

2016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. 27



生物科学総合研究所紀要 27 号

目次

生物科学総合研究所概要	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則	14
研究部門の活動状況	15
研究総括	16
プロジェクト No. P14-01	16
プロジェクト No. P14-02	21
プロジェクト No. P14-03	23
プロジェクト No. P15-01	25
プロジェクト No. P15-02	33
プロジェクト No. P15-03	38
プロジェクト No. P15-04	46
プロジェクト No. P15-05	47
プロジェクト No. P16-01	52
プロジェクト No. P16-02	55
プロジェクト No. P16-03	58
プロジェクト No. P16-04	60
共同利用施設部門	63
共同利用各施設部門	64
研究部門	64
各施設部門	64
動物実験施設	64
感染実験施設	65
化学物質毒性実験施設	65
ラジオアイソトープ実験施設	65
組換え DNA 実験施設	65
テーマ別活動状況	69

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
	課 長		角野 由香
	主 査		神藤 昭
事 務 室 （学術支援課）	事務職員		磯野 裕之

【研 究 部 門】

部門長 ： 佐原 弘益（獣医学部 教 授）

○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 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 非常勤講師）

○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 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 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 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内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 No. P15-05

研究テーマ「マウスにおける情動伝染の分子調節機構の解明」

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 No. P16-01

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いわゆる休肝日の効果の検討」

研究期間：平成 28 年 4 月 1 日～平成 31 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.P16-02

研究テーマ「ラットの系統特性を活かした生殖発生毒性評価に関する研究」

研究期間：平成 28 年 4 月 1 日～平成 30 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： 山本 雅子（獣医学部 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.P16-03

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（Ⅱ）」

研究期間：平成 28 年 4 月 1 日～平成 31 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.P16-04

研究テーマ「生体における糖脂質・糖鎖機能に関する研究」

研究期間：平成 28 年 4 月 1 日～平成 31 年 3 月 31 日

プロジェクト班長： 山下 匡（獣医学部 教 授）

プロジェクト班員： 永根 大幹（獣医学部 助 教）

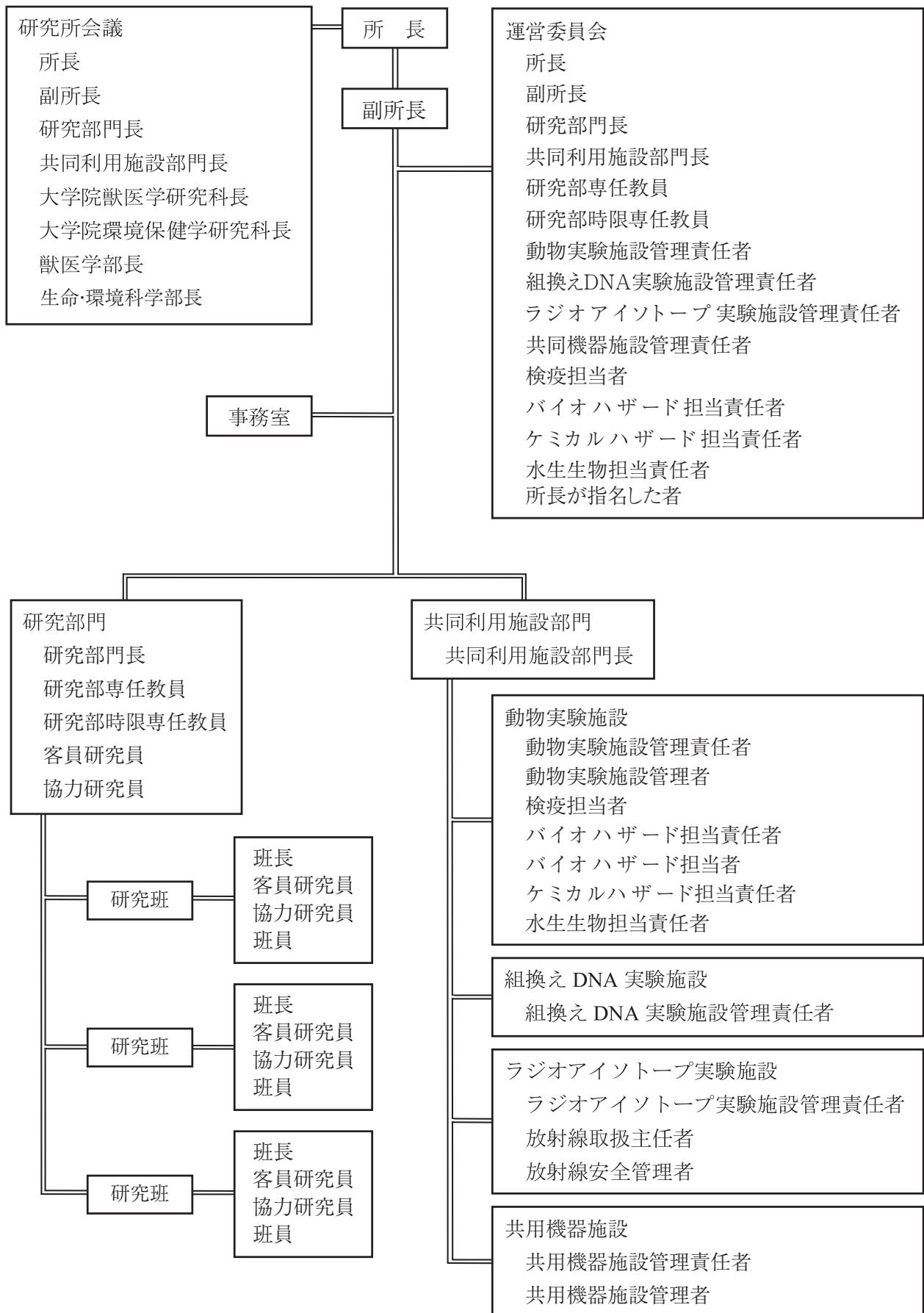
プロジェクト班員： 田原口智士（獣医学部 教 授）

プロジェクト班員： 藤野 寛（獣医学部 助 教）

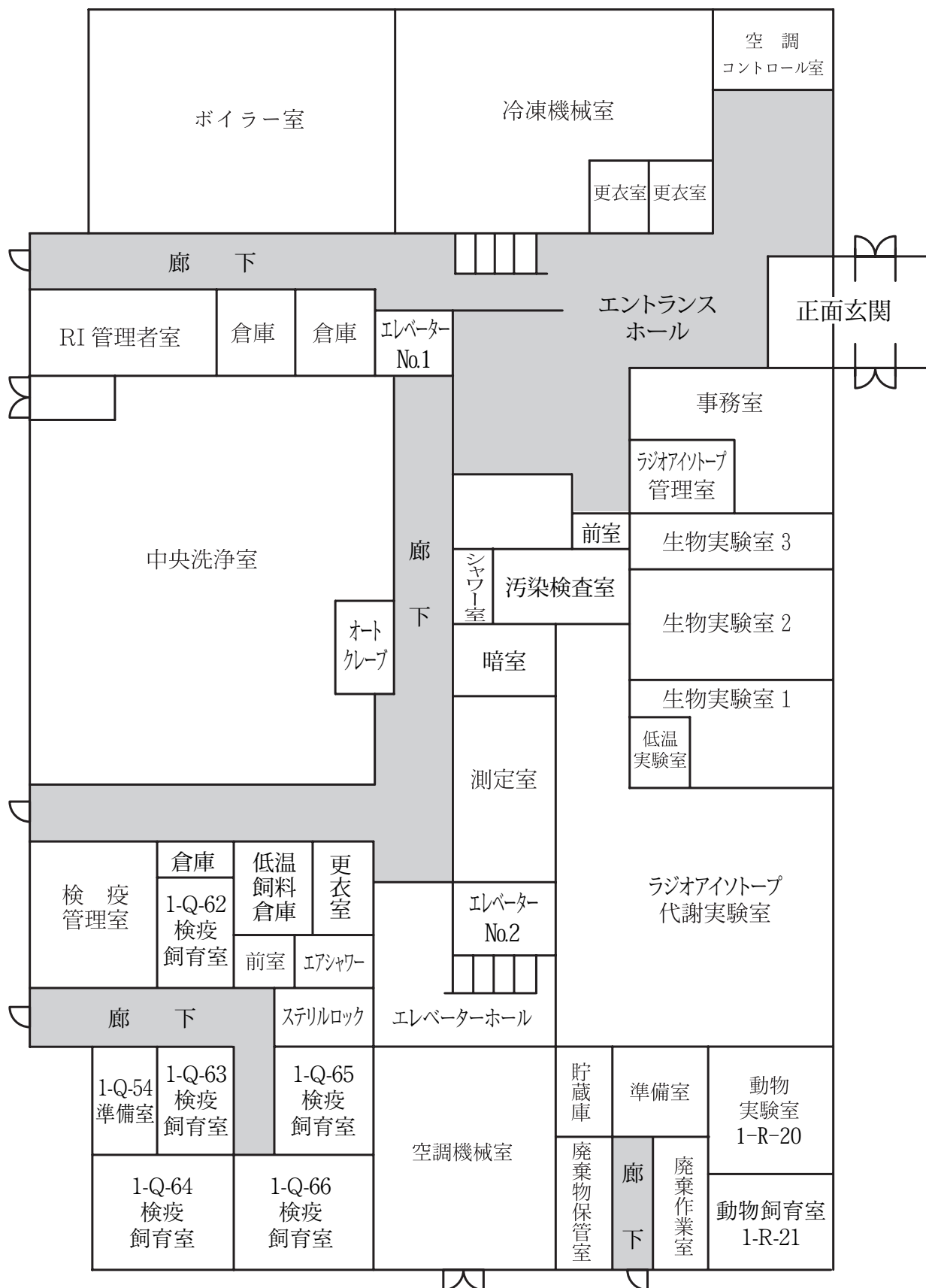
【 共 同 利 用 施 設 】

共同利用施設	氏 名	職 名
共同利用施設部門 共同利用施設部門長	白井 明志	獣 医 学 部 准教授
動物実験施設 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責任者 バイオハザード担当者 ケミカルハザード担当責任者 水生生物担当責任者	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
組換え DNA 実験施設 組換え DNA 実験施設管理責任者	佐原 弘益	獣 医 学 部 教 授
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
共用機器施設 共用機器施設管理責任者 共用機器施設管理者	栗林 尚志 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	2-A-34 飼育室
廊 下	2-S-7 飼育室	前室	<div><div></div><div></div><div></div><div></div></div>		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-A-41 飼育室	
	2-S-11 飼育室	前室	ステリロック			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 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 ホール	エレベーター No.2	2-A-50 飼育室		
				<div><div></div><div></div><div></div><div></div></div>	2-A-51 飼育室		
倉庫			空調機械室		前室		

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-I-33 飼育室	廊 下	3-I-32 飼育室	
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	3-I-37 飼育室	3-I-36 飼育室				
				エレベーター ホール	3-I-39 飼育室	3-I-38 実験室					
実験 前室	3-T-11A 原子吸光 設置室	3-T-11C GCSM 設置室	廊 下	ステリル ロック	廊 下	3-I-41 飼育室	3-I-40 飼育室				
3-T-13 実験室		3-T-12 電子スピン 共鳴装置 設置室		オート クレープ		更衣室	3-I-43 飼育室	3-I-42 飼育室			
秤量 室	3-T-14 準備室			更衣室		更衣室	洗浄室				
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					
				更衣室		更衣室					
3-T-18 飼育室				前室		更衣室	更衣室				
3-T-20 飼育室			前室	更衣室	更衣室						
3-T-21 飼育室				更衣室	更衣室						
				更衣室	更衣室						
				廊 下	エレベーター No.2		3-I-49 飼育室				
					エレベーター ホール		3-I-51 飼育室				
					エレベーター ホール		3-I-53 飼育室				
					エレベーター ホール		3-I-55 飼育室				
				廊 下	3-I-57 飼育室						
					3-I-57 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	平成 27 年 3 月 17 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程は別に定める。

（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、研究所に関する校務をつかさどる。

3 所長及び副所長の選考は、学校法人麻布獣医学園人事規則に基づき、理事長が任命する。

(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。

(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）における研究活動に関する校務を整理する。

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、各施設に関する校務を整理する。

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 規則の改廃手続は、運営委員会及び研究所会議の意見を聴いて学長が行う。

(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。

附則

この規則は、平成 27 年 3 月 17 日に改正し、平成 27 年 4 月 1 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 12 件の研究テーマについて、平成 28 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 14 - 01

研究テーマ

環境化学物質の実験動物・細胞への毒性発現機序に関する研究

研 究 期 間 : 2017 年 4 月 1 日～2020 年 3 月 31 日

プロジェクト班長: 和久井信 (獣医学部 比較毒性学)

プロジェクト班員: 村上 賢 (獣医学部 分子生物学)

プロジェクト班員: 高木敬彦 (獣医学部 公衆衛生学第一)

プロジェクト班員: 猪股智夫 (獣医学部 実験動物学)

Male Sprague-Dawley Rats Prenatal Exposed to Di(n-butyl) phthalate: Morphological Changes in Leydig Cell Smooth Endoplasmic Reticulum

ABSTRACT

When high doses of di(n-butyl) phthalate (DBP) (100 mg/kg/day) were intragastrically administered to pregnant Sprague-Dawley rats throughout gestation days 12 to 21, the male pups showed similar weights with no apparent physical abnormalities (e.g. litter size, sex ratio) compared to that of the vehicle group. However, the prominent age-related morphological alterations occurred to the smooth endoplasmic reticulum (sER) of testicular Leydig cells (LCs) once these animals reach puberty. At weeks 5 and 7 old, the abundant sER with non-dilated cisternae distributed in LCs. After then, although the number of LCs significantly increased, the amount of sER significantly decreased at 9 to 14 weeks old, and disappeared at 17 weeks old. In contrast, the number of LCs and the amount of sER in LCs of lower dose groups (10, 30 and 50 mg/kg/day) were similar to that of the vehicle group. Furthermore, serum testosterone levels in the 100 mg/kg dose group were significantly lower at 5 to 17 weeks old. While their luteinizing hormone (LH) levels were significantly lower at 5 to 7 weeks old, and they became significantly higher at 9 to 17 weeks old. The aged-related and in utero DBP exposed dose dependent decreases the amount of sER in LCs linked with the increase LCs proliferative activity and serum LH Levels.

INTRODUCTION

Since the 1930's, phthalate di-esters have been widely used as solvents (C1-C2; methyl and ethyl esters), plasticizers (C3-C13), film formers, emulsifying agents, surfactants, and added to adhesives, glues, pharmaceutical enteric coatings, paints and printing inks. A common phthalate ester, ortho-di-butyl-phthalate (DBP) may be found in many over-the-counter (OTC) personal care products such as nail polish, cosmetics, shampoo, deodorants, perfumes, and hair spray (OSHA 2009). DBP hydrolyzes *in vivo* to produce mono-butyl-ester (MBP) which may undergo phase I oxidation to give oxidized mono butyl ester (MBP-O) or become glucuronidated (phase II metabolism) to form (MBP-G). MBP-O has also been shown to undergo α and β -oxidation pathways to ultimately produce ortho-phthalate acid. It has been reported that 90-96 % of an oral DBP dose will be excreted (parent and metabolites) via urine within 48 hr (Hoppin et al. 2002; Alam et al. 2010). Incorporating data from a variety of different research groups, an extensive physiological based pharmacokinetic model in pregnant and fetal rats has been reported (Clewett et al. 2008). The model successfully predicted levels of MBP and MBP-G in fetal plasma and testes. It has been shown that DBP dosed at 100 mg/kg/day or greater during gestation results in higher

levels of MBP via saturation of uridine 5'-diphospho-glucuronosyl-transferase (Clewett et al. 2008, Alam et al. 2010).

Therefore, the experimental data appears to support the notion that metabolite MBP acts as the compound predominantly responsible for observed anti-androgenic effects *in vivo*. MBP has been shown to inhibit fetal rat testes testosterone (T) production (Parks et al. 2000; Akingbemi et al. 2004). During the late fetal period, when male rats are in utero exposed to DBP, fetal testicular T synthesis decreases with testicular dysgenesis and Leydig cell (LCs) aggregation (Mylchreest et al. 2002; Barlow and Foster 2003). In normal testis, the LCs are located between the seminiferous tubules in cell clusters; the shapes of LCs vary from round to elongated or even fusiform. Normal steroidogenic LCs are characterized by a large amount of cystic dilated smooth endoplasmic reticulum (sER) in the cytoplasm (Mylchreest et al. 2002). In utero rats DBP (≥ 100 mg/kg) exposure been described to induce the LC hyperplasia at adulthood (Mylchreest et al. 2002, Mahood et al. 2007, Wakui et al. 2012). Hyperplasia is different from hypertrophy that the adaptive cell change in hypertrophy is by increased cellular size only unlike in hyperplasia by increased cellular number (Kumar et al. 2010). Although the detailed mechanism(s) are not fully elucidated (Mahood et al. 2007), various reports support: i) the presence of altered fetal steroid hormones and genes (Howdeshell et al. 2007); ii) that the presence of glucocorticoids can amplify these abnormalities (Drake et al. 2009); iii) that a correlation between inhibition of sterol regulatory element-binding protein 2-dependent gene expression pathways exist; and iv) that suppression of steroidogenesis by DBP and/or MBP via fetal-type LCs occurs in primates as well as in rodents (Hallmark et al. 2007). Recently, we reported prominent postnatal changes of LCs in rats following in utero exposure of DBP were the disappearance of sER with LC hyperplasia at adulthood using light and electron microscopic observations (Wakui et al. 2012). As age-related morphological changes in sER of LCs following in utero DBP exposure to male rats have not been previously described.

MATERIALS AND METHODS

DBP (99.8% pure) was purchased from Aldrich Chemical Co. (Milwaukee, WI). Eight-week-old time-mated female Sprague-Dawley rats ($n = 20$) were procured from SRL Co. (Shizuoka, Japan) on gestation day 0; the day copulation was confirmed. Upon arrival, animals were distributed into dose groups using body weight randomization. Rats were individually housed in polycarbonate cages containing wood chip bedding in a High Efficiency Particulate Air Filter (HEPA)-filtered, mass-air-displacement room maintained on a 12-hr light-dark cycle at approximately 22 ± 2 °C with a relative humidity of 55 ± 5 %. Animals were fed a conventional diet and had free access to food and water (MF, Oriental Yeast, Osaka, Japan). Five groups of pregnant rats ($n = 4$ per group) were intragastrically (i.g.) administered DBP in corn oil (Nacalai Tesque Inc., Osaka, Japan) at 0 (vehicle group), 10 mg, 30 mg, 50 mg or 100 mg/kg/day; ~ 0.5 mL/animal throughout gestation days 12 to 21. Dose solutions were prepared fresh every morning and dosed at 9:00 am. Dosing regimen was based upon previous studies which illustrated adverse effects to fetal male rats at 100 mg DBP/kg/day (Mylchreest et al. 1999; Barlow and Foster, 2003). Offspring were weighed and sexed at birth. Litters were reduced to leave eight offspring, 4 males and 4 females per dam united with a mother not given DBP or corn oil. Weaning was carried out for 21 days post-partum; pups were then removed from mothers. Offspring were housed in polycarbonate cages ($n = 4$ per cage; single sex) with wood chips as bedding and replaced every five days. All animals were weighed at birth and again at 5, 7, 9, 14 and 17 weeks old. For each time-point, one male from each dose group was randomly selected, weighed, anesthetized, and euthanized via CO₂ overdose. The testes were removed, weighed, and representative samples fixed in 0.1 M phosphate buffered containing 1.2% glutaraldehyde (2 hr); post fixed in 1.0% osmium tetroxide (2 hr). After dehydration in graded alcohols, specimens were embedded in Epon 812 (TAAB, Berkshire, UK). Sections (1 μ m) were cut using a Porter-Blum MT-IIb ultra-microtome and stained with methylene blue. To count LCs, light microscope images were captured on a 40 x objective on an Olympus BX53 microscope with CCD attachment DP73 (Olympus Co., Tokyo, Japan). As LCs were located within the interstitial tissue areas without seminiferous tubules, the number of LCs per unit square interstitial tissue areas ($10^4 \mu\text{m}^2$) were calculated using Image-Pro Plus ver.7.0.1 (Media Cybernetics, CA) by examining randomly selected sites (fifty) in each group to avoid sampling bias. Then, for the ultrastructural study, thin sections were

cut on a Porter-Blum MT-IIb ultramicrotome and mounted on formvar (polyvinyl formal) coated slit grids. After double staining with uranyl acetate and lead citrate, sections were detected with an electron microscope (H500H, Hitachi, Tokyo, Japan). As sER is an amorphous organelle, the confirmed quantitative analytical method of sER has not been established. In this study, to generate quantitative sER, the unit circles (1 μm diameter) were overlaid to avoid overlap and each sER mass in forty electron micrographs of the cytoplasmic regions in LCs of x 15,000 magnification were randomly taken from each group to avoid sampling bias. The number of unit circles per unit square (5 μm x 5 μm) were used to count the relative amount of sER quantity in LCs. Serum testosterone (T) and luteinizing hormone (LH) levels were measured by radio-immunoassays as previously described (Fisher et al. 2003; Wakui et al. 2007). For each set of mean values, standard deviation and standard error of means were computed and compared via Scheffé's F-test ($p < 0.05$) using Stat View-J 5.0 ver 5.0 (Abacus Concepts, Berkeley, CA).

RESULTS

Compared to the vehicle group, no statistical differences regarding average body weights (g), litter size, pup survival or sex ratio for all four dose groups, 10 mg, 30 mg, 50 mg and 100 mg DBP/kg/day, were observed (data not shown). At post-birth weeks 5, 7, 9, 14 and 17, testicular weights for 10 mg, 30 mg, and 50 mg/kg dose groups were similar to that for the vehicle group. However, the 100 mg/kg dose group displayed a statistically significant decrease in testicular weight after 9 weeks old (data not shown). Light microscopic observations revealed that the number of LCs in the 100 mg/kg dose group was significantly higher than that of the vehicle group at 9, 14 and 17 weeks old; all other dose groups at all ages were similar to that of the vehicle group (data not shown). As electron microscopic observations regarding normal rat LCs have been previously described, an in depth description will not be described (Russell and Burguet 1977; Jones et al. 1993). In general, normal LCs showed centrally placed with rounded to ovoid nucleus containing marginal heterochromatin, and abundantly dominated by sER; they were diffusely isolated, cystic dilated and distributed throughout the cytoplasm (data not shown). Compared to the vehicle group, distinctive morphological changes were observed in the 100 mg/kg dose group. At 5 to 7 weeks old (*i.e.* puberty periods), the 100 mg/kg dose group had abundant sER with a complicated arrangement of non-dilated cisterna, and few stripped rough endoplasmic reticulum (data not shown). The amount of sER quantity in LCs significantly decreased at 9 to 14 weeks old, and the sER was not observed at 17 weeks old (data not shown). However, mitochondrial swelling was not encountered and the Golgi apparatus displayed no observable change (data not shown). During 5 to 17 weeks old, the 10 mg, 30 mg, and 50 mg/kg dose groups exhibited T and LH levels similar to that of the vehicle group (data not shown); whereas the 100 mg/kg dose group had significantly lower T levels than that of the vehicle group (data not shown). The LH level of the 100 mg/kg dose group was significantly lower at 5 and 7 weeks old, and was significantly higher at 9 to 17 weeks old compared to that of the vehicle group (data not shown).

DISCUSSION

Postnatal male rats exposed to high levels of DBP (≥ 100 mg/kg) induce testicular dysgenesis resulting in increased numbers of LCs; unchanged or decreased testicular steroidogenesis have also been reported (Kim et al. 2004; Alam et al. 2010). In addition, ultrastructural studies showed that dosing *i.g.* rats (at 6 to 8 weeks old) with ortho-phthalates – di(2-ethylhexyl) phthalate, di-n-pentyl phthalate, di-n-octyl phthalate or diethyl phthalate – for 2 days induced vesiculation and dilation of sER in LCs, but the overall sER quantity were unchanged (Jones et al. 1993). In this study, DBP was dosed *i.g.* daily during gestation 12 to 21 induced LC hyperplasia without hypertrophy in the highest dose group (100 mg/kg) at 9 weeks old; they were non-dilated cisternal sER and morphologically steroidogenesis deficient. Upon reaching adulthood (*i.e.* 9 weeks post birth), the amount of sER quantity in LCs of 100 mg/kg dose group exhibited age-related and gradual decrease which disappeared at 17 weeks old. Hence, these data showed time dependent morphological effects on sER in LCs of rats following in utero DBP exposure.

Orally administered DBP becomes rapidly metabolized and excreted in urine within 48 hr (Hoppin et al. 2002; Alam et al.

2010). It has been suggested that in utero DBP exposure directly influence fetal rats LCs (Mylchreest et al. 2002; Barlow and Foster, 2003). Previous rat studies have reported that LC numbers were unchanged during the juvenile to puberty periods, but significantly increased after 90 days old; some studies have proposed a compensatory reaction to testicular steroidogenesis triggered by T insufficiency (Mylchreest et al. 2002; Barlow and Foster, 2003; Hu et al. 2009). In the present study the male pups dosing 100 mg DBP/kg/day from gestation days 12 to 21 induced a significant decrease in T levels even at 5 to 17 weeks old, but showed significant increase number of LCs after 9 weeks old and the amount of sER quantity correlated with increased LH levels. Human studies, compared to controls, have suggested that LC hyperplasia occurred in patients due to lower serum T values and higher LH levels (Booth et al. 1987; Holm et al. 2003).

In conclusion, while a variety of studies have been reported in the literature, the present research illustrates that male rats in utero 100 mg DBP/kg/day at days 12 – 21 of gestation exhibit abundant non-dilated cisternae sER in LCs at puberty and significantly decreases of sER in LCs at adulthood (*i.e.* after 9 weeks of age). These experimental observations have appeared to be linked to low T and high LH levels. While the complete molecular mechanisms and apparent dose-dependent effects are not fully elucidated, links between the alteration of sER and decrease ability to synthesized T with increase receptivity for LH warrant additional research.

REFERENCES

- Akingbemi, B.T., Ge, R., Klinefelter, G.R., Zirkin, B.R. and Hardy, M.P. (2004). Phthalate-induced Leydig cell hyperplasia is associated with multiple endocrine disturbances. *PNAS* **101**: 775-780.
- Alam, M.S., Ohsako, S., Matsuwaki, T., Zhu, X.B., Tsunekawa, N., Kanai, Y., Sone, H., Tohyama, C. and Kuromaru, M. (2010). Induction of spermatogenic cell apoptosis in prepubertal rat testes irrespective of testicular steroidogenesis: a possible estrogenic effect of di(*n*-butyl) phthalate. *Reproduction* **139**: 427-437.
- Barlow, N.J. and Foster, P.M. (2003). Pathogenesis of male reproductive tract lesions from gestation through adulthood following in utero exposure to di(*n*-butyl) phthalate. *Toxicol Pathol* **32**: 319-410.
- Booth, J.D., Merriam, G.R., Clark, R.V., Loriaux, D.L. and Sherins, R.J. (1987). Evidence for Leydig cell dysfunction in infertile men with a selective increase in plasma follicle-stimulating hormone. *J Clin Endocrinol Metab* **64**: 1194-1198.
- Clewell, R.A., Kremer, J.J., Williams, C.C., Campbell, J.L., Andersen, M.E., Borghoff, S.J. (2008). Tissue Exposures to Free and Glucuronidated Monobutylphthalate in the Pregnant and Fetal Rat following Exposure to Di-*n*-butylphthalate: Evaluation with a PBPK Model. *Toxicol Sci*. **103**: 241-259.
- Drake, A.J., Van den Driesche, S., Scott, H.M., Hutchison, G.R., Seckl, J.R., Sharpe, R.M. (2009). Glucocorticoids Amplify Dibutyl Phthalate-induced Disruption of Testosterone Production and Male Reproductive Development. *Endocrinology*. **150**: 5055-5064.
- Fisher, J.S., Macpherson, S., Marchetti, N. and Sharpe, R.M. (2003). Human ‘testicular dysgenesis syndrome’: A possible model using in-utero exposure of the rat to dibutyl phthalate. *Human Reprod* **18**: 1383-1394.
- Hallmark N., Walker, M., McKinnell, C., Mahood, I.K., Scott, H., Bayne, R., Coutts, S., Anderson, R.A., Greig, I., Morris, K., Sharpe, R.M. (2007). Effects of Monobutyl and Di(*n*-butyl) Phthalate in Vitro on Steroidogenesis and Leydig Cell Aggregation in Fetal Testis Explants from the Rat: Comparison with Effects in Vivo in the Fetal Rat and Neonatal Marmoset and in Vitro in the Human. *Environ Health Perspect*. **115**: 390-396.
- Holm, M., Rajpert-De, Meyts, E., Abderrsson, A.M., Skakkebaek, N.E. (2003). Leydig cell micronodules are a common finding in testicular biopsies from men with impaired spermatogenesis are associated with decreased testosterone/LH ratio. *J Pathol* **199**: 378-386.
- Hoppin, J.A., Brock, B.T., Davis, B.T. and Baiard, D.D. (2002). Reproducibility of urinary phthalate metabolites in first morning urine samples. *Environ Health Perspect* **110**: 515-518.
- Howdeshell, K.L., Furr, J., Lambright, C.R., Rider, C.V., Wilson, V.S., Gray, L.E. Jr. (2007). Cumulative Effects of Dibutyl Phthalate and Diethylhexyl Phthalate on Male Rat Reproductive Tract Development: Altered Fetal Steroid Hormones

- and Genes. *Toxicol Sci.* **99**: 190-202.
- Hu, G.X., Lian, Q.Q., Ge, R.S., Hardy, D.O. and Li, X.K. (2009). Phthalate-induced testicular dysgenesis syndrome: Leydig cell influence. *Trends Endocrinol Metab* **20**: 139-145.
- Johnson, K.J., McDowell, E.N., Viereck, M.P., Xia, J.Q. (2011). Species-Specific Dibutyl Phthalate Fetal Testis Endocrine Disruption Correlates with Inhibition of SREBP2-Dependent Gene Expression Pathways. *Toxicol Sci.* **120**: 460-474.
- Jones, H.B., Garside, D.A., Liu, R. and Roberts, J.C. (1993). The influence of phthalate esters on Leydig cell structure and function in vitro and in vivo. *Exp Mol Pathol* **58**: 179-193.
- Kim, H.S., Kim, T.S., Shin, J.H., Moon, H.J., Kang, I.H., Kim, I.Y., Oh, J.Y. and Han, S.Y. (2004). Neonatal exposure to di(*n*-butyl) phthalate (DBP) alters male reproductive-tract development. *J Toxicol Environ Health* **67**: 2045-2060.
- Kumar, V., Abbas, A.K., Fausto, N. and Aster, J.C. (2010). Cellular responses to stress and toxic insults: adaptation, injury, and death. Robbins and Cortran Pathologic Basis of Disease. Eighth Edition, pp. 7-9. Saunders Elsevier, Philadelphia, PA.
- Mahood, I.K., Scott, H.M., Brown, R., Hallmark, N., Walker, M. and Sharpe, R.M. (2007). In utero exposure to di(*n*-butyl) phthalate and testicular dysgenesis: Comparison of fetal and adult end points and their dose sensitivity. *Environ Health Perspect* **115** (Suppl 1) 55-61.
- Mylchreest, E., Sar, M., Cattley, R.C. and Foster, P.M. (1999). Disruption of androgen-regulated male reproductive development by di(*n*-butyl) phthalate during late gestation in rats is different from flutamide. *Toxicol Appl Pharmacol* **156**: 81-95.
- Mylchreest, E., Sar, M., Wallace, D.G. and Foster, P.M. (2002). Fetal testosterone insufficiency and abnormal proliferation of Leydig cells and gonocytes in rats exposed to di(*n*-butyl) phthalate. *Reproduct Toxicol* **16**: 19-28.
- Parks, L.G., Ostby, J.S., Lambright, C.R., Abbott, B.D., Klinefelter, G.R., Barlow, N.J. and Gray L.E. (2000). The plasticizer diethylhexyl phthalate induces malformations by decreasing fetal testosterone synthesis during sexual differentiation in the male rat. *Toxicol Sci.* **58**: 339-349.
- OSHA (2009). Occupational Safety and Health Guideline for Dibutyl Phthalate. <http://www.osha.gov/SLTC/healthguidelines/dibutylphthalate/recognition/html>.
- Russell, L. and Burguet, S. (1977). Ultrastructure of Leydig cells as revealed by secondary tissue treatment with ferrocyanide-osmium mixture. *Tissue Cell* **9**: 751-766.
- Wakui, S., Akagi, Y., Muto, T., Tokoo, K., Kobayashi, Y., Kamei, Y., Shiota, K., Akahori, F., Suzuki, Y., Hano, H., Endou, H. and Kanai, Y. (2007). Testicular toxicology of pubescent and adult rat prenatally exposure to 3,3',4,4',5-pentachlorobiphenyl. *J Toxicol Pathol* **20**: 133-140.
- Wakui, S., Takahashi, H., Muto, T., Shirai, M., Promsuk, J., Anzai, N., Wempe, M.F., Kansaku, N., Hano, H., Inomata, T. and Endou, H. (2012). Atypical Leydig Cell hyperplasia in adult rats with low T and high JH induced by prenatal di(*n*-butyl) phthalate exposure. *Toxicol Pathol* **40**: 1-7.

○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 28 年度 3 月 31 日

プロジェクト班長: 伊藤 潤哉 (獣医学部 准教授)

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: 久松 伸 (生命環境科学部 講師)

【概要】

本研究は、卵丘細胞卵子複合体の状態を超低温保存（ガラス化保存）したラット成熟卵と新鮮または凍結保存精子を用いて体外受精（IVF）を行い、IVF 後の生存性、受精能および産子への発育能を調べた。卵丘細胞卵複合体および卵丘細胞除去卵は、30% (v/v) ethylene glycol (EG), 0.5 mol/L sucrose および 20% (v/v) ウシ胎子血清 (FCS) を含むガラス化保存液により、クライオトップでガラス化保存した。加温卵は新鮮精子または凍結保存精子で IVF を行い、受精率を調べた。新鮮精子との IVF による受精率はガラス化保存したラット卵丘細胞卵子複合体が卵丘細胞除去卵よりも高い値を示した。さらに、新鮮およびガラス化保存した卵丘細胞卵子複合体は、ともに凍結保存精子を用いた IVF により受精 ($62.4 \pm 5.1\%$ および $41.1 \pm 2.6\%$) した。このガラス化保存卵の産子への発育能を調べるために、ガラス化保存した卵丘細胞卵複合体由来の 2 前核保有胚 108 個を 8 匹の仮親へ移植したところ、8 匹の産子が得られた。本研究では、卵丘細胞が付着したガラス化保存ラット未受精卵と超低温保存した精子との IVF により前核期胚が得られ、その胚移植により産子が誕生した。本報告は、ラットにおける超低温保存した未受精卵および精子からの初めての産子作出成功例である。

【目的】

哺乳類における生殖細胞・組織の超低温保存は、効率的な遺伝資源の保存やヒト生殖補助医療として重要な技術である。その中でも未受精卵の状態では効率よく超低温保存することが出来れば、個体復元をするために IVF あるいは卵細胞質内精子注入法に用いる際、雄の遺伝的背景を選択することができることから、極めて重要な技術であると考えられる。しかし、未受精卵の超低温保存は、胚と比較すると加温後の受精能、発生能が著しく低下することが知られている。先行研究において、我々は卵丘細胞を除去した新鮮およびガラス化ラット未受精卵は、新鮮精子を用いた体外受精では精子は受精せず卵腔に留まることを示した (Fujiwara *et al.*, 2010)。一方、マウスでの先行研究において、卵丘細胞が付着した未受精卵 (COC) をガラス化保存すると、保存後の受精率および発生率が改善することを示した (Kohaya *et al.*, 2011)。そこで、本研究では、卵丘細胞付着の有無が新鮮およびガラス化保存ラット未受精卵の新鮮精子を用いた IVF 後の生存性および受精能に及ぼす影響を検討した。さらに、COC でガラス化保存した未受精卵を凍結保存精子を用いて IVF し、産子への発育能を調べた。

【材料と方法】

300 IU/kg eCG および hCG により過剰排卵処置した 3-5 週齢の雌ラット (Crlj: Wistar) の卵管膨大部より卵丘細胞卵子複合体 (COC) を採取した。0.1% hyaluronidase により卵丘細胞を除去した卵を裸化処理卵 (DO) とした。ガラス化保存は、DO および COC をそれぞれ 15% EG および 20% FCS を含む平衡液に 3 分間平衡させた後、30% EG, 20% FCS および 0.5 M sucrose を含むガラス化液に 1 分間感作させ、クライオトップ先端シートに充填し、1 分間の感作終了と同時に液体窒素中へと投入した。加温は、0.5 M sucrose および 20% FCS を含む PB1 中へクライオトップ先端シートを浸漬させることで行った。加温した卵を受精培地 (Oh *et al.* 1998) で洗浄し、IVF に用いた。IVF に使用した精子は、12-24 週齢の雄ラット (Crlj: Wistar) の精巣上体尾部より採取した。採取した精子の一部は、23% (v/v) egg yolk, 8% (w/v) lactose monohydrate, 0.7% (v/v) Equex を含む凍結保存液と懸濁し、0.25 mL プラスチックストローに充填し凍結精子を作製した。凍結精子は、使用の直前まで液体窒素中で保存した。IVF は、 0.5×10^6 sperm/mL に調整した新鮮

精子を受精培地のスポット中で5時間前培養し、精子前培養スポットに新鮮あるいは加温した DO および COC を移し、10 時間共培養した。10 時間後、COC は卵丘細胞を除去し、DO および COC の生存率および2 前核形成率を調べた。さらに、新鮮およびガラス化保存した COC は凍結精子を用いた IVF を行い、同様に生存率および2 前核形成率（受精率）を調べた。8-14 週齢の雌ラットと 15-80 週齢の精管結紮雄ラットを交配し、偽妊娠したレシピエントラットを準備した。作出した2 前核保有胚を偽妊娠誘起したレシピエントラットの卵管へ胚移植し、移植後 21 日後に分娩を確認した。分娩を確認できなかったレシピエントラットは、翌日（移植後 22 日）に帝王切開を行い、産子を確認した。

【結果】

新鮮精子を用いて IVF した新鮮あるいはガラス化 DO および COC の生存率は新鮮 DO が $94.3 \pm 4.7\%$ 、新鮮 COC が $93.3 \pm 4.8\%$ 、ガラス化 DO が $80.0 \pm 4.4\%$ 、ガラス化 COC が $82.7 \pm 3.2\%$ であり、試験区間に有意な差はなかった ($P>0.05$)。受精率は新鮮 DO が $59.4 \pm 14.0\%$ 、新鮮 COC が $68.6 \pm 3.7\%$ 、ガラス化 DO が 0% 、ガラス化 COC が $32.7 \pm 4.3\%$ であり、ガラス化 COC はガラス化 DO より有意に高い2 受精率を示した ($P<0.05$)。また、凍結精子を用いて IVF した新鮮あるいはガラス化 COC の生存率は、新鮮 COC が $95.0 \pm 2.5\%$ 、ガラス化 COC が $85.0 \pm 2.9\%$ であり、有意な差はみられなかった ($P>0.05$)。受精率は新鮮 COC ($62.4 \pm 5.1\%$) がガラス化 COC ($41.1 \pm 2.6\%$) よりも有意に高い値を示した ($P<0.05$)。さらに、新鮮 COC 由来胚を移植したレシピエントの妊娠率は 100% であり、産子率は $52.6 \pm 7.3\%$ であった。一方、ガラス化保存した COC 由来胚を移植したレシピエントの妊娠率は 37.5% であり、産子率は $7.4 \pm 2.7\%$ を示し、妊娠率および産子率ともに新鮮 COC 由来胚を移植した場合と比較し有意に低下した。 ($P<0.05$)。

【考察】

卵丘細胞は受精において重要であることが知られており、Shimada ら (2008) による報告では、マウス卵において卵丘細胞が分泌するケモカインが精子の受精能獲得を誘起することや、受精率を向上することが明らかにされた。また、Vincent ら (1990) は、卵丘細胞の存在が表層顆粒の放出を抑制することを報告している。本研究においても、新鮮精子を用いた IVF の結果より、ガラス化保存した裸化未受精卵は受精しなかったが、卵丘細胞が付着した状態でガラス化保存することで受精率が改善することが明らかになった。一方で、凍結精子およびガラス化保存未受精卵を IVF して作製した胚を移植した産子率 ($7.4 \pm 2.7\%$) は新鮮由来胚 ($52.6 \pm 7.3\%$) の産子率と比較し有意に低下した。哺乳類未受精卵は、通常第二減数分裂で停止しているが、ラット未受精卵は自発的に第二減数分裂後期に進行してしまうことが知られている。加えて、Chebotareva ら (2011) は低温感作によってラット未受精卵において染色体分離が引き起こされることを報告している。したがって、ガラス化保存時の低温感作が減数分裂に異常を生じさせ、産子率が低下したひとつの要因ではないかと考えられる。結論として、本研究では卵丘細胞が付着したガラス化保存ラット未受精卵と超低温保存した精子との IVF により前核期胚が得られ、その胚移植により産子が誕生した。本報告は、ラットにおける超低温保存した未受精卵および精子からの初めての産子作出成功例である。

【引用文献】

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.

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 27 年度 4 月 1 日～平成 29 年度 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）

【研究概要】

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妊娠中は弛緩状態を維持し、妊娠末期に近づくに従っ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。中間径フィラメントの構成タンパク質は細胞種により異なり、それぞれの細胞の構造や機能の特異性と関係し、主に細胞の形態を維持する細胞骨格として機能するとされてきた。その後、デスミンとビメンチンを欠失したノックアウトマウスの研究から、平滑筋細胞の収縮力の発達に、中間径フィラメントが重要であることが報告された。妊娠モルモットの子宮平滑筋において、非妊娠時と比較してデスミン発現が増加し、さらに S-ニトロシル（SNO）化デスミンも著しく増加することが報告され、デスミンが NO による SNO 化修飾を受けていることが明らかにされた。

これらのことから本年度は、妊娠ラットの子宮体と子宮頸管における中間径フィラメントの SNO 化の検出とその変動を解析し、妊娠期の子宮平滑筋への関与を検討することを目的とした。

妊娠 21 日のラット子宮体および子宮頸管において、SNO 化ビメンチンは検出されなかったが、SNO 化デスミンは検出されたことから、ラットの妊娠子宮においてデスミンは SNO 化修飾を受けていることが示された。

子宮体では、SNO 化デスミンは、非妊娠群と比較して妊娠 17 日と妊娠 21 日、出産 1 日後で有意に減少した。一方、子宮頸管の SNO 化デスミンに妊娠期の変動は認められなかった。デスミン陽性細胞は子宮筋層側で確認され、子宮頸管では上皮細胞周辺で観察されたが、分泌腺付近では認められなかった。

これらの結果から、ラット子宮体と子宮頸管においてデスミンが SNO 化されていることが確認されたが、ビメンチンは SNO 化されていなかった。デスミンは妊娠中の子宮平滑筋の肥大と分娩後の収縮や、妊娠維持に必要な子宮頸管の緊密な閉鎖に関与している可能性がある。一方、妊娠時期や NO 量と SNO 化によるデスミンの関与は明らかに出来なかったことから、さらなる検討が必要である。

【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妊娠中は弛緩状態を維持し、妊娠末期に近づくに従っ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。子宮における胚の受容の維持には、以前から、一酸化窒素（NO）が環状グアノシンーリン酸（cyclic Guanosine Monophosphate：cGMP）産生を介して、子宮平滑筋を弛緩させ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、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。

中間径フィラメントの構成タンパク質は細胞種により異なり、それぞれの細胞の構造や機能の特異性と関係している。筋組織にはデスミンが特異的フィラメントタンパク質として存在し、横紋筋細胞の Z 帯、平滑筋細胞の濃密帯に分布している。中間径フィラメントのネットワークは、主に細胞の形態を維持する細胞骨格として機能するとされてきた。しかし、デスミンが子宮平滑筋において収縮や弛緩を制御している（Leoni *et al.*, 1990）ことが明らかにされ、さらに、デスミンとビメンチンを欠失したノックアウトマウス研究から、平滑筋細胞の収縮力の発達に、中間径フィラメントが重要であることが報告された（Tang, 2008）。妊娠時のモルモット子宮平滑筋では、デスミンは非妊娠時と比較して発現が増加し、さらに SNO 化デスミンも著しく増加し、デスミンが NO による SNO 化修飾を受けていることが明らかにされた（Ulrich *et al.*, 2012）。

これらのことから本年度は、妊娠ラットの子宮体と子宮頸管における中間径フィラメントの SNO 化の検出とその変動

を解析し、妊娠期の子宮平滑筋への関与を検討した。

【方法と結果】

妊娠 21 日齢のラット子宮において中間径フィラメントが SNO 化されているか確認した。妊娠 21 日の子宮体および子宮頸管のタンパク質の SNO 化をビオチンスイッチ法 (Jaffrey *et al.*, 2001) により検出した。妊娠 21 日のラット子宮体および子宮頸管において、SNO 化ビメンチンは検出されなかったが、SNO 化デスミンは検出されたことから、ラットの妊娠子宮においてデスミンは SNO 化修飾を受けていることが示された。

ラット子宮体および子宮頸管において、SNO 化デスミンが検出されたことから、次に、子宮における NO 合成酵素 (NOS) 遺伝子発現を real-time RT-PCR を用いて解析し、デスミンの局在を免疫組織化学染色により解析した。また、SNO 化タンパク質は、ビオチンスイッチ法とアビジン結合試薬および抗デスミン抗体を用い、ウェスタンブロット法により解析した。

デスミン mRNA は、卵巣除去 (OVX) 群の子宮と比較して妊娠期の子宮で高発現していた。子宮体におけるデスミンタンパク質も同様に、非妊娠群および OVX 群と比較して妊娠 17、21 日、分娩 1 日後で有意に増加し、その後に減少傾向を示した。SNO 化デスミンは、非妊娠群と比較して妊娠 17 日と妊娠 21 日、分娩 1 日後で有意に減少した。

子宮頸管におけるデスミンは、非妊娠群および OVX 群と比較して妊娠 17 日で増加傾向を示し、妊娠 21 日で有意に増加した。分娩後には減少傾向を示し、分娩 7 日後で非妊娠群および OVX 群と同等の値を示した。子宮頸管の SNO 化デスミンに妊娠期の変動は認められなかった。

デスミン陽性細胞は子宮筋層側で観察され、子宮頸管では上皮細胞周辺で観察されたが、分泌腺付近では認められなかった。

【考察】

本実験結果から、ラット子宮体と子宮頸管でデスミンが SNO 化されていることが確認されたが、ビメンチンは SNO 化されていなかった。デスミンは妊娠中の子宮平滑筋の肥大と分娩後の収縮や、妊娠維持に必要な子宮頸管の緊密な閉鎖に関与している可能性がある。一方、妊娠時期や NO 量と SNO 化によるデスミンの関与は明らかに出来なかったことから、さらなる検討が必要である。

○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 年度 4 月 1 日～平成 30 年度 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

幼少期の母子間の関係性、とくに母からのグルーミング刺激が、子の社会性発達に大きな影響を与えることが知られている。そこで、仔マウスに母からのグルーミング刺激を模した筆刺激を与え、オキシトシン（OT）の神経細胞が存在する室傍核（PVN）と視索上核（SON）における c-fos 陽性細胞数と OT 産生細胞数を測定した。結果、筆刺激群における PVN での c-fos 陽性細胞数、OT 産生細胞数はどちらも刺激なしの群と比較して多い傾向が見られた。このことから、筆刺激のような、なで刺激により、PVN での神経活性が高まり、OT 産生細胞が高活性化することが示唆された。また、SON における OT 産生細胞数に差は見られなかったことから、筆刺激による OT 産生細胞の活性は PVN が関与していると考えられた。

緒言

母性行動の質や頻度は、仔の社会的行動の発達に大きな影響を持ち、次世代へ伝播する [1]。このような世代間伝播はラットの研究などでも多数報告されているが、これは特に幼少期に母からうけるグルーミング量が神経発達をエピジェネティックに制御するためであることが示唆されている [2]。しかし、そもそも母からのグルーミングによって活性化する脳領域はまだ分かっていない。近年、皮膚接触を伝達する C 繊維系には、「撫でる」ことに特異的に反応する細胞が見出された [3]。このことから、母から受けるグルーミングは、脳内の特定の回路を活性化する可能性が考えられた。特に、幼少期にうけたグルーミングの多少は、将来母になった時の母性行動に影響することからも [2]、母性行動を制御する神経回路、すなわち脳内オキシトシン（OT）に伝達されることが想定される。ヒトではマッサージなどの皮膚接触でオキシトシン神経系が活性化されることが知られていることから、オキシトシンの産生領域である PVN と SON におけるオキシトシン産生細胞数に着目した。

本研究では、「撫で」に感受性ニューロンに着目し、幼少期に母から受けるなで刺激によって活性化する脳領域の同定を目的として仔マウス筆刺激実験を行い、OT 神経細胞の変化、あるいはその活性化を評価した。

材料と方法

供試動物

供試動物として本研究室で繁殖維持されてきた C57BL/6 マウスを用いた。生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。産仔数が多い場合には、1 日齢（PD1）までに 10 匹（♂ 5 匹、♀ 5 匹）になるように揃えた。実験では生後 9～11 日齢の仔マウスを用いた。

実験方法

実験の約 24 時間前に実験場所である防音室にホームケージを移動し、場所への馴化を行った。実験ケージ（小ケージ）はアルミホイルで区画を作り、それぞれの区画にコーンコブを敷いたものを使用した。場所への馴化後、仔マウス（PD9-11）を親から離し、それぞれの区画に 1 匹ずつ隔離した。雄雌は control 群と筆刺激群で均等になるように分けた。その 2 時間後、筆刺激群には 30 分間背中側を筆（12.7 mm 平筆）で刺激した。

なお、筆刺激は 40 回 / 分のペースで一定に行った。その 1 時間半後、灌流固定を行い脳を採取した。

組織切片の作成・薄切

灌流固定して採取した脳を、凍結クライオスタット（Leica Microsystems GmbH, CM1850, Wetzlar, Germany）を用

いて切片を作成した。脳は、 -21°C 下で Tissue-tec O.C.T コンパウンド（サクラファインテックジャパン株式会社：東京：日本）でブロック台に固定し、厚さ $30\mu\text{m}$ で薄切した。脳地図を参考に Bregma 2.34 mm \sim -3.64 mm まで網羅的に切り出し、4 枚おきに免疫組織化学染色に使用した。脳切片はスクロース 300 g、エチレングリコール 300 ml、pH7.4 の 0.4MPB 250 ml、ポリビニルピロリドン 10 g を混合したものを DW で 1 ℓ にメスアップした Cryo Protectant で満たした 24 穴 well 内に入れ、 -20°C の冷凍庫内で保存した。

免疫染色

Cryo Protectant にて保存した切片を、PBST で 3 回、各 10 分間ずつ洗浄した。ブロッキングのために 0.1MPBST で 5% になるように希釈した Normal Donkey serum（和光純薬工業株式会社）に切片を 1 時間浸漬した。その後、PBST-5% Normal Donkey serum にて 100 倍希釈した一次抗体 Goat anti-c-fos（Santa Cruz biotechnology, SC-52-G）と 1000 倍希釈したオキシトシン抗体 Rabbit anti-Oxytocin（ImmunoStar, 20068）に切片を浸漬し、 4°C にて 48 時間反応させた。反応終了後、PBST で切片を 3 回、各 10 分間ずつ洗浄した。さらに PBST-5% Normal Donkey serum にて 250 倍希釈した二次抗体 2 種類 Donkey anti-Goat IgG, Alexa594/Donkey anti-Rabbit IgG, Alexa488（Jackson Immuno Research, 705-586-147/711-546-152）に切片を 24 時間浸漬し、陽性細胞を可視化した。反応終了後、PBST にて 3 回、各 10 分間ずつ洗浄した。洗浄した切片は 0.9% 生理食塩水を満たしたシャーレに移し、筆でスライドガラスに乗せ、封入剤 DAPI Fluoromount-G（コスモバイオ株式会社）で封入した。カバーガラスは MATSUNAMI NEO micro cover glass $24\times 55\text{ mm}$ （松浪硝子工業株式会社：大阪）をおもに用いた。

組織標本の観察および写真撮影

全ての組織標本は光学顕微鏡（OLYMPUS BX51-N：東京：日本）にて 10×10 倍で観察した。蛍光画像は顕微鏡に装着したレーザースキャンデジタルカメラ（OLYMPUS, Shinhuku, 東京）にて撮影した。解析では PVN と SON における c-fos 発現細胞数とオキシトシン産生細胞数を計測した。1 個体あたり各領域 7 \sim 8 枚の切片のうち、4 枚の切片を選び解析に使用した。

結果

PVN において、筆刺激をした際のオキシトシン産生細胞数は刺激なし（control 群）と比べて差が見られなかった（図 1, 2）。また、同様に c-fos 陽性細胞数も筆刺激群と control 群で差が見られなかった（図 3, 4）。しかし、オキシトシン産生細胞数、c-fos 陽性細胞数ともに個体のばらつきが大きいことが分かった。

また、SON におけるオキシトシン産生細胞数、c-fos 陽性細胞数ともに筆刺激群と control 群で差が見られず、個体のばらつきも少なかった（図 5-8）。

さらにオキシトシン産生細胞と c-fos 陽性細胞の共発現割合は、PVN, SON どちらも control 群と筆刺激群で差は見られなかったが、PVN と比較して SON の方が共発現の割合が高かった（図 9-10）。

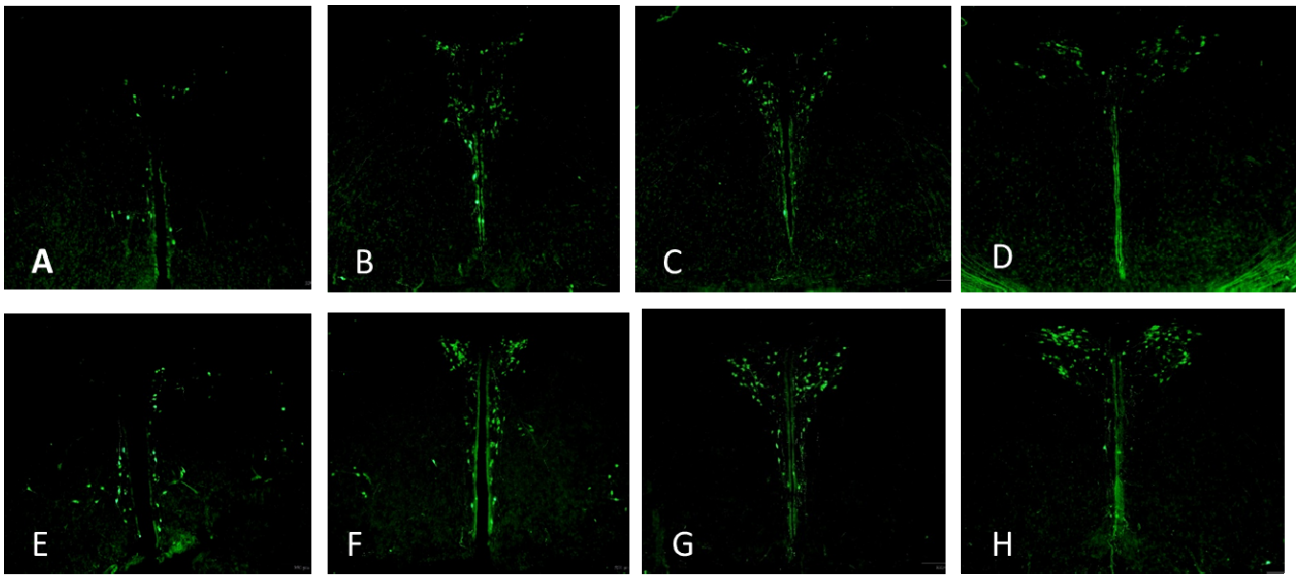


図 1 PVN におけるオキシトシン産生細胞の蛍光染色画像；
 (A~D) control 群、(E~H) 筆刺激群
 Bregma -0.46 mm (A, E)、-0.82 mm (B, F)、-1.06 mm (C, G)、-1.34 mm (D, H)

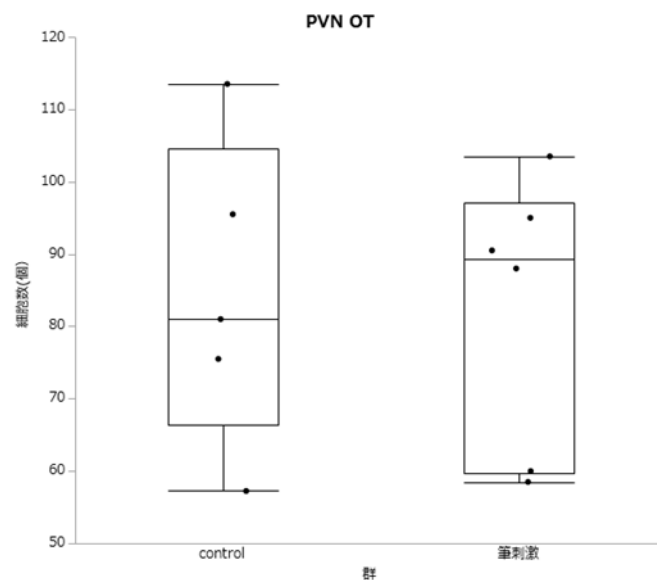


図 2 PVN におけるオキシトシン産生細胞数 分布図

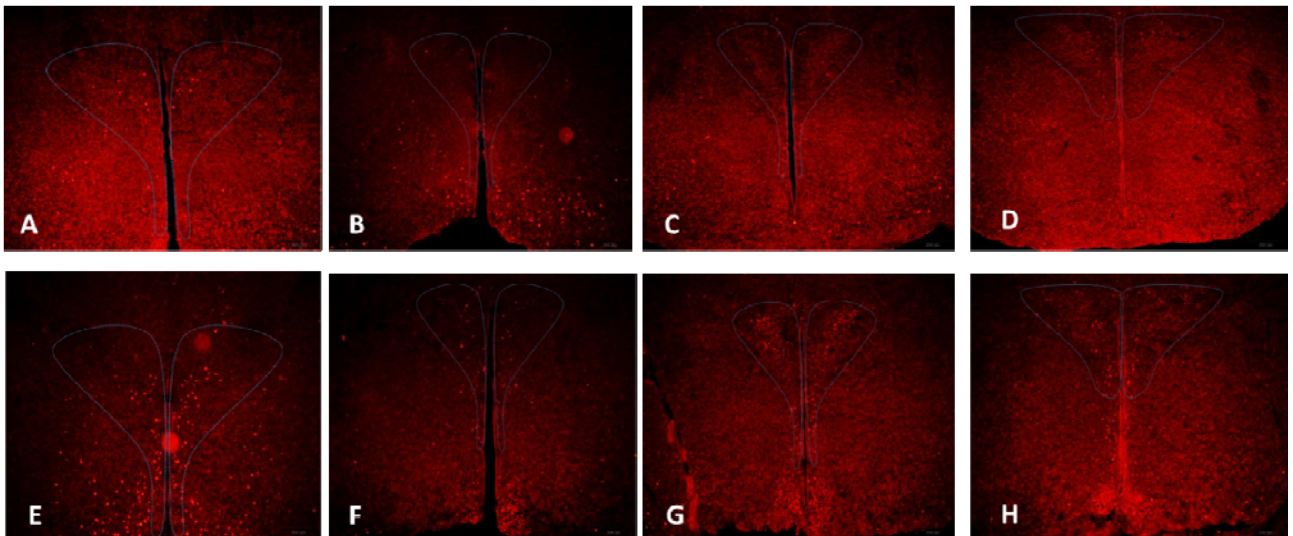


図3 PVN における c-fos 陽性細胞の蛍光染色画像；
 (A～D) control 群、(E～H) 筆刺激群
 Bregma -0.46 mm (A, E)、-0.82 mm (B, F)、-1.06mm (C, G)、-1.34 mm (D, H)

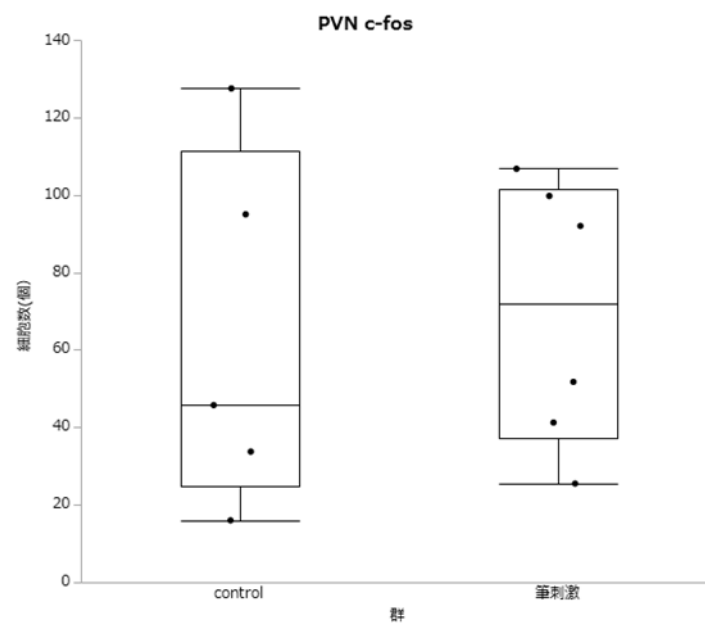


図4 PVN におけるオキシトシン産生細胞数 分布図

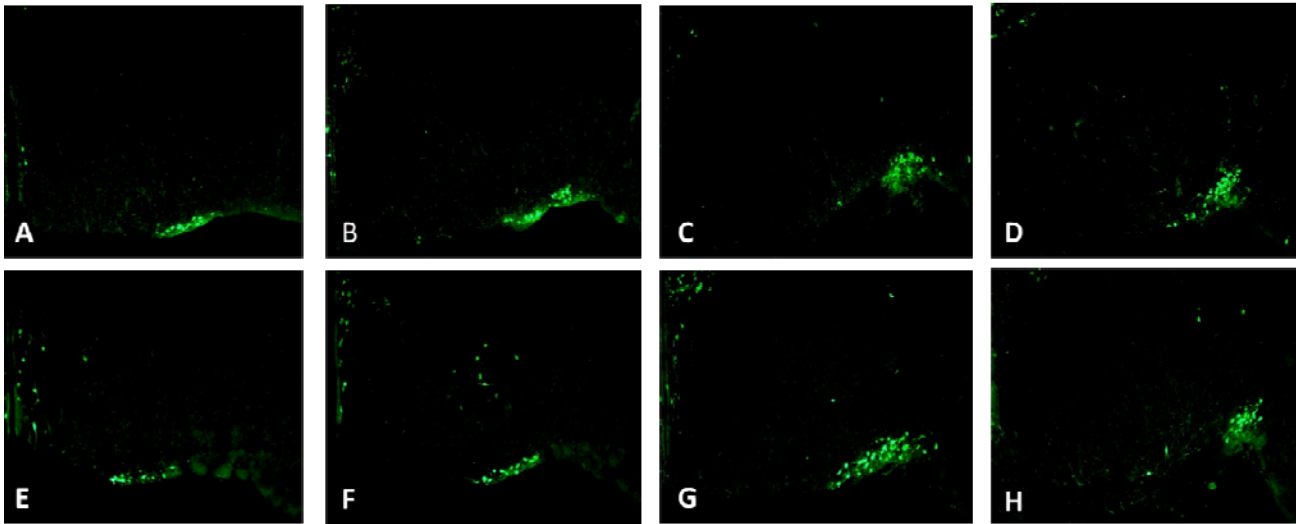


図5 SONにおけるオキシトシン産生細胞の蛍光染色画像；
 (A～D) control 群, (E～H) 筆刺激群
 Bregma -0.46 mm (A, E)、-0.82 mm (B, F)、-1.06 mm (C, G)、-1.34 mm (D, H)

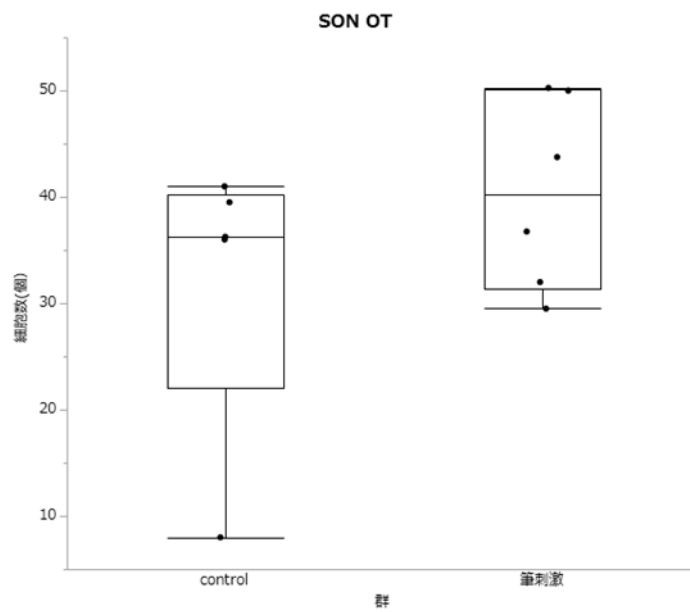


図6 SONにおけるオキシトシン産生細胞数 分布図

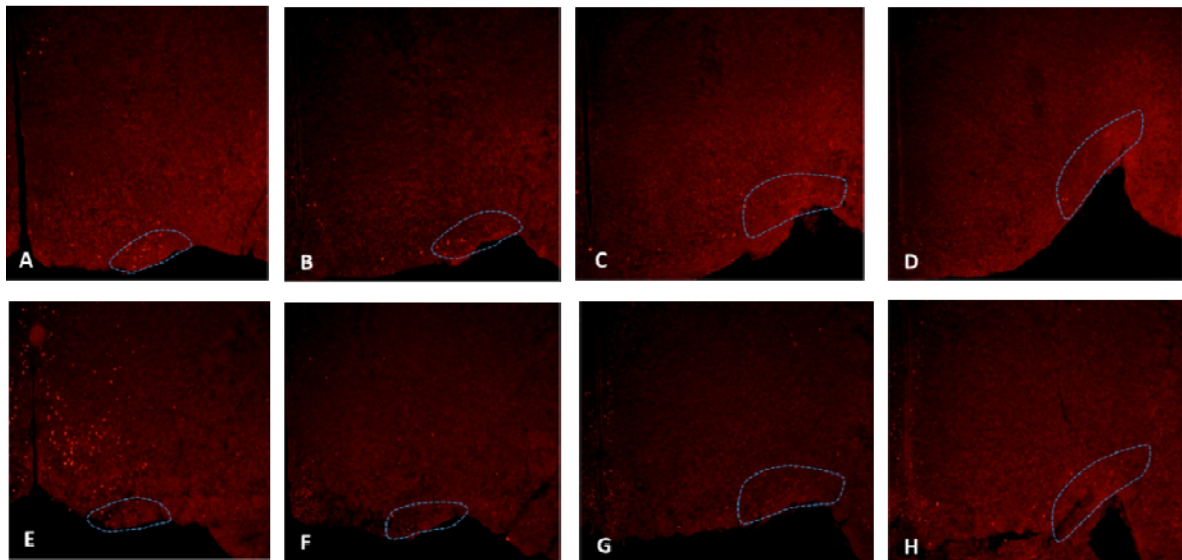


図 7 SON における c-fos 陽性細胞の蛍光染色画像；
 (A~D) control 群、(E~H) 筆刺激群
 Bregma -0.46 mm (A,E)、-0.82 mm (B,F)、-1.06 mm (C,G)、-1.34 mm (D,H)

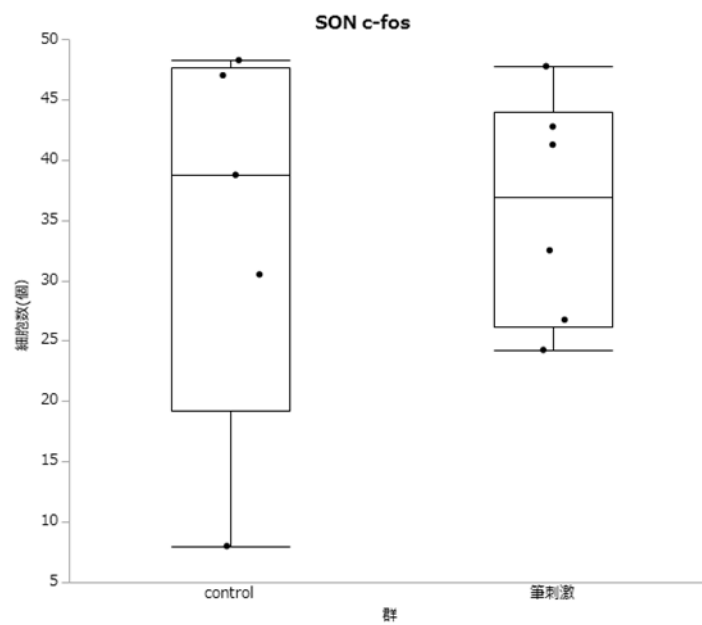


図 8 SON における c-fos 陽性細胞数 分布図

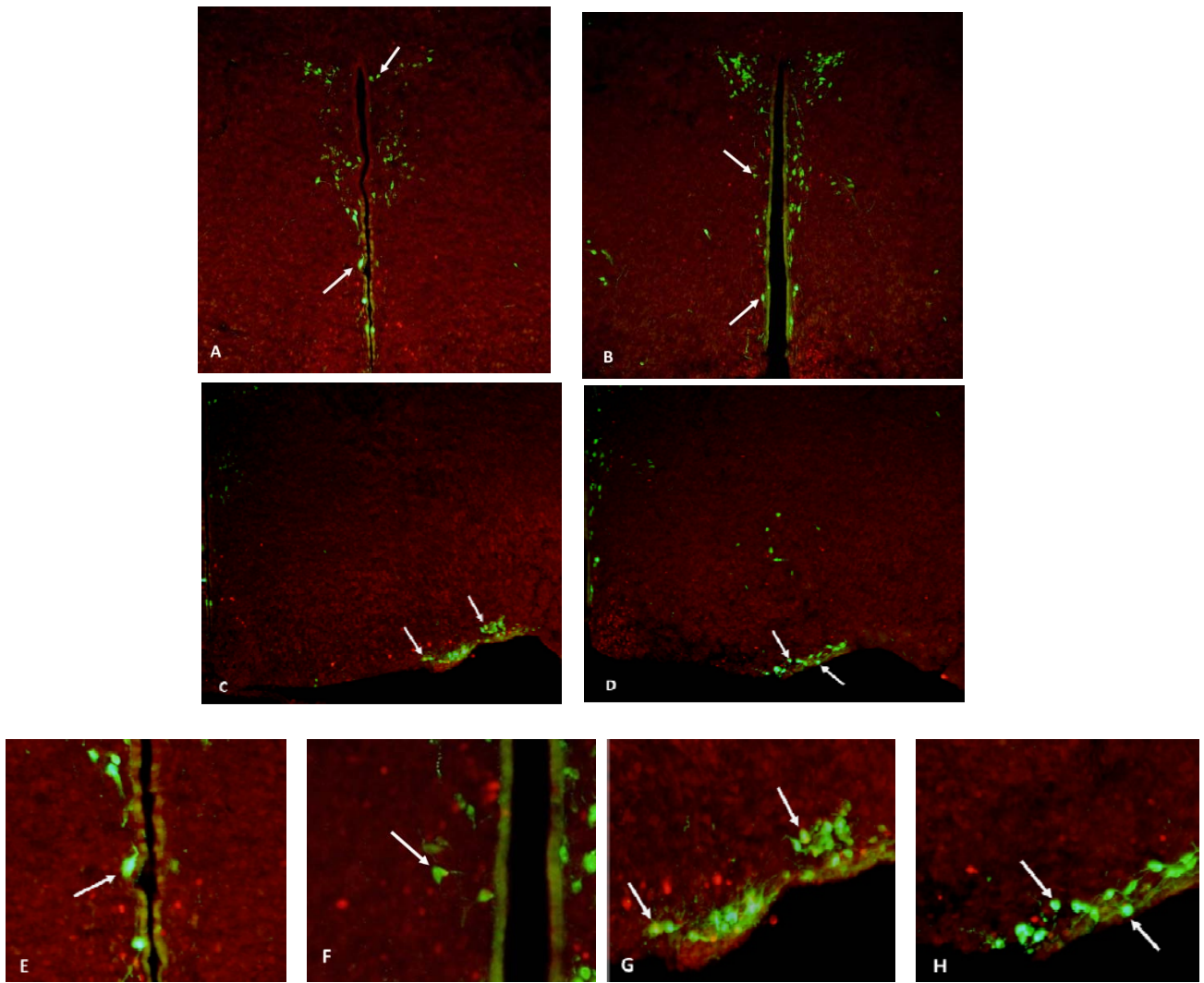


図9 PVN, SON におけるオキシトシン産生細胞と c-fos 陽性細胞の共染色画像
 (A, C) Control 群、(B, D) 筆刺激群、(E, F) A, B の拡大画像、(G, H) C, D の拡大画像
 矢印は共発現の細胞を示している

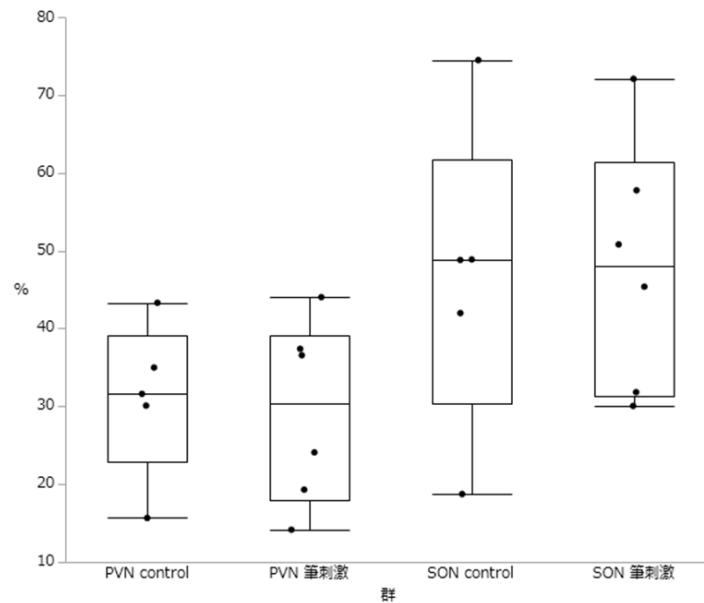


図 10 PVN, SON におけるオキシトシン産生細胞と c-fos 陽性細胞の共発現割合分布図

考察

本研究では、なで刺激により脳のどの領域が活性化するのか、またその際、オキシトシン産生細胞が活性化しているかを調査した。これまで、マッサージなどの皮膚接触でオキシトシン神経系が活性化されることや、母子分離により PVN におけるオキシトシン量が低下し、筆刺激によってその低下が抑制される傾向が見られることが報告されてきた。このことから、筆刺激のようななで刺激により、PVN での神経活性が高まり、オキシトシン産生細胞が活性化するのではないかと考えたが、結果 PVN, SON において control 群と筆刺激群を比較すると c-fos 陽性細胞数、オキシトシン産生細胞数ともに差が見られなかった。しかし、PVN においては上昇する個体が観察されたが、個体差のばらつきが大きかったため、有意差に至らなかった。個体差の原因と例数追加によって結果を明瞭化させる必要があった。また、control 群で c-fos 活性が上昇してしまう個体があったため、母子分離の時間を短くするなど、実験スケジュールの見直しも必要である。

今後は PVN や SON の他に、体性感覚を司る somatosensory trunk cortex、嗅覚に関わる梨状葉皮質 piriform cortex、報酬系に関わる accumbens nucleus、などでも解析を進め、脳領域の同定を目指したい。

文献

1. Behavioural and neurochemical consequences of early weaning in rodents. Kikusui T, Mori Y. J Neuroendocrinol. 2009 Mar; 21(4): 427-31.
2. Epigenetic programming by maternal behavior. Weaver IC, Cervoni N, Champagne FA, D'Alessio AC, Sharma S, Seckl JR, Dymov S, Szyf M, Meaney MJ. Nat Neurosci. 2004 Aug; 7(8): 847-5.
3. Genetic identification of C fibres that detect massage-like stroking of hairy skin in vivo. Vrontou S, Wong AM, Rau KK, Koerber HR, Anderson DJ. Nature. 2013 Jan 31; 493 (7434): 669-73.

○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 年度 4 月 1 日～平成 30 年度 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

早期に母子分離された動物の弊害はよく知られている。早期離乳によりペットの問題行動が増加し、産業動物では生産性の低下が報告されている。マウスモデルにおいても不安行動が増加することが明らかとなっている。しかしその脳内メカニズムは不明な点が多い。本実験では、ICR 系のオスマウスにおける早期離乳による不安行動上昇の神経回路解明を目的とした。情動行動に関連の深い前頭葉 (PFC)- 扁桃体外側核 (BLA) 回路に着目し、早期離乳操作を行ったマウスに AAV ウイルスベクターを用い hM3Dq (DREADDs-Gq) を PFC に、Cre-TTC を BLA に感染させた。その後、CNO 投与により PFC-BLA 回路を人為的に活性化させ、高架式十字迷路試験を行って不安行動を評価した。その結果、PFC と BLA でウイルス感染が確認された個体において不安行動の減少がみられた。これにより、不安行動の増加に PFC-BLA 回路が関連していることが明らかとなった。

緒言

幼少期の母子関係は動物の情動発達に大きな影響を与える。マウスをモデルにした研究でも、通常より 1 週間早くマウスを離乳する早期離乳によって、成長後の不安行動が上昇した [1]。また、ICR 系マウスにおいては、早期離乳により 3 週齢では雌雄ともに不安行動が増加したものの、5 週齢と 8 週齢ではオスにおいてのみ早期離乳による不安行動の増加が認められ、メスでは早期離乳による不安行動増加は認められず、通常離乳との差が消失したことから、その影響には雌雄差の存在が知られている [1]。しかし、それらの情動変化の原因となる脳内神経メカニズムは、いまだ解明に至っていない。前頭前野 (PFC) は、不安を司る部位である扁桃体外側核 (BLA) を抑制する作用をもち、不安をコントロールしている。早期離乳された雄マウスでは、扁桃体基底外側核前部において軸索の直径の減少がみられ [3]、さらに、PFC-BLA 回路での paired pulse facilitation が減少し、PFC-BLA 回路の伝達効率が低下していることが分かっている [3]。つまり、PFC-BLA 回路の機能低下が原因で、不安行動が上昇している可能性がある。

そこで本研究では、ICR 系のオスを使用し、早期離乳操作をした後に hM3Dq (DREADDs-Gq) と Cre-TTC をウイルスインジェクションすることで PFC-BLA 回路を活性化させ、その後、高架式十字迷路試験により不安行動の減少を評価した。hM3Dq は、G タンパク受容体の細胞内シグナル活性型サブユニットの Gq と共役したレセプターであり、内在性のリガンドには反応せず、人工的に合成されたリガンドであるクロザピン窒素酸化物 (CNO) に特異的に反応し、ニューロン活動を一定時間活性化することができる [4]。つまり、前頭前野 (PFC) に hM3Dq を、扁桃体 (BLA) に逆行性の Cre-TTC を発現させ、その後、CNO を腹腔内投与すると、CNO が hM3Dq に受容され、Gq が Cre-TTC の発現している細胞内において下流の細胞内シグナル伝達系を活性させる。この方法で PFC-BLA 回路を人為的に活性化し、不安行動が改善するかを調べた。

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、日本チャールズ・リバー株式会社から導入され、本研究室において繁殖維持されてきた ICR マウス (jcl: ICR, crl: ICR) を用いた。生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。仔マウスは誕生日を 0 日齢 (PD0) とした。産仔数が多い場合には、1 日齢 (PD1) までに 10 匹 (♂ 6 匹、♀ 4 匹) になるように揃えた。その後は、離乳操作までに親仔ともに同一ケージにて飼育した。

ウイルスの導入

ウイルスインジェクションは6週齢で行った。イソフルラン（フォーレン, Abbot）によりマウスを麻酔し、脳手術用固定器に固定し、Cre 作動性アデノ随伴 hM3Dq (Gq) ウイルスベクター（AAV-hSyn-FLEX-hM3Dq-EGFP）とアデノ随伴 Cre-TTC ウイルスベクター（AAV-CMV-mCherry-2A-Cre-TTC）の2種類のウイルスベクターを用いて、前頭前野（PFC）と扁桃体（BLA）の神経細胞に導入した。AAV-hSyn-FLEX-hM3Dq-EGFP と AAV-CMV-mCherry-2A-Cre-TTC は、共同研究の名古屋大学医学部山中章弘教授より提供を受け、-80℃で凍結保存し手術時に氷上で解凍した。10 μ L のハミルトンシリッジ（HAMILTON）と 33G のインジェクターを用い、最初に AAV-hSyn-FLEX-hM3Dq-EGFP を前頭前野（AP:+1.8, ML: \pm 0.2, DV:+1.9）の両側に、次に AAV-CMV-mCherry-2A-Cre-TTC を扁桃体（AP:-1.0, ML: \pm 3.4, DV:+4.2）の両側に、それぞれ 0.6 μ L 導入した。インジェクション速度は、0.2 μ L を 7 分間隔で導入し、全量の 0.6 μ L を導入した後は 14 分間静置した。最後のみ 14 分間にするこで、針を抜く際のウイルスの漏れを抑えることができる。術後は、元の飼育環境で 2 週間以上飼育し、その後高架式十字迷路試験を行った。

高架式十字迷路試験

ウイルスの導入から 2 週間以上経過した後、高架式十字迷路を行った。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後、実験開始の 1 時間半前にクロザピン窒素酸化物（CNO）を腹腔内投与した。hM3Dq 受容体を発現した神経細胞は、Clozapine-N-oxide（CNO）の投与によって活性化する（図 1）。先行研究と同様に、CNO（C0832, SIGMA-ALDRICH）は Dimethylsulfoxide（DMSO）（472301, SIGMA-ALDRICH）に溶解し、0.9%生理食塩水（Saline）を用いて、DMSO の終濃度が 10%になるよう調整した。試験は行動観察室（温度 23 \pm 2℃）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（5cm \times 25cm）と高さ 5cm の接触壁によって囲まれているクローズアーム 2 本（5cm \times 25cm）、これらの中央にある 5 \times 5cm 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 30cm 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。EthoVision XT 10 を用いて、録画記録データのマウスの各アーム進入までの潜時と進入回数、各アームでの滞在時間、オープンアームへの進入回数率と滞在時間率、侵入回数を記録した。また、行動実験は各個体に CNO と Saline を投与し、2 回実施した。投与の順はランダムとし、その繰り返しの影響を考慮した。

灌流固定

高架式十字迷路試験から 1 週間以上経過した後、マウスに 2mg/0.04ml のネブタール注射液（大日本住友製薬：大阪：日本）を腹腔内投与し深麻酔をかけ、胸部を切開した。灌流固定器を利用して灌流した。左心室に灌流固定器の針の先端を刺して、右心耳を切り放血させ、注射器にてリン酸緩衝生理食塩水（0.1 M PBS）を 15ml 灌流させた。放血を確認後、16%パラホルムアルデヒド（PFA、和光純薬工業株式会社：大阪：日本）と 0.1 M PBS を混合させた PFA 濃度 4%液を、同様に 15ml 灌流、断首し、ピンセットで骨をはがして脳を取り出した。取り出した脳は、4% PFA と 0.1 M PBS との混合液で 3 時間再固定し、その後 4℃で 30%シュウクロース溶液（和光純薬工業株式会社：大阪：日本）に置換、沈下するまで浸漬させそのまま保存した。

免疫組織化学染色

凍結クライオスタット（Leica Microsystems GmbH, CM1850, Wetzlar, Germany）にて切片を作成した。脳は、-21℃下で Tissue-tec O.C.T コンパウンド（サクラファインテックジャパン株式会社：東京：日本）でブロック台に保定し、前頭前野と扁桃体の切片を切り出した（株式会社ファインテック：東京：日本）。厚さ 30 μ m で薄切した切片は即座に Cryo Protectant（組成：スクロース 300g, 0.4MPB 250ml, エチレングリコール 300 g, ポリビニルピロリドン 10 g, milliQ 250ml（全て和光純薬工業株式会社：大阪：日本））を満たした 12 穴の Well 内に入れ、-20℃の冷凍庫内にて保存した。

切り出した切片は 3 枚おきに免疫組織化学染色に使用した。PBS にて切片を 10 分間洗浄し、さらに PBST にて切片を 10 分 \times 3 回洗浄した。ブロッキングのために 1% bovine serum 入り PBST（BSA-PBST）で 5%になるように希釈した normal goat serum（Vector, Burlingame, CA）に切片を 1 時間浸漬した。その後、1 次抗体として BSA-PBST にて 500 倍希釈した Chicken anti-GFP（Medical & Biological Laboratories）と Rabbit anti-RFP（Medical & Biological Laboratories）を 4℃にて 60 時間程度反応させた。反応終了後、PBST にて切片を 10 分 \times 3 回洗浄した。さらに、BSA-PBST にて 250 倍希釈した二次抗体（donkey anti-chicken IgG, Alexa 488 Life technology, 米国、と donkey anti-rabbit IgG, Alexa

594, Life technology, 米国) に切片を 24 時間程度反応させた。反応終了後, PBST にて切片を 10 分 ×3 回洗浄し、Dapi Fluoromount-G (Southern Biotech) にて切片を封入した。封入の際、カバーガラスは MATSUNAMI NEO micro cover glass 24 × 50mm (松浪ガラス工業株式会社: 大阪: 日本) を用いた。蛍光画像は顕微鏡に装着したレーザースキャンデジタルカメラ (Olympus, Shinhuku, 東京) にて撮影した。

結果

逆行性 AAV はインジェクションサイトの BLA への感染がみとめられ、ターゲットである PFC において、Dreadds-Gq-GFP の発現が確認された (図 1)。41 例中 14 例にて確認されたことから、技術的な問題は含むものの、実験可能であることが示された。8 週齢のマウスにおける十字迷路のオープンアーム侵入回数、クローズアーム侵入回数を調べた。ウイルス感染の良い個体のみを選別し、統計解析を行った。その結果、オープンアーム進入回数とオープンアーム進入回数%に NW 群の CNO 投与時と Sal 投与時の間に有意な差がみられた (図 2)。

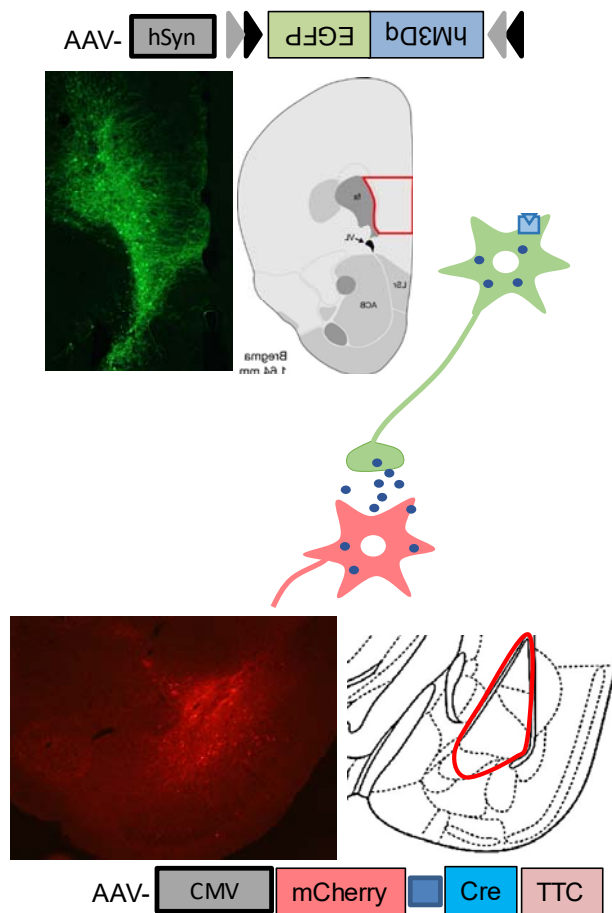


図 1 今回の実験に用いたウイルスの構造、注入部位 (脳地図)、ならびに投与が成功したマウスにおける感染部位 (BLA は mCherry で赤色、PFC は GFP で緑色) の様子。

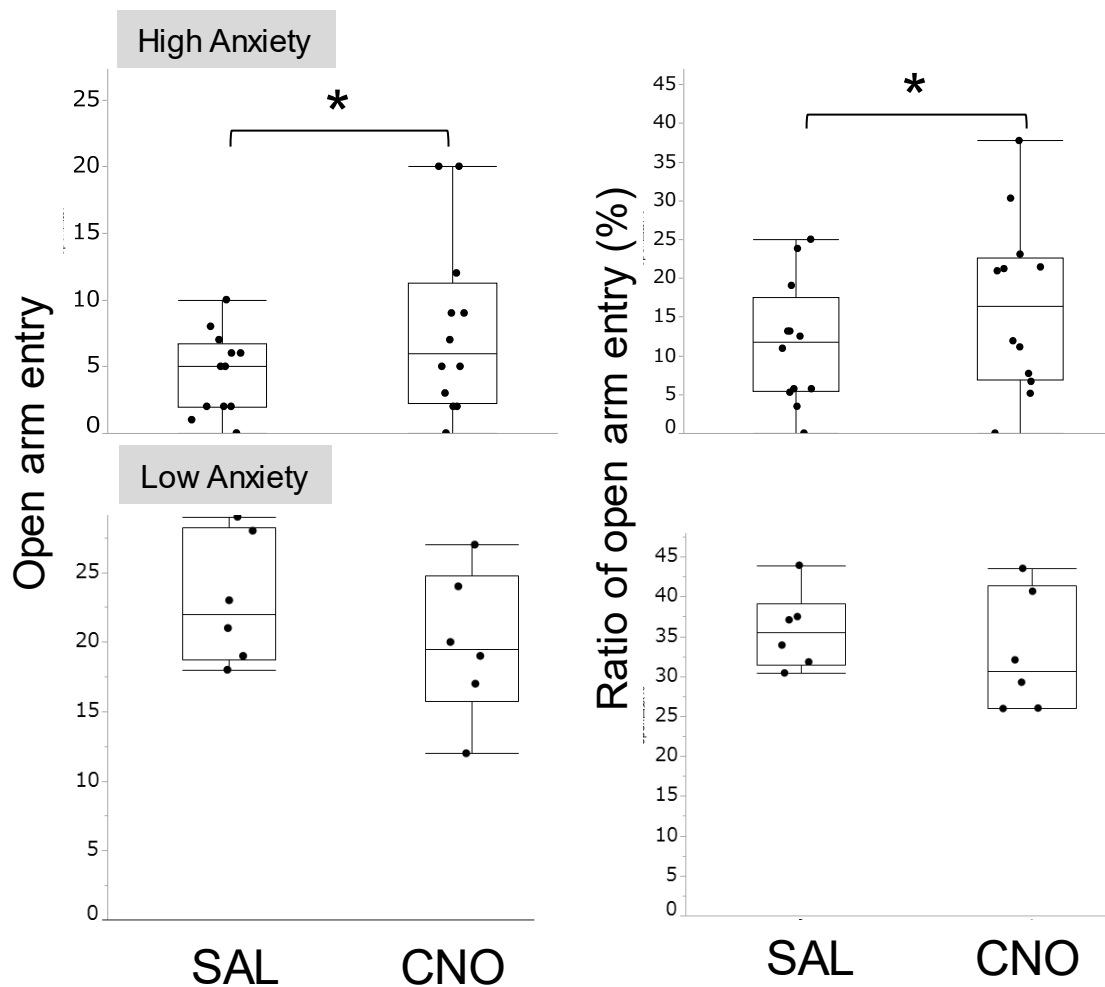


図2 高架式十字迷路の結果。不安が高い傾向にあるマウスでは、CNO 投与によって PFC-BLA 回路が活性化されることで、不安行動が軽減され、オープンアームへの侵入回数と侵入回数割合が増加した。一方、不安行動が低い個体では CNO 投与による影響はみとめられなかった。

考察

インジェクションは、N=41 中 14 で成功しており、ウイルス感染が認められた。その内 N=6 では、高架式十字迷路試験における不安行動の減少がみられた。全個体の統計解析では、どの解析項目においても有意な差はみられなかったが、ウイルス感染がよりみられた個体のみで行った統計解析では、オープンアーム進入回数とその Z 値、さらにオープンアーム進入回数%を Z 値化した値における、通常離乳群の CNO 投与時と Sal 投与時において有意な差がみられた。

インジェクションの成功率は低いですが、ウイルス感染が確認された個体では、不安行動の減少が有意にみられた。つまり、PFC-BLA 回路の活性化が不安行動の神経回路である可能性を示唆する。特に不安傾向の強い個体では不安軽減効果が認められたが、不安傾向の低い個体では効果が認められなかった。この原因として、不安傾向の低い個体ではすでに PFC-BLA が十分に活性化していたと考えられる。

今後、例数追加を行い、PFC-BLA の活性化で不安行動の改善がみられれば、不安行動上昇の神経回路が確実に解明できるであろう。

文献

1. Behavioural and neurochemical consequences of early weaning in rodents. Kikusui T, Mori Y. *J Neuroendocrinol*. 2009 Mar; 21(4): 427-31.
2. Early weaning induces anxiety and precocious myelination in the anterior part of the basolateral amygdala of male Balb/c mice. Ono M, Kikusui T, Sasaki N, Ichikawa M, Mori Y, Murakami-Murofushi K. *Neuroscience*. 2008 Oct 28; 156(4): 1103-10.
3. Early weaning influences short-term synaptic plasticity in the medial prefrontal-anterior basolateral amygdala pathway. Takita M, Kikusui T. *Neurosci Res*. 2016 Feb; 103: 48-53
4. DREADDs for Neuroscientists. Roth BL. *Neuron*. 2016 Feb 17; 89(4): 683-94.

研 究 期 間 : 平成 27 年度 4 月 1 日～平成 30 年度 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

Abstract

Olfactory signals, including the scent of urine, are thought to be processed by specific brain regions, such as the medial amygdala (Me), and regulate sexual behavior in a sex-dependent manner. We aimed to reveal the sex-specific neural circuit from the accessory olfactory bulb (AOB) to Me by using a transgenic mouse. We quantified the long-lasting green fluorescent protein (GFP) expression profile, which was controlled by the c-fos promotor in a sex-dependent manner by the scent of urine. Female urine predominantly activated neurons of the MePD in male mice and the MePV in female mice. Male urine, in contrast, generated the opposite pattern of activation in the Me. There were clear sex differences in the pheromone conveying circuits in the AOB-Me of mice. The sex-dependent functional activation of the Me, however, only had small effects on behavior. This suggests that a diverse number of nuclei and brain areas are likely to function in concert to successfully facilitate sexual and aggressive behaviors.

1. Introduction

Pheromones are chemical cues essential for intra-species communication, particularly with regard to sex and aggression. In mice, the vomeronasal organ (VNO), which is located beneath the nasal septum, detects chemicals that convey biologically relevant information, including sex and reproductive status. The coordination of sex-specific behaviors is highly dependent on the vomeronasal neural system (VNS) [1-3]. For example, the ablation or functional loss of the VNO impairs sexual behavior [4, 5], even when sex-related odor discrimination is intact [6, 7], suggesting that the VNO mediates pheromonal signals that trigger sex-specific patterns of behavioral plasticity. The accessory olfactory bulb (AOB) is the primary target of the VNO, and efferents from the AOB extend to the medial amygdala (Me) [8, 9]. Therefore, some of the pheromonal signals responsible for the induction of sex behavior are conveyed to the Me via the VNS.

The Me is one of the sexually dimorphic nuclei in the brain and consists of the anterior (MeA), posterodorsal (MePD), and posteroventral (MePV) components. Neurons located in the MePD are larger and more abundant in male mice, compared to female mice [10, 11]. Recent neurochemical analyses of the MePD demonstrated that expression profiles of genes encoding the GPCRs *Brs3* and *Cckar* were sexually dimorphic. These sex differences are steroid hormone dependent and control the expression of sex-specific behaviors [12, 13]. In addition, neurons that express aromatase are critical for the conversion of testosterone to estradiol in the MePD, which is a process that promotes territorial and maternal aggression, in male and female mice, respectively [14]. Neural fibers in the Me project to discrete nuclei in the hypothalamus that are known to regulate sex-specific behaviors, including aggression and sex [15]. It remains to be determined if olfactory-related sensory information is uniquely decoded in the Me by each sex to facilitate adaptive behavioral responses. However, the temporal dynamics of the cellular, molecular, and functional contributions of these distinct neural circuits in the Me remains unclear, particularly with regard to the expression of sexually dimorphic behaviors. In the current study, we examined sex-dependent neural activation across subregions of the Me by a prominent sex signal, i.e., urine. Using a transgenic mouse model, we observed the long-lasting green fluorescent protein (GFP) expression in these neurons via c-fos activation, which was temporally specific and doxycycline suppressible [16]. Importantly, neurons that were selectively activated by male or female urine were measured within the same individual.

The expression of a different immediate early gene of Zif268 was used to label neurons activated by the second stimulus during the suppression of additional GFP expression due to doxycycline, thus, preserving the label from the first stimulus. Using this system, we observed the separate neural activations by male and female urine, separately in the same mouse. Further, we compared male and female recipients to visualize sex-specific cells that were activated in response to urine.

2. Methods

2.1. Animals

All mice were housed under a standard 12-h light/dark cycle (lights on from 6 a.m. to 6 p.m.). The vivarium was maintained at a constant temperature ($24 \pm 1^\circ\text{C}$) and level of humidity ($50 \pm 5\%$). Food and water were provided ad libitum.

The double transgenic mouse line *c-fos*-tTA, Fos-EGFP was generated by crossing *c-fos*-tTA and tetO-EGFP transgenic mice [16]. They were bred at The HAKUBI Center of Kyoto University (Sakyo-ku, Kyoto, Japan). After being transferred to the Azabu University, these male mice were crossed with wild-type C57BL/6 (B6) female mice. The genotypes of the offspring were confirmed using a polymerase chain reaction-based genotyping protocol, with DNA purified from tail clips. All pups were weaned at 28 days of age and housed in groups of the same sex until eight weeks of age. For viral infection studies, experimental B6 mice (purchased from CLEA Co. Ltd, Hamamatsu Japan, and bred in the lab) were group-housed according to their sex and age in larger cages ($175 \times 245 \times 125$ mm). Immediately after viral infections, mice were singly housed for two weeks until measurements of behavior.

2.2. Experiment 1: Histological Analysis of Zif268 and Green Fluorescent Protein (GFP) Expression in Neurons

Experimental transgenic mice (i.e., 9 male and 7 female mice) were fed pellets containing doxycycline (CE-2+Doxycycline 0.005%, Nihon CLEA Co. Ltd., Hamamatsu, Japan) and housed singly for 10 days before exposure to urine. Doxycycline feeding was stopped 4 days before the first urine exposure. Male and female double-transgenic mice were exposed to female and male urine, respectively (See Supplementary Figure S1-A). In the absence of doxycycline, neurons activated by the first stimulus expressed *c-fos* and GFP. The urine used as an olfactory stimulus was a mixture obtained from three other B6 mice immediately prior to the experiment. A total of $60\ \mu\text{l}$ of urine sample was transfused onto a piece of cotton and presented to the experimental mice for 60 min. After an initial exposure to the urine stimulus, all experimental mice were fed with doxycycline containing pellets again for three consecutive days to suppress any additional GFP expression during the interval between stimuli or in response to the second stimulus. The second exposure was conducted using the same protocol as the first, but urine derived from the opposite sex was used instead. Further, neurons activated by the second stimulus was accessed Zif268, instead of GFP. The mice were deeply anesthetized with pentobarbital (100 mg/kg, i.p.) 60 min after the second urine exposure and perfused with 4% paraformaldehyde in 0.1 M sodium phosphate buffered saline (PBS) at pH 7.4. The brains were immediately removed, immersed in the fixative overnight, at 4°C , and then immersed in a 30% sucrose (0.1 M PBS) solution until they sunk.

Each brain was coronally sectioned at $30\ \mu\text{m}$ using a freezing microtome. Tissue sections were washed with PBS and treated with 0.6% H_2O_2 in methanol for 30 min at room temperature (RT). Next, sections were rinsed with 0.3% Triton X-100 and 0.1 M PBS, followed by incubation with 5% normal goat serum (NGS, S-100, Vector Lab. Burlingame, CA) in 0.3% Triton X-100 and 0.1 M PBS for 1 h at RT. Thereafter the sections were incubated with an antibody against Zif268 (SC-189, working dilution 1: 4,000, Santa Cruz Biotechnology, Dallas, TX) containing 5% NGS, 0.3% Triton X-100 and 0.1 M PBS two over-nights at 4°C . Following the incubation, sections were washed with 0.3% Triton X-100 and 0.1 M PBS, and then incubated with biotinylated goat anti-rabbit IgG (1:1000, BA-100, Vector Lab. Burlingame, CA) in 5% NGS, 0.3% Triton X-100 and 0.1 M PBS overnight at 4°C . The sections were then washed three times. The stained sections were then intensified and visualized using a VECTASTAIN Elite ABC kit (Vector Lab., Burlingame, CA) with DAB (3,3'-diaminobenzidine) Peroxidase Substrate Solution (0.05% DAB, 0.015% H_2O_2 in Sodium acetate buffer 0.175 M) containing 0.05% nickel chloride. The sections were then rinsed with 0.175 M sodium acetate buffer for 10 min, and

thereafter rinsed five times with 0.1 M PBS (for 5 min per wash) to minimize residue from the first antibody. Next, the sections were incubated with an antibody against GFP (#598 Anti-GFP Purified IgG/Rabbit Polyclonal, working dilution 1: 10,000, MBL, Nagoya, Japan), in a solution of 5% NGS, 0.3% Triton X-100, and 0.1 M PBS, overnight at 4 ° C. Following washes with 0.3% Triton X-100 and 0.1 M PBS, the sections were incubated with biotinylated goat anti-rabbit IgG (1:1000, BA-100, Vector Lab. Burlingame, CA) in 5% NGS, 0.3% Triton X-100, and 0.1 M PBS, for 1 h at RT, followed by a series of three washes. The sections were intensified and visualized using a VECTASTAIN Elite ABC kit (Vector Lab., Burlingame, CA), with a DAB (3,3'-diaminobenzidine) Peroxidase Substrate Solution (0.05% DAB, 0.015% H₂O₂ in sodium acetate buffer 0.175 M) without 0.05% nickel chloride. Sections were then washed with water, mounted on gelatin-coated glass slides, dehydrated, and cover-slipped with mounting medium (Entellan New, Merck Japan, Tokyo). Zif268 positive neurons, activated by the second stimulus, were stained blue and GFP positive neurons, activated by the first stimulus, were stained brown, for both sexes. All Zif268 protein expressed in response to the first stimulus would be degraded and removed before the second stimulus. Since the antibodies against Zif268 and GFP were raised in rabbit, we confirmed that no cross-reaction occurred by using a no primary antibody control, i.e., conducting the same staining procedure minus the incubation step with the antibody against GFP (See Supplemental Figure S2). In addition, when the transgenic mice were exposed to no-pheromone stimuli (only cotton) twice, only a very small number of positive cells were observed in the MeA, MePD, and MePV, compared with the number of positive cells found in the brains of mice that were exposed to urine (Supplementary Figure S3).

Every third section derived from the serial sections (average: 13.5 ± 0.94 sections/animal, 16 mice in total) was visualized and analyzed using light microscopy with commercially available software (OLYMPUS BX51-N, and OLYMPUS DP71, Tokyo, Japan). The neuroanatomical areas of the ME were confirmed using the Paxinos and Franklin (2001) brain atlas. An example photo of the immunostained cells were shown in Supplementary Figure S4. Given the small size of the soma of the neurons in the ME and the relatively thick section (i.e., 30 μ m), GFP was observed over the nucleus. The immunoreactive cells in these areas, in both left and right hemispheres, were counted and averaged as the number of cells/side/section. The criteria for counting an immunoreactive cell was as follows. Initially, a high magnitude photo of each section was acquired (Supplementary Figure S4) and the immunoreactive cells were grouped by color as expressing GFP (blue, including light blue, gray-blue, but not deep dark blue), Zif268 (brown, including light brown, red-brown, but not bray-brown), or both (dark-blue, dark-brown, and black). Thereafter, three observers, who were blinded to the conditions, sorted and counted the cells in the large magnitude fields, with a reliable correlation co-efficiency ($r^2 = 0.80$).

3. Results

3.1. Experiment 1: Histological Analysis of Zif268 and Green Fluorescent Protein (GFP) Expression in Neurons

Cells that were stained with GFP, Zif, and double stained for both reflected cells that were activated in response to the first urine stimulus, second urine stimulus, and both urine stimuli, respectively. Neurons that were positive for GFP and Zif268 were clearly observed in the Me (Fig. 1A, B, Supplementary Table S7). In the MePD of male mice, the number of neurons that were activated in response to female urine (GFP+) was significantly greater than those activated in response to male urine (Zif+) (Fig 1B). In contrast, the number of neurons in the MePD in female mice that were activated in response to male urine (GFP+) was significantly greater than those activated in response to female urine (Zif268+). For both sexes, the number of positive neurons in the MeA responding to male urine was comparable to those responding to female urine (Fig. 2A). In contrast, there were sex differences in the distribution patterns of neurons responding to male or female urine in the MePD and MePV. Interestingly, the total number of double labeled neurons was less than 10% (4.8-9.1%) of the total population of all labeled cells for each subregion of the Me.

In male mice, the generalized linear model revealed a significant effect of “Stimuli” (Wald $X^2=5.14$, $p<0.05$) and an interaction between “Area” and “Stimuli” (Wald $X^2=9.18$, $p<0.005$), but no effect due to “Area” (Wald $X^2=0.61$, $p=0.43$). The

total number of neurons responding to female urine in the MePD was significantly greater than those responding to male urine in the MePD, and those responding to female urine in the MePV (Fig. 2B, Bonferroni post-hoc comparisons, $p < 0.05$).

In female mice, the generalized linear model revealed significant effects of an “Area-Stimuli” interaction (Wald $X^2 = 25.68$, $p < 0.0001$), but no effect of “Stimuli” (Wald $X^2 = 3.01$, $p = 0.08$) or “Area” (Wald $X^2 = 0.924$, $p = 0.338$) alone. The total number of neurons responding to female urine in the MePD was significantly less than those activated by male urine in the MePD and those activated by female urine in the MePV (Fig. 2B, Bonferroni post-hoc corrections, $p < 0.05$). Neurons activated by female urine in the MePV were significantly greater than those activated in the MePV in response to male urine (Fig. 2B, Bonferroni post-hoc corrections, $p < 0.05$). These results clearly indicate that male and female urine stimulated different neuronal populations in the Me. These findings suggest that the recognition of the opposite sex is processed more actively in the MePD, while information about the same sex is more actively processed in the MePV. This sex-specific information may be functionally relevant to different neural circuits in the MePD and MePV.

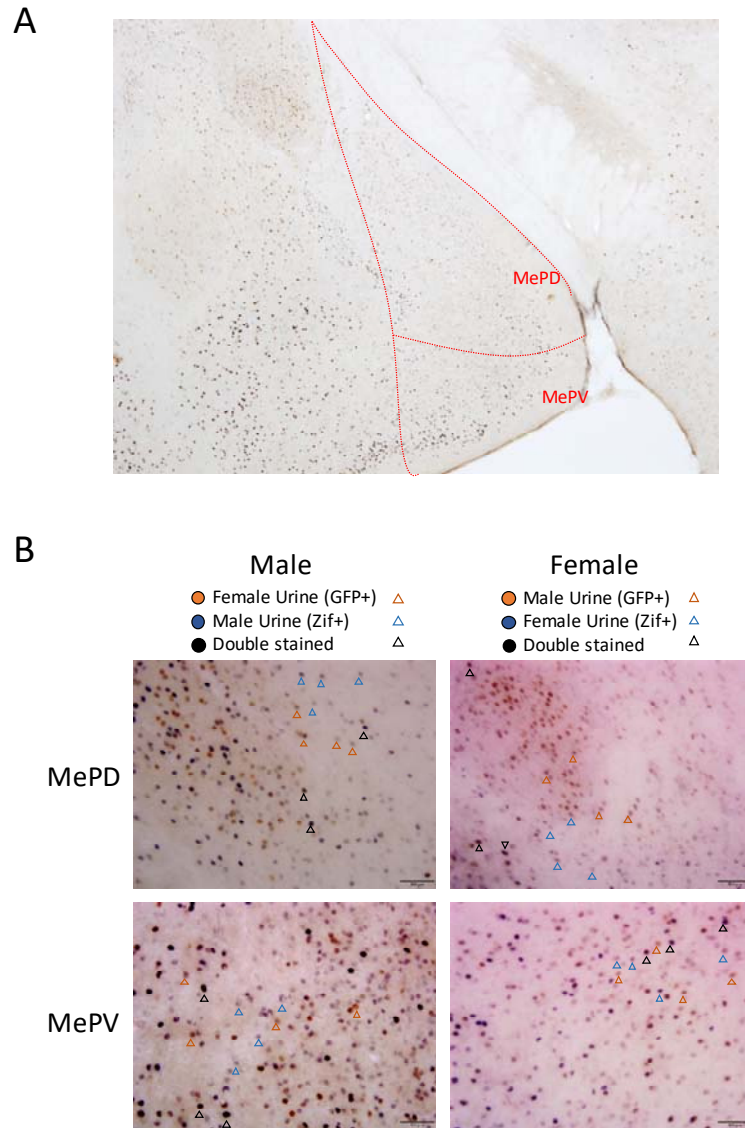


Figure 1. (A) Double immunohistochemical staining against Zif268 and green fluorescent protein (GFP) in the *c-fos*-tTA, Fos-EGFP mouse. Positive neurons can be readily observed in the posterodorsal medial amygdala (MePD) and posteroventral medial amygdala (MePV). (B) In male mice, neurons responding to male urine and female urine were positive for Zif268 (blue) and GFP (brown), respectively. Conversely, for female mice, neurons responding to male and female urine were positive for GFP (brown) and Zif268 (blue), respectively. There was a significant sex difference in the distribution pattern of neurons responding to male or female urine in the MePD and MePV.

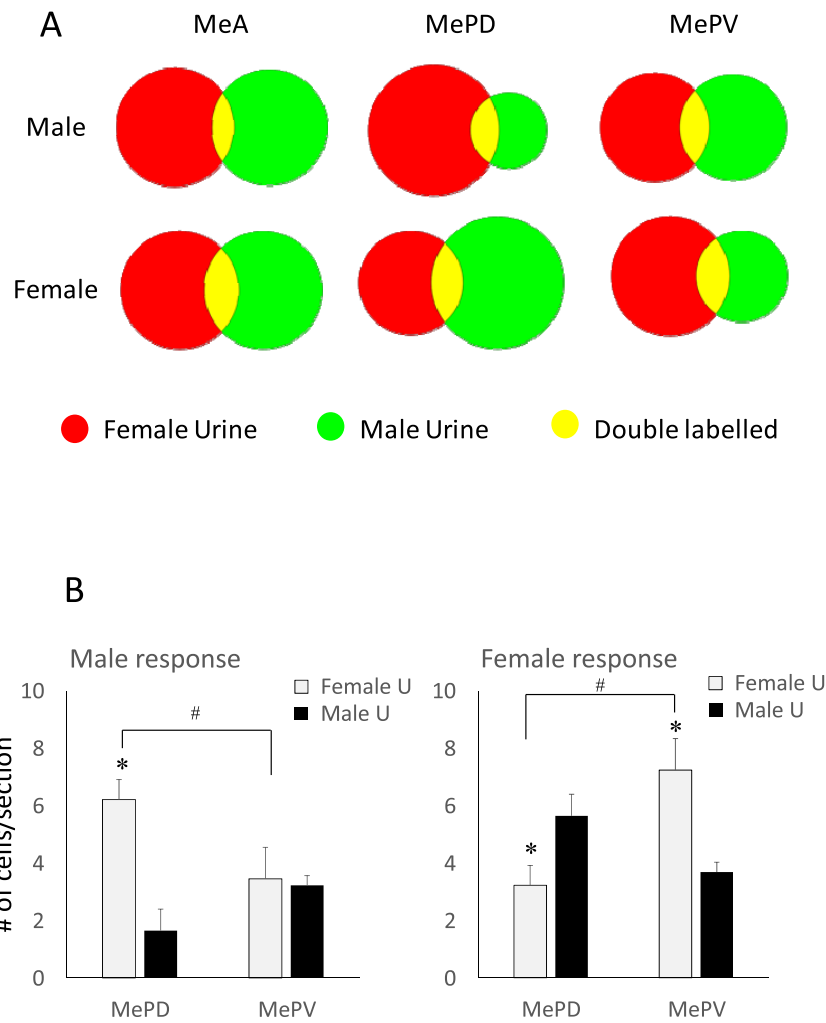


Figure 2. (A) The number of positive neurons responding to male or female urine in the anterior medial amygdala (MeA), posterodorsal medial amygdala (MePD) and posteroventral medial amygdala (MePV) of male and female mice. There was a small portion of neurons, which were double-labeled and activated by male and female urine. The consistent relationship between the numbers of activated neurons in a brain region and the area of the circles is also illustrated. (B) In male mice, significantly more neurons were activated in response to female urine in the MePD, compared with those in the MePV ($\#p<0.05$) and those that responded to male urine in the MePD ($*p<0.05$). In female mice, significantly more neurons were activated in response to female urine in the MePV, compared with those in the MePD ($\#p<0.05$) and those responding to male urine in the MePV ($*p<0.05$). The functional activity of neurons responding to male urine in the MePD was also significantly more intense when compared to neurons that were activated in response to female urine in the same region ($*p<0.05$). Statistical analysis was conducted using a generalized linear model, followed by a Bonferroni's post-hoc test. Data are presented as mean \pm standard error of mean (sem).

4. Discussion

Neural circuits that control sexually dimorphic behavioral responses are critical for adapting to social stimuli. The action of the male pheromone ESP1 in the VNO triggers female sexual behavior while stimulating male aggression [17, 18]. There are also sex differences in the functional activity of hypothalamic regions in response to ESP1 stimulation when measured by c-Fos expression. In female mice, the posteromedial cortical amygdaloid nucleus (PMCo) and ventromedial hypothalamic nucleus (VMH) were significantly activated, whereas c-Fos was increased in the bed nucleus of the stria terminalis (BNST) and medial preoptic area (MPA) in male mice [17, 18].

In the current study, we aimed to dissociate signaling pathways dependent on sex, using the stimuli present in urine, and further reveal a function of one pathway by experimentally activating a key neural circuit important for sex recognition and social behaviors. In Experiment one, a sex-dependent activation pattern of the Me neurons were observed in response to urine, i.e., a sexually relevant olfactory cue; female urine predominantly activated neurons in the MePD in male mice, but in the MePV in female mice. In contrast, male urine tended to produce the opposite pattern of activation (i.e., increased activation of the MePV and MePD, in male and female mice, respectively). We therefore hypothesized that a sex-dependent neural circuit from the AOB to the Me would be, in part, controlling sex-specific behaviors. That is, the AOB-MePD pathway in male mice activated by female urine would induce mounting behavior, while the activation of the AOB-MePV circuit by male urine would induce aggressive behaviors.

References

- [1] KARLSON P, LUSCHER M. Pheromones': a new term for a class of biologically active substances. *Nature*, 1959;183:55-56.
- [2] Wyatt TD, Wyatt TD. *Pheromones and animal behaviour: communication by smell and taste*, 2003.
- [3] Dulac C, Torello AT. Molecular detection of pheromone signals in mammals: from genes to behaviour. *Nat Rev Neurosci*, 2003;4:551-562.
- [4] Kimchi T, Xu J, Dulac C. A functional circuit underlying male sexual behaviour in the female mouse brain. *Nature*, 2007;448:1009-1014.
- [5] Stowers L, Holy TE, Meister M, Dulac C, Koentges G. Loss of sex discrimination and male-male aggression in mice deficient for TRP2. *Science*, 2002;295:1493-1500.
- [6] Pankevich DE, Baum MJ, Cherry JA. Olfactory sex discrimination persists, whereas the preference for urinary odorants from estrous females disappears in male mice after vomeronasal organ removal. *J Neurosci*, 2004;24:9451-9457.
- [7] Martel KL, Baum MJ. A centrifugal pathway to the mouse accessory olfactory bulb from the medial amygdala conveys gender-specific volatile pheromonal signals. *Eur J Neurosci*, 2009;29:368-376.
- [8] Scalia F, Winans SS. The differential projections of the olfactory bulb and accessory olfactory bulb in mammals. *J Comp Neurol*, 1975;161:31-55.
- [9] Cadiz-Moretti B, Otero-Garcia M, Martinez-Garcia F, Lanuza E. Afferent projections to the different medial amygdala subdivisions: a retrograde tracing study in the mouse. *Brain Struct Funct*, 2016;221:1033-1065.
- [10] Hines M, Allen LS, Gorski RA. Sex differences in subregions of the medial nucleus of the amygdala and the bed nucleus of the stria terminalis of the rat. *Brain Res*, 1992;579:321-326.
- [11] Cooke BM, Stokas MR, Woolley CS. Morphological sex differences and laterality in the prepubertal medial amygdala. *J Comp Neurol*, 2007;501:904-915.
- [12] Yang T, Shah NM. Molecular and neural control of sexually dimorphic social behaviors. *Curr Opin Neurobiol*, 2016;38:89-95.
- [13] Xu X, Coats JK, Yang CF, Wang A, Ahmed OM, Alvarado M, Izumi T, Shah NM. Modular genetic control of sexually dimorphic behaviors. *Cell*, 2012;148:596-607.
- [14] Unger EK, Burke KJ, Jr, Yang CF, Bender KJ, Fuller PM, Shah NM. Medial amygdalar aromatase neurons regulate

aggression in both sexes. *Cell Rep*, 2015;10:453-462.

[15] Choi GB, Dong HW, Murphy AJ, Valenzuela DM, Yancopoulos GD, Swanson LW, Anderson DJ. Lhx6 delineates a pathway mediating innate reproductive behaviors from the amygdala to the hypothalamus. *Neuron*, 2005;46:647-660.

[16] Matsuo N, Reijmers L, Mayford M. Spine-type-specific recruitment of newly synthesized AMPA receptors with learning. *Science*, 2008;319:1104-1107.

[17] Hattori T, Osakada T, Matsumoto A, Matsuo N, Haga-Yamanaka S, Nishida T, Mori Y, Mogi K, Touhara K, Kikusui T. Self-Exposure to the Male Pheromone ESP1 Enhances Male Aggressiveness in Mice. *Curr Biol*, 2016;26:1229-1234.

[18] Haga S, Hattori T, Sato T, Sato K, Matsuda S, Kobayakawa R, Sakano H, Yoshihara Y, Kikusui T, Touhara K. The male mouse pheromone ESP1 enhances female sexual receptive behaviour through a specific vomeronasal receptor. *Nature*, 2010;466:118-122.

○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 XX 年度 4 月 1 日～平成 XX 年度 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 年度 4 月 1 日～平成 30 年度 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

情動伝染とは、他者の情動の表出を手掛かりとして、自らも同じ情動状態となることである。この現象は霊長類を含む様々な動物で観察されており、適応的な進化的戦略である。しかし、どのようなシグナルで情動が他個体に伝わるのか、どのような神経回路が情動伝染を司っているのかは解明されていない。本研究では、痛み情動伝染の実験モデルを用いて、痛み情動伝染を司る神経回路を同定することを目標とした。そこで、痛みの知覚に関する脳領域である帯状皮質と、情動行動、特に不安や恐怖に関係している扁桃体に着目して実験を行った。

その結果、他個体が痛がっているところを観察しているマウスのすくみ行動の割合と、帯状回で活動している神経細胞数が相関していることが分かった。このことより、帯状回が痛み情動伝染の神経回路に含まれていることが示唆された。

緒言

情動伝染は動物が生き残り、自身の遺伝子を後世に伝えていくために大切な機能であり、進化的にも保存されてきたと考えられている [1, 2]。例えば群れの中の他個体が危険状態にあることをいち早く認知し、その他個体の情報を察知することで自身も危険に備えることができる。つまり、他個体の警戒心や苦痛状態を受容し、自らも同じような情動状態になることは適応的な進化的戦略といえるだろう [2]。

マウスにおいても情動伝染が生じることが知られている。透明な仕切りの向こうに電気刺激を受けている個体がいると、自身は電気刺激を受けていないにもかかわらず、見ている側のマウスがフリージングを発現させる [3]。恐怖の観察学習を行ったヒトや霊長類の先行研究によれば、他個体の恐怖反応を見て自身も同様の反応を起こすにはその相手の情動状態を認知する能力が必要であり、従って他個体の観察による恐怖反応が起きた場合には観察者側の個体に共感性があるとみなすことができるとしている [2]。本実験でも、demonstrator がショックを受けている時の観察個体 (observer) のフリージングを共感性の指標とした。

類似の実験を行った先行研究では前部帯状回の麻酔によって相手がショックを受けている間のフリージングが減少したため、帯状回を中心とする神経回路が情動伝染に関連する可能性は高い [3]。また、情動伝染の際に扁桃体と前帯状回間の活動の増加と同期が観察されている。そのため、本実験では、demonstrator が電気刺激を受け、observer が何らかのシグナルを受け取った際に帯状回に情報が入り、その情報が扁桃体に伝わり、最終的にフリージングが発現するという仮説を立てた。この仮説をもとに、他個体が痛みを受けているときに、それを見ている個体が同じような情動に至り、フリージングを発現させるという情動伝染を司る脳内神経回路を解明することを目的として実験を行った。

神経回路を同定するため、神経細胞が活動した後に発現する c-fos という神経活性マーカーを観察した。神経細胞が活動すると、c-fos をコードしている遺伝子の発現が誘導され、神経細胞の活動から 1 時間半から 2 時間後に c-fos がタンパク質として神経細胞に発現する。この c-fos の活性を指標に情動伝染の神経回路の同定を目指した。

材料と方法

試供動物

試供動物として供試動物として、日本チャールズ・リバー社（港北区：横浜：日本）より購入した C57BL/6J 系統の未去勢雄マウスを用いた。供試動物は、麻布大学生物科学総合研究所 2 階の 2-A-50 飼育室にて飼育した。動物は、暗期 12 時間、明期 12 時間（午前 8 時点灯、午後 8 時消灯）に調節された室内で、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 α 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 (CE-2: 日本クレア株式会社) を給餌し、水は自由摂取とした。

Footshock 実験と脳サンプルの作出

実験には、仕切板を含めたフットショック実験箱、フットショックジェネレーター (設定したタイミングで電流を流す機械)、解析用に実験箱上部に設置するカメラを用いた。これらの実験用具は小原医科産業株式会社 (中野区, 東京) より購入した。

フットショック実験箱は、実際にフットショックを受ける個体が入る demonstrator (demo) エリア (14 cm×9 cm×11 cm) と、フットショックを受けない個体が入る observer (obs) エリア (16 cm×10 cm×13 cm) の二区画構造をとした。demo エリアには格子床 (直径 2 mm, 19 本) があり、そこから電気刺激を与えることでマウスにストレスを負荷する仕組みとなっている。二区画は透明のアクリル板で仕切られており、仕切板には穴 (直径 2 mm) が 540 個開いており、二区画間で嗅覚や視覚情報は伝わるようにした。

demo ならびに obs のマウスを実験箱に入れた直後の 5 分間を「pre」、その後の 4 分間を「shock」、その後の 2 分間を「post」とした。「shock」の 4 分間で demo に電気ショックを与えた。刺激は 2 秒 × 12 回の 18 秒間隔で与えた。刺激強度として 0.1 mA と 0.99 mA の刺激が与えられる 2 群を作出した。また、footshock 実験を行わず、ホームケージで飼育していたマウスをそのまま灌流固定し、control 群とした。

テストの 11 分間を終えた後、demo と obs を 2 匹ともホームケージに戻し、防音室で 1 時間 30 分静置した。その後、obs は灌流固定を行い、脳を取り出した。

灌流固定

まずマウスにソムノペンチル (共立製薬株式会社: 東京: 日本) を腹腔内投与 (0.05 ml) して麻酔をかけ、胸部を切開して心臓を露出させた。左心室に灌流固定器の針の先端を刺し、右心耳を切って放血させ、ペリスタチューブポンプ SJ-1211 (アトー株式会社: 大阪: 日本) を利用してリン酸緩衝生理食塩水 (0.1 MPBS) を灌流させた。放血を確認後、4%ホルマリン溶液 (4% PFA) を同様に灌流した。全身が固定されたことを確認したのち断首し、ピンセットで頭蓋骨をはがして脳を取り出した。取り出した脳は、4% PFA で 24 時間かけて固定し、その後 30%スクロース溶液に置換、沈下するまで -4℃ 下で浸漬させそのまま保存した。

免疫染色

Cryo Protectant 内で保存した切片を、0.1 MPBS で 10 分洗浄を 3 回繰り返した。その後、0.1MPBS に過酸化水素 (和光純薬工業株式会社: 東京: 日本) が 0.6% の溶液になるように過酸化水素を添加し、混合液に反応させた。30 分後、PBS で 10 分洗浄を 3 回繰り返した。0.1 MPBST 内に 5% になるように normal donkey serum (和光純薬工業株式会社: 東京: 日本) を加えた溶液内で 60 分反応させ非特異的反応を抑制した。反応後 0.1MPBST と normal donkey serum の混合液に、一次抗体として Goat anti-c-fos (sc-52G) Santa Cruz Biotechnology) を 2500 倍希釈に調整して加えたものをプレートに入れ、4℃ 下で 48 時間程反応させた。一次抗体との反応終了後、0.1MPBST で 10 分洗浄を 3 回繰り返した後、0.1MPBST と normal donkey serum の混合液に、250 倍希釈になるように Donkey anti-Goat IgG (SIGMA) を加え 4℃ 下で 24 時間程反応させた。その後 0.1 MPBST で 10 分洗浄を 3 回繰り返し、0.1MPBST に Vectastain ABC Reagent (フナコシ株式会社) を入れて 30 分間静置したものに 60 分間室温で反応させた。反応終了後、PBST で 10 分洗浄を 2 回繰り返した。その後、0.175 M の Sodium acetate buffer で 10 分間洗浄を 2 回繰り返した。その後、Sodium acetate buffer と NiCl₂ DAB stock solution、Hydrogen peroxide の混合液を入れて反応させた。5 から 6 分反応させ発色したところで、Sodium acetate buffer に入れ、2 回洗浄し反応を止めた。その後、0.1MPBS に入れて 4℃ 下で保存した。

洗浄した切片は 0.9% 生理食塩水を満たしたシャーレに移し、筆でスライドガラスに貼り付けた。その後、24 時間程度乾燥させた。乾燥させたスライドガラスを蒸留水に入れて洗浄した。その後、70% のアルコールに 3 分、80% に 3 分、90% に 5 分、99% に 10 分、もう一度 99% に 10 分漬けて脱水させた。その後、キシレン (和光純薬工業株式会社: 東京: 日本) に 15 分程度つけて取り出し、Entellan (和光純薬工業株式会社: 東京: 日本) で封入した。

結果

obsa の実験後の CG において、神経活性マーカーである c-fos の発現が観察された (図 1, 2)。GC における単位面積当

たりの c-fos の数は、刺激が 0.99 mA の条件では、ほかの 2 条件と比較して多い傾向があった (図 3)。また、0.99 mA の条件において freezing の発現率と CG における c-fos の密度に正の相関がみられたが (図 4)、0.1 mA 条件では相関は見られなかった。扁桃体の亜核、BLA と CeL、CeM においてはどの群もあまり c-fos が発現していなかった。

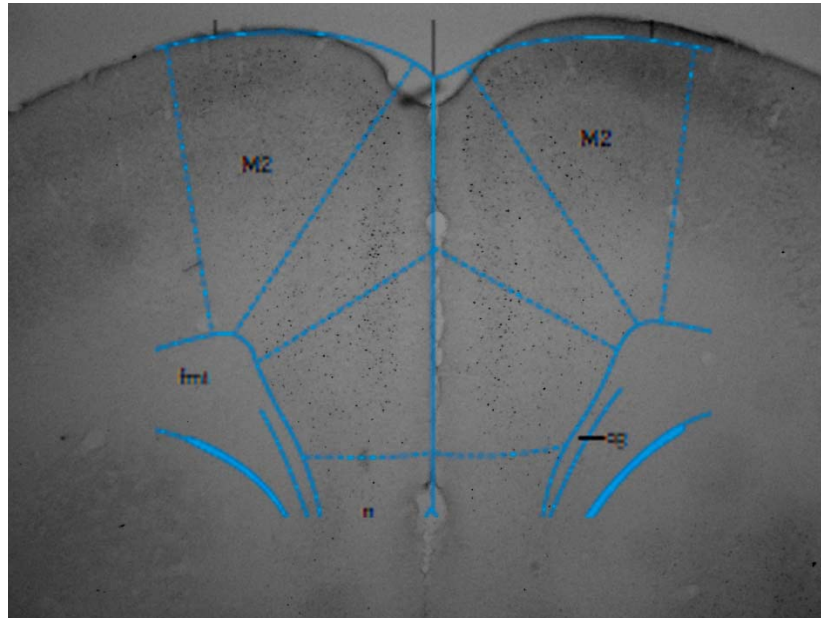


図 1 demo が 0.99mA の footshock を受けている実験における obs の CG の代表画像

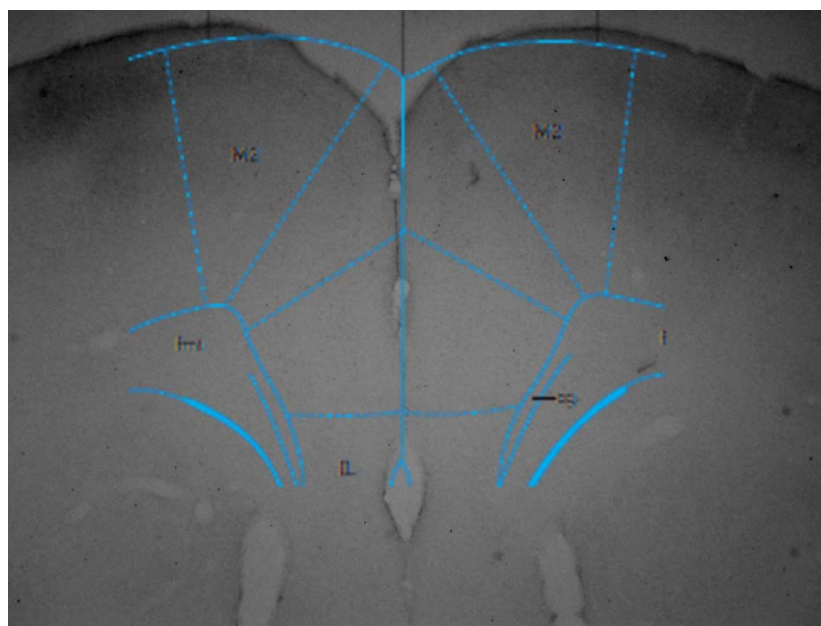


図 2 demo が 0.1mA の footshock を受けている実験における obs の CG の代表画像

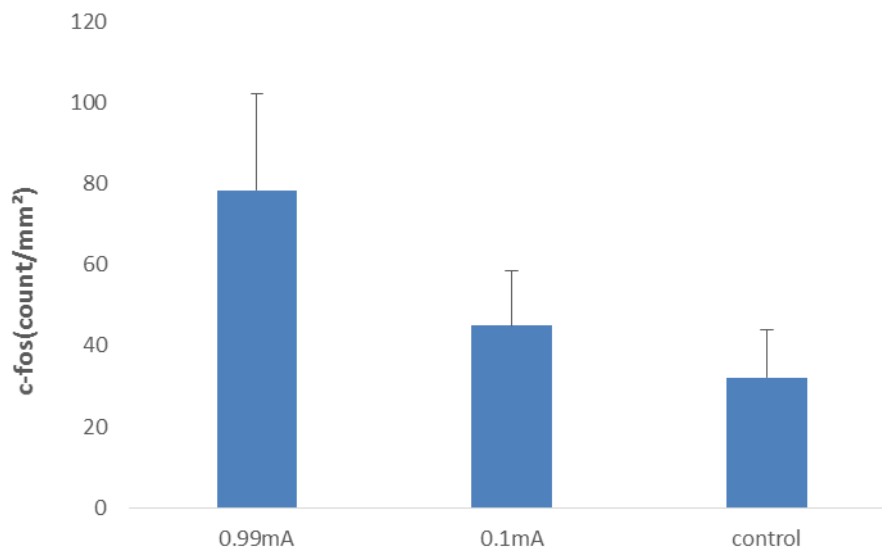


図3 各群のCGにおけるc-fosの密度（エラーバーは標準誤差）

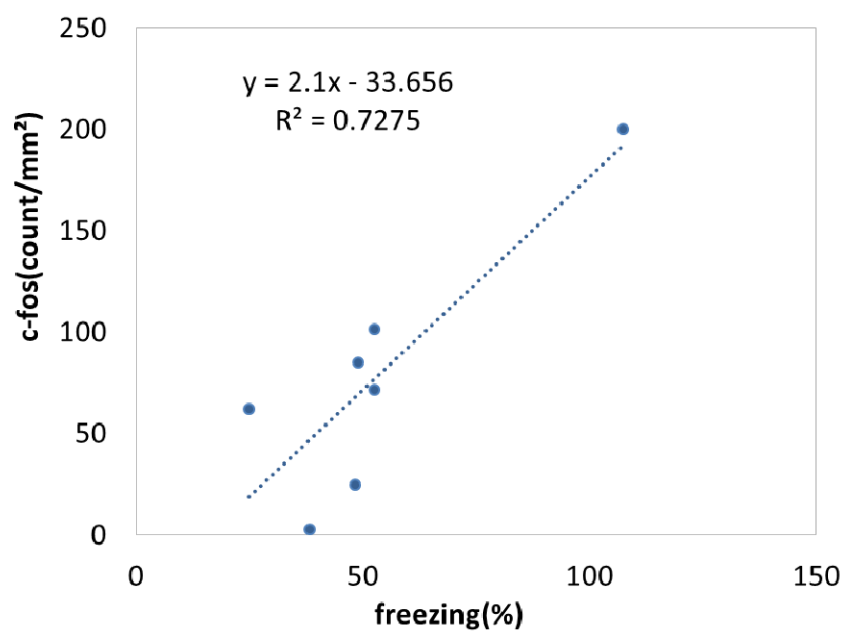


図4 0.99mA条件でのobsのFreezingの割合（shockとpostの6分間におけるfreezingの発現率の合計）とCGにおけるc-fosの密度の相関図

考察

本実験結果より、demo が電気刺激を受けて、obs もフリージングを発現させるという回路に CG が関与していると考えられた。また、demo に与える電気刺激が大きい場面において、何らかの社会因子が obs に伝わり、CG が活動し、結果としてフリージングが発現すると考えられた。

不安や情動を司る扁桃体において、BLA も痛みの情動伝染の神経回路に関与していると提唱されてきたが、BLA においてはどの群も c-fos の発現が非常に少なく、また、フリージングとの相関もみとめられなかった。このことから、footshock 実験における痛みの情動伝染の回路には BLA は中心的な役割を担っているとは考えにくかった。同様に CeL や CeM も関与していないと考えられた。今後、痛み情動伝染における、帯状回からの投射部位を同定することで、その機能を明らかにすることが期待される。

文献

1. Langford, D. J., & de C Williams, A. C. (2014). The caring, sharing rat? *Pain*, 155, 1183-1184.
2. Preston, S. D., & de Waal, F. B. (2002). Empathy: Its ultimate and proximate bases. *The Behavioral and Brain Sciences*, 25, 1-20.
3. Jeon, D., Kim, S., Chetana, M., Jo, D., Ruley, H. E., Lin, S. Y., Rabah, D., Kinet, J. P., & Shin, H. S. (2010). Observational fear learning involves affective pain system and Cav1.2 Ca²⁺ channels in ACC. *Nature Neuroscience*, 13, 482-488.

○プロジェクト No. P 16—01

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いわゆる休肝日の効果の検討

研 究 期 間 ：平成 28 年度 4 月 1 日～平成 30 年度 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】

飲酒は身近な生活習慣の 1 つである。飲酒をすることで、気持ちをリラックスさせストレスを和らげる効果や会話を増やし人間関係をスムーズにする効果などが挙げられる。しかしながら、アルコール多量摂取は様々な生活習慣病を引き起こし、死亡率をあげる危険因子でもある。平成 25 年度から 10 年間の計画で行われている健康日本 21（第 2 次）では飲酒において、生活習慣病のリスクを高める量を飲酒している者の割合の減少を目指し、1 日平均純アルコールで 20g 程度を推奨している。一方、いわゆる休肝日の効用についての基礎的データは十分ではない。そこで今回我々は、いわゆる休肝日の取り方がアルコールによる肝障害にいかに関与するかについてラットモデルを用いて検討することを目的とした。

【研究目的】

飲酒は身近な生活習慣の 1 つである。飲酒をすることで、気持ちをリラックスさせストレスを和らげる効果や会話を増やし人間関係をスムーズにする効果などが挙げられる。しかしながら、アルコール多量摂取は様々な生活習慣病を引き起こし、死亡率をあげる危険因子でもある。

2014 年にアルコール健康障害対策基本法が施行された。この法律の基本理念は、アルコール健康障害の発生、進行および再発の各段階に応じた防止対策を適切に実施することで、国および地方公共団体はその基本理念にのっとり、アルコール健康障害対策を総合的に策定し、実施する責務を有する^{1,2)}。生活習慣病のリスクを高める量（男性純アルコールで 40 g 以上、女性 20 g 以上 / 日）を飲酒している者の割合の減少を目指し、節度ある適度な飲酒である 1 日平均純アルコールで 20 g 程度を推奨している。

公益社団法人アルコール健康医学協会は適正飲酒の 10 か条を掲げている。その 1 つに週 2 日の休肝日が含まれている。光宗らは人間ドック受診者 1859 名を対象に γ -GTP を指標に疫学調査を行った結果、1 週間に 10 合以下が妥当な線であることを提唱し、1 日に日本酒 1 合なら毎日飲めるが、1 日に 2 合なら休肝日が 2 日必要であると述べているが³⁾、2 日の休肝日の具体的なとり方についての言及はない。池原らは Japan Public Health Center-based prospective Study において 40～79 歳約 83000 人を対象に 15 年間追跡調査を行った結果、飲酒者の脳卒中や虚血性心疾患の予防においては、1 日に日本酒 1 合、あるいは 2 合未満の節酒と休肝日を設けることが重要であることを提唱しているが⁴⁾、休肝日について具体的には述べていない。このようにいわゆる休肝日の効用は広く認識されているが、その基礎的データは十分ではない。

本研究では、いわゆる休肝日の取り方がアルコールによる肝障害にいかに関与するかについてラットモデルを用いて検討することを目的とした。

【材料と方法】

実験動物及び飼育条件

4 週齢の SD 系雄性ラット（Charles River）32 匹を Lieber-Decarli 手法⁵⁾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水化物で置換した液体飼料（オリエンタル酵母工業）で 8 週間及び 11 週間の pair-feeding を行った。8 週間及び 11 週間の 5% エタノール含有液体飼料給餌（5% EtOH, n=4：アルコール群）及びコントロール液体飼料給餌（Non- EtOH, n=4：コントロール群）、週に 2 日の連続した休肝日を設け残りの 5 日間は 5% エタノール含有飼料を 11 週間投与した群（n=4：土・日休肝日アルコール群）及び週に 2 日の間において休肝日を設けて残りの 5 日間は 5% エタノール含有液体飼料を投与した群（n=4, 水・日休肝日アルコール群）、8 週間及び 11 週

間の通常固型食給餌（n=8：固型食群）の計5群を作製した。アルコール群は、まず3%エタノ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%エタノール含有液体飼料をそれぞれ8週間、11週間で与えた。

飼育終了時に1-2%イソフルランによる吸入麻酔科にて心採血後、開腹を行い、すぐに肝臓を摘出し、左葉は中性緩衝ホルマリン液で固定し、右葉は液体窒素による急速凍結後、 -80°C で保存した。

血清は、心採血後6 mL用分離剤入り真空採血管（極東製薬工業）に血液を移し、30分以上～2時間以内室温で静置させ、血液が凝固したことを確認してから室温3000 rpm, 10分間遠心分離した血清を -80°C に凍結保存し、使用する際に室温で溶解した6）。採血後血清分離までの時間、保存方法など対象検体すべてで共通のプロトコルを用いた。

病理組織学的検討

肝臓の3 mmの組織切片を作成し、Hematoxylin-Eosin（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。

生化学的検討

血液を遠心分離して得た血清を用いて aspartate aminotransferase（AST）、alanine aminotransferase（ALT）、alkaline phosphatase（ALP）値を測定し、肝機能を評価した。また肝臓組織からTM-PEK 膜タンパク質抽出キット（メルク株式会社）を用いて抽出した細胞質タンパク質分画の triglyceride（TG）量をトリグリセライドキット（TG-PIII；富士フイルム株式会社）で測定し、肝臓組織中のTG量を評価した。

【結果・考察】

Pair-feedingによって、総エネルギー摂取量や体重について液体飼料給餌の4群間で8週間後及び11週間後に有意な差を認めなかった。肝臓重量はアルコール群（ 6.2 ± 0.3 g）と休肝日アルコール群（ 5.9 ± 0.2 g（土・日休肝日アルコール群）、 5.5 ± 0.3 g（水・日休肝日アルコール群））との間で有意な差が認められた。5%エタノール含有液体飼料を給餌した総エタノール摂取量は、3群でほぼ同様であった。

HE染色による病理組織像では、摂取エタノールを揃えるため、コントロール群とエタノール群は8週間後、休肝日アルコール群の2群は11週間後である。エタノール群において中心静脈を中心に高度の脂肪滴沈着を認めた。休肝日アルコール群はコントロール群と変わらない肝組織像を呈した。

肝臓組織中のTG量はコントロール群、5%エタノール含有液体飼料を給餌したアルコール群、水日休肝日アルコール群、土日休肝日アルコール群で、それぞれ 87.7 ± 5.9 、 267.1 ± 9.3 、 159.1 ± 4.7 、 130.1 ± 3.3 であり、4群間で有意な差（ $p < 0.05$ ）が認められた。

血清AST値はコントロール群及び5%エタノール含有液体飼料を給餌したアルコール群3群で有意な違いがみられなかった。血清ALT値は、コントロール群、5%エタノール含有液体飼料を給餌したアルコール群、水日休肝日アルコール群、土日休肝日アルコール群で、それぞれ 28.5 ± 4.4 、 66.3 ± 3.6 、 46.5 ± 3.4 、 31.5 ± 3.6 であり、4群間で有意な差（ $p < 0.05$ ）が認められた。血清ALP値は、コントロール群、5%エタノール含有液体飼料を給餌したアルコール群、水日休肝日アルコール群、土日休肝日アルコール群で、それぞれ 642.3 ± 29.3 、 852.8 ± 102.9 、 720.8 ± 22.3 、 661.3 ± 8.3 であり、4群間で有意な差（ $p < 0.05$ ）が認められた。

今回の研究では肝臓組織の脂肪化に着目し、いわゆる週2日の休肝日がラットへの11週間の慢性的なアルコール投与により、HE染色による病理組織像では休肝日アルコール群はコントロール群と変わらない肝臓組織像を呈し、有効性が確認した。連続週2日と間隔をおいた週2日のいわゆる休肝日は、病理組織像では違いがみられないが、肝臓中のTG量において、間隔をおいた週2日の休肝日ラット群で有意に高値であった。週2日の休肝日の取り方は、肝臓の脂肪化において連続週2日のいわゆる休肝日があることが確認できた。今回の検討では連続週2日及び間隔をおいた週2日のいわゆる休肝日による肝臓組織の脂肪化の違いについて明らかにすることが出来たが、その違いをもたらした機序については今後の検討課題であり、長期習慣飲酒が肝臓に及ぼす影響について休肝日を設けることでいかに減弱しうるかについて、酵素誘導（CYP2E1）や酸化ストレスマーカー（SOD, 8-OHdG）など様々な角度からさらに検討していきたいと考えている。

【参考文献】

1. 堀江義則、海老沼浩利、金井 隆典. 本邦におけるアルコール性肝障害の実態. 日本消化器病学会雑誌 112: 1630-1640, 2015.
2. 瀧村剛、樋口進. アルコール関連問題に対する新たな取り組み アルコール健康障害対策基本法が制定されて. 日本社会精神医学会雑誌 23: 301-311, 2014.
3. 光宗皇彦、松尾和美、藤原武、光宗泉、赤木公成、妹尾悦雄、萱嶋英三、安達倫文、沼田尹典、原義人. 飲酒指導における“酒過量”の有用性について. 日本総合健診医学会誌 27: 367-371, 2000.
4. 池原賢代、磯博康. 飲酒習慣を見直す. Life Style Medicine 4: 53-59, 2010.
5. Lieber CS, Decarli LM. Liquid diet technique of ethanol administration. Alcohol Alcohol 24: 197-211, 1989.
6. Umemura H, Nezu M, Kadera Y, Satoh M, Kimura A, Tomonaga T, Nomura F. Effects of the time intervals between venipuncture and serum preparation for serum peptidome analysis by matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry. Clin Chim Acta 406: 179-180, 2009.

○プロジェクト No. P 16—02

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 28 年 4 月 1 日～平成 30 年 3 月 31 日

プロジェクト班長：代田眞理子（獣医学部 比較毒性学研究室）

プロジェクト班員：山本雅子（獣医学部 解剖学第二研究室）

プロジェクト班員：代田欣二（獣医学部 病理学研究室）

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】

生殖発生毒性試験は人や動物の生殖能力や次世代の発生に関する化学物質の毒性を評価する特殊毒性試験である。雌性生殖毒性の評価において生殖器の重量や組織学的変化、性周期の回帰状態などは重要な指標となるが、これらの指標に影響を及ぼす因子のひとつに黄体退行が挙げられる。

排卵に伴って形成される黄体は妊娠維持に必須のステロイドホルモンであるプロジェステロン（P4）を産生するが、妊娠が成立しなければ P4 分泌機能を失い、形態学的にも消失する。この過程のうち前者を黄体の機能的退行と呼び、後者を形態学的退行という。黄体相を欠く不完全性周期を回帰するラットでは、3-4 回の性周期回帰を経て黄体が消失する。黄体の消失は黄体を構成する細胞のアポトーシスと貪食細胞による排除を特徴とする。黄体退行において中心的な役割を担っている貪食細胞はマクロファージであり、アポトーシスを起こした細胞が表出する“eat-me”シグナルを認識してこれを貪食すると考えられている。しかし我々は、卵巣に残存する黄体数に系統差が認められる Hatano ラットの 2 つの亜系統（HAA および LAA）の卵巣を比較した先行研究において、アポトーシス小体の少ない LAA の黄体で HAA よりも多くのマクロファージが出現し、マクロファージの出現と退行の程度は必ずしも一致しないことを認めた。このことは退行黄体に出現するマクロファージには多彩な役割があることを示唆している。本研究では生殖発生毒性評価に影響を及ぼす黄体退行のメカニズムを明らかにするために、黄体退行に系統差のみられる Hatano ラットの退行黄体に生じる細胞死とそこに存在するマクロファージの特徴を解析して、黄体の形態学的退行に関わるマクロファージの役割を検討した。

【方法】

成熟 LAA 系統雌を発情期に剖検し、排卵が確認された動物から卵巣を採取した。採取した卵巣は 4 %パラホルムアルデヒドで固定し、常法に従ってパラフィン包埋後 4 μ m 厚の切片として、H.E 染色により黄体組織を観察した。次いで CD68 および P450scv の二重免疫組織化学を行いマクロファージと内分泌細胞の局在を確認した。さらに、MFG-E8 mRNA の in situ hybridization を行いその局在を検討した。

【結果および考察】

ラット退行黄体では中心部とそれ以外の領域で異なる細胞死が認められ、いずれにおいても死細胞の排除には滲出型マクロファージが中心的な役割を果たすことが示唆された。活性型 caspase 3 陽性細胞が局在する領域では、マクロファージは MFG-E8 を介してアポトーシス細胞を貪食し、それ以外の領域では MFG-E8 を発現しないマクロファージが変性壊死した細胞を排除しているものと考えられる。LAA で MFG-E8 を発現しないマクロファージが活性型 caspase 3 陽性細胞局在領域に多数観察されたが、これは単球由来のマクロファージを誘引する monocyte chemoattractant protein-1 (MCP-1) を誘導する発情前期のプロラクチン (PRL) サージレベルが、HAA と比べて LAA で高いことを反映した変化であると理解される。本研究では死細胞排除の過程におけるマクロファージの役割を検討したが、MFG-E8 分泌のようにアポトーシス細胞がマクロファージを刺激することもあるので、マクロファージから分泌される tumor necrosis factor-alpha (TNF- α) などのアポトーシス誘導刺激と黄体細胞におけるそれらの受容能の検討も必要であると考えられた。

【参考文献等】

1. 末岡 花菜子「ラット黄体の形態学的退行に演ずるマクロファージの役割」平成 28 年度麻布大学大学院獣医学研究科修士課程論文
2. 末岡花菜子、宮田奈緒、松村 竜、山田峻彰、松井 陸、代田欣二、太田 亮、代田真理子「ラット性周期黄体における Milk fat globule-EGF factor 8 (MFG-E8) mRNA の局在」(第 109 回日本繁殖生物学会大会、2016 年 9 月)

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である合成エストロジェンの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、この時期の EE 曝露は性成熟後の性周期回帰停止を始めとする様々な遅発影響を及ぼすことを報告してきた。特に、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、性成熟後に性周期の回帰が停止し、卵巣に嚢胞状卵胞が形成されること、ならびに嚢胞状卵胞形成の最小用量は、子宮肥大試験の検出感度を下回ることを確認した。このような遅発影響は、視床下部／下垂体／性腺軸の変化に起因した生殖内分泌機能の変化を反映しているものと考えられ、投与終了翌日の 6 日齢に、視床下部で性腺刺激ホルモン放出ホルモン (GnRH) 分泌を直接制御しているキスペプチン (KP) をコードする *Kiss1* 遺伝子の発現を調べたところ、弓状核で顕著に低下することが明らかになった。本研究では、遅発影響出現のメカニズム解明を目的として、前腹側室周囲核に *Kiss1* 発現がまだ認められない 6 日齢までの視床下部について EE の用量と *Kiss1* 発現の関係ならびに発現の推移を調べた。

【方法】

Sprague-Dawley 系妊娠ラットから自然分娩で得られた新生雌を出生翌日 (1 日齢) に個体識別し、性周期回帰停止を招く 2 あるいは 10 $\mu\text{g}/\text{kg}$ の EE を単回経口投与し、その 24 時間後 (2 日齢) あるいは 5 日後 (6 日齢) に剖検した。また、性周期に影響は認められないが嚢胞状卵胞保持率が増加する 0.08 $\mu\text{g}/\text{kg}$ あるいは影響の認められない 0.016 $\mu\text{g}/\text{kg}$ を 1 日齢から 5 日間反復経口投与し、その 24 時間後 (6 日齢) に剖検した。いずれも視床下部を採取し、real-time PCR で *Kiss1* を定量解析し、コーン油を同様に経口投与した対照群のそれと比較した。

【結果および考察】

EE は単回投与翌日の *Kiss1* 発現を顕著に低下させたが、その程度に用量間で差は認められなかった。また、対照群を含めていずれの投与群も投与 5 日後の 6 日齢の方が 2 日齢と比べて低値を示し、日齢の進行に伴い減少することが示唆された。さらに、性周期に影響を及ぼさない用量でも反復投与により有意に *Kiss1* 発現を低下させ、0.4 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 以上を投与した先行研究では認められなかった用量反応関係が認められた。これらのことから、弓状核 *Kiss1* の発現低下の程度が性周期の回帰停止時期に直接反映されるものではないが、弓状核 *Kiss1* は極めて低い用量範囲の EE に反応し、反復投与は日齢の進行に伴う発現低下を加速していると考えられた。

【参考文献等】

1. Shiota M, Kawashima J, Ogawa Y, Kamiie J, Yasuno K, Shiota K, Yoshida M. 2012. Delayed Effects of Single Neonatal Subcutaneous Exposure of Low-Dose 17 α -Ethinylestradiol on Reproductive Function in Female Rats. *Journal of Toxicological Sciences* 37: 681-689.
2. Shiota M, Kawashima J, Nakamura T, Kamiie J, Shiota K, Yoshida M. 2015. Dose-dependent acceleration in the delayed effects of neonatal oral exposure to low-dose 17 α -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 26 年度麻布大学大学院獣医学研究科修士課程論文)
4. 吉河佑莉、田中 恵、太田 亮、代田真理子「新生雌ラットへのエチニルエストラジオール (EE) 経口投与が視床下部 *Kiss1* 遺伝子の発現に及ぼす影響」(第 109 回日本繁殖生物学会大会、2016 年 9 月)

3) 化学物質の卵巢毒性に関する比較毒性学的研究

【目的】

卵巢機能は視床下部 / 下垂体が分泌するホルモンにより制御されているが、これらは卵巢が分泌するホルモンを介して卵巢からの調節を受けている。従って、卵巢を直接傷害する化学物質でも、その表現型は視床下部 / 下垂体の修飾を受けるため、卵巢への直接的な影響を *in vivo* で評価することは難しい。一方、*in vitro* では吸収 / 分布 / 代謝の影響を再現するのは困難である。そこで本研究では、視床下部で性腺刺激ホルモン放出ホルモン (GnRH) 分泌を直接制御しているキスペプチン (KP) をコードする *KissI* 遺伝子を欠失させたラット (*KissI* KO) を用いて、卵巢からのフィードバック作用を受けることなく、化学物質の卵巢毒性を *in vivo* で評価するモデルの作出を目的とした。*KissI* KO は卵巢に GnRH 受容体は発現しているが血中性腺刺激ホルモン (GTH) 濃度が基底レベル以下であるため性腺は萎縮している。卵巢毒性評価モデルとするためには GTH の補充が必須であるが、KP は卵巢にも発現していることから、本年度研究では *KissI* KO 卵巢が正常な GTH 環境下で正常な機能を有するかどうかを、GTH 投与実験ならびに野生型ラットへの移植実験により検討した。

【方法】

名古屋大学より提供を受けた *KissI* と *TdTomato* のヘテロ組換え体を継代繁殖して得られた *KissI* KO および野生型を用いた。まず、7 日齢の *KissI* KO に eCG5IU を 3 日間皮下投与して 10 日齢で卵巢を採取し、生理食塩水を同様に投与した野生型と比較した。次いで、卵巢摘出により発情回帰を停止した成熟野生型の腎被膜下に 23 日齢の *KissI* KO あるいは野生型の両側卵巢を移植して性周期を観察し、移植後 6-8 週の発情期に剖検した。一部は野生型雄と交配し、交尾後 6 日に剖検した。いずれも移植卵巢および子宮を採取して重量を測定するとともに卵巢組織を観察した。

【結果および考察】

KissI KO の卵巢は、eCG 投与により Type 5a の前胞状卵胞が観察されるようになり、野生型とほぼ同等のサイズになった。卵巢摘出した野生型に卵巢を移植すると移植卵巢の遺伝子型に関わらず、移植後約 5 日で発情前期または発情期が見られるようになり、約 15 日で正常な性周期を回帰した。また、移植前に認められた顕著な重量差は認められなくなり、黄体が形成されていた。子宮重量にも差異は認められず、卵胞発育、排卵、黄体形成は野生型卵巢と同様に進行したものと考えられた。さらに、交尾後 6 日の移植卵巢にはよく発達した黄体が観察された。これらのことから、*KissI* KO の卵巢は正常な内分泌環境下では、正常な卵巢活動を営む能力を有することが示唆された。

【参考文献等】

1. Shirota M., Suzuki M., Tanaka H., Sueoka K., Yoshikawa Y. and Tanaka K. 2017. Noninvasive sample collection for the genotyping of neonatal rats using adhesive tape. *Journal of Veterinary Medical Science* 79: 827-829.
2. 田中啓陽、鈴木美帆、今村理沙、小林琴美、太田 亮、代田真理子「性腺刺激ホルモン (GTH) 存在下における *KissI* 遺伝子ノックアウトラットの卵巢機能」(第 109 回日本繁殖生物学会大会、2016 年 9 月)

○プロジェクト No. P 16—03

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 (Ⅱ)

研 究 期 間 : 平成 28 年 4 月 1 日 ~ 平成 31 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】

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 (Cg2 系統) および 9 番 (Cg9 系統) 染色体上に存在する QTL を C57BL/6J 系統 (以後 B6) に導入したコンジェ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、グルタミン酸トランスポーター (*Slc1a2*) 遺伝子が存在している。そこで、海馬における mRNA の発現量を調査した。

【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、これらのコンジェニック系統は、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。各コンジェニック系統は、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 つのコンジェ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、コンジェ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】

コンジェニック系統の中で最も発症率の高い Cg2 系統 [B6.EL-(D2Mit365-D2Mit280)] 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。すなわち、2 系統に対して、それぞれ放り上げ刺激の負荷を 7 個体、通常飼育 7 個体の 2 × 2 群になるようにした。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 cDNA を用いて *Slc1a2* 遺伝子の mRNA 量を定量的 RT-PCR による発現量を測定した。発現量の解析は一元配置分散分析法と繰り返しのある二元配置分散分析法及び Tukey-Kramer 法を使用して、放り上げの有無および系統間における発現量の差異を解析した。

【結果と考察】

Slc1a2 の発現量は、放り上げ刺激の有無によって有意な差が検出された (繰り返しのある二元配置分散分析法: $P < 0.05$)。B6 系統と Cg2 系統の両方で、放り上げ刺激を行った群では、通常飼育群に比べて *Slc1a2* 遺伝子の mRNA の

発現量が平均 15~20% 増加する傾向が認められた。しかし、Turkey-Kramer 法によって、4 群間の平均値を総当たりで比較した場合には、統計的有意水準に達した差は検出されなかった。

Slc1a2 は主にアストロサイトに発現するグルタミン酸トランスポーターである。シナプス間隙に放出された興奮性神経伝達物質であるグルタミン酸を速やかに細胞内に回収して取り除くことで、過剰な興奮を防ぐ作用を持つ (Tanaka et al., 1997)。今回の解析からは、てんかん発作感受性を持つ Cg2 系統と、これを持たない B6 系統との間に *Slc1a2* 遺伝子の mRNA 発現量に明確な差は認められなかった。しかし、発作を誘発するための刺激を負荷すると、*Slc1a2* 遺伝子の発現量が増加することが示唆された。このため *Slc1a2* 遺伝子は、放り上げ刺激に応答して発現量に変化する遺伝子であることが明らかになった。今後、遺伝子発現の測定ポイントを増やすことで、大発作に至る過程で、*Slc1a2* 遺伝子の発現量に系統差が存在するか否かを検討する。

【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.
- Tanaka K, Watase K, Manabe T, Yamada K, Watanabe M, Takahashi K, Iwama H, Nishikawa T, Ichihara N, Kikuchi T, Okuyama S, Kawashima N, Hori S, Takimoto M, Wada K. 1997. Epilepsy and exacerbation of brain injury in mice lacking the glutamate transporter GLT-1. *Science*. 1997, 276(5319); 1699-702

○プロジェクト No. P 16—04

研究テーマ

生体における糖脂質・糖鎖機能に関する研究

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

プロジェクト班長：山下 匡

プロジェクト班員：永根大幹

プロジェクト班員：田原口智士

プロジェクト班員：藤野 寛

研究概要

スフィンゴ脂質（GSL）合成酵素欠損マウスを用いて、潰瘍性大腸炎（IBD）及びアトピー皮膚炎の発症、病態について検討した。

研究目的

① 細胞の形質膜にはコレステロール、スフィンゴミエリン、スフィンゴ糖脂質を主成分とする細胞膜マイクロドメインが存在し、細胞内小胞輸送や情報伝達などに寄与している。スフィンゴ糖脂質はセラミが存在し、細胞内小胞輸送や情報伝達などに寄与している。スフィンゴ糖脂質はセラミドに糖鎖が付加した糖脂質であり、なかでもシアル酸を有するスフィンゴ糖脂質はガングリオシドと呼ばれ、様々な疾患への関連が報告されている。その 1 つに炎症性腸疾患（IBD）があげられる。IBD は慢性持続性の消化器炎症であり、IBD の罹患により QOL が著しく低下する。また近年、その罹患患者数が増加傾向にあることは重大な社会問題となっている。しかし、IBD 病態におけるガングリオシドの役割は今まで明らかにされていない。そこで本研究では、細胞膜構成成分のガングリオシド合成酵素に注目し、IBD とガングリオシドの関連性と IBD の病態を明らかにすることを目的とした。② アトピー性皮膚炎 (Atopic dermatitis; AD) は増悪と寛解を繰り返す、掻痒感のある湿疹を主症状とする皮膚疾患で、患者の QOL 低下が問題となっている。環境や体質など原因は多岐にわたるが、根本的な原因や効果的な治療は未解明のままである。近年、細胞膜構成成分であるスフィンゴ脂質の一つであるセラミドおよびそれを起点とする関連分子と皮膚バリア機能の破綻による AD の関連が示唆されている。本研究では、スフィンゴ脂質であるスフィンゴミエリンに焦点を当て、セラミドからスフィンゴミエリンを合成するスフィンゴミエリン合成酵素 1(Sphingomyelin synthase 1; SMS1) と AD の発症および病態への関与を解明することを目的とした。

材料と方法

① C57BL/6N 野生型 (WT) マウス、GD3S ノックアウト (GD3S KO) マウス、GM3S ノックアウト (GM3S KO) マウス、GalNAc-T ノックアウト (GalNAc-T KO) マウスに 2% デキストラン硫酸ナトリウム (DSS) を最大 10 日間飲水投与し、実験的大腸炎の誘発し体重変化の推移を観察した。各種ガングリオシドが腸内細菌叢の形成に寄与していることが報告されているため、抗菌剤混合液を経口投与後に、WT マウスと GalNAc-T KO マウスそれぞれの糞便を用い腸内細菌叢移植を行った。その後、同様に大腸炎誘発実験を行った。また、ガングリオシド合成酵素の DSS 誘導性大腸炎に伴う遺伝子・タンパク質発現を解析した。② 12 週齢の C57BL/6 由来 SMS1(+/-) マウス、SMS1(+/-) マウス、SMS1(-/-) マウスに対して、耳介部・除毛を施した頸背部皮膚に 4% SDS 塗布後、コナヒョウヒダニ由来アレルゲンを含む軟膏試薬（ビオスタ AD、Biostir Inc.）を週 2 回、3 週間、計 6 回塗布した。皮膚症状の評価として臨床スコアを測定し、その合計を重症度の指標とした。また、耳介部肥厚の測定、H&E 染色、トルイジンブルー染色、DFS 染色による組織学的評価、および免疫学的評価として血漿中ヒスタミン濃度測定を行った。

結果

① 本実験に使用した 3 種のガングリオシド合成酵素欠損マウスでは、WT と比較し体重減少が抑制されたが、その中

で GalNAc-T KO マウスが最も DSS 誘導性大腸炎に対する抵抗性を示した (Fig1)。しかしながら GalNAc-T KO マウスの腸内細菌叢は DSS 誘導性大腸炎への抵抗性に関与していなかったことが明らかになった。一方、WT において大腸炎の誘発した場合、GalNAc-T の腸上皮細胞における発現上昇が観察された。② AD 誘発マウスにおいて、KO 群では肉眼的に重度の痂皮形成と乾燥、耳介部における組織欠損が認められた。耳介部肥厚の測定では、WT 群で軽度、Het 群で中等度、KO 群で重度の肥厚が確認された。AD スコアも KO 群でより重度であった。また、WT 群・Het 群と比較して KO 群では AD 様皮膚炎症状発症時期が早期であった。組織学的評価においても WT 群・Het 群と比較して KO 群で重度炎症および慢性炎症像が観察された (Fig. 2)。

考察

① ガングリオシドは DSS 誘導性大腸炎の病態形成に関与しており GalNAc-T によって合成されるガングリオシド分子種が大きく関与していることが示唆される。また GalNAc-T は免疫系と腸内細菌叢を介さず DSS 誘導性大腸炎の重症化に作用することが示唆された。② SMS1KO 群が早期に AD 様皮膚炎を発症したことから、SMS1 およびスフィンゴミエリンが皮膚バリア機能の恒常性に関与していることが示唆された。

参考文献等

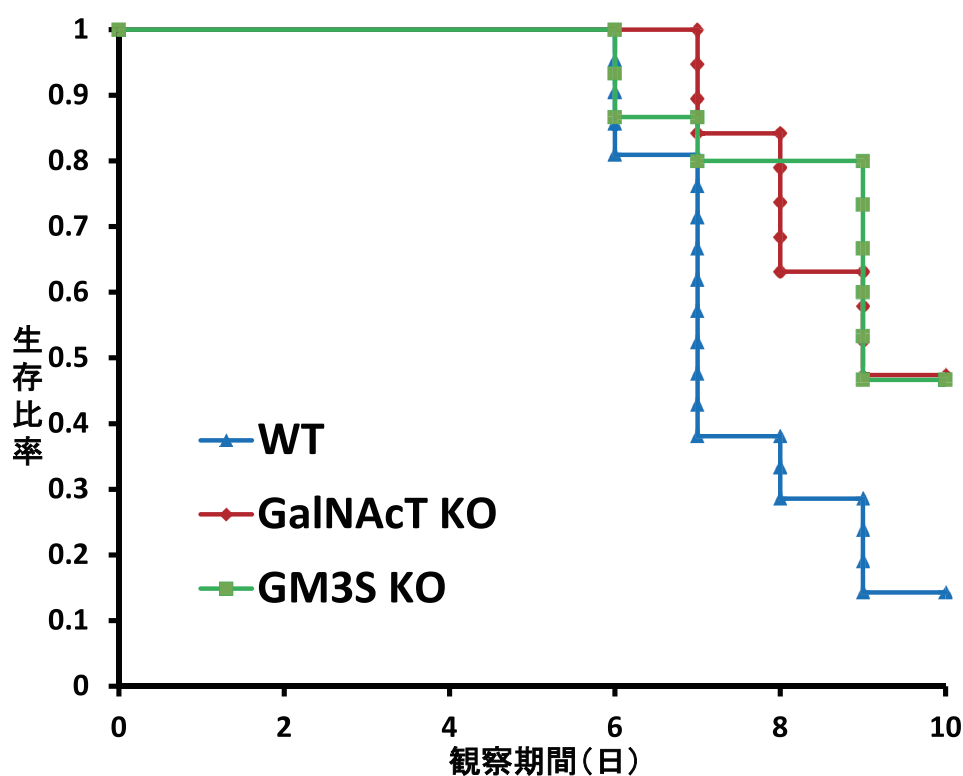


Fig. 1 DSS 授与による体重の増減

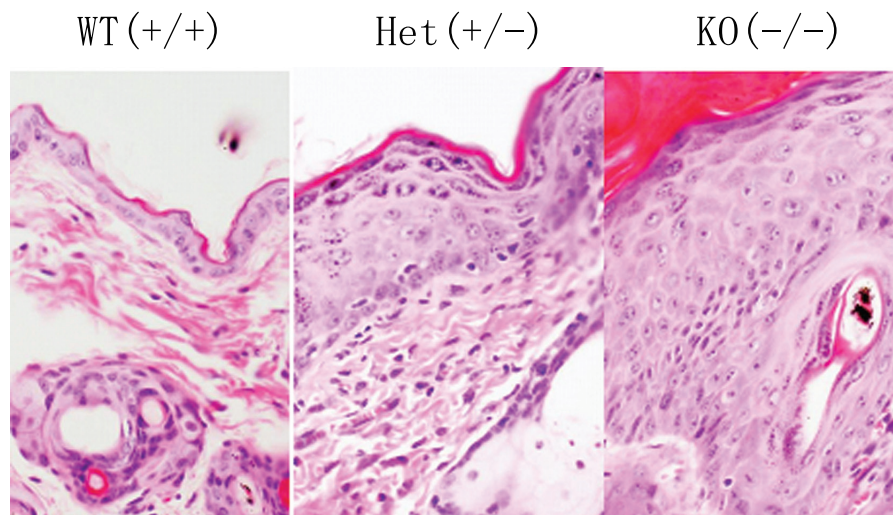


Fig. 2 KO 群において、背部表皮の肥厚が観察

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（2017年度生物科学総合研究所施設利用者説明会資料の23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1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疫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 10 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、マウス・ラットを対象とした動物飼育施設（3 階 3 室）、低温環境及び高温環境が設定できる飼育実験室（3 階 2 室）を備え、専用のマウス・ラット兼用陰圧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。

また、搬入される飼育動物は、すべて SPF 動物である。

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・海水に生息する魚類や藻類両生類など、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）がある。低温室も 1 つ整備されている。

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、 γ -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 部屋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 28 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 28 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 28 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	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 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 ア フ リ カ ツ メ 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（大型水槽）	10	－	10	－
	貝類（小型水槽）	5	－	5	－

※ 飼育室の動物飼育は、自主飼育管理を基本とする。

(図 - 2) 平成 28 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 ネ ズ ミ	ネ コ	ニワトリ	ウ ズ ラ	水 生 動 植 物	
4 月	1,982	888	0	20	15	9	0	0	359	3,273
5 月	2,045	799	0	20	15	9	0	0	359	3,247
6 月	2,317	781	0	20	11	9	0	0	359	3,497
7 月	2,144	731	0	20	11	9	0	0	364	3,279
8 月	2,099	815	0	20	11	9	0	0	364	3,318
9 月	2,326	643	0	20	0	9	0	0	381	3,379
1 0 月	2,673	706	0	20	0	9	40	0	378	3,826
1 1 月	2,747	704	0	20	0	6	0	0	385	3,862
1 2 月	2,951	582	0	20	0	6	0	10	385	3,954
1 月	3,061	681	0	20	0	6	0	0	386	4,154
2 月	2,718	554	0	18	0	6	0	0	382	3,678
3 月	2,713	553	0	18	0	6	0	15	375	3,680
合計 (匹数)	29,776	8,437	0	236	63	93	40	25	4,477	43,147

・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

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 28 年度の研究概要と成果

PTHrP が胎子発育に重要な役割を果たすことは知られているが、微量ミネラルに対する関与はほとんど研究されていない。そこで今回、ホルスタイン種乳牛において微量ミネラルの濃度を ICP-MS で測定し、母子間の移行や周産期の栄養状態について検討した。分娩予定日前後に帝王切開を行ったホルスタイン種乳牛を用いて、胎子娩出時に臍帯動静脈、胎子頸静脈、および母牛頸静脈より採血し血清分離後、測定を行った。その結果、今回測定可能であったミネラルにおいては、臍帯動静脈間では有意な濃度差を認めなかった。母子間の濃度比較においては Ca や P をはじめ、Zn や Fe などが胎子側で高値であったのに対して、Cu や Se は母体側で高値であった。胎子側で高濃度であったミネラルの多くはヒトやマウスの報告と一致しており、牛においても濃度勾配に逆らい胎子に輸送することの重要性が明らかとなり、現在は PTHrP の関与を検討中である。

研究成果報告

論文 1 Ken Onda, Reiichiro Sato, Yosuke Sasaki, Hiroo Madarame, Hideharu Ochiai, Kazuhiro Kawai and Fujiko Sunaga. Serum Ornithine Carbamoyltransferase Activity and Correlation with Fatty Liver in Dairy Cows with Displaced Abomasum. American Journal of Animal and Veterinary Sciences, 11(3): 85-90 (2016)

論文 2 Ken Onda, Chikako Noda, Kazue Nakamura, Reiichiro Sato, Hideharu Ochiai, Sachiko Arai, Hiroo Madarame, Kazuhiro Kawai and Fujiko Sunaga. Effects of intravenous lactated Ringer's solution in cows suffering from hepatic disorders. Asian Journal of Animal and Veterinary Advances 11(8): 469-476 (2016)

論文 3 Abd Eldaim MA, Hashimoto O, Ohtsuki H, Yamada T, Murakami M, Onda K, Sato R, Kanamori Y, Qiao Y, Tomonaga S, Matsui T, Funaba M. Expression of uncoupling protein 1 in bovine muscle cells. Journal of Animal Science 94(12): 5097-5104 (2016)

その他の雑誌、報告書 恩田賢, 乳牛の周産期における低無機リン血症, 家畜診療, 63(1): 5-13 (2016)

学会発表 1 Reiichiro Sato, Kazuhiro Kawai, Yasunori Shinozuka, Ken Onda. A case study of the hindlimb amputation in a Holstein cow. WBC congress 2016, July, Dublin, oral.

学会発表 2 秋山 真之介、佐野 麻衣、佐藤 礼一郎、恩田 賢、牛の迷走神経性消化不良（幽門移送障害）における血清と第一胃液の電解質濃度の変化。第 159 回日本獣医学会学術集会、2016 年 9 月、神奈川県藤沢市、口演。

○ No. 16—03

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

平成 28 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。

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、特に猫にとって視線で追われることがストレスとなる「閾値」を検討した。その結果、視線で追われることにより猫の心拍数と行動学的ストレススコアの上昇が見られ、見知らぬ人で特に高いことが示された。

研究成果報告

なし



○ No. 16—04

研究テーマ ビタミン K 投与による周産期乳牛のカルシウム代謝への影響

使用申請者 佐藤礼一郎

利用実験エリア RI 実験施設エリア

平成 28 年度の研究概要と成果

周産期乳牛への VK3 と酢酸 Na 給与が、体内の骨代謝回転に及ぼす影響を検証した。

ホルスタイン種乳牛を 12 頭用いて、基礎飼料に VK3 を 50 mg/ 日と酢酸 Na を 136 g/ 日を添加した投与群（6 頭）と、基礎飼料のみのコントロール群（6 頭）の 2 群に分けた。分娩前 3 週から分娩後 3 週まで VK3 を給与し、分娩後 12 週まで実験を行った。血中オステオカルシン濃度は、コントロール群、投与群とも初産牛が高値を示し、ビタミン K 投与の周産期乳牛のカルシウム代謝への影響が示唆された。

研究成果報告

なし

平成 28 年度の研究概要と成果

我々は、マウス Major Histocompatibility Complex (MHC) class 2 (以下、MHCII) に提示される minor histocompatibility antigen (mHAgs) である、IL4i1 分子の抗原提示細胞内での抗原提示機構では、オートファジー非依存的な抗原提示経路が存在することを報告している^(1, 2)。すなわち MHCII 拘束性自己抗原は小胞体での生成後、ゴルジ体から EpsinR/Vtilb 陽性のクラスリン小胞に内包 (EV 小胞) 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にした⁽²⁾。さらに、EV 小胞はライソソームには行かず、内包される IL4i1 抗原がライソソーム内の消化酵素非依存的にプロセッシングされることである。そして、その小胞に抗原が選択的に内包されるためには IL4i1 の N 末端のシグナルシーケンスが EpsinR/Vtilb 陽性小胞に選択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/Vtilb 陽性小胞に特異的なカーゴ受容体の存在が示唆された。

研究成果報告

- 論文 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.
- 論文 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.
- 学会発表 Ryuzaki K, Sato N, Tanabe A, Sahara H Association with MHC II-restricted antigen and a cargo receptor into a processing vesicle. 45th Annual Meeting of The Japanese Society for Immunology, Dec 5-7, 2016, Naha. Poster presentation.

○ No. 16—06

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

使用申請者 佐原弘益

平成 28 年度の研究概要と成果

我々はヒト DExD/H Box 型 RNA ヘリカーゼ YTHDC2 はヒト大腸癌患者における癌の進行度や遠隔転移有無と正の相関を示す、癌化促進因子であることを報告してきた^(1,2)。YTHDC2 がどのように癌化形質に関与しているのかを、すなわち YTHDC2 によって翻訳が促進される標的遺伝子はなにか DNA マイクロアレイによって調べた結果、癌細胞が転移するときに重要とされる E-cadherin の発現を抑制する転写因子 Twist1 や転移が誘導されるときに低酸素環境下で必要とされる転写因子 HIF1α がその標的となっていることが明らかとなった⁽²⁾。

研究成果報告

- 論文 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.
- 論文 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 which is translated. *Cancer Letters*, 2016. 376: 34-42.
- 学会発表 1 Tanabe A, Takai K, Ikeda H, Okihira R, Matsuura M, Furuya A, Sahara H YTHDC2 contributes to the cellular response to hypoxia by regulating the translation of HIF-1α. 75th Annual Meeting of the Japanese Cancer Association, Oct 6-8, 2016, Yokohama. Poster presentation.
- 学会発表 2 Takai K, Tanabe A, Suzuki M, Ikeda H, Okihira R, Kimura K, Matsuura M, Sahara H YTHDC2 regulate the expression of E-cadherin by which Twist1 mRNA is translated on colon cancer. 75th Annual Meeting of the Japanese Cancer Association, Oct 6-8, 2016, Yokohama. Poster presentation.



○ No. 16—07

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 化学物質毒性エリア

平成 28 年度の研究概要と成果

GLP-1 誘導体リラグチドが新規メタボリックシンドロームモデル動物つである WBN/Kob 糖尿病肥満ラットにおいて抗糖尿病効果に加え高肥満効果を示すことを見出した。高肥満作用は摂食抑制に基づくことが示唆された。

研究成果報告

- 論文 Nagakubo D, Shirai M, Wakabayashi K, Nakamura Y, Kaji N, Asai F: Therapeutic effects of liraglutide, a glucagon-like peptide-1 analog, in diabetic WBN/Kob-Leprfa rats with obesity and chronic pancreatitis. *Integr Obesity & Diabetes*, 2; 265-270, 2016.

○ No. 16—08

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

学内共同実験者 加藤行男

学外共同実験者 渡辺 到

利用実験エリア 化学物質毒性エリア

平成 28 年度の研究概要と成果

マスティック（mastic）は、ギリシャ・ヒオス島で産出される木から取れる樹液であり、天然ガム成分として知られる。本研究ではビーグル犬に対するマスティックゲル（マスティック検体（改良品） / No.4）の口腔内塗布が口腔内細菌数に及ぼす効果を検討した。マスティックゲルの 4 週間投与は口腔内細菌数を有意に減少させることが示された。

研究成果報告

論文 加藤行男、東出京子、小林郁美、阿部信之介、白井明志、浅井史敏：樹液成分マスティックの抗菌作用， 獣医畜産新報 69 (8) ;599-602, 2016.



○ No. 16—09

研究テーマ 幼少期栄養環境と成長後の行動変化の解析

使用申請者 菊水健史

学内共同実験者 茂木一孝 永澤美保

平成 28 年度の研究概要と成果

マウスをモデルに完全人口哺乳での飼育に成功し、この時期の栄養素の心身発達に与える影響の解析を可能としてきた。今回、人口哺乳マウスの成長後の社会性を評価した。人口哺乳マウスでは著しい母性行動の障害、社会認知能力の欠如が認められた。さらにこのマウスに対して養母マウスを導入し、社会接触刺激を付加した群を作成したが、その効果は低く、母乳中に含まれる何らかの成分が社会性の発達に与える大きな影響があることを見出した。本モデルを用いて、アミノ酸などの栄養素付加の効果検出が可能となった。

研究成果報告

なし

○ No. 16—15

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

学内共同実験者 津郷孝輔

利用実験エリア 感染エリア

平成 28 年度の研究概要と成果

Yersinia pseudotuberculosis (Y. ptb) によって引き起こされるエルシニア症は、人獣共通感染症で様々な動物に急性腸管感染症を引き起こし、しばしば動物園で流行する。我々は流行をコントロールするために組換え YadA (rYadA) 皮下投与ワクチンを開発し、その有効性を示した (157 回本学会)。今回、簡便かつ安全な投与方法で、さらに効果的な免疫賦与 (感染阻止) を目指して経口ワクチン開発を試みたので報告する。

【材料と方法】 免疫群：マウス (BALB/c) 5 匹、rYadA500mg、1 週間おき 2 回経口投与。非免疫群：PBS 経口投与 3 匹。免疫後 1 週間で、全匹に Y. ptb を 10×7 乗個 / 匹経口接種して比較した。【結果】 ワクチン接種後の生存率は、非免疫群 33% だったのに対して免疫群 100% と有意に高かった。【考察】 rYadA 経口投与によって病勢悪化を抑え、死を免れる程度の免疫が賦与できたと判断した。

研究成果報告

論文 Kosuke Tsugo, Shin-ichi Nakamura, Hiroko Yamanaka and Yumi Une. A study on the efficacy of the recombinant *Yersinia adhesin A* vaccine against yersiniosis in the early phase. The Journal of Veterinary Medical Science. 2017 May 18; 79(5): 855-863. doi: 10.1292/jvms. 16-0528. Epub 2017 Mar 20.

学会発表 平野祐美 野外例から分離された *Yersinia pseudotuberculosis* の種々の血清型の性状と病原性の比較 第 160 回日本獣医学会 2017 年 9 月 13 日 鹿児島県 鹿児島大学 口頭発表

○ No. 16—16

研究テーマ ボールパイソン由来マイコプラズマ属菌の病原性の検討

使用申請者 宇根有美

学内共同実験者 前野 愛 津郷孝輔

学外共同実験者 常盤俊大 小林秀樹

利用実験エリア 感染エリア

平成 28 年度の研究概要と成果

我々は、ボールパイソン (Bp) の流行性慢性咽喉頭炎より新種のマイコプラズマ (Mp) を検出し、Bp の Mp 症として 158 学会に報告した。今回は、本 Mp の Bp への起病性を検討した。その結果、実験 1: 同居約 1 か月後から流涎を認め、PCR 検査で Mp を検出した。実験 2: 接種 Bp すべてが発症し、感染 2 ヶ月後と 3 ヶ月後に 1 匹ずつが死亡した。PCR 検査で接種 Bp すべてから Mp を検出した。実験 3: 抗マイコプラズマ薬 (チアムリン) 投与後、Mp は検出されなくなった。実験 4: 接種 15 匹中 13 匹から PCR 検査で Mp が検出された。過去報告した Mp 症の病変と同一の変化が再現された。また、実験 4 では接種後時間が経過するとともに病変が重度化した。本 Mp 特異抗体による免疫染色で口腔および食道粘膜病変部の上皮自由縁が陽性となった。実験 3 では、病変は消失あるいは軽減していた。以上の結果より、我々が見出した Mp が Bp の流行性致死性咽喉頭炎の原因であると結論づけた。

研究成果報告

学会発表 前野愛 ボールパイソンのマイコプラズマ症の再現実験 第 159 回日本獣医学会 2016 年 9 月 神奈川県 日本大学 口頭発表



○ No. 16—17

研究テーマ サル類の肺炎桿菌性髄膜脳炎に関する研究

使用申請者 宇根有美

学内共同実験者 瓢子華観 津郷孝輔 加藤行男

利用実験エリア 感染エリア

平成 28 年度の研究概要と成果

動物園においてキツネザルに致死性髄膜炎を起こした *K. pneumoniae* (以下、K.p.) に対するワクチン開発を目的として研究を行った。ワクチン効果判定はマウス K.p. 10^3 個 / 0.2 ml 腹腔内接種で評価した。免疫原は、K.p. (莢膜+) と莢膜 (-) の 2 種のホルマリン死菌とした。その結果、2 群ともに容量依存性に生存率が高くなり、莢膜 (+) 群がより高かった。また、投与条件は、皮下接種 1 回以上の群では生存率 100% で、回数にかかわらず、経口接種のみの群では効果がなかった。結論として、莢膜 (+) 死菌は、免疫増強剤を使わず、1 回、わずか 20 mg/0.2 ml 以上の皮下投与で、生存率 100% という、効果的なワクチン開発に成功した。

研究成果報告

なし

○No. 16—18

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 28 年度の研究概要と成果

H28 年度において食物アレルゲン 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の繁殖が実験に使用できる数が確保できなかった。そのため、研究の継続が困難となり、H28 年度でこの研究は終了した。

研究成果報告

なし



○No. 16—19

研究テーマ 遺伝子組換え乳酸菌を用いた経口免疫療法の基礎的検討

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 28 年度の研究概要と成果

昨年度は OVA 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。原因としては乳酸菌の発現量が少ないと考えられた。本年度は OVA の発現量の多い OVA アレルゲン発現乳酸菌の作成の検討を行ったが十分な OVA 発現量を産生する乳酸菌が確立できなかった。

研究成果報告

なし

○ No. 16—20

研究テーマ 吸虫類の中間宿主貝の飼育

使用申請者 平 健介

利用実験エリア 水生生物エリア

平成 28 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



○ No. 16—21

研究テーマ 肝蛭の継代と感染動物の作製

使用申請者 平 健介

利用実験エリア 感染エリア

平成 28 年度の研究概要と成果

肝蛭を小型実験動物に感染させ、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

○ No. 16—22

研究テーマ 回虫類幼虫の感染動物の作製

使用申請者 平 健介

利用実験エリア 感染エリア

平成 28 年度の研究概要と成果

回虫類の虫卵を小型実験動物に投与し、幼虫を長期寄生させた。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



○ No. 16—23

研究テーマ 鶏コクシジウムの継代と感染動物の作製

使用申請者 平 健介

利用実験エリア 感染エリア

平成 28 年度の研究概要と成果

鶏コクシジウムを実験鶏に感染させ、継代維持した。このコクシジウム原虫を獣医寄生虫学実習の教材として用いた。なお、教材として用いるコクシジウム原虫は非感染性のステージを用い、外部への拡散が起こらないよう十分な配慮・処置を行った。

研究成果報告

なし

○ No. 16—24

研究テーマ 糞線虫の継代と感染動物の作製

使用申請者 平 健介

利用実験エリア 感染エリア

平成 28 年度の研究概要と成果

鼠の糞線虫を小型実験動物に感染させ、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

○ No. 16—25

研究テーマ 鞭虫の継代と感染動物の作製

使用申請者 平 健介

利用実験エリア 感染エリア

平成 28 年度の研究概要と成果

鼠鞭虫を小型実験動物に感染させ、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

○ No. 16—26

研究テーマ 盲腸虫の継代と感染動物の作製

使用申請者 平 健介

利用実験エリア 感染エリア

平成 28 年度の研究概要と成果

盲腸虫を小型実験動物に感染させ、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



○ No. 16—27

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

使用申請者 黄 鴻堅

利用実験エリア 感染エリア

平成 28 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に感染させ、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

○ No. 16—28

研究テーマ 多包虫の継代および感染動物の作製

使用申請者 黄 鴻堅

利用実験エリア 感染エリア

平成 28 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に投与し、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



○ No. 16—29

研究テーマ 妊娠期から授乳期のラットに給与する飼料のタウリン含量のちがいが産子の筋形成におよぼす影響の解明

使用申請者 勝俣昌也

学内共同実験者 高橋知也

平成 28 年度の研究概要と成果

妊娠成立を確認した雌ラットを対照区、タウリン 0.5% 区、同 1.0% 区、同 2.0% 区にわけた。タウリンは蒸留水に 0.5%、1.0%、2.0% の濃度になるように溶かし、該当する雌ラットにそれぞれのタウリン添加水を給与した。雌ラットへタウリンを給与すると、産仔の離乳体重が小さくなった ($P<0.01$)。さらに、離乳時に採取した産仔の腓腹筋の重量と体重の比は、雌ラットへのタウリン給与で小さくなった ($P<0.01$)。

研究成果報告

学会発表 妊娠ラットに給与するタウリン濃度の違いが産子の腓腹筋の重量と MHC タンパク質の mRNA 発現量に及ぼす影響・第 71 回日本栄養・食糧学会大会・2017 年 5 月・沖縄コンベンションセンター。ポスター発表

○ No. 16—30

研究テーマ ラットの神経幹細胞を用いた評価系の確立

使用申請者 滝沢達也

学内共同実験者 田中和明

平成 28 年度の研究概要と成果

哺乳類の成体あるいは胎児の脳から組織を採取し、単一細胞に分散した後に浮遊培養することで球状の細胞塊を形成させ、形成された細胞塊（スフィア）を単一細胞に再度分散し、単一細胞から再び細胞塊を形成させることができる。この手法を用いて増殖能力と分化能力を有する神経幹細胞の確立が可能である。本研究では、上記の手法を用いて、ラット胎児の神経組織から神経幹細胞が採取できることが確認できた。さらに、同様の手法を持ちいて、脂肪組織由来の幹細胞からも神経系の細胞への分化可能なニューロスフィアが形成できた。

研究成果報告

なし

○ No. 16—31

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

平成 28 年度の研究概要と成果

ラットの脂肪組織から脂肪組織幹細胞（Adipose tissue-derived stem cell: ASC）を採取した。ASC 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ている。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 ASC を処理した後、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、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。また、クロマチン免疫沈降法により、NO- シトルリン回路構成酵素（アルギニノコハク酸合成酵素 ASS, アルギニノコハク酸分解酵素 ASL）コード遺伝子のプロモーター領域がアセチル化されていることが示された。

研究成果報告

学会発表 ○林大希 大久保巧 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 89 回日本生化学会大会・2016 年 9 月 26 日・仙台国際センター・ポスター発表

○ No. 16—33

研究テーマ フッ素樹脂表面への 細胞接着機構の解析および応用

使用申請者 滝沢達也

平成 28 年度の研究概要と成果

フッ素樹脂は血栓形成を抑制することから、人工血管などの血液が接触する場での医療機器表面には、フッ素樹脂が塗布されている。生細胞の経時的観察には、位相差顕微鏡が繁用されている。しかし、フッ素樹脂の光透過性が低いことから、フッ素樹脂表面での生細胞の動態等を経時的に観察することは困難であった。近年、フッ素樹脂をガラス表面に薄く塗布することにより光透過性を増加させ、簡便にフッ素樹脂表面での生細胞を観察できる手法が開発された。この手法を用いることにより、フッ素樹脂表面における生細胞の接着と増殖や、細胞の剥離などを長期間にわたり、簡便に観察することが可能となった。

研究成果報告

Naoto Inukai, Kazuaki Tanaka and Tatsuya Takizawa. A convenient technique for live-cell observation on the surface of polytetrafluoroethylene with an inverted phase-contrast microscope. Microscopy, 2016, 1-7.



○ No. 16—35

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 28 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

○ No. 16—36

研究テーマ OM ラットの進行性腎症の病理発生機序に関する研究

使用申請者 代田欣二

学内共同実験者 上家潤一 西 玲央 柴田紘佑

平成 28 年度の研究概要と成果

若齢 Osborne-Mendel ラットに牛血清アルブミン (BSA) を投与し、糸球体傷害と続発する尿細管・間質障害 (TII) をより早期かつ重度に誘発し、腎における MCP-1 mRNA の発現と糸球体傷害および TII との関係について検討した。その結果、BSA 群で尿中蛋白質排泄量が有意に多く、組織学的に BSA 群では非投与群と比較して足細胞障害マーカー Desmin の発現、尿細管上皮細胞 (TE) 障害マーカーである Osteopontin および Vimentin の発現、尿細管間質線維化、尿間質への浸潤 Mφ 数が有意に増加した。また、腎における MCP-1 mRNA 発現が BSA 群において有意に高かった。In situ hybridization では MCP-1 mRNA が TE と浸潤細胞集簇巢に発現していた。MCP-1 mRNA 発現細胞数は、尿中蛋白排泄量、線維化スコア、足細胞傷害、TE 障害、間質線維化、浸潤 Mφ 数と正の相関を示した。以上、本実験において、糸球体傷害に続発する TII 発現期では MCP-1 mRNA が TE に局在することを示し、TII は糸球体傷害程度に相関し、蛋白尿が TE に MCP-1 の発現を誘導し間質の炎症と線維化に関与する事を示唆した。

研究成果報告

学会発表 牛血清アルブミン投与による OM ラットの加速型腎症における尿細管・間質障害と尿細管上皮細胞での MCP-1 発現、第 4 回日本獣医病理学専門家協会学術集会、2017 年 3 月、さいたま市、ポスター



○ No. 16—38

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 28 年度の研究概要と成果

抗体価の高い陽性血清を得るため、再度、ラットへ *Candida albicans* (*C. albicans*) を免疫し、陽性血清の作製を行った。*C. albicans* を結合させたラテックス粒子をスライドガラス上に塗抹し、2 倍系列で希釈した血清を反応させた。洗浄後、FITC 標識抗ラット IgG 抗体を反応させた。蛍光顕微鏡で観察し、蛍光所見が認められない希釈倍率の 1 つ前を終価とした。その結果、4 個体の抗体価を求めることが可能であった。ヒトにおいては、ゲル内沈降反応において *C. albicans* に対する抗体が存在するか否かが評価されている。しかし、本法を利用することで、抗体の有無だけでなく抗体価を求めることができ、ヒトへの応用が期待される。

研究成果報告

なし

○ No. 16—39

研究テーマ ウシ免疫初乳抗体の動物腸管内における中和作用および除菌作用の検討

使用申請者 栗林尚志

利用実験エリア 感染エリア

平成 28 年度の研究概要と成果

Helicobacter pylori (*H. pylori*) を感染させたスナネズミへ反復経口投与することで *H. pylori* を除菌することが可能であったウシ免疫初乳抗体について追加検討を行った。本抗体をヒトへ応用する場合は、乳製品へ添加することが想定される。しかし、短期間で除菌を成功させるためには、抗体と共に補体を投与する必要がある。予備検討としてウシ免疫初乳抗体と常乳を投与したが、除菌効果は認められなかった。*In vitro* で評価した結果、常乳中には、補体成分のうち僅かに C3 のみが存在しておた。そのため、短期間で除菌を成功させるためには、補体としてウシ血清をウシ初乳抗体と共に経口投与する必要があると考えられる。

研究成果報告

なし



○ No. 16—40

研究テーマ 抗マウスノロウイルス活性物質の検索および効果判定

使用申請者 田原口 智士

利用実験エリア 感染エリア

平成 28 年度の研究概要と成果

28 年度の実績はありません。

研究成果報告

なし

○ No. 16—41

研究テーマ 猫カリシウイルス（FCV）ワクチン開発に伴う野外ウイルスの変異について

使用申請者 田原口智士

利用実験エリア 感染エリア

平成 28 年度の研究概要と成果

ネコカリシウイルス（FCV）の変異株出現を期待し、経時的に FCV 感染猫からサンプリングを行っている。現在のところ、変異株の出現を示唆する結果は得られていない。

研究成果報告

なし



○ No. 16—42

研究テーマ ウイルスの病原性獲得要因の解析（ウサギ）

使用申請者 田原口智士

平成 28 年度の研究概要と成果

鶏アデノウイルス血清型 1 の DNA binding protein（DBP）を抗原にし、ウサギに免疫を行い抗体を得た。得られた抗体は、ウエスタンブロットで予想される 51kda の蛋白を認識し、蛍光抗体で核内に存在する蛋白を検出した。

研究成果報告

学会発表 佐藤 暢彦、氏野 昭彦、小倉 大紀、石田 起也、留場 寛子、Thaasut Khompakorn、藤野 寛、田原口 智士. Myosin9 が鶏アデノウイルス（FAV）の感染に与える影響. 第 159 回 日本獣医学会学術集会, 2016 年 9 月 9 日, 日本大学. 口頭発表

○ No. 16—43

研究テーマ ウイルスの病原性獲得要因の解析（マウス）

使用申請者 田原口智士

利用実験エリア 感染エリア

平成 28 年度の研究概要と成果

鶏アデノウイルス（FAV）は、鶏 CAR をレセプターとして利用する可能性が示唆された。

研究成果報告

論文 Gallus gallus coxsackievirus and adenovirus receptor facilitates the binding of fowl adenovirus serotype 1 in chickens. Japanese Journal of Veterinary Research. 64 (3) ;183-190



○ No. 16—44

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 28 年度の研究概要と成果

インフルエンザウイルス（PR8）をマウスに経鼻接種し、その LD50 を測定した。

研究成果報告

なし

○ No. 16—45

研究テーマ 腫瘍細胞株を用いたアミノ酸輸送活性の変化

使用申請者 落合秀治

利用実験エリア RI 実験施設エリア

平成 28 年度の研究概要と成果

生体内でアミノ酸代謝に深いかわりを持つ、コリンについてその輸送体（SLC44）の 5 つのアイソフォームについて調べた。第一段階として不明であったイヌの cDNA 塩基配列を決定し、その組織・細胞分布を調べた。イヌ SLC44A 1～5 はそれぞれ報告されているヒトやげっ歯類と高い相同性を示した。組織分布については報告されているものと大きな違いが見出された（詳細は次報にて）。また、イヌ肺がん細胞株をもちいて、コリンの輸送活性を調べたところ、正常細胞に比べて高いコリン輸送能が確認され、これは有機酸輸送体阻害剤等で強く阻害されることが確認された。現在、これらのがん細胞増殖への阻害効果を調べている。

研究成果報告

なし



○ No. 16—47

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子増殖機構の解明

使用申請者 萩原喜久美

学内共同実験者 納谷裕子

利用実験エリア 感染エリア

平成 28 年度の研究概要と成果

ウシ小型ピロプラズマ病はダニ媒介性の *Theileria orientalis* (*T.o*) 原虫が引き起こす血液寄生原虫性疾患で、肝機能障害を伴うことが報告されている。しかし、肝障害発生機序の詳細は不明である。NOG マウスを用い、*T.o* 非感染ウシ骨髄を移植し、骨髄生着後、*T.o* 感染赤血球を接種し、肝細胞傷害発生機序について病理学的解析を行った。1. *T.o* 感染群の原虫の感染率は 0.4-0.7% であり、Ht 値は 11.1-25.7%、*T.o* 非感染群では Ht 値 25.7-41.9% を示した。2. *T.o* 感染群マウスの肝臓において、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活性化が認められた。3. AST、ALT が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。以上の結果から *T.o* 感染 NOG マウスの肝障害に炎症性サイトカインの関与が認められ、ウシ小型ピロプラズマ病において起こる肝機能障害発生機序に原虫感染によって誘導された炎症性サイトカインが深く関与することが示唆された。

研究成果報告

なし

○ No. 16—48

研究テーマ 小空間飼育ストレスに対する ω 3系脂肪酸の作用

使用申請者 守口 徹

学内共同実験者 原馬 明子

平成 28 年度の研究概要と成果

マウスケージに仕切りを入れ、1/3 程度の容積にマウスを 4 匹 8 週間飼育し、その後の精神的な影響を確認するために不安様行動、うつ様行動（自発運動量、高架式十字迷路試験、新奇環境摂食抑制試験）の測定を行った。現在、それらの解析中である。

研究成果報告

なし



○ No. 16—51

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 28 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

○ No. 16—52

研究テーマ 母体へのバルプロ酸投与が次世代ラットアイソレーションコールに及ぼす影響

使用申請者 猪股智夫

利用実験エリア クリーンエリア

平成 28 年度の研究概要と成果

バルプロ酸はてんかん、うつ病などの治療に用いられている。妊娠時にバルプロ酸を服用すると生まれてくる子供に脳発達障害を誘発することが知られている。本研究は、妊娠したラットに、バルプロ酸を投与し、次世代であるラット新生仔に及ぼす影響について、アイソレーションコールを利用し、発声のタイプや回数について解析し、バルプロ酸の新生仔中枢神経系に対する毒性を評価した。Wistar ラット妊娠雌を 1 群 2 匹とし、妊娠 12.5 日目の母体にバルプロ酸 400 mg/kg（ラット自閉症モデルを作出するための最小投与量）、200 mg/kg を、それぞれ単回、経口投与し、対照群と比較した。各母体から分娩した新生仔は、出生日を 0 日齢とし、2、5、8、11 日齢にアイソレーションコールを測定した。バルプロ酸 400 mg/kg 投与群において生後 8 日齢、11 日齢のアイソレーションコールが対照群に比べ増加していた。

研究成果報告

なし



○ No. 16—53

研究テーマ *Rhizopus oryzae*（クモノスカビ）水抽出物による潰瘍性大腸炎制御効果の検討

使用申請者 鈴木武人

利用実験エリア 感染エリア

平成 28 年度の研究概要と成果

Rhizopus oryzae 水抽出物（RU）は経口投与によりアトピー性皮膚炎誘発マウスの血中 IL-4 および IgE 濃度を低下させ、症状を緩和させることが分かっている。近年、同様な効果を持つ乳酸菌やビフィズス菌が潰瘍性大腸炎（UC）を抑制することが報告されていることから、RU の UC 抑制効果について検証した。

DSS 経口投与により誘発させた UC モデルマウスにおいて、誘発 3 日前から 10 日間毎日 RU を経口投与した。増体量、大腸の長さ及び組織学的評価、大腸及び肝臓組織中の炎症に関わる遺伝子の mRNA 発現量、ヘルパー T 細胞のサブクラス解析により RU の効果を判断した。いずれの項目も RU 投与で有意な改善効果は認められなかったが、IL-1 β 、TNF- α 、IL-6 など炎症性サイトカインの発現量が RU 投与で低下傾向を示した。今後、慢性期の軽症～中等症の UC モデルでの評価を行いたい。

研究成果報告

なし

○ No. 16—56

研究テーマ 廃用性萎縮モデルマウスの新たな評価方法確立と筋萎縮発生メカニズムの解明

使用申請者 折戸謙介

平成 28 年度の研究概要と成果

筋力増強を有する薬物やサプリメントを評価する動物実験システムを確立するため、後肢にギプスを装着することで廃用性萎縮モデルを作成し、我々が開発した筋力測定装置（Okada & Orito, J Pharmacol Toxicol Methods, 2015）で客観的に筋収縮能を評価した。廃用性筋萎縮マウスは作成できたが、運動活性が下がりすぎて筋力測定装置での評価はできなかった。動物実験システムを確立するには、他のモデルマウスで評価する必要がある。今後は筋萎縮症モデルの dmd マウスの筋力評価を実施する予定である。

研究成果報告

なし



○ No. 16—57

研究テーマ ラットを用いた心機能と末梢血管調節機構の解明研究

使用申請者 折戸謙介

平成 28 年度の研究概要と成果

血管収縮物質により動脈を収縮させると、血管拡張能が低下する。このような状態では、拡張能正常時に比べて心臓から送出される血液による血圧上昇と動脈血流増加のタイミングが異なることが予想される。しかし血圧上昇 / 血流増加のタイミングの変化が、各血管収縮物質により異なるか否かは不明であった。EndGear3 (EG3) は、Transonic により開発中の 1 本のカテーテルで血圧と血流を同時に測定できるプローブである。この EG3 を頸動脈から挿入することで大動脈弓の血圧と血流の同時測定を計画した。現在は、EG3 により得られる測定値（血圧 / 血流）の有効性について評価中である。

研究成果報告

なし

○ No. 16—58

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

平成 28 年度の研究概要と成果

豚の野生型および変異型 SAA の部分配列ペプチドを合成し、in vivo におけるアミロイド線維形成性を解析した。In vitro において変異型ペプチドは野生型と比較して高い線維形成性を示したが、AA アミロイド症モデルマウスへの接種では両ペプチドともに臓器への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. Vet Pathol. 2017 Jan; 54(1): 111-118.



○ No. 16—59

研究テーマ 両生類の新興病原体ラナウイルスに関する研究

使用申請者 宇根有美

学内共同実験者 阪本真由美

利用実験エリア 感染エリア

平成 28 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。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結果、感染率が季節変動することを明らかにした。そこで、季節変動が生じる機序およびヌマガエルの自然界での役割を解明すべく、2015 年より室温一定 (25℃) で明暗周期一定の環境下における感染率の推移を個体ごとに追跡した。

その結果、対象としたヌマガエル 17 匹のうち 3 匹は観察期間中一貫して陰性であったが、14 匹は陽転、陰転を繰り返し、飼育期間が長くなると陰性期間が延長し、陽性数が減少した。さらに個体によっては多種類のウイルスに感染し、陽性の際に検出されるウイルス種も変化した。今回の検索によって、ヌマガエルがラナウイルスに長期に不顕性感染するが徐々に体内から排除されている可能性があり、これにはカエルの免疫反応の関与が考えられた。

研究成果報告

学会発表 1 阪本真由美 ヌマガエル (*Fejervarya kawamurai*) 体内におけるラナウイルスの動態と意義 第 160 回日本獣医学会 2017 年 9 月 13 日 鹿児島県 鹿児島大学 口頭発表

学会発表 2 宇根有美 野生ヌマガエル *Fejervarya kawamurai* におけるラナウイルスの動態 第 160 回日本獣医学会 2017 年 9 月 13 日 鹿児島県 鹿児島大学 口頭発表

学会発表 3 宇根有美 企画集会 1: 両生類の新興感染症の今 — ヒキガエルの現状を考える — 日本爬虫両棲類学会第 55 回沖縄大会 2016 年 11 月 26 日 沖縄県 琉球大学 口頭発表

○ No. 16—60 及び 16—61

研究テーマ カエルツボカビの生物学的特徴および病原性の解析

使用申請者 宇根有美

学内共同実験者 嘉手苅将 伊藤葉子

学外共同実験者 鈴木雅一

利用実験エリア 感染エリア

平成 28 年度の研究概要と成果

両生類の新興感染症の原因の 1 つであるカエルツボカビ (Bd) の生物学的特性と宿主との関係を明らかにすることを目的としており、28 年度は Bd 感染がどのように宿主を死に至らしめるかの機序を皮膚水透過性に関連する因子の側面から検討した。従来から Bd は宿主の血中電解質減少とそれに関連する心不全によって死亡するとされている。今回、皮膚に分布するアクアポリンを対象として、Bd を感染させた Bd 高感受性カエルの皮膚水透過性の変化を検索した。その結果、Bd 感染によって、血漿膠質浸透圧の低下、Na、Cl、Mg および Ca 値の低下を認めた。AVT 刺激条件下で (AQP2s (AQP6vs) を介する) 水透過性が減少、AVT 非刺激条件下で (AQP3 を介する) 水透過量が上昇した。病理組織学的に明らかな傷害が認められないにも関わらず、高度の水吸収調節障害がみられた。よって、Bd 感染は宿主の皮膚に物理的傷害を加えるのではなく、Bd が産生する何らかの物質が皮膚に影響を与えている可能性が示唆された。

研究成果報告

学会発表 嘉手苅将 カエルツボカビ感染が皮膚水吸収に与える影響 第 3 回日本獣医病理専門家協会学術集会 東京都 三鷹 2016 年 3 月 30 日 ポスター発表



○ No. 16—62

研究テーマ 犬および猫における PARIS 100 正常動物および自然発症肝疾患症例における効果と有害事象の検討

使用申請者 久末正晴

学内共同実験者 根尾櫻子

学外共同実験者 秋吉亮人

平成 28 年度の研究概要と成果

PARIS100 はヒト胎盤抽出物に含有されるアミノ酸から成る合成化学物質で、マウスでは初代培養肝細胞の増殖を促進することが明らかにされている。本化学物質は、かつ肝硬変をはじめとする難治性肝疾患において肝機能改善薬として期待される。以前から、犬では高齢化に伴い、慢性の肝炎および肝硬変の患者が増加しつつある。このような状況の中、安価で副作用の少なく、かつ幹細胞から肝細胞の増殖を促す先端の再生医療技術を応用した薬剤の開発は、極めて重要な課題である。そこで、今回我々は健康ビーグル犬および猫を用いて PARIS100 を投与した際の有害事象を確認した後に、本学付属動物病院および一般診療施設における難治性もしくは致死性の重度肝疾患に対して補助療法として本薬剤の使用を行う。現在、in vitro において犬の肝細胞に対する傷害効果の有無を確認中である。

研究成果報告

なし

○ No. 16—63

研究テーマ ホテイアオイの馴化に関する研究

使用申請者 久松 伸

利用実験エリア 水生生物エリア

平成 28 年度の研究概要と成果

現在、水生生物であるホテイアオイの環境分野での応用を試みるために、ホテイアオイへの遺伝子導入法の検討を計画している。形質転換体を得るための材料として使用するホテイアオイは、光と温度が制御できるグロースキャビネット内で無菌的に栽培している。仮にこの無菌ホテイアオイの形質転換体が得られた場合、将来的にはその形質転換体を非無菌環境下で栽培する必要があるが、一般的に、無菌環境で生育されている植物をそのまま非無菌環境下に移すと生育が悪く、やがて個体死となる場合もある。そこで、遺伝子を組換えしていない無菌ホテイアオイを用いて、非無菌環境下でも良好に成長・栽培ができるよう本学生物科学総合研究所水生生物施設内で無菌ホテイアオイの馴化と非無菌環境下での栽培条件の検討を行っている。これまで光照射のために使用していた植物育成用蛍光灯の供給が止まってしまったため、LED ランプに切り替えて栽培を試みている。

研究成果報告

なし



○ No. 16—64

研究テーマ 両性類の新興病原体ラナウイルスに関する研究（媒介動物の検索）＜アイガモ＞

使用申請者 宇根有美

学内共同実験者 田原口智士 杉山淳一

利用実験エリア 感染エリア

平成 28 年度の研究概要と成果

国内自然界におけるラナウイルスの広域分布と検出率の上昇が明らかにされたことから、キャリア動物の探索のための実験を行った。孵化後間もないアイガモヒナ 1 羽あたり 10^8 CF のウイルスを経口投与し感染状況を経時的に検索した。その結果、接種後 2 日目のヒナの実質臓器（腎臓）から目的領域の遺伝子の増幅が検出されたが、他の材料からは検出されず、また、検出されたとしても極めて不鮮明なバンドのため、遺伝子の増幅の評価は困難であった。その他の個体からも遺伝子の増幅は認められなかった。また肉眼的に全ての臓器において、ウイルスの感染を疑う著変は認められなかった。野生水禽類からしばしばラナウイルスが検出されるが、今回、アイガモヒナでは、明らかな感染の成立はみられなかった。今後は条件を検討し、可能な限りの分子生物学的および生化学的検査を行っていく予定である。

研究成果報告

なし

○ No. 16—65

研究テーマ 海水からサンゴ礁共生生物（サンゴ・イソギンチャク）への微量金属摂取プロセス

使用申請者 伊藤彰英

平成 28 年度の研究概要と成果

海水からサンゴ礁共生生物への微量金属摂取プロセスを検討するために水槽内でイソギンチャクを飼育し、海水に微量の重金属イオンを添加して飼育実験を行った。添加する微量金属イオンは、Fe, Zn, Cd, Pb, Niなどを10 ppm以下となるように調製し、水槽中でppbレベルになるよう添加した。微量金属を添加して一定時間経過後にイソギンチャクを褐虫藻と軟体組織に分離後、分解しICP-MSで微量金属を測定したところ、FeやZnについて褐虫藻への取り込みが確認された。

研究成果報告

なし

平成 28 年度の研究概要と成果

ウズラの視床下部に存在する生殖腺刺激ホルモン放出抑制ホルモン (GnIH) 産生細胞は、ノルアドレナリン (NA) 受容体 $\alpha 2A$ 型の mRNA を発現し、NA の神経投射を受けている。しかしながら、NA の GnIH 発現に対する効果は不明であった。私達は NA 選択的神経毒 (DSP-4) を用いて、GnIH 発現に対する NA の制御を調べた。DSP-4 を 50 mg/kg を腹腔投与した雄ウズラでは、青斑核に存在する NA 産生細胞数と視床下部の NA 含有量が減少したが、延髄に存在する NA 産生細胞数は減少しなかった。同様に DSP-4 を投与した雄ウズラを 1 時間、社会的に隔離すると、GnIH mRNA の発現が増加した。同種他個体が視認できる環境では、この効果はみられなかった。これらの結果は、雄ウズラが単独にいるときに青斑核の NA 産生細胞は、GnIH 発現に対して抑制的に作用することを示唆している。

研究成果報告

- 論文 N. Kansaku, Y. Tobari G. Hiyama, S. Wakui, N. Moriguchi, M. Numata, K. Kino, D. Zadworny Effects of vasoactive intestinal polypeptide and forskolin on mRNA expression of prolactin and prolactin regulatory element-binding protein in the anterior pituitary gland of chicken embryo and laying hens. Journal of Poultry Science vol. 53, pp. 313-317 (2016)
- 学会発表 1 Tobari Y A new pathway mediating social effects on the endocrine system: Female presence acting via norepinephrine release stimulates gonadotropin-inhibitory hormone in the paraventricular nucleus and suppresses luteinizing hormone in quail. The 22nd International congress of zoology, the 87th meeting of zoological society of japan. Okinawa, Japan (2016 年 11 月 16 日 シンポジウム口頭発表)
- 学会発表 2 戸張靖子 鳴禽類におけるメソトシン cDNA クローニング 2016 年度遺伝研 行動遺伝学研究会「個体の繋がり」の分子進化研究」2016 年 10 月 13 日 静岡 (ポスター発表)
- 学会発表 3 丸谷桃花 神作宜男 戸張靖子 コシジロキンバラの脳における家畜化候補遺伝子 Williams-Beuren syndrome chromosome region 17 (WBSCR17) の cDNA 日本動物学会関東支部第 69 大会 2017 年 3 月 20 日 東京 (ポスター発表)
- 学会発表 4 戸張靖子 丸谷桃花 神作宜男 鳴禽類におけるウィリアムズ群遺伝子 (WBSCR17) の同定と脳内発現 日本動物学会関東支部第 69 大会 2017 年 3 月 20 日 東京 (ポスター発表)

○ No. 16—67

研究テーマ 胎仔期から育成期にかけての $\omega 3$ 系列脂肪酸給与の有無がマウスの筋線維構成に及ぼす影響に関する研究

使用申請者 勝俣昌也

学内共同実験者 田中美帆

平成 28 年度の研究概要と成果

C57BL/6 雌マウスを $\omega 3$ 系列脂肪酸給与区と無給与区の 2 群に振り分け、1 週間の馴致期間後から産仔の離乳までそれぞれの飼料で飼育した。雌マウスは 9 週齢を過ぎてから、同時期に導入した同じ週齢の C57BL/6 雄マウスと交配し、妊娠させた。産仔が 3 週齢に達した時点で離乳させ、母マウスと別のケージで飼育した。産仔には母マウスと同じ飼料を給与した。産仔が 6 週齢に達した時点で腓腹筋とヒラメ筋を採取した。サンプル採取時の産仔の体重と腓腹筋重量への給与飼料の影響はなかった。

研究成果報告

なし



○ No. 16—68

研究テーマ 神経系と免疫系のクロストークに着目した急性膵炎の治療

使用申請者 塚本篤士

平成 28 年度の研究概要と成果

オピオイド受容体は主に神経系に局在する 7 回膜貫通受容体である。 μ 、 κ 、 δ の 3 つに分類され、主に痛みの制御を担っている。近年の研究で、 μ -opioid 受容体が痛みの他に、炎症の抑制に関連することが報告されている。本研究では、急性膵炎モデルマウスにおいて μ -opioid 受容体作動薬の抗炎症作用のメカニズムを検討した。RT-PCR の結果、膵臓組織において μ -opioid 受容体の mRNA 発現を認めた。蛍光二重免疫染色を実施したところ、 μ -opioid 受容体は主に膵島、血管平滑筋に高発現し、血管内皮細胞と一部の炎症細胞においても発現を認めた。 μ -opioid 受容体完全作動薬である DAMGO の投与により NF- κ B 活性の有意な変化は認められなかった。しかし、急性膵炎の誘発によって上昇した血管透過性は DAMGO の投与により有意に低下した。本研究の結果から、 μ -opioid 受容体作動薬による抗炎症効果のメカニズムには、血管内皮細胞の μ -opioid 受容体を介した血管透過性の調節が関連していると考えられた。

研究成果報告

なし

○ No. 16—69

研究テーマ 麻酔感受性に関わる環境因子の同定とエピゲノム解析

使用申請者 塚本篤士

平成 28 年度の研究概要と成果

本研究では、麻酔感受性に与える環境要因を特定するとともに、その制御機構を明らかにすることを目的として以下の検討を行った。

① 慢性ストレスによる麻酔感受性の変化

：慢性ストレス化で飼育したマウスは、通常環境で飼育したマウスと比較して麻酔感受性が低下する傾向にあった。

② 単独飼育と群飼育における麻酔感受性の違い

：単独飼育のマウスでは、群飼育のマウスと比較して麻酔感受性が低下した。

今後は採材したサンプルを解析し、麻酔感受性変化の制御機構を検討する予定である。

研究成果報告

なし



○ No. 16—71

研究テーマ 異物代謝酵素を含んだ細胞内画分の調整

使用申請者 関本征史

平成 28 年度の研究概要と成果

マウスおよびラットに対して異物代謝酵素の誘導剤を投与し、化学物質の代謝活性化に関わる異物代謝酵素を含んだ細胞内画分を調整することを計画した。しかし、申請年月日が年度末に近く、年度内に研究を実施することが困難だったため、本年度の実施は見送り、次年度に実施することとした。

研究成果報告

なし

○ No. 16—72

研究テーマ げっ歯類の精巢の石灰化およびヘモクロマトーシスの研究

使用申請者 宇根有美

学内共同実験者 神谷有美子 園田 朔

利用実験エリア 感染エリア

平成 28 年度の研究概要と成果

天然記念物である沖縄原産ケナガネズミと、ハダカデバネズミを病性鑑定したところ、前者に高度の精巢石灰化を、後者に高率に肝ヘモジデローシスを確認したことから、両疾患の病理発生を明らかにすることを目的とした。今回はハダカデバネズミの疾病解析を行った。同一施設で 15 匹の動物が 3 期に分けて死亡した。これらの動物を疫学的および病理学的に検索したところ、程度に差があるもののすべての動物の肝臓にヘモジデリンの沈着があり、鉄を添加した餌を与えられた動物でより高度であった。考察として、病勢悪化に食餌性ヘモジデローシスが深く関わっていると考えた。本種は低 O₂ に強く、常にビタミン D3 欠乏とされ、室温 30℃、湿度 60% の環境要求性も高く、他のげっ歯類とは異なる生理機構を持っている可能性があり、今後本種の鉄代謝関連因子について検討していく予定である。

研究成果報告

学会発表 神谷有美子 集団死したハダカデバネズミ (*Heterocephalus glaber*) の病理学的検索第 160 回日本獣医学会
会 2017 年 9 月 13 日 鹿児島県 鹿児島大学 口頭発表

麻布大学附置生物科学総合研究所 紀要第27号

(作成基準日：平成28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

担当事務 神藤 昭・磯野 裕之

