMA-2、室町機械、東京）に接続し、検出した音を前述した MK-1500 を介してデジタル信号に変換、コンピューターに入力した。また、コンピューター上では Spectral LAB により、検出した超音波領域の音声を表示することが可能である。

## 再生音声 2

WT pup USVs については実験 1 - 1 に準ずる。Randomized pup USVs については以下の手順で作成した。WT pup USVs を Call ごとに分割し時間軸に沿ってすべてに番号をふった。ただしこの時の Call とは 1 つの Syllable と次の Syllable までの interval とする。この番号 (No,694 まで) を 100 通りにランダム化し元の音声の Syllable 構造からよりその構造が壊されたものを選択した。この構造の違いについてはまず、2 つの Syllable の発生率を計算する。Syllable は計 10 種類なので 100 通りの発生率について計算されるが以下の 3 点に着目して選別した。一つ目は元データで最も発生率の高かった "cx-cx" の発生率が減少していること。二つ目は元データで発生率が 4% 以上であった上位 4 種類 (cx-cx, h-h, ts-ts, h-cx) の組み合わせが減少していること。最後に元データで発生率が 3% 以上であった上位 7 種類 (cx-cx, h-h, ts-ts, h-cx, cx-f, cx-h, fs-cx) の組み合わせが減少していること。この条件に合ったパターンが 10 通りであったが、より各条件の発生率が減少しているものを採用した。採用されたランダム化の番号に従い分割した音声を再構築したものを Randomized pup USVs として使用した。音声の編集には Audacity を用いた。

## 統計処理

各測定項目について wilcoxon rank sum test を用いて検定した。有意水準は 0.05% とした。統計ソフトはエクセル統計の Statcel 3 をもちいた。

## 結果

WT pup USVs と HT pup USVs に対する嗜好性の結果を測定項目ごとに図 1-4 に示した。WT pup USVs において筒を覗いた時間が non-sound よりも sound で長くなることが分かった。同じ項目でも HT pup USVs では有意な差は見られなかった。筒内滞在時間においても WT pup USVs 再生時は non-sound よりも sound で有意に長くなったが HT pup USVs では有意な差は見られなかった。網探査時間も同様に WT pup USVs で有意に sound が高い値になるが、HT pup USVs では有意な差は見られなかった。

WT pup USVs と Randomized pup USVs に対する嗜好性の結果を測定項目ごとに図 1-4 (rWT) に示した。筒内侵入回数において WT pup USVs では有意に no-sound よりも sound で高い値になったが Randomized pup USVs 再生時では有意な差は認められなかった。筒内滞在時間においても WT pup USVs では有意に no-sound よりも sound で高い値になったが Randomized pup USVs では有意な差は見られなかった。網探査回数では WT pup USVs では有意に no-sound よりも sound で高い値になった。しかし Randomized pup USVs 再生時では有意な差は見られなかった。網探査時間では WT pup USVs では有意に no-sound よりも sound で高い値になったが Randomized pup USVs では有意な差は見られなかった。

## 考察

再生実験 1 の結果から WT pup USVs の音声は母マウスの関心を惹き、接近行動が増加したが、HT pup USVs ではそれが認められなかった。今回使用した音声の特徴から、このような結果になった要因は各 Syllable の発声割合もしくは Syllable 構造の違いによるものと考えられる。また実験 1 の結果より出生時においては体重に差は現れないが、発声ができるようになりだす PD.4 からはその体重に有意な差が表れることが分かった。これは、実験 1 の結果と一致する。その後離乳期においても体重に差が表れることから、固形飼糧をとるにあたり他の個体の行動から学習できない可能性が示唆された。しかし今回の Tbx1HT 欠損マウスは全身での HT 欠損であるため代謝、吸収等に問題がある可能性は否定できない。ただし先行研究より運動活性や嗅覚系に関しては異常がないことが報告されている (5)。

今回の実験では音声の違いは構造だけであることから、母マウスの関心を惹くうえで Syllable 構造が重要であることが示唆された (4)。実験 1 - 1 の結果を含めるとマウスの pup USVs には言語構造に近いものを有しており、Tbx1HT マウスではそれを正しく組み合わせで発声することができていないことが考えられた。

## 文献

1. Paylor R, Glaser B, Mupo A, Ataliotis P, Spencer C, Sobotka A, Sparks C, Choi CH, Oghalai J, Curran S, Murphy KC, Monks S, Williams N, O'Donovan MC, Owen MJ, Scambler PJ, Lindsay E. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2006 May 16; 103(20): 7729-34. Tbx1 haploinsufficiency is linked to behavioral disorders in mice and humans: implications for 22q11 deletion syndrome.
2. Asaba A, Kato M, Koshida N, Kikusui T. *J Vis Exp*. 2015 Sep 3; (103). doi: 10.3791/53074. Determining ultrasonic vocalization preferences in mice using a two-choice playback test.
3. Okabe S, Nagasawa M, Kihara T, Kato M, Harada T, Koshida N, Mogi K, Kikusui T. *Behav Neurosci*. 2013 Jun; 127(3): 432-8. Pup odor and ultrasonic vocalizations synergistically stimulate maternal attention in mice.
4. Takahashi T, Okabe S, Broin PÓ, Nishi A, Ye K, Beckert MV, Izumi T, Machida A, Kang G, Abe S, Pena JL, Golden A, Kikusui T, Hiroi N. *Mol Psychiatry*. 2015 Dec 15. Structure and function of neonatal social communication in a genetic mouse model of autism.
5. Hiramoto T, Kang G, Suzuki G, Satoh Y, Kucherlapati R, Watanabe Y, Hiroi N. *Hum Mol Genet*. 2011 Dec 15; 20(24): 4775-85. Tbx1: identification of a 22q11.2 gene as a risk factor for autism spectrum disorder in a mouse model.

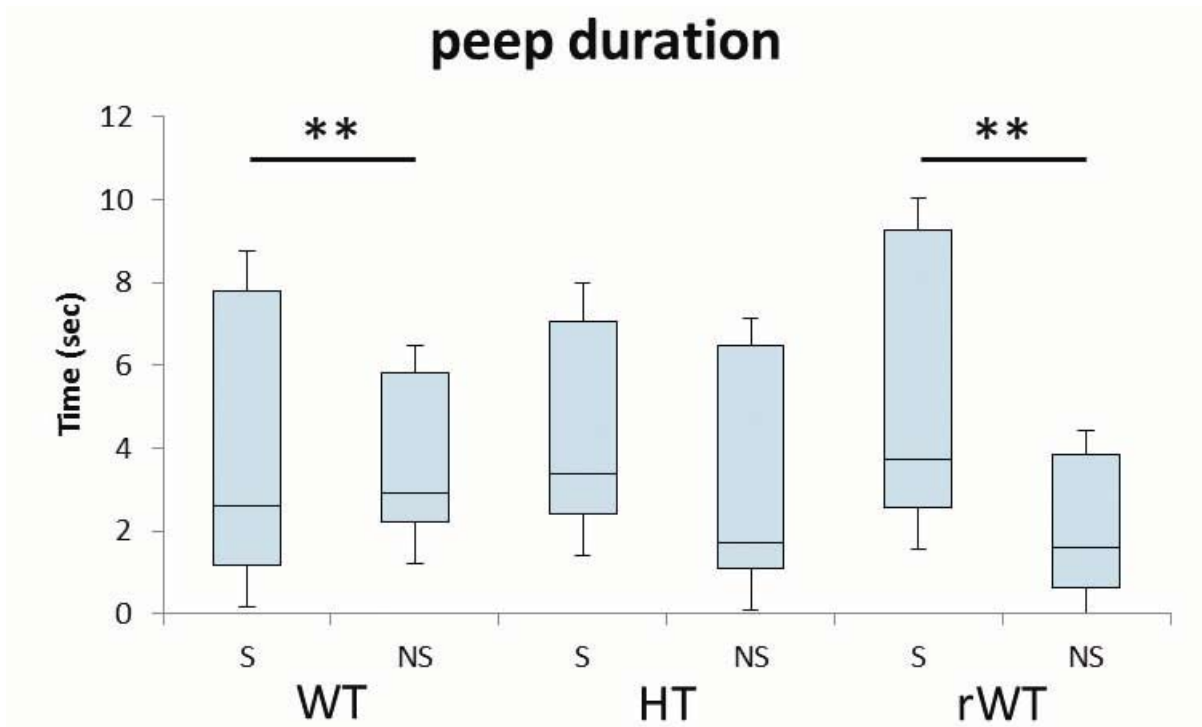


図1：音声再生時の筒を覗いた回数（peep number）の比較

S：sound

NS：no-sound

WT：A340 音声

HT：A338 音声

rWT：Randomized pup USVs

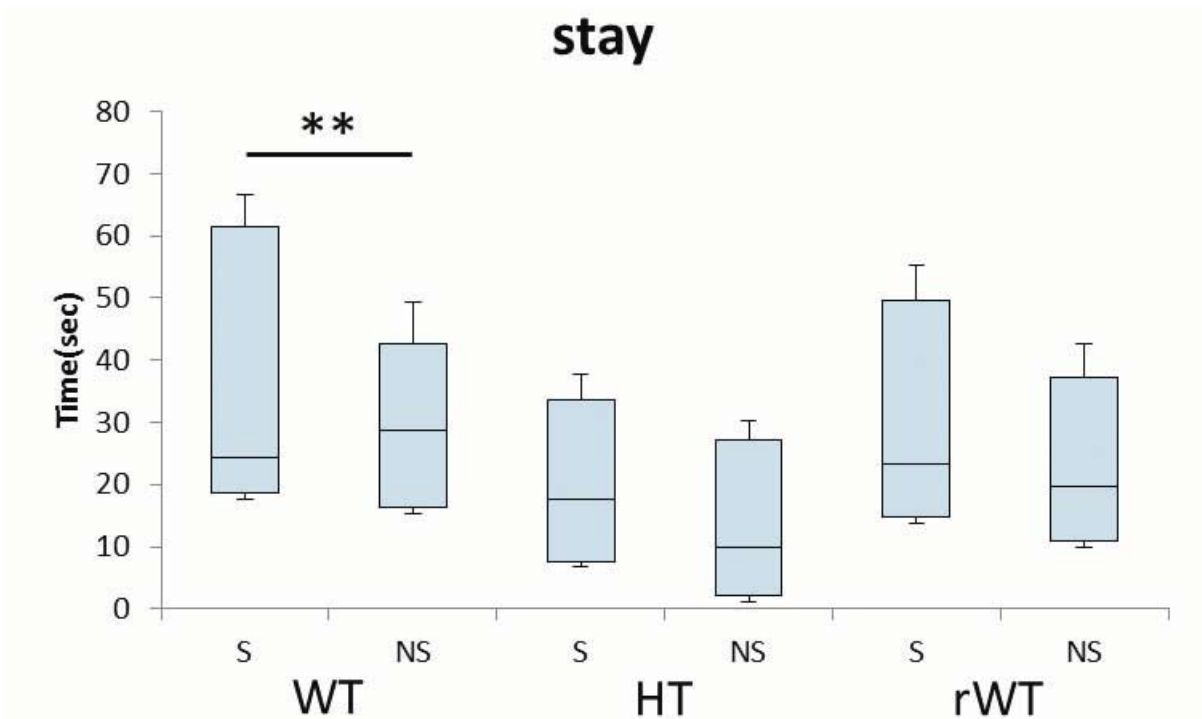


図2：音声再生時の筒に滞在した時間（stay）の比較



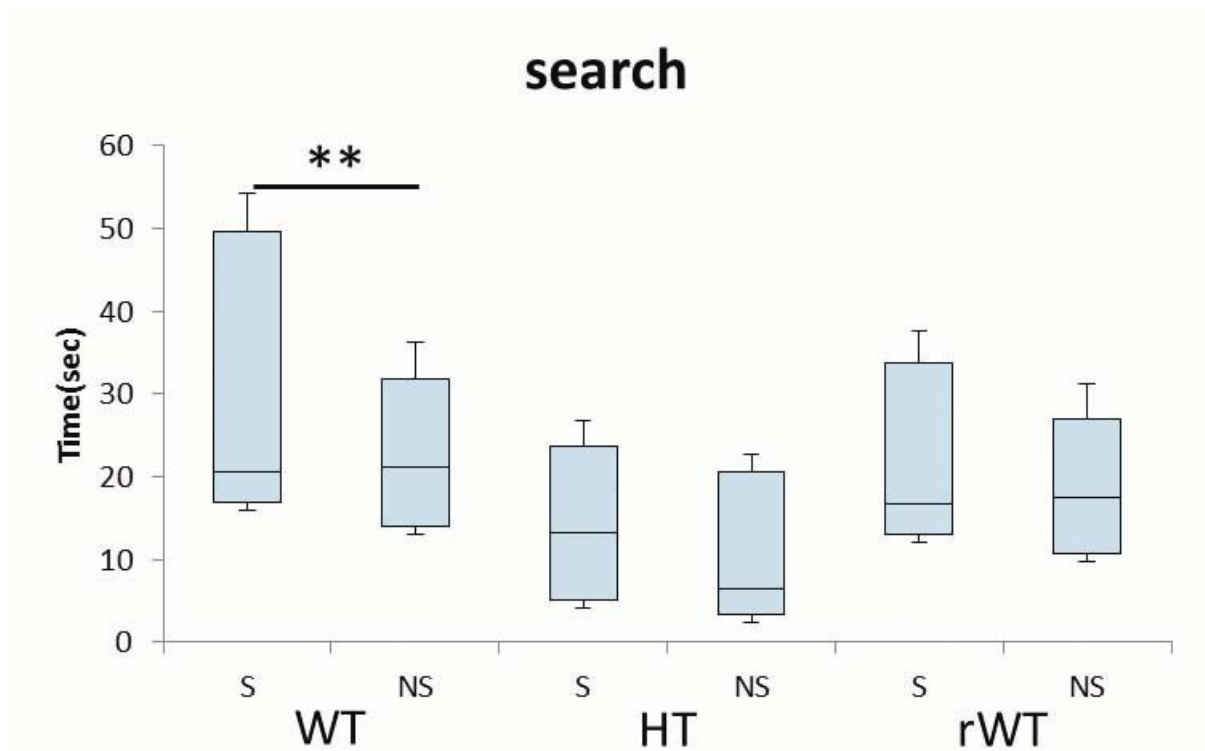


図3：音声再生時の網を探索した時間（search）の比較

S：sound

NS：no-sound

WT：A340 音声

HT：A338 音声

rWT：Randomized pup USVs

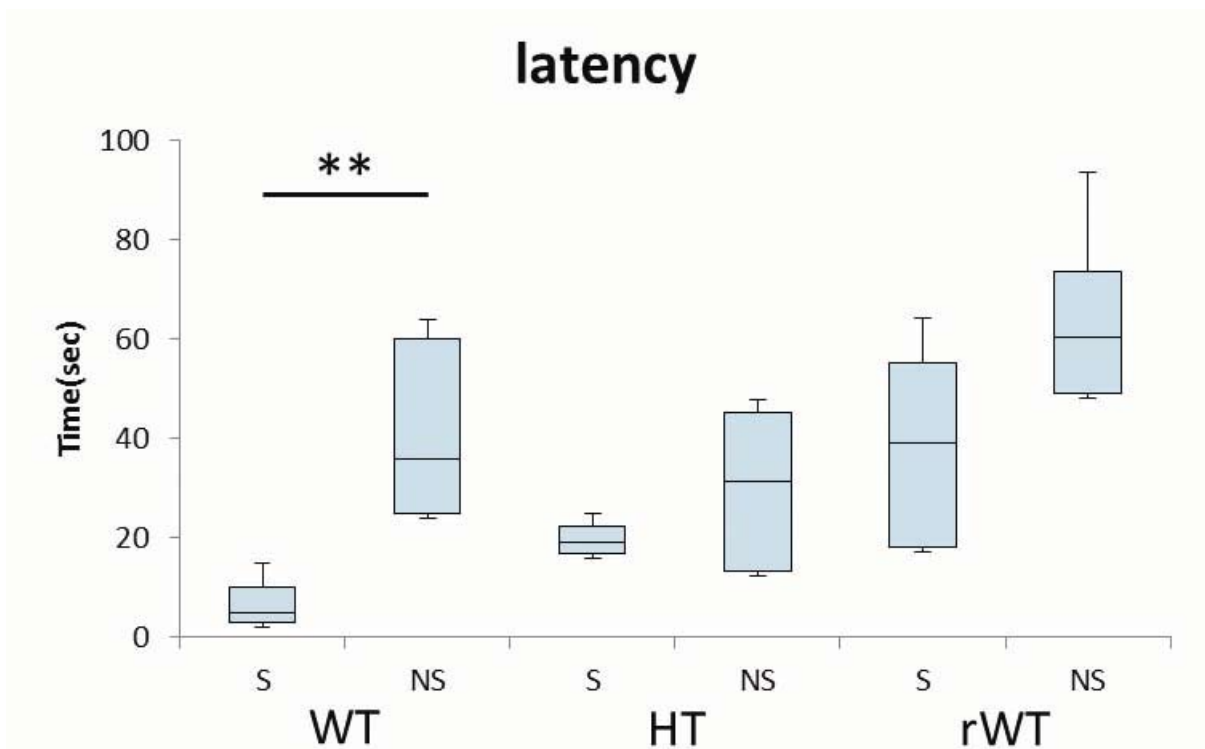


図4：音声再生時の筒に入るまでの潜時（latency）の比較

○プロジェクト No. P 15－04

研究テーマ

腸内細菌移植による中枢ならびに行動分泌機能の伝播の解析

研 究 期 間 ：平成 27 年 4 月 1 日～平成 30 年 3 月 31 日

プロジェクト班長：菊水健史（伴侶動物学）

プロジェクト班員：茂木一孝（伴侶動物学）

プロジェクト班員：永澤美保（伴侶動物学）

**（現在、特許申請準備中につき、紙面での提出ができません）**

## ○プロジェクト No. P 15－05

### 研究テーマ

#### マウスにおける情動伝染の分子調整機構の解明

研究期間：平成27年4月1日～平成30年3月31日

プロジェクト班長：菊水健史（伴侶動物学）

プロジェクト班員：茂木一孝（伴侶動物学）

プロジェクト班員：永澤美保（伴侶動物学）

### 概要

情動伝染は、他個体の情動状態が自身にも伝染する現象で、原始的な共感性といわれている。マウスにおいても痛み情動伝染が確認されている。また、情動伝染に関わる脳部位では、TRPV1という身体的痛み感受性分子の発現が認められている。そこで本研究では、TRPV1が共感性行動に関与していると仮説を立て、TRPV1欠損マウスを用いて、TRPV1が痛み情動伝染に及ぼす影響を調べた。ホルマリン投与により痛みを誘起し、痛み情動伝染を足なめ回数で評価した。その結果、TRPV1欠損マウスでは情動伝染が起こらなかった。これらから、TRPV1は実際に痛み情動伝染に関与していることがわかった。今後は、これに伴う脳内変化などさらなる影響の検証が必要である。

### 緒言

他者が痛がっている様子を見ると、自分も同じように痛い思いをしているような気分になることは、誰しも経験したことがあるだろう。このような共感能力は、高等な霊長類にのみ見られるものだと考えられてきた。しかしこれは哺乳類全般にわたる情動伝染のような現象と理解されはじめている<sup>(1)</sup>。

このような情動伝染を調べた先行研究では、同ケージで飼育されたマウス2匹に痛みを伴うホルマリン溶液を投与する実験が行われた。この実験では、2匹のマウスに同濃度のホルマリン溶液を投与したときと、2匹それぞれ異なる濃度のホルマリン溶液を投与したときとで、痛みを表す行動の発現が比較された。その結果、自身は高濃度を、ケージメイトには低濃度を投与された時と比較し、二個体ともに高い濃度が投与された時は痛みが上昇することが示された<sup>(2)</sup>。これは、他個体が感じている痛みが伝わり、自身が感じている痛みと相まってさらなる痛みの行動を引き出したからだと考えられている。

また、痛みの中枢伝達機構には、TRPV1という身体的痛み感受性分子が関与している。TRPV1は、強い酸や熱、トウガラシの辛味成分であるカプサイシンなど、さまざまな侵害刺激によって活性化する多刺激痛み受容体である。先行研究において、TRPV1を遺伝的に欠損させた遺伝子改変マウスでは、低濃度のホルマリンに対する痛み行動が減少することが示されており、野生型マウスと比較しTRPV1KOマウスは痛み鈍感になっていると考えられた<sup>(3)</sup>。また興味深いことに、TRPV1は中枢でも発現し、たとえば帯状回など情動伝染に関与する脳部位でも発現が認められている<sup>(4)</sup>。これらのことから、TRPV1は自身の身体的痛みのみならず他者の痛みの受容、つまり痛み情動伝染に関与しているのではないかと仮説を立てた。つまりTRPV1KOマウスでは、他個体が示す痛み行動を受容しても情動伝染は起こりにくいと見え、以下の実験を行った。

本実験では、まず、ワイルドタイプ（C57BL/6）のマウスにおいて、1匹のみでホルマリン溶液を投与した時と、2匹ともに高濃度のホルマリン溶液を投与した時、観察個体には高濃度、もう1匹には低濃度のホルマリン溶液を投与した時で痛み行動の発現を測定した。これにより、先行研究<sup>20</sup>で用いられているICR系統マウスでみられた痛み情動伝染が、C57BL/6系統マウスにおいてもみられるかを調べた。次に、TRPV1KOマウスにおいても同様に実験を行い、情動伝染が起こるかどうかを調べた。

### 材料と方法

#### 試供動物

試供動物として、TRPV1KOマウス（岡崎統合バイオサイエンスセンター 細胞生理研究部門 富永真琴先生提供）

を用いた。

また、コントロールとして、本研究室で繁殖維持された C57BL/6 マウスを使用した。

#### 飼育環境

温度 23℃、湿度 50%、明期 12 時間、暗期 12 時間（6 時点灯、18 時消灯）に調整された飼育室で中ケージ（17.5 cm × 24.5 cm × 12.5 cm）で飼育した。床敷きには Corn Cob（Shephaerd's Cob:SHEPHERD）、巣材にはパルマス  $\alpha$ N（鍋林フジサイエンス株式会社）を用いた。動物には、飼育用固形飼料（株式会社船橋農場）を給餌し、水は自由採取とした。ペアの間に産まれた仔は生後 21 日まで父マウスと母マウスと共に飼育した。その後、雄と雌を分けて離乳し、性成熟期（生後 8 週齢）を迎えてから実験に供した。

#### 繁殖

TRPV1KO マウスの繁殖は、ヘテロ型×ヘテロ型で行った。ホモ型の仔を TRPV1KO マウスとして用いた。

#### DNA 抽出

1.5 ml チューブに切断した指を入れ、0.04M に調節した NaOH 溶液を 500  $\mu$ l 入れた。サンプルが入った 1.5 ml チューブを 95℃ で 1 時間融解した。指が溶けたことを確認後、チューブを vortex し、1 M に調節した Tris-HCl (pH7.5) を 200  $\mu$ l 加え、中和し、DNA サンプルとした。

#### PCR 試験

PCR は MyCycler Thermal Cycler（バイオ・ラッド・ラボラトリーズ株式会社）を用いた。使用するものは、精製水（大塚製薬）、10Xbuffer、dNTPs (2.5 mM each)、rTaq、プライマーミックス、DNA サンプル、1.5 ml チューブ、200  $\mu$ l チューブである。プライマーは -20℃ で保存した。

#### TRPV1KO の検出

TRPV1KO の検出におけるプライマーは、VR1FOR、VRTA1、VR1REV を用いた。各プライマーの配列は以下の通りである。

VR1FOR 5'-TGGCTCATATTTGCCTTCAG-3'

VRTA1 5'-CTGTCCATCTGCACGAGACT-3'

VR1REV 5'-CAGAATCTCTTTCAGCCCCTGG-3'

プライマーミックスは、各プライマーを VR1FOR:VRTA1:VR1REV=1:1:2 の割合で混合して調製した後、-20℃ で保存した。

PCR 反応液は、精製水 6.32  $\mu$ l、10 x buffer 1  $\mu$ l、dNTPs (2.5 mM each) 0.8  $\mu$ l、プライマーミックス 0.8  $\mu$ l、rTaq 0.08  $\mu$ l を、サンプル+1 の量で混ぜ、氷上で分注した後、DNA サンプルを 1.0  $\mu$ l を加えた。PCR は、95℃ を 5 分間の後、95℃ 45 秒、54℃ 40 秒、72℃ 1 分を 35 サイクルし、72℃ 10 分を 1 サイクルし、その後 10℃ で保存した。

#### 電気泳動

電気泳動に使用する 1.5% アガロースゲルを作成した。1 × TAE 溶液（組成は図 1-1 を参照）を 120 ml とアガロース（和光純薬工業株式会社）1.8 g を三角フラスコに入れ、ラップで二重にふたをし、穴を数カ所開けた。レンジで沸騰するまで加熱した後、人肌程度に冷めるまでゆっくり攪拌した。これをアガロースが完全に融解するまで繰り返した。コームをセットしたトレーに静かに注ぎ込み、ラップで上から覆い、室温で 30 分以上放置した。固まったらトレーから取り出し、電気泳動装置（Mupid-2plus タカラバイオ株式会社）にセットし、ゲルにマイクロピペットを用いてサンプルを 10  $\mu$ l 入れた。ゲルの一番端のレーンにはサイズマーカー（Gene Ladder Wide 1：和光純薬工業株式会社）を入れた。100 V で陰極から陽極方面に 15 分間電気泳動し、エチジウムブロマイド（EtBr Solution 01305H 10 mg/ml：和光純薬工業株式会社）が入ったタッパーに入れ、15 分間シェイカーの上に乗せながら浸漬した。DW を満たしたタッパーでエチジウムブロマイドリンスを行い、ゲルを Transilluminator（Trans illuminator Model：LMS-20E P/N 95-0220-03：フナコシ株式会社）に移し、紫外線を照射し観察した。

#### 実験スケジュール

動物を 21 日齢で離乳させた後、同性で 2 匹ずつに分けてケージメイトを作成し、飼育した。動物が 8 週齢を超え、ケージメイトを作成してから 28 日以上経過してから実験を行った。

## ホルマリン投与実験

観察用チャンバー（直径 25 cm のメジャーカップ）をアクリルガラスの上に置き、下方からマウスの動きが見えるよう設置した。このチャンバーに、実験の 1 時間以上前にマウスを入れ、馴化を行った。その後、マウスを速やかに取りだし、0.5% または 2% のホルマリン溶液を、左足裏に皮下注射し、再びチャンバー内に戻した。鏡をアクリルガラスの下に斜めに設置し、そこから反射する、下方から見たマウスの様子をビデオカメラで録画した。録画は、マウス 2 匹に注射をし、チャンバーに戻し終わってから 30 分間とした。

先に注射するマウスを demonstrator、次に注射するマウスを observer とし、observer の行動を解析した。群は、demonstrator と observer がどちらも野生型であるコントロール群と、demonstrator が野生型、observer が TRPV1KO である TRPV1KO 群に分けた。Observer に 2% のホルマリンを投与し、demonstrator には 0.5% のホルマリンを投与する条件、2% を投与する条件、1 匹のみで 2% を投与する条件で実験を行った。

## 統計・解析の手法

解析は、各行動の発現した時間を、Excel イベントレコーダー（東京大学獣医動物行動学研究室卒業生赤川直人氏および Chuo Ito Technoscience 山本武氏作製）を用いて測定し、観察時間 30 分間のうち行動が発現した時間の割合を算出した。記録する行動は、Licking、Self-grooming、Allo-grooming（Single 群をのぞく）である。0.5% 条件と 2% 条件では、observer の行動のみ観察し、解析した。

ホルマリンの投与による効果が、時間の経過によって二相性の反応を示すことが知られていることから、開始 0 分から 5 分を Phase1、10 分から 30 分を Phase2 とし、分けた解析も行った。

## 結果

結果は、図 1-1~9 で示した。群は、コントロール群（C57BL/6）、TRPV1KO 群（demonstararor が C57BL/6、observer が TRPV1KO）で示した。

### I. コントロール群と TRPV1KO 群における Licking 行動発現時間の比較

各群の 0.5%、2%、Single 条件における Licking 発現時間の割合を図 1-1、1-2、1-3 に示した。WT マウスでは Single に対して、デモンストレーターに 2%、0.5% のホルマリンを同時投与されることで、痛み行動の増強が認められたが、TRPV1KO マウスではその痛み増強効果が認められなかった。この光波は Phase1 では観察されず、PhaseII で認められたので、ホルマリンによる炎症性疼痛の情動伝染であることが示された。

### II. コントロール群と TRPV1KO 群における Self-grooming 行動発現時間の比較

各群の 0.5%、2%、Single 条件における Self-grooming 発現時間の割合を図 1-4、1-5、1-6 に示した。痛み行動と同様に、WT マウスでは、Single に対して、デモンストレーターが 2% のホルマリンを同時投与された場合に、Self-grooming の値が上昇した。この効果はデモンストレーターが 0.5% のホルマリン投与の場合では認められなかった。この Self-grooming の増強は PhaseI でも PhaseII でも観察された。特に PhaseI では 0.5% のホルマリンをデモンストレーターに投与した場合でも軽度の上昇が観察された。一方、TRPV1 の KO マウスでは Self-grooming の増強が弱く、全体を通すと有意差が得られず、PhaseI のみで、その効果が認められた。

### III. コントロール群と TRPV1KO 群における Allo-grooming 行動発現時間の比較

各群の 0.5%、2% 条件における Allo-grooming 発現時間の割合を図 1-7、1-8、1-9 に示した。痛み行動や Self-grooming とは異なり、WT ではデモンストレーターの痛みの程度による Allo-grooming の上昇効果は認められなかったが、TRPV1KO マウスでは 2% のホルマリンを投与されたデモンストレーターに対して、高い頻度の Allo-grooming が観察されたが、弱い痛み（0.5% ホルマリン投与）では観察されなかった。この効果は PhaseI でも PhaseII でも同様に観察された。

## 考察

結果 I (図 1-1) において、コントロール群では Single 条件と 2% 条件の間で差が見られたが、TRPV1KO 群では Single 条件と 2% 条件の間では差が見られなかったことから、C57BL/6 マウスでは痛み情動伝染が起こるが、TRPV1KO マウスでは起こらないことが示された。これまで痛み情動伝染がマウスで報告されてきたが、その分子に迫る研究は皆無であった。今回、TRPV1 が最初の分子として同定された。TRPV1 は末梢の疼痛情報を中枢に伝える際に働く分子、つまり自分自身の痛みを伝える分子であると共に、他者の痛みを感じ、自信の痛みを増強させる効果を持つことが明らかとなった。TRPV1 は中枢にも発現することが報告されている。今後、この分子の中枢発現部位の同定、痛み情動伝染時での活性化状態の観察、さらには TRPV1 を操作した場合の痛み情動伝染の変化を観察することで、TRPV1 のもつ機能に迫ることが可能となろう。

## 文献

1. Sivaselvachandran S, Acland EL, Abdallah S, Martin LJ. *Neurosci Biobehav Rev.* 2016 Jun 14. pii: S0149-7634 (16) 30063-X. Behavioral and mechanistic insight into rodent empathy.
2. Langford DJ, Crager SE, Shehzad Z, Smith SB, Sotocinal SG, Levenstadt JS, Chanda ML, Levitin DJ, Mogil JS. *Science.* 2006 Jun 30; 312 (5782): 1967-70. Social modulation of pain as evidence for empathy in mice.
3. Diaz-Franulic I, Caceres-Molina J, Sepulveda RV, Gonzalez-Nilo F, Latorre R. *Mol Pharmacol.* 2016 Jun 22. pii: mol.116.104430. Structure driven pharmacology of transient receptor potential channel vanilloid 1 (TRPV1).
4. Liu MG, Zhuo M. *Mol Brain.* 2014 Apr 5;7:27 No requirement of TRPV1 in long-term potentiation or long-term depression in the anterior cingulate cortex.

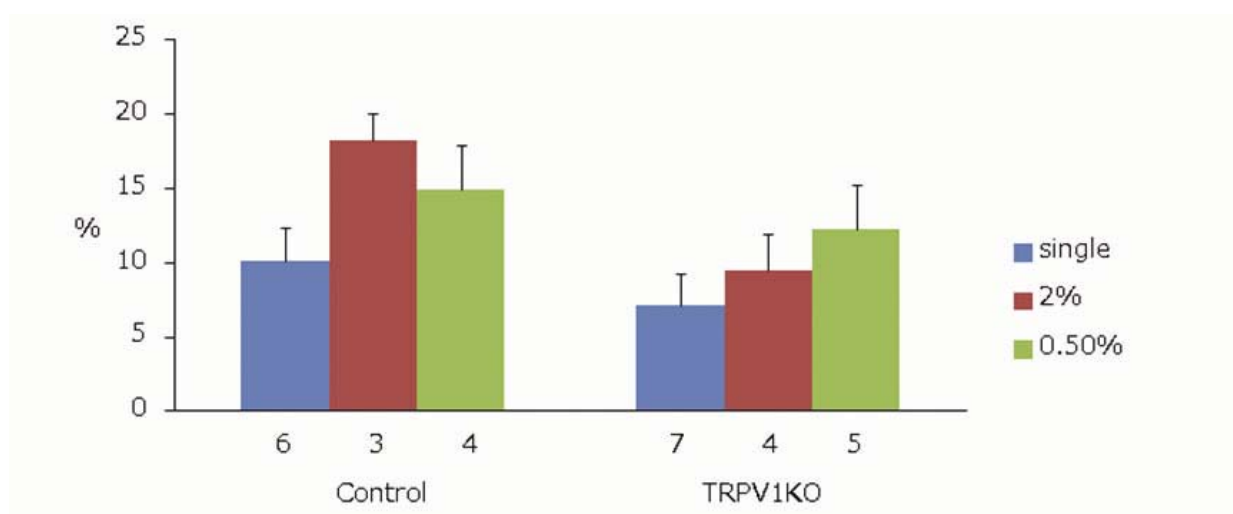


図 1-1 ホルマリン投与実験における Licking 行動の発現割合

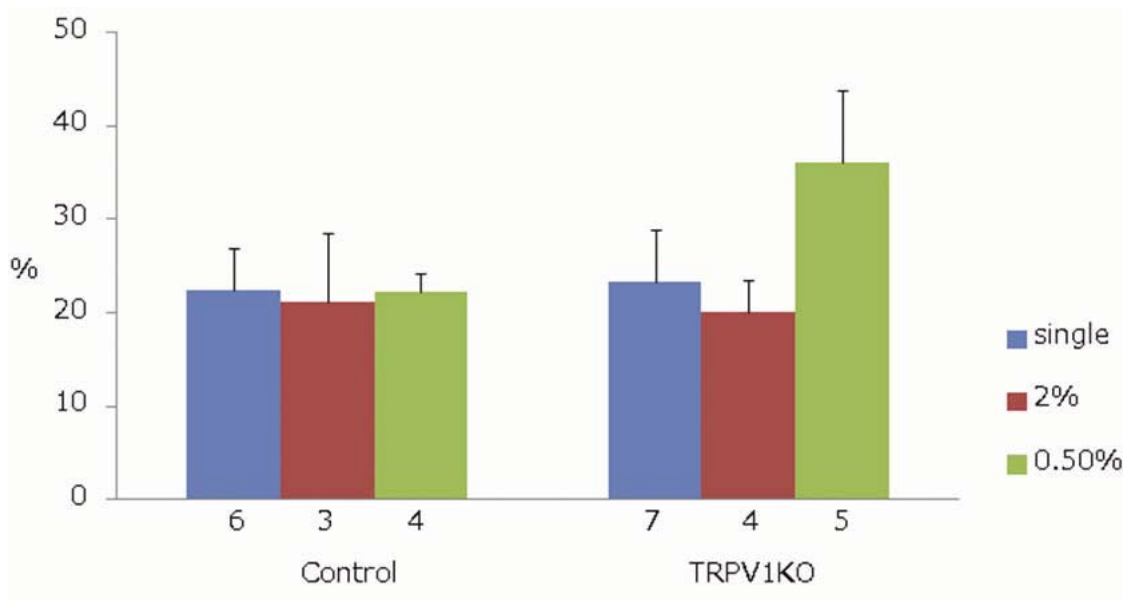


図 1-2 ホルマリン投与実験における Licking 行動の発現割合 (Phase I)

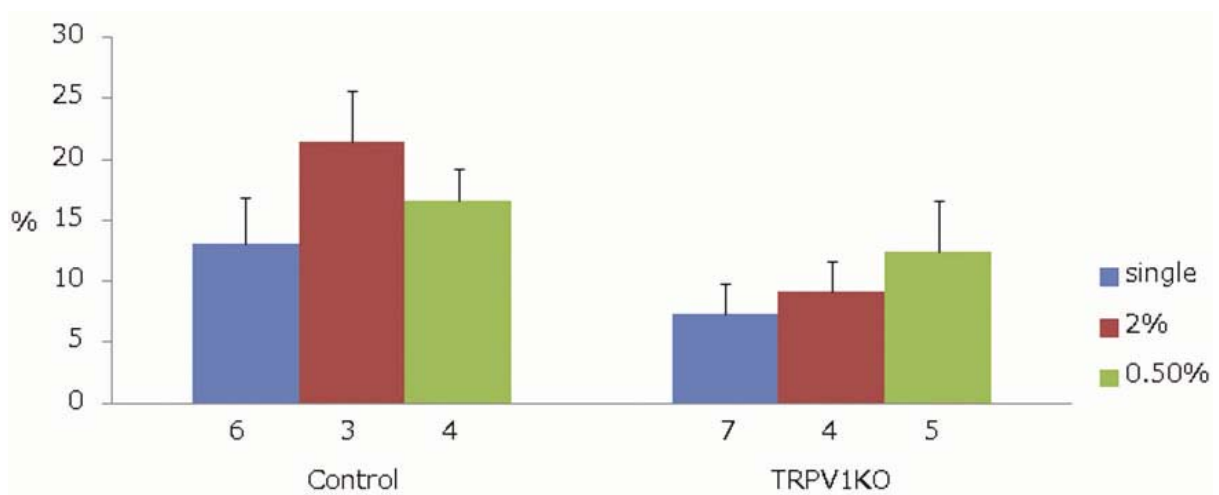


図 1-3 ホルマリン投与実験における Licking 行動の発現割合 (Phase II)

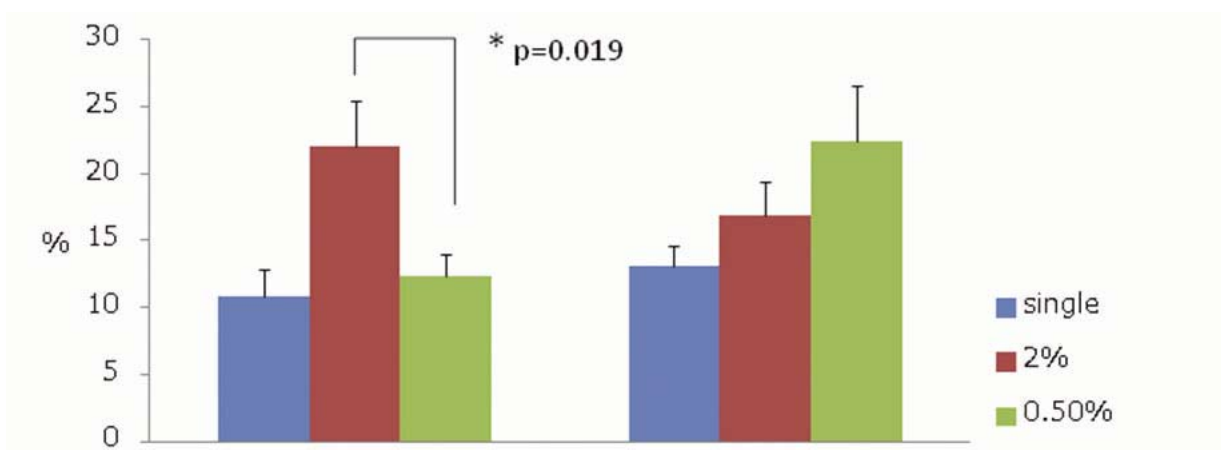


図 1-4 ホルマリン投与実験における Self-grooming 行動の発現割合

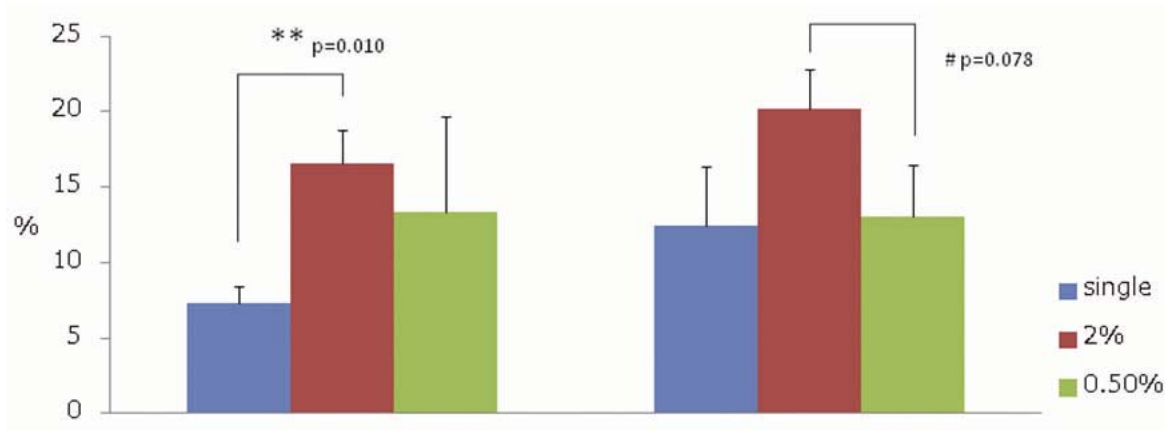


図 1-5 ホルマリン投与実験における Self-grooming 行動の発現割合 (Phase I)

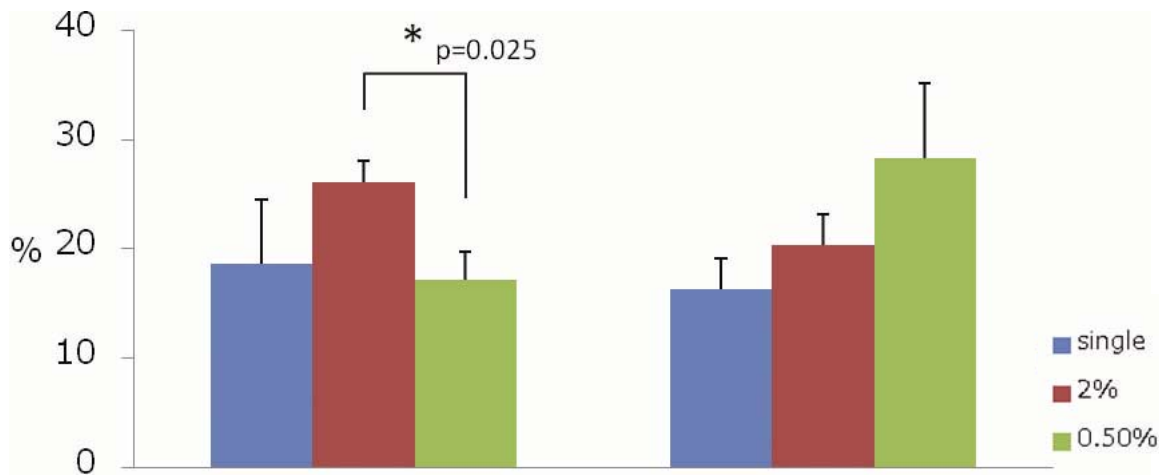


図 1-6 ホルマリン投与実験における Self-grooming 行動の発現割合 (Phase II)

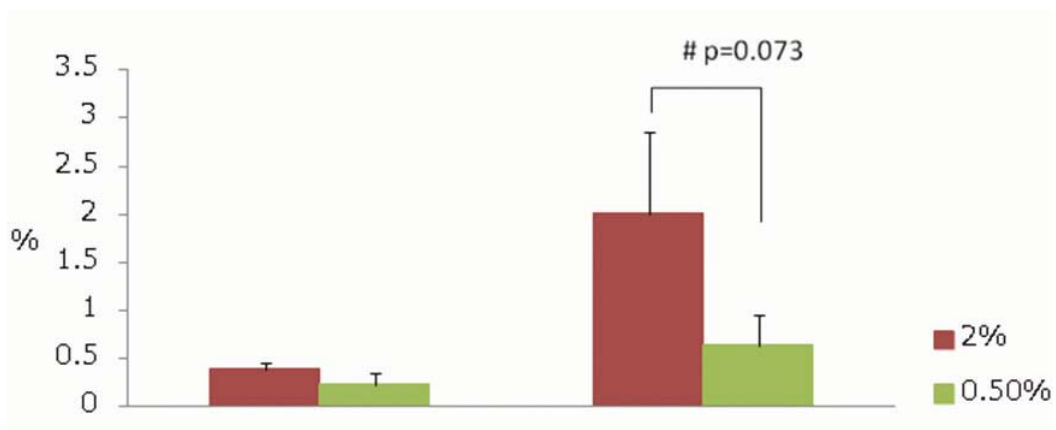


図 1-7 ホルマリン投与実験における Allo-grooming 行動の発現割合



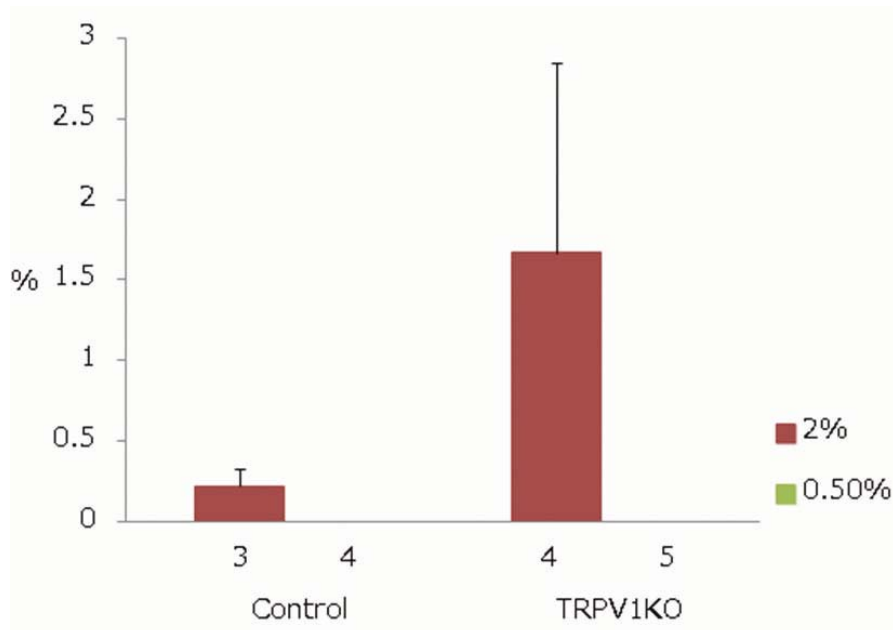


図 1-8 ホルマリン投与実験における Allo-grooming 行動の発現割合 (Phase I)

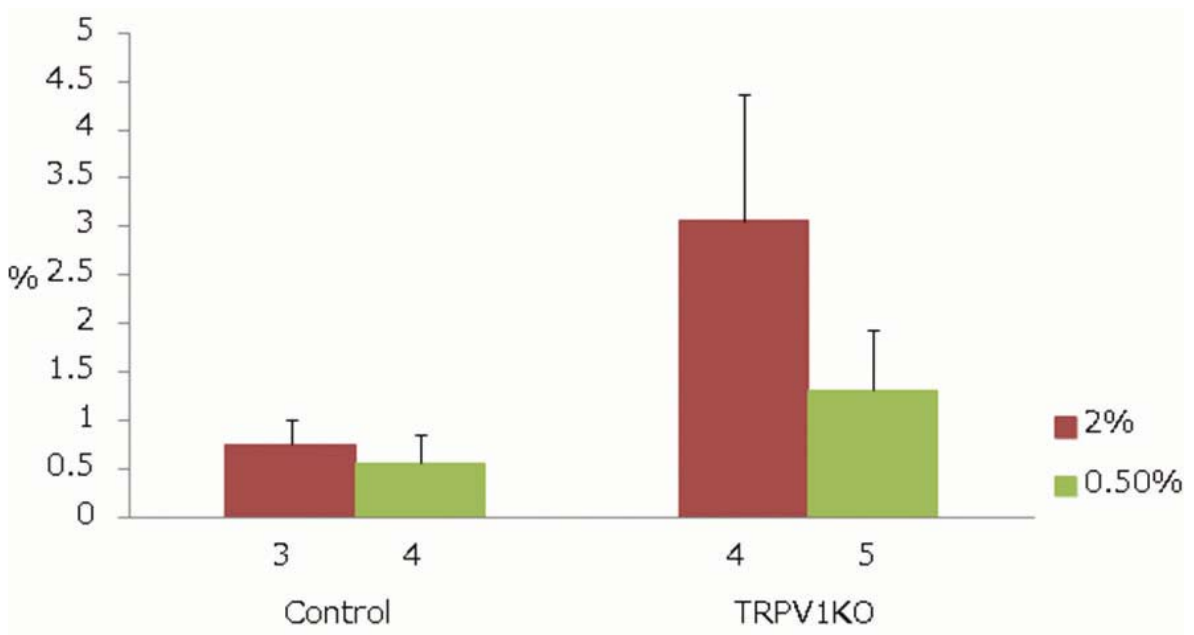


図 1-9 ホルマリン投与実験における Allo-grooming 行動の発現割合 (Phase II)

## 共同利用施設部門

## 共同利用各施設部門

### 【研究部門】

生物科学総合研究所における研究部門は独自の研究活動を担い、原則として3年以内の時限課題を遂行する複数の研究班（生物科学総合研究所研究プロジェクト）から構成される。

各研究班は、研究所専任教員及び時限専任教員と学内の教員（研究班長、研究班員、研究班友）で構成されるが、必要に応じて学外研究員及び客員研究員も、協力研究員として参加している。

また、研究プロジェクト班長は、生物科学総合研究所ワークショップ講演会の参加を義務付けている。

なお、研究班のリーダーは原則として専任教員が当たる。

### 【各施設部門】

生物科学総合研究所における各施設を管理する部門であり、共同利用施設部門は以下の施設がある。

なお、毎年、生物科学総合研究所施設利用者に対し、説明会を開催している。

### ○動物実験施設

生物科学総合研究所内にて動物を飼育する場合は、「外部から病気を持ち込まない」という防疫目的のために、動物の微生物学的グレード（動物がクリーンな状態を示すグレード）はSPFレベル以上でなければならない（イヌを除く）。

また、生物科学総合研究所の動物実験施設には、マウス・ラット・ハムスター等、齧歯類を中心とした小動物、イヌ・ネコ・ウサギ・モルモットを中心とした中動物を飼育するエリアがある。

### ○検疫動物飼育施設

生物科学総合研究所内にて動物を飼育する場合は、専門の実験動物供給業者（2014年度生物科学総合研究所施設利用者説明会資料の19ページに記載）が生産場から適切な輸送手段を経て搬入されたものに限り搬入できる。

ただし、他の研究機関から譲渡された動物を生物科学総合研究所内の施設での飼育を希望する場合は、あらかじめ新たな動物の搬入が可能か否かを確認した上で、原則として2週間前までに搬入届けを事務室に提出し、導入する動物を検疫動物飼育施設にて検収することになっている。

なお、検疫期間は以下のとおりである。

#### <検疫期間>

◆マウス・ラット・ハムスター類 4週間以上

（微生物クリーニングをするか、又はおとり動物と同居4週間後おとり動物の微生物モニタリングの結果で判断する。）

◆モルモット・ウサギ 4週間

◆イヌ・ネコ 2週間以上

（イヌは、検疫期間中に狂犬病ワクチンを接種するか又は注射済票を添付）

◆ニワトリ・ウズラ等 2～9週間

（卵殻を消毒した卵を、持ち込む場合を除く）

### ○SPF動物実験施設

SPF動物実験施設は、主にマウス・ラットなどのSPF動物（特定病原体が存在しないことを確認）を対象とした飼育施設（2階8室）あり、本施設外からの物品の持込やヒトの入域を制限し、無菌的な飼育環境を維持している。

また、マウス・ラットは、クリーンラック内に収容され、二重の感染防御に努めている。

### ○Clean 動物飼育施設

Clean 動物飼育施設では、マウス・ラット・ハムスター・モルモット・ウサギ等を対象とした動物飼育施設（2階8室）であり、特にマウス・ラットについては、クリーンラック内に収容し、二重の感染防御に努めている。  
また、搬入される飼育動物は、すべて SPF 動物である。

### ○Conventional 動物飼育施設

Conventional 動物飼育施設は、イヌ・ネコを対象とした動物飼育施設（3階3室）であり、実験用に生産された動物のみの飼育を行っている。

### ○感染実験施設

感染実験施設は、感染実験を目的とした動物の飼育施設（3階16室）、実験室（3階1室）及び洗浄室が設備されている。

感染実験施設では、各種実験動物を用いて病原体（ウイルス・細菌・寄生虫）の感染実験を行っており、病原体、発症機序、感染動態、診断、治療法の研究開発を進めている。

また、本感染実験施設では、病原体の感染実験施設からの漏出及び屋外からの侵入を遮断するため、本施設内すべての器具器材は滅菌処理される。

### ○化学物質毒性実験施設

本実験施設は、SPF 動物飼育施設（3階3室）、低温環境及び高温環境が設定できる飼育室（3階2室）を備え、それぞれの目的に合わせ切り替え可能な陰陽圧兼用動物飼育ラックが設備されている。

本実験施設では、内分泌攪乱化学物質や発癌性物質を始めとする多くの化学物質に関し、人や動物に及ぼす影響、並びに環境に及ぼす影響についての研究が進められている。

各動物実験施設には、バイオハザード及びケミカルハザード担当者を配置し、細心の注意が払われている。

### ○水生生物飼育施設

淡水・海水に生息魚介類や藻類さらに両生類など、広範囲の水生動植物を対象とした飼育施設（23℃と13℃の2つの恒温室）ある。

各飼育室は、魚介類や藻類を、数百匹飼育できる。

### ○ラジオアイソトープ実験施設

ラジオアイソトープ実験施設は、12部室から構成されており、各々の部屋は、各種トレーサー実験、ラジオイムノアッセイ法によるホルモン量の測定、生理活性物質定量、動物個体への放射線標識化合物投与による代謝実験、組換え体を用いた機能活性の評価、ウイルスの分離と性状解析等を行っている。

本実験施設の設備は、ラジオアイソトープを用いる代謝実験室のほか、動物飼育室、ラジオアイソトープ測定室などがある。

本実験施設の機器備品は、液体シンチレーションカウンター、 $\gamma$ -カウンター、安全キャビネットなどがある。

なお、ラジオアイソトープ実験施設は、法律及び規則に基づいた正しい放射性同位元素の使用と厳密な管理の上に機能運営されている。

### ○組換え DNA 実験施設

組換え DNA 実験施設は、P1・P2 及び遺伝子組換え実験に対応したバイオハザードレベルの実験施設は、3部室から構成されており、各々の部屋は、本学の遺伝子研究を支援するためのものである。

本実験施設は、遺伝子構造、分子獣医学、遺伝子科学に関連する組換え DNA 技術を含めた遺伝子工学の分析を目的としている。

平成 26 年度生物科学総合研究所実験施設利用費及び実験動物飼育状況

平成 26 年度生物科学総合研究所実験施設の飼育利用費（図 1）及び実験動物飼育状況（図 2）は、次のとおりである。

**（図 - 1） 生物科学総合研究所実験施設利用費一覧**

平成 26 年 4 月現在

利用場所	種類	利用者（円/日）	1ゲージ当たり 最大収容匹数	内 訳（円）	
		（ゲージ・水槽等）		基本料金	飼料費
S P F	マウス	16	3	10	6
	ラット	30	3	20	10
	ウサギ	47	1	30	17
ク リ ー ン	マウス	11	3	5	6
	スナネズミ	17	3	10	7
	ハムスター	24	2	15	9
	ラット	20	3	10	10
	モルモット	17	2	10	7
	ウサギ	31	1	17	14
毒 性	マウス	11	3	5	6
	スナネズミ	17	3	10	7
	ハムスター	24	2	15	9
	ラット	20	3	10	10
	モルモット	17	2	10	7
	ウサギ	31	1	17	14
コ ン ペ ン シ ョ ナ ル	ネコ	30	1	17	13
	イヌ	70	1	45	25
感 染	マウス	11	3	5	6
	スナネズミ	17	3	10	7
	ハムスター	24	2	15	9
	ラット	20	3	10	10
	モルモット	17	2	10	7
	ウサギ	31	1	17	14
	ネコ	30	1	17	13
	イヌ	70	1	45	25
	ニワトリ	21	1	13	8
	ヒナ (3週令まで)	20	4	12	8
両生類 (実験動物化 されている ヌマガエル) 魚類	5	-	5	-	
検 疫	ネコ	30	1	17	13
	イヌ	70	1	45	25
水 生 生 物	両生類・魚類等	5	-	5	-
	貝類	10	-	10	-

1. 飼料を自己持込みする場合は、飼料費を免除（無料）とする。
2. 飼育室の動物飼育については、自主飼育管理を基本とする。

(図 - 2) 平成 26 年度実験動物飼育状況一覧

飼育月	動 物 種									合 計 (匹数)
	マウス	ラット	ウサギ	イヌ	スナズミ	ネコ	ニワトリ	ウズラ	水生動物	
4月	2794	1223	1	28	3	10	0	0	9	4068
5月	2633	1197	1	28	3	10	50	0	9	3931
6月	2771	1092	3	27	3	10	0	0	0	3906
7月	2807	1158	2	28	3	10	0	0	0	4008
8月	2941	1154	8	28	3	9	0	0	0	4143
9月	2900	1186	2	26	3	9	0	0	0	4126
10月	2784	1101	2	26	3	9	0	0	300	4225
11月	2802	1186	2	26	3	9	0	0	300	4328
12月	2858	1128	0	26	21	9	0	0	300	4342
1月	2724	1065	0	26	21	9	24	0	300	4169
2月	2803	1295	0	26	21	9	24	0	325	4503
3月	2579	1368	1	25	20	9	24	0	325	4351
合 計 (匹数)	33396	14153	22	320	107	112	122	0	1868	50100

・各月の匹数は各月 15 日現在の飼育匹数を示す。

・水生生物飼育エリア

生物科学研究所における水生動植物（貝類・カエル・イモリ・ホテイアオイ等）を飼育する施設及び低温飼育室（13℃）と常温飼育室（23℃）がある。



## テーマ別活動状況



**研究テーマ** ウシにおける副甲状腺ホルモン関連タンパク質 (PTHrP) の役割

使用申請者 恩田 賢

利用実験エリア 組み換え DNA エリア

RI 実験施設エリア

**平成 27 年度の研究概要と成果**

分娩時の母牛、胎子、臍帯の血液中副甲状腺ホルモン関連タンパク質 (PTHrP)、Ca、P 濃度や PTHrP の各臓器における遺伝子発現と、新生子血液中の PTHrP、Ca、P 濃度の継時的変化を観察し子牛ミネラル代謝への関与を検討した。その結果、胎子循環血液中の Ca と P の濃度は母牛より高濃度で、ヒトやマウスと同様であった。血液中 PTHrP 濃度は母牛頸静脈では全て検出限界以下、胎子頸静脈、臍静脈、臍動脈中濃度では 2.5 ~ 6.0 pM であり、この三つの血液中濃度に有意な差はみられなかった。また胎盤節子宮側、胎盤節胎子側、胎子臓器の PTHrP 遺伝子発現を比較したところ、胎盤節子宮側で最も高い発現量であった。血液中 PTHrP 濃度に臍動静脈間で差がないことと、胎盤節子宮側での高い遺伝子発現量より、胎子循環血液中 PTHrP の主な由来は、胎盤節子宮側であることが示唆された。

**研究成果報告**

論文 Yoshida M, Onda K, Wada Y, Kuwahara M. Influence of sickness condition on diurnal rhythms of heart rate and heart rate variability in cows. *J Vet Med Sci.* 77 (3) :375-379 (2015)

学会発表 西尾卓馬、佐藤礼一郎、石原章和、須永藤子、恩田賢・副甲状腺ホルモン関連タンパク質の周産期ホルスタイン種乳牛の胎盤における発現および臍帯血液中の濃度・第 158 回日本獣医学会学術集会・2015 年 9 月 8 日・青森・口演

**研究テーマ** 食物アレルギーモデルマウスを用いた polyl:C12U の免疫学的作用の解析

使用申請者 阪口雅弘

学内共同実験者 島倉秀勝

利用実験エリア 組み換え DNA エリア

**平成 27 年度の研究概要と成果**

平成 27 年度は食物アレルギー OVA を認識する T 細胞受容体を発現するトランスジェニックマウスを用いて検討していく予定であるが、このトランスジェニックマウスの繁殖が実験に使用できる数が確保できなかったため、通常の BALB/c マウスを用いた食物アレルギーモデルの実験系の予備的な研究を行った。マウスを無作為に様々な条件の OVA 感作群 (0.1 μg/匹, 1 μg/匹, 10 μg/匹, 100 μg/匹の 4 群) と対照群の群に分けて実験を行った。OVA 10 μg 処置群と 100 μg 処置群の両方で OVA 特異的 IgE, IgG1, IgG2a, IgA の上昇が認められた。また、OVA 10 μg 処置群と 100 μg 処置群は PBS 群と比較して有意な直腸温低下が認められ、安定した結果を得ることができた。

**研究成果報告**

なし

**研究テーマ** 食物アレルギーモデルマウスに対する遺伝子組換え乳酸菌の免疫学的作用の解析

使用申請者 阪口雅弘

学内共同実験者 島倉秀勝

利用実験エリア 感染エリア

組み換え DNA エリア

**平成 27 年度の研究概要と成果**

平成 26 年度はアレルゲン発現乳酸菌を用いて経口免疫療法を実施したが、良好な結果が得られなかった。適切な OVA 量を検討するため、OVA (1 $\mu$ g-10 mg/dose) と OVA を発現していない乳酸菌を混合して、マウスに経口投与した。OVA 10 $\mu$ g 以上の経口投与で OVA 特異的 IgE の抑制が見られた。また、PBS 投与群と比較して OVA 10 $\mu$ g-10 mg 投与群は OVA 特異的 IgG1 ならびに IgG2a の増加が認められた。しかしながら、アナフィラキシー反応の抑制が見られなかった。アナフィラキシー反応が観察された理由として、IgG を介したアナフィラキシー反応が起きた可能性が考えられた。

**研究成果報告**

なし



**研究テーマ** 旋毛虫（トリヒナ）幼虫の継代および感染動物の作製（寄生虫学実習で使用）

使用申請者 黄 鴻堅

利用実験エリア 感染エリア

**平成 27 年度の研究概要と成果**

昨年に引き続き、旋毛虫（トリヒナ）の幼虫を小型実験動物で継代維持した。これらの寄生虫を獣医寄生虫学実習の教材として用いた。なお、教材として用いる寄生虫検体はホルマリン固定等を行い、バイオリスク対策における十分な配慮・処置を行った。

**研究成果報告**

なし

**研究テーマ** 多包虫の継代および感染動物の作製（寄生虫学実習で使用）

使用申請者 黄 鴻堅

利用実験エリア 感染エリア

#### 平成 27 年度の研究概要と成果

昨年に引き続き、多包虫の二次包虫を小型実験動物で継代維持した。この寄生虫を獣医寄生虫学実習の教材として用いた。なお、教材として用いる寄生虫検体はホルマリン固定等を行い、バイオリスク対策における十分な配慮・処置を行った。

#### 研究成果報告

なし



**研究テーマ** 吸虫類の中間宿主の飼育

使用申請者 平 健介

利用実験エリア 水生生物エリア

#### 平成 27 年度の研究概要と成果

昨年に引き続き、吸虫類の中間宿主である淡水性巻貝を飼育・維持し、肝蛭などの吸虫類の生活環を確保した。これらの巻貝あるいは吸虫は、獣医寄生虫学実習の教材として用いられた。なお、教材として用いる巻貝や寄生虫検体はホルマリン固定等を行い、バイオリスク対策における十分な配慮・処置を行った。

#### 研究成果報告

なし

研究テーマ 寄生虫学実習の教材として用いる寄生虫株の継代維持と寄生虫感染動物の作製

使用申請者 平 健介

利用実験エリア 感染エリア

#### 平成 27 年度の研究概要と成果

昨年に引き続き、鞭虫、盲腸虫、糞線虫、コクシジウムおよび肝蛭を小型実験動物で継代維持した。これらの寄生虫を獣医寄生虫学実習の教材として用いた。なお、教材として用いる寄生虫検体はホルマリン固定等を行い、バイオリスク対策における十分な配慮・処置を行った。

#### 研究成果報告

なし



研究テーマ 歯周病治療薬に関する研究

使用申請者 浅井史敏

利用実験エリア SPF エリア

#### 平成 27 年度の研究概要と成果

本研究ではイヌの歯周病原菌である *Porphyromonas gulae* に対する樹液成分の *in vitro* および *in vivo* 抗菌作用を検討した。樹液 3～10% (v/v) は濃度依存のおよびインキュベーション時間依存的に *P. gulae* に対する殺菌効果を示した。また、樹液成分含有ゲルのイヌ口腔内への 1 日 2 回塗布による 4 週間投与は口腔内細菌数を有意に減少させた。

#### 研究成果報告

なし

研究テーマ イヌの口腔におけるヒト歯周病関連菌種の保有状況の調査

使用申請者 浅井史敏

利用実験エリア SPF エリア

#### 平成 27 年度の研究概要と成果

僧帽弁閉鎖不全 (MR) と診断された犬 (MR 群; 25 匹) および健常犬 (健常群; 32 匹) から得た口腔内スワブを用いて *Porphyromonas gulae* およびその線毛遺伝子 (*fimA*) 型について分子生物学的手法による解析を行った。その結果、両群ともに 90% 以上の犬が *P. gulae* を保有していた。一方で、MR 群では 48.0% の犬が病原性の最も高い *fimA* 遺伝子 C 型を優位に保有しており、健常群 (18.8%) と比較して有意に高い保有率を示した。

#### 研究成果報告

論文 Shirai M, Nomura R, Kato Y, Murakami M, Kondo C, Takahashi S, Yamasaki Y, Matsumoto-Nakano M, Arai N, Yasuda H, Nakano K, Asai F: Distribution of *Porphyromonas gulae fimA* genotypes in oral specimens from dogs with mitral regurgitation. *Res Vet Sci*, 102; 49-52, 2015.

研究テーマ 抗糖尿病薬に関する研究

使用申請者 浅井史敏

利用実験エリア SPF エリア

#### 平成 27 年度の研究概要と成果

肥満、糖尿病、脂質異常症を自然発症する WBN/Kob-Leprfa (以下 fa/fa) ラットにおける食塩負荷の心血管系への影響について Wistar ラットと比較検討した。6 週齢の fa/fa および Wistar ラットを各 2 群に分け、各々標準食 (0.26% NaCl) および高食塩食 (8% NaCl) で 20 週齢まで飼育し、尾部カフ法により非麻酔下で血圧を測定した。実験終了時に胸部大動脈を摘出し、マグヌス法により血管反応性を測定するとともに、血液生化学解析および病理組織学解析を行った。高食塩食により fa/fa ラットおよび Wistar ラットにおいて高血圧が発症することが明らかとなった。その機序として、両系統ともに血管反応性の変化が関与しており、fa/fa ラットにおいてはさらに血中 Na<sup>+</sup> 濃度上昇も関与することが示唆された。

#### 研究成果報告

学会発表 1 高木善市、門脇はるの、小林郁美、伊藤薫、伊藤勝昭、白井明志、浅井史敏・メタボリックシンドロームモデル WBN/Kob-Leprfa ラットの心血管系に対する高食塩食負荷の影響・2015 年 9 月・第 158 回日本獣医学会口演

学会発表 2 高木善市、門脇はるの、小林郁美、伊藤薫、伊藤勝昭、白井明志、浅井史敏・肥満を伴う 2 型糖尿病モデル WBN/Kob-Leprfa ラットの血圧および血管反応性に対する高食塩食負荷の影響・2015 年 12 月・第 25 回日本循環薬理学会口演

研究テーマ 抗生活習慣病薬に関する研究

使用申請者 浅井史敏

利用実験エリア SPF エリア

#### 平成 27 年度の研究概要と成果

本研究では高脂肪食を負荷したマウス（C57BL/6NCr）における肝障害ならびに糞中インドール濃度に対する水溶性ケイ素の補給が及ぼす効果を検討した。高脂肪食（60% kcal）の9週間負荷により肝の脂肪変性および糞中インドール濃度の上昇が惹起された。水溶性ケイ素の7週間投与は肝の脂肪変性を軽減し、糞中インドール濃度の上昇を有意に抑制することが示された。

#### 研究成果報告

論文 杉田和俊、川合麻美、白井明志、高木敬彦、後藤純雄、浅井史敏：高脂肪食負荷マウスにおける水溶性ケイ素の糞臭低下作用および脂肪肝抑制作用. 獣医畜産新報 68 (11) ;843-847, 2015.

学会発表 川合麻美、白井明志、杉田和俊、高木敬彦、後藤純雄、浅井史敏・高脂肪食負荷マウスにおける水溶性ケイ素の脂肪肝抑制作用および糞臭低下作用・2015年7月・第132回日本薬理学会関東部会ポスター発表

研究テーマ ボールパイソン由来のマイコプラズマ属菌の病原体の検討

使用申請者 宇根有美

利用実験エリア 感染エリア

#### 平成 27 年度の研究概要と成果

本研究の目的はボールパイソンより分離されたマイコプラズマ属菌による感染症を病理学的、微生物学的に証明することである。分離した本菌液を用いて感染実験を行った結果、自然感染例と同様の臨床症状・病理学的変化が観察された。ウサギで作製した免疫血清を用いて免疫染色を行ったところ病変が観察された部位の粘膜上皮自由縁に陽性反応が認められた。PCR検査では消化器材料から本菌が検出された。リクガメ由来マイコプラズマとの交差性を検討したが交差性はなく、塩基配列も異なっていたため新規マイコプラズマと同定し、ボールパイソンに流行する感染症が本菌により引き起こされたと結論付けた。更に類似の症状を呈して動物病院を受診したヘビ78検体の口腔内スワブを用いたPCR検査ではボールパイソンで10検体、その他のヘビ1検体から本菌が検出された。従って本菌はボールパイソン以外の種類のヘビにも感染し病変を起こす可能性が考えられる。

#### 研究成果報告

なし

研究テーマ カエルツボカビの生物学的特徴および病原体の解析

使用申請者 宇根有美

利用実験エリア 感染エリア

#### 平成 27 年度の研究概要と成果

カエルツボカビ (Bd) 国内分布状況とその起源を解明するために、ウシガエル幼生を対象として研究を行った。19 都県 29 地域から野外採取したウシガエル幼生を対象として nested PCR 法を用いて検査したところ感染率は 31% であった。Bd は国内自然界に広く分布していることを明らかにした。また、ウシガエル幼生の口器から Bd 培養株樹立を試み、複数株の樹立に成功し、遺伝子型解析を行った。その結果、遺伝子解析のできたすべての培養株がハプロタイプ E に型別された。また、他の 3 つの遺伝子型もすべて同じであった。併せて、カエルツボカビの病理発生を明らかにするため、カエルツボカビ感染動物の皮膚における水透過性およびアクアポリンの分布検討を行った。その結果、カエルツボカビ感染によって水透過性が変化することが明らかになり、陸棲と樹上性のカエルによって、反応が異なることがわかった。

#### 研究成果報告

なし

研究テーマ 両生類のラナウイルスに関する研究

使用申請者 宇根有美

利用実験エリア 感染エリア

#### 平成 27 年度の研究概要と成果

ラナウイルスは生態系保全の脅威となる重要な両生類の病原体である。国内におけるラナウイルスの起源、自然界での維持の状態、大量死の機序は不明のままであった。そこでラナウイルスに不顕性感染しているヌマガエルに着目し、2011 年から 2014 年にかけて全国におけるヌマガエルの感染率調査を実施した。その結果、感染率には季節変動性があることが判明した。ヌマガエルの自然界での役割を解明すべく、一昨年より室温一定 (25℃) で明暗周期一定の環境化にてヌマガエルのラナウイルス感染の季節変動性の確認試験を実施しているが、その結果、ヌマガエルの体内では、ウイルスが消えることなく、陽転、陰転を繰り返すことが明らかとなった。ヌマガエルの自然界での役割が少しずつ解明されようとしている。

#### 研究成果報告

なし

研究テーマ 遺伝子組換え大腸菌を用いた病原性 *Yersinia* の感染防御抗原に関する研究

使用申請者 宇根有美

利用実験エリア 感染エリア

### 平成 27 年度の研究概要と成果

本研究の目的は、エルシニア症をコントロールするための簡易、安全かつ有効で、*Yersinia pseudotuberculosis* (*Y. ptb*) の感染を阻止可能な経口投与型ワクチン開発である。これまでに、我々は、*Y. ptb* の接着因子である組換え YadA (rYadA) を作製し、マウスへの皮下投与によって免疫原としての有用性を証明した。今回の実験では、経口投与によって、腸管局所免疫を誘導するために、rYadA を経口投与することで、糞中 YadA 特異 IgA 抗体価が最大 3 週間上昇し、かつ *Y. ptb* 感染による死亡率を低下させる局所免疫を誘導できた。しかし、病変は、軽度ではあるが認められたため、感染阻止には至っていないと考えられた。今後は、粘膜アジュバントなどを用いてより高い局所免疫の付与を目指す。なお、コレラトキシン B サブユニットが粘膜免疫のアジュバントとして有効であるという報告があり、rYadA に混じてマウスに投与してみたが、*Y. ptb* の感染防御には全く効果がなかった。

### 研究成果報告

なし

研究テーマ 関節リウマチモデルマウスによる新しい疼痛評価方法の確立

使用申請者 折戸謙介

利用実験エリア SPF エリア

### 平成 27 年度の研究概要と成果

筋力低下を引き起こす筋ジストロフィーや多発性筋炎などの疾病は分子病態が明らかにされ、遺伝子治療方法や薬物療法が提案されつつある。これらの治療方法のマウスなどの実験動物を用いた前臨床研究では、実験動物を殺処分して筋肉を単離し、病理学的変化を観察することが評価の主軸であった。今までに、ICR マウスにて分単位の経時的な筋力測定を可能にし、筋弛緩薬の薬効の経時的推移やリウマチモデルマウスの関節腫脹との関連を明らかにしてきた。しかし別系統で遺伝子改変で汎用される C57BL(B6) マウスでは、筋力測定はできるものの、反復測定は安定していなかった。そこで本研究では、今までに開発してきた装置をさらに改良することで、B6 マウスでも安定して筋力を測定できるシステムを構築した。

### 研究成果報告

論文 Okada S, Orito K. Tugging force: A new objective index for evaluating acute changes in neuromuscular function in mice. *J Pharmacol Toxicol Methods* 76: 23-26.



研究テーマ      ラットを用いた足裏皮膚循環調整機構の解明研究

使用申請者      折戸謙介

利用実験エリア   化学物質毒性エリア

#### 平成 27 年度の研究概要と成果

末梢循環調節は皮膚や筋肉の恒常性の維持、体温調節において重要な役割を果たし、全身血圧を決定する構成要素の1つでもある。しかし、四肢末端や皮膚表面の循環についての研究は少なく、末梢循環調節の詳細については未だ解明されていない。本研究では麻酔下のラットの足底部皮膚血流を2次元レーザードプラ血流計で測定する実験方法の確立を行い、大腿動脈に物理的刺激を与えた時とその後の反応性充血による血流の変化、血管作動物質（アセチルコリンやアデノシン、ニトロプルシドナトリウム、バソプレッシン、フェニレフリン、アンジオテンシン II）を投与した時の足底部皮膚血流の変化を Angiosome（主要血管の解剖学的支配領域）の概念に従い3つの領域（踵、内側、外側）ごとに比較した。これにより足底の部位別の末梢循環調節機構の一端を明らかにした。

#### 研究成果報告

なし

研究テーマ      骨形成不全症モデルマウスの心臓弁の解析

使用申請者      折戸謙介

利用実験エリア   SPF エリア

#### 平成 27 年度の研究概要と成果

骨形成不全症（OI）はタイプ1型コラーゲン遺伝子の変異により易骨性、骨変形などが起こる先天的疾患である。本研究では、OIモデルの心臓弁異常は骨形成不全と共通の病因があると仮定し、体内でも合成される安全な物質であるカルニチンの骨変形に対する効果を評価した。OIモデルマウスにカルニチンを8週間飲水投与した後、大腿骨の形体と骨強度が増加するか調べた。骨幹部での全骨塩量、皮質骨塩量、ねじり強度の値がカルニチン投与群でわずかに上昇したが、コントロール群との間に有意な差は認められなかった。本研究を通して骨形成不全症ではRunx2という骨芽細胞分化関与転写因子の過剰発現が病態に起因すると考察し、培養骨細胞を用いてRunx2の発現量を経時的に測定することで病態解明につながると考えた。今後の検証が必要である。

#### 研究成果報告

なし

研究テーマ  $\Delta 6$  不飽和化酵素欠損マウスの人工飼育による各脂肪酸の必須性に関する研究

使用申請者 守口 徹

利用実験エリア クリーンエリア

### 平成 27 年度の研究概要と成果

リノール酸 (LA) や  $\alpha$ -リノレン酸 (ALA) を摂取しても、その代謝の下流にあたるアラキドン酸 (ARA)、EPA、DHA 等を産生することができない D6D KO マウスを用いて、各脂肪酸の役割について検討した。LA と ALA を含んだ人工乳 (Cont) と、Cont 乳に ARA、EPA、DHA、ARA+DHA、ARA+EPA の各脂肪酸をそれぞれ 0.2% (w/w) ずつ添加した 6 種類の人工乳を用いて、生後 2 日齢から 3 週齢まで人工飼育した。離乳後は、人工乳と同様の脂肪酸を添加した精製飼料を自由摂取させ、9 週齢時からモリス水迷路試験などの行動試験を実施した後に、脳の各部位の脂肪酸組成を測定した。Cont 群は、離乳後から顕著な体重上昇の抑制を示した。一方、ARA を含んだ ARA 群や ARA+DHA 群、ARA+EPA 群は通常の体重推移を示したが、DHA 群と EPA 群は、6 週齢以降、徐々に体重の上昇量が低下した。モリス水迷路試験の学習試行では、DHA を含んだ DHA 群と ARA+DHA 群は良好なプラットホーム到達を示したが、その他の群は程度の差はあるものの、到達に時間を要した。

### 研究成果報告

論文 1 Hatanaka E, Harauma A, Yasuda H, Watanabe J, Nakamura M, Salem N Jr., Moriguchi T, Essentiality of arachidonic acid intake in murine early development, *Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids*, 108 (2016) 51-7.

学会発表 1 Hatanaka E, Yasuda H, Harauma A, Watanabe J, Konishi Y, Nakamura M, Salem N Jr, Moriguchi T, The effects of arachidonic acid on the brain development using artificial rearing of delta-6-desaturase knockout mice, 12th Asian congress of nutrition, Poster (PS-01-p-043), May14-18 (2015) Kanagawa, Japan.

学会発表 2 畑中 えりさ, 原馬 明子, 小西 良子, 中村 学, Salem N Jr, 守口 徹, マウス脳機能における各種必須脂肪酸の働きとその相互作用, 日本脂質栄養学会 24 回大会, (O-7) Aug. 28-29 (2015) 佐賀.

研究テーマ      マウス周産期における不安・うつ（気分障害）に対する n-3 系脂肪酸素材の評価

使用申請者      守口 徹

利用実験エリア   クリーンエリア

## 平成 27 年度の研究概要と成果

n-3 系脂肪酸欠乏飼料と正常飼料で飼育繁殖した母獣マウスを用い、母性行動について検討した。n-3 系脂肪酸欠乏母獣では、産後 1 日目に食殺、育児放棄する母獣が 30~40% 観察された。また、産後 3 日目に行った新生仔の回収試験では、n-3 系脂肪酸欠乏母獣は正常母獣よりも、仔の回収、保温までに時間を要した。産後 10 日目の母獣脳の脂肪酸組成とモノアミンの測定から、海馬において DHA とセロトニンに正相関が、ドーパミンには負相関が認められた。周産期での n-3 系脂肪酸欠乏状態は、出産に対して神経過敏となり、母性発動の遅延や低下が観察された。よって、周産期の n-3 系脂肪酸摂取は、母親の気分障害の予防と母子間の良好な関係の構築のために重要な役割を持つことが示唆される。

## 研究成果報告

論文 Harauma A, Sagisaka T, Horii T, Watanabe Y, Moriguchi T, The influence of n-3 fatty acid to maternal behavior and monoamine of brain in perinatal period, *Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids*, 107 (2016) 1-7.

学会発表 1 Harauma A, Sagisaka T, Horii T, Nakamura S, Wakinaka N, Watanabe Y, Moriguchi T, The influence of n-3 fatty acid on maternal behavior and brain monoamine content in the perinatal period, 12th Asian congress of nutrition, Poster (PS-01-p-042), May14-18 (2015) Kanagawa, Japan.

学会発表 2 原馬 明子, 匂坂 貴幸, 脇中 奈津子, 内田 康太, 黒田 瑛里, 安齊 嘉恵, 堀井 卓, 中村 俊一, 渡邊 芳剛, 守口 徹, マウス周産期における多価不飽和脂肪酸の重要性, 第 4 回 日本 DOHaD 研究会学術集会, (P-13) Aug. 1-2 (2015) 東京.

## 研究テーマ ウシ住血原虫感染ウシモデルマウスを用いたタイレリアおよびバベシアの分化増殖機構の解明

使用申請者 萩原喜久美

利用実験エリア 感染エリア

### 平成 27 年度の研究概要と成果

脾摘した SCID マウスの腹腔内に *T. o* 非感染ウシ赤血球を移入し作製した SCID-Bo マウスに *T. o* 感染ウシ赤血球 (*T. o* 感染群) および *T. o* 非感染ウシ赤血球 (*T. o* 非感染群) を接種した。接種 47 日後に、剖検し、血液の臨床病理学的解析および肝組織の傷害像について病理学的および分子生物学的に解析した。その結果、1. *T. o* 感染群の原虫の血液寄生率は 24.2-53.2% であり、Ht 値は 19.6-32.9%、*T. o* 非感染群では、Ht 値 40.7-43.7% を示した。2. *T. o* 感染群マウスの肝臓には、類洞内の原虫感染赤血球の処理に伴うヘモジデリン含有マクロファージの集簇およびマクロファージの活性化、髄外造血像および肝細胞内のヘモジデリン沈着が認められた。3. 肝機能障害の指標 (AST、ALT) の高い個体でサイトカイン陽性細胞数の増数が認められた。4. 炎症性サイトカイン (TNF- $\alpha$ 、IL-1 $\beta$ 、IL-6) の mRNA の発現量は *T. o* 感染群で高値を示した。以上の結果から、*T. o* 感染 SCID-Bo マウスの肝障害発生機序に炎症性サイトカインが関与することが示唆された。

### 研究成果報告

学会発表 黒鳥優、鶴丸智貴、萩原喜久美、納谷裕子、曾川一幸、島田章則

*Theileria orientalis* (*T. o*) 原虫感染ウシ赤血球置換 SCID マウスの病理学的解析：血液寄生原虫性疾患における肝障害発生機序の解析モデルとしての意義，第 10 回臨床検査教育学会（長野県諏訪市）平成 27 年 8 月（口演発表）

## 研究テーマ ラットの成体幹細胞に関する研究

使用申請者 滝沢達也

学内共同実験者 田中和明

利用実験エリア クリーンエリア

### 平成 27 年度の研究概要と成果

ラットの脂肪組織由来の培養細胞から間質細胞を分離した。分離した細胞は、既に報告されている誘導方法を用いると、骨や脂肪などの間葉系の細胞に分化することが確認され、間葉系幹細胞を含んでいることが示された。ヒストン脱アセチル化酵素阻害剤であるバルプロ酸 (VPA) で事前に処理した後、既報により神経細胞へ分化誘導すると、神経細胞への分化が著しく促進され、神経細胞分化に伴い、神経細胞マーカーおよび幹細胞マーカーの発現の増加が認められた。さらに、その神経分化機序を検討した結果、バルプロ酸による神経分化の促進には、一酸化窒素合成酵素 (NOS) を介した NO が関与していることが示唆された。また、この NO 産生に NO- シトルリン回路の亢進を伴う NO 産生が関与している可能性が示唆された。

### 研究成果報告

学会発表 ○林大希 宮崎陽子 田中和明 滝沢達也

バルプロ酸によるラット脂肪組織幹細胞の神経分化の促進と NO- シトルリン回路の関与  
第 158 回 日本獣医学会学術集会、2015 年 9 月 9 日、北里大学（十和田）、口演

**研究テーマ** *Rhizopus oryzae* 水抽出物による肝障害抑制メカニズムの検討

使用申請者 鈴木武人

利用実験エリア 化学物質毒性エリア

**平成 27 年度の研究概要と成果**

*Rhizopus oryzae* 培養菌体の温水抽出物 (RU) をラットに 10 日間投与した後に肝障害を誘発し、その抑制効果を検討した。

これまでの研究で、RU 投与により肝障害誘発後 24、48 時間で時間依存的、投与量依存的 (10 mg または 100 mg/kg B.W.) に肝臓での細胞増殖促進が認められた。また、RU 高濃度投与群では肝細胞増殖因子 (HGF) 遺伝子の発現は 6 時間後に有意に増加し、48 時間後には IGF-I 遺伝子の発現も回復した。これらの結果から、RU は HGF の産生を促進することで肝細胞の増殖を促進し、肝機能が速やかに回復した可能性が示唆された。

そこで、肝障害モデルラットにおける肝再生に関与するいくつかのシグナル分子の遺伝子発現量を定量したところ、RU 投与により肝臓の HGF 受容体である c-met の遺伝子発現量が有意に増加し、細胞周期を G0 から G1 期に移行させる IL-6 の遺伝子発現量も増加傾向にあり、上述の細胞増殖のメカニズムの一端が捉えられた。

**研究成果報告**

なし

**研究テーマ** *Rhizopus oryzae* 水抽出物の抗アレルギー効果の検討

使用申請者 鈴木武人

利用実験エリア 感染エリア

**平成 27 年度の研究概要と成果**

*Rhizopus oryzae* 水抽出物 (RU) は免疫担当細胞の調節作用やイヌにおける皮膚炎症状の改善が報告されているが、両者を関連付ける研究はない。そこで本研究では、アトピー性皮膚炎モデルマウスを用いて、RU の抗アレルギー効果を検討した。

ピクリクロライドで皮膚炎を誘発した NC/Nga マウスに、RU を 1 mg/g (体重)/日の用量で 10 日間経口投与した。RU 投与群では皮膚炎スコア、血中 IgE 濃度ともに対照群に対し低下傾向を示した (P=0.12)。血中 IL-4 濃度は RU 投与群で低下した (P<0.05)。ヘルパー T 細胞は、RU 投与群で対照群に対し Th2 細胞数が減少 (P<0.05)、Th0 および Th1 細胞数が増加した (P<0.05)。

RU 投与により Th1/2 バランスが改善したことで、血中 IL-4 および IgE 濃度が低下し、皮膚炎スコアも改善したものと考えられた。

**研究成果報告**

学会発表 鈴木武人・加藤由紀子・小林亜里紗・勝俣昌也・牛越設男、*Rhizopus oryzae* 水抽出物の抗アレルギー効果の検討、第 70 回 日本栄養・食糧学会大会 (2016 年 5 月 15 日、武庫川女子大、口頭発表)

研究テーマ ラットの筋肉のミオシン重鎖タンパク質発現の成長にともなう変化におよぼす甲状腺ホルモンの影響

使用申請者 勝俣昌也

利用実験エリア 化学物質毒性エリア

#### 平成 27 年度の研究概要と成果

- ① 妊娠 14 日目の雌ラットを導入し、抗甲状腺剤プロピルチオウラシル (PTU) を 15 ppm の濃度で飲水中に混ぜて、妊娠 18 日目から給与した。出生時と離乳時に子ラットから胸最長筋と腓腹筋を採取した。離乳時の対照区の子ラットの体重は 50.7 g であったのに対し、PTU 投与区は 30.4 g だった。
- ② 出生時のラットの脚の筋肉では、胎児型、新生児型、1 型の MHC mRNA の発現量が高く、2A、2X、2B 型の発現量は低いことを確認した。

#### 研究成果報告

なし

研究テーマ 医薬品による発がんリスク増加に関する輸送担体の探索とその評価系の開発

使用申請者 関本征史

利用実験エリア 組み換え DNA エリア

#### 平成 27 年度の研究概要と成果

申請者らは、発がん性物質の細胞外排泄の変化が、その毒性発揮に大きく関わると考えている。本研究では、医薬品 (ニカルジピン、NIC) が発がん性物質 (メチルコランズレン、MC) の細胞外排泄の阻害を介した毒性増強の可能性について、種々ヒト細胞株を用いて検討した。その結果、HepG2 や Caco-2、MCF7、Hela、Ishikawa など多くの細胞株で、NIC は MC による毒性反応 (異物遺伝子発現誘導) を増強した。しかし、ヒト肺がん A549 細胞では、NIC による増強作用はほとんど見られなかった。A549 細胞株での異物排出トランスポーター分子種の顕著な発現低下は報告されていないことから、これらとは異なる分子が、発がん性物質の細胞外排泄や、NIC による作用増強に関わっている可能性が示唆された。

#### 研究成果報告

学会発表 関本征史、吉成浩一、出川雅邦・薬物の安全性評価における新たな挑戦 化学物質の複合曝露による細胞毒性発現: AhR 活性化を指標として・日本毒性学会・2015 年 7 月・金沢・口頭発表 (シンポジウム)

## 研究テーマ 動物介在介入 (Animal-assisted intervention) における動物のストレス評価

使用申請者 大谷伸代

学内共同実験者 小林 愛

利用実験エリア RI 実験施設エリア

### 平成 27 年度の研究概要と成果

猫において、人とのさまざまな関わりでの尿中ホルモン濃度を評価した。ストレス指標であるコルチゾール濃度と幸せホルモンであると言われているオキシトシン濃度との相関関係は見られなかった。マッサージにおいてオキシトシン濃度が上昇したため、猫にとってマッサージはリラックスとなることが示唆された。今後は個体数を増やし、より詳細を明らかにしたい。また現在、自律神経活性を測定できる心拍計をもちいて、神経活性の検討も同時に行っている。

さらに、猫へのコマンドトレーニングは飼い主とのより良い関係の構築につながるとの仮説をたて、その検討を継続中である。猫とその飼い主をいつもどおり過ごす群とトレーニングする群にわけ、ホルモン・神経レベルで猫と飼い主のストレス評価を行っている。

猫との関わりにおいて、直接的なもの（声かけ、触れるなど）と間接的なもの（視線で追う）があるが、特に猫にとって触れられること、視線で追われることがストレスとなる「閾値」を明らかにする研究を始める予定である。

### 研究成果報告

なし



## 研究テーマ 老齢動物における各種麻酔法の作用特性

使用申請者 塚本篤士

学内共同実験者 鯉淵千春

利用実験エリア SPF エリア

### 平成 27 年度の研究概要と成果

本研究では老齢マウスにおいて齧歯類の代表的な麻酔法の作用特性を検討した。12ヶ月齢の ddY マウスにおいて、ケタミン-キシラジン (K/X)、メドミジン-ミダゾラム-ブトルファノール (M/M/B)、イソフルラン、セボフルランの4種の麻酔を実施した。各麻酔群において麻酔深度、麻酔時間を評価するとともにバイタルサイン、血液生化学検査を検討した。K/Xは十分な麻酔深度が得られなかった。M/M/Bは徐脈、呼吸抑制が重度であったが、十分な外科麻酔深度が得られた。また、アチパメゾールの投与により早期覚醒が可能であった。イソフルラン、セボフルランは呼吸抑制が強いが、循環器抑制は軽度であった。いずれも十分な麻酔深度が得られたが、セボフルランの方が速やかな導入が得られた。以上のことから、老齢マウスでは注射麻酔としてM/M/Bが、吸入麻酔としてセボフルランが有用であると考えられた。

### 研究成果報告

学会発表 坂本瑞歩、鯉淵千春、塚本篤士、猪股智夫・老齢マウスにおける各種麻酔法の作用特性・日本実験動物技術者協会・2016年10月・川越・ポスター発表

研究テーマ 三輪加速度センサーを用いたラットの行動解析

使用申請者 猪股智夫

利用実験エリア SPF エリア

#### 平成 27 年度の研究概要と成果

胸腺の甲状腺および副腎への作用を調査するため、若齢ラットから採取した胸腺より胸腺抽出液を作成、老齢ラットに投与し、甲状腺機能および副腎機能にどのような影響を及ぼすかを検討した。甲状腺濾胞の短径と血中 FT4 量は胸腺因子投与群において有意に増加した。甲状腺体積も増加する傾向にあった。血中 TSH 量に差はなかった。副腎重量、副腎皮質細胞密度は、胸腺抽出液投与群において有意に高い値を示した。血中 ACTH 量は胸腺抽出液投与群で増加する傾向にあった。血中コルチコステロン量は胸腺抽出液投与群で高い値を示したものの、有意な差はなかった。本研究結果より胸腺因子は甲状腺および副腎機能を亢進させることが示唆された。

#### 研究成果報告

学会発表 鈴木武人・加藤由紀子・小林亜里紗・勝俣昌也・牛越設男、*Rhizopus oryzae* 水抽出物の抗アレルギー効果の検討、第 70 回 日本栄養・食糧学会大会（2016 年 5 月 15 日、武庫川女子大、口頭発表）



研究テーマ ウイルスの病原性獲得要因の解析

使用申請者 田原口智士

学内共同実験者 藤野 寛

利用実験エリア 感染エリア

#### 平成 27 年度の研究概要と成果

鶏における鶏アデノウイルス（FAV）のレセプター分子は、いまだ明らかとなっていない。私たちは鶏の CXADR が FAV の感染に関与しているかを調査した。

鶏筋胃から、CXADR をクローニングし、CXADR 安定発現 CHO 細胞を作成した。これに FAV JM1/1 株を感作させ、上清に放出されたウイルス価の測定、細胞に結合したウイルス粒子を Realtime-PCR により測定した。さらに、細胞を回収し、ウイルスの初期遺伝子と後期遺伝子の発現を調査した。

CXADR 発現 CHO 細胞に FAV を感染させても、感染性ウイルスは認められなかったが、細胞に結合したウイルス量は有意に増加した。また、FAV を感作した CXADR 発現 CHO 細胞では、初期遺伝子の発現は認められたが後期遺伝子の発現は認められなかった。

#### 研究成果報告

なし



**研究テーマ** クマササエキスおよびアガリクスエキスの抗ウイルス作用

使用申請者 田原口智士

利用実験エリア 感染エリア

### 平成 27 年度の研究概要と成果

キングアガリクス KA21 の栽培方法が抗インフルエンザ効果に与える影響を調査

アガリクスは栽培方法によって子実体の構成成分に差が出る事が知られている。そこで今回我々はハウス栽培もしくは、自然露地栽培したアガリクスの抗インフルエンザ効果の比較を行った。

ハウス栽培ならびに自然露地で栽培した KA21 アガリクスの抽出液である AE の抗インフルエンザ作用をブラック形成抑制試験および HA および NA の mRNA 発現によって評価した。

ハウス栽培ならびに自然露地で栽培した AE を含んだ培地でブラックの形成が抑制され、その抑制の効果は自然露地栽培の AE を含んだ培地においてより大きく、また AE を含んだ培地において HA および NA の mRNA 発現の抑制が認められた。

### 研究成果報告

学会発表 キングアガリクス KA21 の栽培方法が抗インフルエンザ効果に与える影響・第 158 回日本獣医学会学術集会・北里大学・口演



**研究テーマ** マウスノロウイルスに対する抗体の作成

使用申請者 田原口智士

学内共同実験者 藤野 寛

利用実験エリア 感染エリア

### 平成 27 年度の研究概要と成果

マウスノロウイルス (MNV) を培養し、不活化後精製したウイルスを使い、ウサギに免疫を行った。得られた抗体がウエスタンブロットおよび蛍光抗体で使用出来ることを確認した。

### 研究成果報告

学会発表 榎本和真、高橋俊一、藤本洋平、柏木優海、辰野真理子、藤野 寛、田原口智士・マウスノロウイルスの温度依存性吸着効率の調査・日本獣医学会総会・2014 年 9 月・札幌・口頭

研究テーマ      バベシア   ローダニー原虫の継代維持（家畜伝染病学実習で使用）

使用申請者      須永藤子

利用実験エリア   感染エリア

#### 平成 27 年度の研究概要と成果

獣医学科 4 年   家畜伝染病学実習の「ピロプラズマ、アナプラズマの診断」項目で、バベシア   ローダニー感染血液を用いた実習を行った。

#### 研究成果報告

なし



研究テーマ      Babesia gibsoni 原虫の維持（家畜伝染病学実習）

使用申請者      須永藤子

利用実験エリア   感染エリア

#### 平成 27 年度の研究概要と成果

獣医学科 4 年   家畜伝染病学実習の「ピロプラズマ、アナプラズマの診断」項目で、バベシア   ギブソニー感染血液を用いた実習を行った。

#### 研究成果報告

なし

研究テーマ *Aspergillus fumigatus* 及び *Candida albicans* に対する抗体価測定法の検討

使用申請者 栗林尚志

利用実験エリア 感染エリア

#### 平成 27 年度の研究概要と成果

間接蛍光抗体法を原理とした *Candida albicans* および *Aspergillus fumigatus* に対する簡易な抗体価測定法を検討した。免疫血清を作製するため、SD 系雄性ラットへ *C. albicans* あるいは *A. fumigatus* を反復投与した。*C. albicans* を結合させたラテックス粒子をスライドガラスに塗抹・固定し、免疫血清を反応させた。さらに、FITC 標識抗ラット IgG 抗体を反応させた後、蛍光顕微鏡で観察した結果、抗原を結合させたラテックス粒子に蛍光を認めた。現在、抗体価を求める最適条件を検討するため、塗抹するラテックス粒子および FITC 標識抗体の希釈倍率を検討している。

#### 研究成果報告

なし

研究テーマ SAA タンパク質接種によるアミロイド伝達試験

使用申請者 上家潤一

利用実験エリア クリーンエリア

#### 平成 27 年度の研究概要と成果

豚の SAA2 の野生型および変異型タンパク質をマウスに接種し、硝酸銀の皮下接種により炎症を惹起させ、臓器へのアミロイド沈着の誘発を評価した。In vitro では両者はアミロイド線維形成性に大きな差がみられており、アミロイド沈着に差があることが予想されたが、どちらの SAA についてもアミロイド沈着は認められなかった。

#### 研究成果報告

論文 Kamiie J, Sugahara G, Yoshimoto S, Aihara N, Mineshige T, Uetsuka K, Shirota K. Identification of a Unique Amyloid Sequence in AA Amyloidosis of a Pig Associated With Streptococcus Suis Infection. *Vet Pathol.* 2016 Aug 12 (Epub ahead of print)

## 生物研セミナー

### 動物まるごとの動態の微細解析：システムバイオロジーの最先端

ヒトを含め、動物は非常に複雑な機能が連携し、生命活動が営まれている。これまでの生命科学の主流は、動物の生命機能を細分化し、極限のミクロの場面まで落とし込むことで、この機能を分子で明らかにする「還元主義」であった。これらの功績は大きく、遺伝子の発見から発現制御、細胞の機能などが次々と明らかとなり、現在でも「命」のミクロ解析が画期的に進んでいる。これら還元主義的生命科学の発展により、次の課題が見えてきている。すなわち、多層的な分子レベルの変化が、如何に「命」のシステムとして、機能するか、を明らかにする試みである。分子は単体では動くことはなく、他の分子との応答が必要であり、他の分子は、細胞のレベルを超え、生体の内部で複雑にやり取りされる。さらに個体に限らず、他個体の存在など環境の要因があつてこそ、動く分子さえある。つまり分子の複雑なやり取りの全体像を明らかにしなければ、「命」の理解には至らない。これらはシステムバイオロジーとして工学的・数理的観点から進められ始めている。このシステムバイオロジーを画期的に発展させる実証研究が、生体分子の微細解析である。近年の解析技術の革新的発展に伴い、数万という分子を、それぞれの1分子の動きとして測定可能となったのである。この技術を生体に応用することで、「命」がどのように構成されているのか、またシステムとして疾患となるかが明らかになれつつある。今回、慶応大学医学部 医化学教室の杉浦悠毅先生をお招きして、質量分析による生体代謝プロファイリング技術の最先端研究を紹介いただく。

#### 生物研セミナー

### 「動物まるごとの動態の微細解析： システムバイオロジーの最先端」

分子は単体では動くことはなく、他の分子との応答が必要であり、他の分子は、細胞のレベルを超え、生体の内部で複雑にやり取りされる。さらに個体に限らず、他個体の存在など環境の要因があつてこそ、動く分子さえある。このような多層的な分子レベルの変化が、如何に「命」のシステムとして機能するのか。つまり分子の複雑なやり取りの全体像を明らかにしなければ、「命」の理解には至らない。今回、慶応大学の杉浦先生をお招きして、システムバイオロジーの最前線を紹介する。

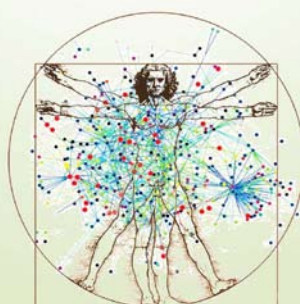
2016年2月8日 17時 - 19時  
獣医学部棟7階 大会議室

#### 社会をつくる分子

麻布大学獣医学部・伴侶動物学研究室  
菊水健史

#### 質量分析による生体代謝プロファイリング技術 ～イメージングからリアルタイム代謝解析まで～

慶應義塾大学・医学部医化学教室 / JST さきかけ  
杉浦悠毅



## 社会をつくる分子

菊水健史

麻布大学獣医学部・伴侶動物学研究室

ヒトを含めた動物は、群れを形成し、お互いに影響を与えつつ、調和のとれた集団となる。群れ全体の適応性を上げることはすなわち、個体の適応度の上昇にも資するため、群集を1つの機能的な有機体と捉えることが可能である。このような群れの中では、個々の社会的な役割分担が集団の機能性を向上させる。これまでこのような研究は社会性昆虫が主体となり、モデルが提唱されてきたが、多様な動物種で同じような至近要因が機能する可能性も示唆されてきた。その1つがホルモンによる社会行動の制御である。

ホルモンは産生臓器から分泌され、抹消のみならず中枢にも作用し、その効果が非常に永続的であることが特徴である。よく知られた例として、周産期のステロイドホルモンがオスとメスの機能を決定づけ、生涯にわたる脳機能、行動を変容させる。このオスとメス、も群れの中のオスとしての役割、メスとしての役割を担うと考えると、ホルモンによる社会的役割の特徴付け、とも言えるだろう。雌雄のみならず、親としての役割、仔の役割、社会的階級の役割、など群れの機能性の向上に内分泌学が重要な役割を担っていると言える。またこの内分泌と深い関係にある腸内細菌叢が、生体の行動のみならず、社会性にも影響を与える可能性について論じる。



**質量分析による生体代謝プロファイリング技術**  
**—イメージングからリアルタイム代謝解析まで—**  
 杉浦悠毅  
 慶應義塾大学 医学部 医化学教室 / JST さきがけ

基礎研究から臨床診断に至るまで、ライフサイエンスにおける質量分析 (MS) の応用は近年特に広範かつ急速である。これは細胞や動物等の生体試料を扱うに際して、以下の2つの技術進展、

- (A) 生体からのサンプリング技術の向上、
- (B) イメージングを始めとした、データ取得(表現)法の開発

により有用な分子情報を、*in vivo* から効率よく抽出可能になったことが貢献している。

私達はこれまで上記2点にフォーカスした MS 技術開発を通して、病態モデルや臨床検体において「生体代謝」情報を抽出し、疾患機序の理解やバイオマーカー探索研究を行ってきた。

本発表では、新しく開発した生体代謝プロファイリングのための MS 技術群、

1. 少数の細胞 (10<sup>4</sup>cell オーダー以下) を解析可能な高感度メタボロミクス、
2. 代謝イメージング質量分析 (図右)、さらに
3. 代謝リアルタイム解析 (マイクロダイアリシス + 質量分析) (図左)

以上をキーワードに、これらの技術がどのようにライフサイエンス研究に応用されたか、例を挙げて紹介したい。



*in vivo* 代謝プロファイリングのための2つの技術

---

---

**麻布大学附置生物科学総合研究所 紀要第26号**

(作成基準日：平成27年4月1日現在)

発行所 〒252-5201

神奈川県相模原市中央区淵野辺 1-17-71

麻布大学附置生物科学総合研究所

TEL 042-754-7111 (内線 2216・2416・2420)

FAX 042-754-9930

発行者 所長 猪股 智夫

編集責任者 落合 秀治

---

---



No. 26