

2017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. 28



生物科学総合研究所紀要 28 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	5
生物科学総合研究所見取図	6
生物科学総合研究所規則	9
生物科学総合研究所紀要投稿規程	12
研究部門の活動状況	13
研究総括	14
プロジェクト No. P15-01	14
プロジェクト No. P15-02	18
プロジェクト No. P15-03	22
プロジェクト No. P15-04	27
プロジェクト No. P15-05	28
プロジェクト No. P16-01	31
プロジェクト No. P16-03	33
プロジェクト No. P16-04	36
プロジェクト No. P17-01	41
プロジェクト No. P17-03	44
共同利用施設部門	51
共同利用各施設部門	52
研究部門	52
各施設部門	52
動物実験施設	52
検疫動物飼育施設	52
SPF 動物実験施設	52
Clean 動物飼育施設	53
Conventional 動物飼育施設	53
感染実験施設	53
化学物質毒性実験施設	53
水生生物飼育施設	53
ラジオアイソトープ実験施設	53
遺伝子組換え実験施設	53
テーマ別活動状況	57
麻布大学バイオセキュリティー教育講演	87

生物学総合研究所概要

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
	教 授 獣医学博士	落合 秀治
事 務 室	課 長	角野 由香
(学術支援課)	主 査	神藤 昭
	主 任	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. 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. P16-03

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）

○プロジェクト No. P17-01

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 29 年 4 月 1 日～平成 32 年 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）

○プロジェクト No. P17-03

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 29 年 4 月 1 日～平成 32 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）

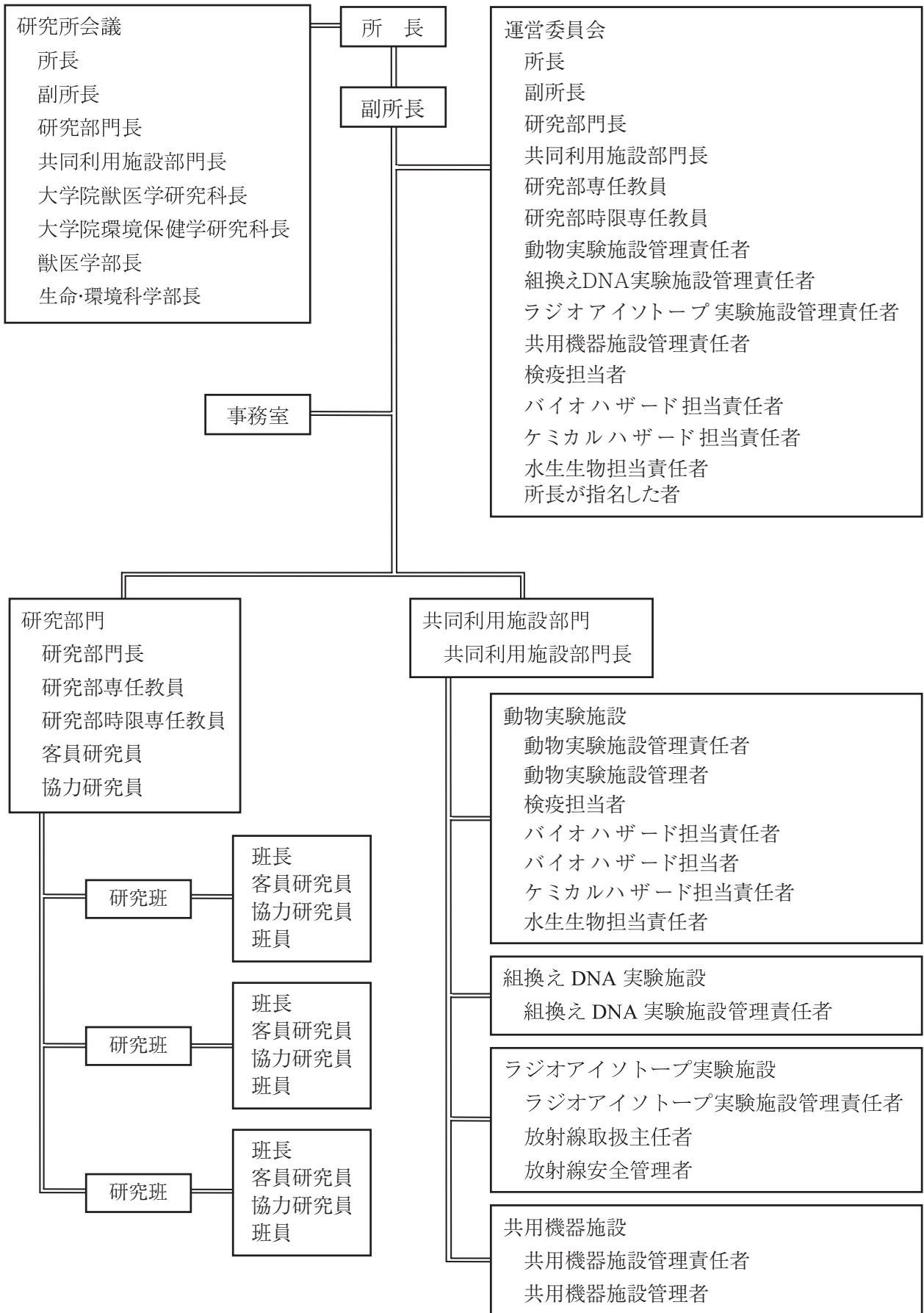
プロジェクト班員： 高木 敬彦（獣医学部 教授）

プロジェクト班員： 猪股 智夫（獣医学部 教授）

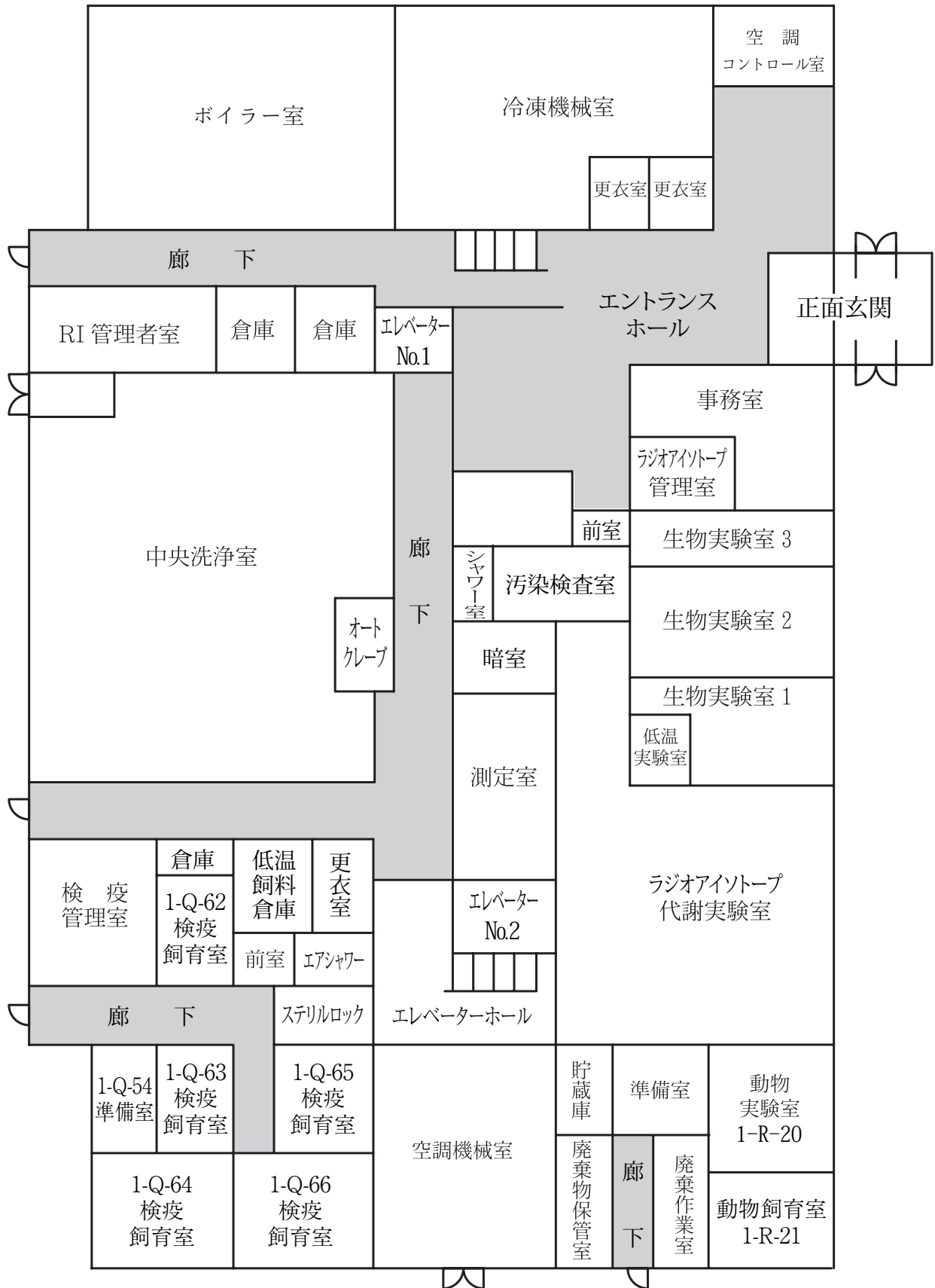
【 共 同 利 用 施 設 】

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	田原口智士 須永 藤子 須永 藤子 平 健介 須永 藤子 白井 明志 松井 久実	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 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	恩田 賢 落合 秀治 落合 秀治	獣 医 学 部 教 授 生物科学総合研究所 教 授 生物科学総合研究所 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	2-A-34 飼育室	
廊下	2-S-7 飼育室	前室	エレベーター No.1		エレベーター ホール	廊下	前室	2-A-40 飼育室	
	2-S-9 飼育室	前室	ステリルロック	2-A-41 飼育室					
	2-S-11 飼育室	前室	2-A-44 飼育室		前室		2-A-42 飼育室		
	2-S-13 飼育室	前室	2-A-36 飼育室	前室	2-A-45 実験室				
	2-S-15 飼育室	前室	2-A-38 飼育室	前室					
	2-S-17 飼育室		前室	飼料倉庫			解剖室	処置室	
	オートクレーブ		ステリル ロック	更衣室	エレベーター No.2		2-A-49 準備室		
作業室			エレベーター ホール	2-A-50 飼育室					
倉庫				空調機械室		前室	2-A-51 飼育室		

生物科学総合研究所見取図 3階

3-T-7 高温 飼育室	3-T-8 低温 飼育室	前室	廊 下	空調機械室				3-I-31 飼育室			
3-T-4 飼育室		前室						3-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	エレベーター ホール	3-I-37 飼育室	3-I-36 飼育室				
実験 前室	3-T-11A 原子吸光 設置室	3-T-11C GCSM 設置室	ステリル ロック	廊 下	3-I-39 飼育室	3-I-38 実験室					
3-T-13 実験室		3-T-12 電子スピ ン共鳴装 置設置室	オート クレーブ		更衣室	3-I-41 飼育室	3-I-40 飼育室				
秤量 室	3-T-14 準備室		更衣室		更衣室	3-I-43 飼育室	3-I-42 飼育室				
3-T-16 高分解能 ガスクロマトグラフ 質量分析計 設置室		3-T-15 クローズ キャビネット 設置室	更衣室		更衣室	洗浄室					
3-T-18 飼育室		前室	更衣室	更衣室	飼料 倉庫					倉庫	
3-T-20 飼育室			廊 下	エレベーター ホール	エレベーター No.2	前室	3-I-49 飼育室				
3-T-21 飼育室				廊 下	空調機械室		前室	3-I-51 飼育室			
					前室			前室	3-I-53 飼育室		
			前室			前室	3-I-55 飼育室				
			前室			前室	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す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 規則の改廃手続きは、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。

「麻布大学生物科学総合研究所紀要」投稿規程

第1条（趣旨）

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

第2条（発行及び編集）

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

第3条（発行時期）

本誌は、原則として年1回発行とする。

第4条（原稿執筆者）

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

第5条（掲載記事）

掲載記事は麻布大学生物科学総合研究所を用いて生まれた成果内容を中心とする。

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

第6条（転載の禁止）

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

第7条（原稿の形式・送付先）

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

執筆要項は別に定める。

提出先：〒252-5201

神奈川県相模原市中央区淵野辺 1-17-71

麻布大学内

麻布大学生物科学総合研究所紀要編集委員会事務局

電話 042-754-7111

第8条（著作権）

本誌に掲載された論文・記事の著作権は、全て編集委員会に帰するものとする。

附則

- 1 この規程は、平成25年10月15日から施行する。

研究部門の活動状況

研究総括

生物科学総合研究所・研究プロジェクト12件の研究テーマについて、平成29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. 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：2015年4月1日～2018年3月31日

プロジェクト班長：菊水健史（獣医学部）

プロジェクト班員：茂木一孝（獣医学部）

プロジェクト班員：永澤美保（獣医学部）

Summary

In humans, tear volume increases in emotional arousal. No studies have investigated the relationship of emotional arousal and tear volume in animals. Using mice model, oxytocin receptors were highly expressed in the acinar cells (AC) in the lacrimal gland, and oxytocin stimulations increased Ca²⁺ influx and shrinkage of the AC, resulting in secretion of tear. Oxytocin receptor null mice or oxytocin antagonist treatment abolished the effects of oxytocin on tear secretion both in vitro and vivo. Thus, tear volume increased in emotional arousal and oxytocin can mediate the emotion-induced tear secretion.

Introduction

Humans often exhibit increased lacrimation, which appears as tears, in situations involving in pain. Tears are continuously secreted in small quantities and as a protective reflex to irritants, and act as a protective barrier, and disinfecting. Interestingly, humans also have emotional tears that are secreted in response to emotional arousal, both in positive and negative. Tears also have a role in nonverbal visible communication, and are used when infants want to communicate negative feelings, such as hunger, pain, and discomfort, to their parents. Moreover, tear can be observed in high-positive emotional states, such as reunion with parents or friends, and victory or success after the large efforts. In these situations, emotional hormone, oxytocin, is secreted into both the central nervous system as well as peripheral organs. Aqueous tear fluid is secreted from the lacrimal gland (LG) and like other peripheral organs, is regulated by direct innervation by the central nervous system and a wide variety of hormones through receptor-mediated mechanisms (1). In this study, we hypothesized that tear secretion is controlled by oxytocin. The functional mechanisms of oxytocin in tear secretion were examined in mice models, in which tear secretion mechanisms can be visualized.

Methods

Animals

Ten-week-old C57BL/6, Oxt^rVenus-Neo/+ mice (4), and Yellow Cameleon 3.60 (YC3.60) mice (8) were used in this study. The mice were housed in general conditions; room temperature 23 ± 2°C, relative humidity 60 ± 10%, and alternating 12-hour light-dark cycle (8 AM to 8 PM), with free access to food and water.

Quantitative real time PCR

Male and female C57BL/6 mice were euthanized with an overdose of pentobarbital sodium. The olfactory bulb (OB), lacrimal gland (LG), and mammary gland (MMG) were quickly dissected. Total RNA was isolated using an RNA extraction

reagent (ISOGEN; Nippon Gene, Tokyo Japan), according to the manufacturer's instructions. The RNA was converted to cDNA by reverse transcription using the ReverTra Ace qPCR RT kit (TOYOBO, Osaka, Japan). SYBR Green-based quantitative real-time PCR was performed using the Step One Plus system (Applied Biosystems, Framingham, MA, USA) using a specific primer set. The primer sequences were as follows: GAPDH (sense 5'-ACCCAGAAGACTGTGGATGG-3', antisense 5'-GGATGCAGGGATGATGTTCT-3'), oxytocin receptor (Oxtr; sense 5'-ACGGGTCAGTAGTGTCAAGC-3', antisense 5'-TAATGCTCGTCTCTCCAGGC-3'). Data were normalized to GAPDH.

Visualization of oxytocin receptor (OXTR) in the lacrimal gland (LG)

C57BL/6 mice and OxtrVenus-Neo/+ mice were euthanized with an overdose of pentobarbital sodium and their LG were quickly dissected.

To observe the endogenous Venus fluorescent protein, LG isolated from OxtrVenus-Neo/+ mouse was stained with phalloidin-labeled wheat germ agglutinin (WGA: 1:500 dilution; Vector Laboratories, Burlingame, CA, USA), which binds to lectins and act as a marker for the cell surface (5), at room temperature (approximately 23°C) for 30 minutes. WGA-stained LG was washed three times with a saline solution (140 mM NaCl, 5 mM KCl, 2 mM CaCl₂, 1 mM MgCl₂, 10 mM HEPES, and 10 mM dextrose; pH 7.4) for 3 minutes.

To localize OXTR, the LG isolated from OxtrVenus-Neo/+ mouse was fixed in 4% paraformaldehyde in 0.1 M phosphate buffer. After fixation, it was blocked with 10% donkey serum in PBS containing 0.25% Triton X-100 for 1 hour at room temperature. The LG was incubated overnight at 4° C with a goat polyclonal antibody against green fluorescence protein (GFP: 1:200 dilution, Abcam, Cambridge, MA, USA) and a rabbit polyclonal antibody against calponin, a specific MEC marker (6), (1:250 dilution, Abcam). It was washed with PBS, and incubated with Alexa Fluor 488-conjugated donkey-anti goat and Alexa Fluor 555-conjugated donkey-anti rabbit secondary antibody (1:300 dilution, Molecular Probes, Eugene, OR, USA) for 3 hours at room temperature, and subsequently washed with PBS.

WGA-stained or immune-stained LG was observed with an upright two-photon microscope (FV1200MPE: Olympus, Tokyo, Japan) equipped with a water immersion objective lens (XLPlaN25 × /1.05WMP, Olympus), which was connected to a femtosecond laser source, Ti: sapphire laser (MaiTaiHP: Spectra Physics, Santa Clare, CA, USA). The excitation wavelength for endogenous Venus, WGA, Alexa-488, and Alexa-555 was 790 nm, and the emission was simultaneously detected through a band-pass filter for endogenous Venus and Alexa-488 (510-550 nm), and WGA and Alexa-555 (575-630 nm). Fluorescence images at a depth of approximately 50 μm from the surface of LG were reconstructed from 50 images acquired at a z-step size of 1 μm using Imaris software (Bitplane AG, Zurich, Switzerland).

Measurement of tear secretion

Tear secretion was measured using a modified Schirmer's test (14). A phenol red thread (Zone-Quick; Showa Yakuhin Kako, Tokyo, Japan) was placed on the temporal side of the upper eyelid margin for 15 seconds. The length of the moistened area from the edge was measured.

For the evaluation of the effect of intravitral exposure to OXT on tear flow rate, mice were placed in a lateral position, and the skin on the right temporal side of the head was incised under the mice were anesthetized with intraperitoneal injection of urethane (1.1 g/kg). After the LG was exteriorized, a custom-build ring was attached to the masseter muscle using a cyanoacrylate-based glue (Loctite, Henkel Japan, Yokohama, Japan) surrounding the LG. The perfusion chamber was fitted on the ring fixed to a head-holder. The LG was continuously perfused with saline solution at flow rate of 0.8 mL/minute. Solution of OXT (100 nM) was applied to the LG for 10 minutes. To evaluate the inhibitory effect of atosiban (100 nM) and BDM (10 mM) on OXT-induced increased tear secretion, each solution was applied to the LG 5 min before the application of OXT. Tear secretion was measured 5 and 10 min before and 1 minute after the start of OXT application. Tear flow rate was determined by dividing the moistened length of the phenol red thread due to tear secretion for 15 seconds and that due to permeation of 1 μL of saline.

For the evaluation of the effect of intravenous injection of OXT on tear secretion, OXT was injected at the dosage of 1 mg/kg via the tail vein of C57BL6 and OxtVenus-Neo/+ mice. Tear secretion measurements were performed as mentioned above, before and after 1, 3, 5, 7.5, and 10 minutes of the OXT injection.

For the measurement of tear secretion in the lactating mice, 12-15 week-old female mice 5 days after parturition and age-matched female mice (control) were used.

Statistical analysis

Statistical analyses were performed by JMP12 software (SAS Institute, Cary, NC, USA). Comparison between the two groups was done using the F-test followed by Student's t-test for parametric variables and Mann-Whitey U test for non-parametric variables. Multiple comparisons were performed by one-way ANOVA followed by Dunnett test. Differences between the measured variables were considered significant if the resultant P-value was 0.05 or less.

Results

Gene expression level of OXTR in the LG was found to be the same as in the mammary gland (MMG), but was less compared to the expression in the olfactory bulb (OB); the expression of OXTR is well-documented in animals and humans (2). Although sexual dimorphism in the gene expression of OXTR was observed in the MMG, there was no significant difference in the OXTR expression level in the LG between male and female.

The LG is a tubuloacinar exocrine gland, with branching lobule-like structures similar to MMG. Each secretory lobule is an aggregation of spherically shaped acinar cells (AC) with stellate-shaped myoepithelial cells (MEC) covering them with a basket-like network (3). To investigate the localization pattern of OXTR in LG, immune-histochemical analysis were performed in OXTR-Venus knock-in (OxtVenus-Neo/+) mice (4) by two-photon imaging; lobule-like structures were visualized by staining with wheat germ agglutinin (WGA), a marker for cell surface (5). Stellate-shaped OXTR positive areas were observed, bordering the AC with a network pattern. Double staining with calponin, a specific MEC marker (6), revealed that the OXTR was expressed on MEC. In the wild-type mice, networked calponin-positive area was seen in the LG, but there was no Venus-positive area. These results suggested that the presence of OXTR in the LG, and its localization is specific to the MEC.

Exposure to OXT transiently increased tear flow rate. This increase was significantly suppressed in the presence of atosiban or BDM. Significant increase were observed during OXT exposure compare to saline. In the OxtVenus-Neo/+ mice, tear flow rate was unchanged during exposure to OXT. Exposure to ACh increased the tear flow rate in the OxtVenus-Neo/+ mice to the same level as in wild type mice. Exogenously injected OXT by intravenous routes significantly increase in increased tear secretion in wild type mice. In contrast, tear secretion did not change after injection of OXT in the OxtVenus-Neo/+ mice. It is a well-known fact that endogenous blood levels of OXT are elevated during the lactation period mammals (7). Tear secretion level in lactating mice was significantly higher (approximately 1.5-fold) than that in age-matched non-lactating female mice. Weeping, a process that involves tearing, was marked by transient secretion that synchronized with overwhelmed emotional expression; therefore it is reasonably assumed that the role of OXT in weeping is an instantaneous expulsion of the tear fluid forced by LG MEC contraction.

References

1. Dartt DA. Neural regulation of lacrimal gland secretory processes: relevance in dry eye diseases. *Prog Retin Eye Res.* 28, 155-177 (2009).
2. Gimpl G. Fahrenholz F. The oxytocin receptor system: structure, function, and regulation. *Physiol Rev.* 81, 629-683 (2001).

3. Satoh Y. Oomori Y. Ishikawa K. Ono K. Configuration of myoepithelial cells in various exocrine glands of guinea pigs. *Anat Embryol (Berl)*. 189, 227-236 (1994).
4. Yoshida M et al., Evidence that oxytocin exerts anxiolytic effects via oxytocin receptor expressed in serotonergic neurons in mice. *J Neurosci*. 29, 2259-2271 (2009).
5. Borges LF. Sidman RL. Axonal transport of lectins in the peripheral nervous system. *J Neurosci*. 2, 647-653 (1982).
6. Makarenkova HP. Dartt DA. Myoepithelial Cells: Their Origin and Function in Lacrimal Gland Morphogenesis, Homeostasis, and Repair. *Curr Mol Biol Rep*. 1, 115-123 (2015).
7. Higuchi T. Tadokoro Y. Honda K. Negoro H. Detailed analysis of blood oxytocin levels during suckling and parturition in the rat. *J Endocrinol*. 110, 251-256 (1986).

○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：2015年4月1日～2018年3月31日

プロジェクト班長：菊水健史（獣医学部）

プロジェクト班員：茂木一孝（獣医学部）

プロジェクト班員：永澤美保（獣医学部）

要旨

マウスにおいて、母性行動の形質が次世代にも伝承することが明らかになっており、母性行動の質の高い親に育てられた個体は、母性行動の質が高く、早期離乳されて育った個体は、母性行動の質が低くなることが分かっている。しかし、その伝承メカニズムについては不明であった。そのため、その伝承が胎児期における環境の違いによるものなのか、母親から受けた母性行動の質によるものか、あるいは腸内細菌叢の伝播によるものなのかについて調べた。

本研究では、通常離乳と早期離乳の仔を入れ替え、仔の成長後の母性行動を観察した。さらに母親と仔の糞便から腸内細菌叢の解析を行い、母性行動との相互性を検討した。その結果、母性行動は産みの親ではなく、育ての親に影響を受ける傾向が見られた。また腸内細菌叢は産みの親と育ての親の影響を受けていた。今後、さらなる例数追加によって腸内細菌叢と母性行動発現の関係を明らかにしたい。

緒言

ラットにおいて、licking や grooming をする割合の高い母親に育てられた仔は、それらの行動の割合が低い母親に育てられた仔に比べて、成長後のストレス反応が低く、学習能力も高いことから (1, 2)、母性行動の質と量が仔の行動発達に重要な影響を及ぼすことがわかっている。また、この母性行動の質は、親から仔へと受け継がれ、質の高い母性行動を示す母親に育てられた仔は、成長後に質の高い母性行動を示し、逆に、質の低い母性行動しか示さない母親に育てられた仔は、同様に質の低い母性行動を示すことも明らかとなっている (2, 3)。アカゲザルにおいても、母親のいない状況下で育ったサルは自分の仔に対して全く示すことができず、生まれたばかりの仔を無視したり、虐待したりする様子がみられる。そして、このような母性の低下は少なくとも3世代まで及ぶことが認められた (2-4)。

また、このような母性行動形質の次世代への伝承は C57BL/6 系統マウスでも見られることが明らかになっており、母性行動の質が高い親に育てられた個体は母性行動の質が高く、早期離乳されて育った個体は、母性行動の質が低くなるということが分かっているが、その伝承が胎児期における環境の違いによるものなのか、あるいは母親から受けた母性行動の質による影響なのかは明らかになっていない。もしも遺伝的なメカニズムではなく、母性行動の質によるものならば母性行動の質が低い母親から生まれた子でも、母性行動の質の高い親に育てられれば母性行動の質が回復する可能性が考えられる。

さらに、近年の研究では母子間の腸内細菌叢の伝播の重要性が問われており、ヒトにおいても母親の腸内細菌叢が子に伝播することが分かっている (5)。本研究室における無菌マウスの飼育などからも、腸内細菌叢が変化することで母性が低下し、その親の腸内細菌叢が仔に伝承することで、母性の低下の伝承に繋がっている可能性が考えられる。

そこで本研究では、母性行動の質の伝承が、親の母性行動の質あるいは腸内細菌叢によるものかを調べるために、通常離乳した雌と早期離乳した雌を同日出産させ、生まれた仔を里子操作し、その仔たちの母性行動の質と、腸内細菌叢を比較した。

材料と方法

供試動物

F1（親世代）の雌の供試動物として、日本クレア株式会社より導入され本研究室において繁殖維持されてきた C57BL/6 マウスを早期離乳した個体と、通常離乳した個体を用いた。早期離乳は生後 16 日目、通常離乳は生後 28 日目

に行った。雄の供試動物は日本クレア株式会社より導入され本研究室において繁殖維持されてきた C57BL/6 マウスを通常離乳したものをを用いた。

F2（次世代）の供試動物は、F1 の仔に対し里子操作したものを通常離乳した個体を用いた。

飼育環境

動物は温度 23℃、湿度 50%、明期 12 時間（6 時点灯、18 時消灯）に調節された動物室内で中ケージ（17.5 cm × 24.5 cm × 12.5 cm）で飼育された。床敷きには Corn Cob、巣材を用いた。飼料は、繁殖中には繁殖用固形飼料として、マウス・ラット・ハムスター繁殖用を使用した。飼育用繁殖用ケージともに、床敷きの交換は原則 1 週間に 1 度とした。飼育中には飼育用固形飼料として、マウス・ラット・ハムスター繁殖用を使用し、給餌した。水は自由摂取とした。

繁殖

供試動物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。雄は、雌のプラグ（陰栓）が確認でき次第外した。仔マウスは誕生日を 0 日齢（P0）とし、離乳操作まで親仔ともに同一ケージにて飼育した。

里子操作

通常離乳と早期離乳された個体間で、片方が出産後その 24 時間内にもう一方が出産した場合、その中から雌の仔を 1~2 匹指切りによる個体識別を施した後に、通常離乳雌から産まれた仔を早期離乳雌に、早期離乳雌の仔を通常離乳雌に育てさせ、その母性行動の量を観察した。

母性行動解析

仔が産まれた日を 0 日目として、6:00 ~ 17:00 間の 1 時間おきのマウスの様子を、9 日目まで毎日録画した。そのうち 1, 3, 5, 7, 9 日目の計 30 時間分を解析した。観察した項目は仔なめ / 毛づくろい行動（licking/grooming）、仔に接している（parental contact behavior）、仔から離れている（parent off pup）の 3 つである。各 1 時間を 3 分ごとに区切り、3 項目の発現回数について、瞬間サンプリングを行った（図 4-3）。1 日の各項目の発現回数合計を 1 日の最大発現数 120 回で割り、各項目の 1 日当たりの割合を求めた。また、早期離乳群と通常離乳群に分け、一変量分散分析（ANOVA）を行い、主効果と交互作用を検定した。さらに群間における各行動の比較は、有意差が検出された項目について多重比較検定 Bonferroni を行った。すべての統計処理は SPSS statistics 22.0 を用い、有意水準は 5% とした。

次世代マウス

里子操作をした F2 のマウスを性成熟するまで飼育し、供試動物雄と繁殖を行い、出産後、同様に母性行動解析を行った。

糞便採取

糞便採取は、底を切り取った中ケージの底に滅菌ガーゼ（スズラン株式会社）を張り付け、通常の中ケージに重ね、蓋の上にマウスを乗せて行った。滅菌ガーゼに落ちた糞を細菌叢解析用サンプルとして採取した。採取後は、無菌空間で 1 × PBS を 1 ml、40% Gly を 1 ml 入れた 15 ml チューブに入れ竹串で粉碎後、-80℃で保管した。

また、糞便採取は、母マウスが「妊娠期」、「出産後」、「仔が 2 週齢の時」、「仔が 3 週齢の時」、「仔が 4 週齢の離乳後」の 5 ポイントで行い、2 週齢以降の仔マウスも同時に採取を行った。細菌叢解析の際には、「仔が 2 週齢の時」と「3 週齢の時」の 2 つの時期を合わせて「育児期」としている。

糞便内の細菌ゲノム抽出と解析

-80℃で凍結していた糞便サンプルは、氷上で融解してから本実験に用いた。まず、サンプルの懸濁液を 100 μ 径のセルストレイナーに通し、1 × PBS、TE10 でサンプルを洗浄した後、ペレットを TE10 に懸濁した。Lysozyme と Achromopeptidase による溶菌処理後に、SDS と ProteinaseK によりタンパク質の分解、フェノール / クロロホルム / イ

ソアミルアルコール処理でタンパク質の除去を行った。得られた上清に3M 酢酸ナトリウムとイソプロパノールを加えて4℃・12000 rpm・15min で遠心した。デカントしてさらに75% エタノールでリンスをした。上清を除去した後、乾燥して、4℃で一晩1×TE 600 μl に溶解した。75% エタノールでリンスした後、上清を除き、乾燥させ、1×TE 50 μl に溶解した。

抽出を行ったサンプルは、NanoDrop™ Lite 分光光度計と Qubit® 3.0 フルオロメーターを使用して、濃度 (ng/μg) と精度 (A260/A280) を計測した。精度が1.6以上であったサンプルを、理化学研究所の宮内栄治氏にご協力いただき、16S rRNA 遺伝子の高頻度可変領域である V4 領域において PCR 法によって増幅後、シーケンス、OTU 解析していただいた。

解析結果から、細菌同士で相関をとり、似たような増減パターンを示すものでグループ分けを行った。そのグループ分けをもとに、妊娠期、出産後、育児期、離乳後の4つの時期、また次世代の EW → NW、NW → NW、EW → EW、NW → EW の4郡での細菌叢の変化と違いを見た。さらに、細菌叢と母性行動間に相関が見られるかを検討した。細菌叢と母性行動の相関については、JMP ver.11 を用い、有意水準は5%とした。

結果

親世代の母性行動

里子操作をした後の母性行動の質を調べた。その結果として、早期離乳親 (EW) と通常離乳親 (NW) との差は微小なものとなったが、仔なめ (Licking/grooming) はわずかながらに NW の方が高く、仔と接している頻度も NW の方が高めに高いことが分かるが、全ての項目において有意な差は認められなかった (仔なめの PD1 においては、傾向が見られた ($P<0.1$))。

次世代の母性行動

次世代の母性行動の結果では、NW → NW は通常離乳親産まれ通常離乳母育ち、EW → EW は早期離乳母産まれ早期離乳母育ち、NW → EW は通常離乳母産まれ早期離乳母育ち、EW → NW は早期離乳母産まれ通常離乳母育ちを示している。

産みの親が同じ場合と、育て親が同じ場合でそれぞれ比較したところ、産みの親が EW の場合の、EW → EW と EW → NW の仔なめ行動 (Licking/grooming) は、PD7 において有意な差が認められた ($p<0.05$)。また、育て親が EW の場合の、EW → EW と NW → NW の、PD5 では仔から離れていた頻度で傾向が見られた ($p<0.1$)。育て親が NW の場合の、NW → NW と EW → NW では、PD3、PD5、PD9 での仔から離れていた頻度が NW → NW の方が有意に高い結果となった。

細菌叢解析と母性行動

解析結果から、似たような増減パターンを示す細菌でグループ分けを行い (CAG clustering)、それぞれのグループを CAG1 ~ 6 とした (図 4-9,1)。親世代と次世代の、妊娠期から仔離乳後までの全体的な細菌叢の変化を見たところ、出産後における細菌叢で、大幅な変化があることが分かった。また次世代 EW → NW、NW → NW、EW → EW、NW → EW の4郡の細菌叢の比較においても、妊娠期から出産後には細菌叢の変化が見られた。中でも、出産後の EW → EW の細菌叢が、他の郡と異なっていた。

さらに、細菌の OTU 数、母性行動 (指標を仔なめ行動 (Licking/grooming) とした) の相関を調べ、その中から相関がある可能性の高い細菌を一部抜粋した。正の相関が見られた細菌として、ポルフィロモナス科、アサッカロバクター属、負の相関が見られた細菌として、クロストリジウム XIVb、ヘリコバクター属、ラクトコッカス科、未分類菌 Bacteria unclass が挙げられた。また正の相関も負の相関も見られた細菌として、Ruminococcaceae、Lachnospiraceae があった。

文献

1. Liu, D., Diorio, J., Day, J. C., Francis, D. D. & Meaney, M. J. Maternal care, hippocampal synaptogenesis and cognitive

- development in rats. *Nat. Neurosci.* 3, 799-806 (2000).
2. Liu, D., Caldji, C., Sharma, S., Plotsky, P. M. & Meaney, M. J. Influence of neonatal rearing conditions on stress-induced adrenocorticotropin responses and norepinephrine release in the hypothalamic paraventricular nucleus. *J. Neuroendocrinol.* 12, 5-12. (2000).
 3. Champagne, F., Diorio, J., Sharma, S. & Meaney, M. J. Naturally occurring variations in maternal behavior in the rat are associated with differences in estrogen-inducible central oxytocin receptors. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 98, 12736 (2001).
 4. Harlow, H. F. & Suomi, S. J. Nature of love--simplified. *Am. Psychol.* 25, 161-168 (1970).
 5. 布山裕一, 外岡俊樹, 和田靖之, 久保政勝 & 井田博幸. *Bifidobacterium* 菌株の母子間伝播について (原著). (2013).

○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析

研究期間：2015年4月1日～2018年3月31日

プロジェクト班長：菊水健史（獣医学部 伴侶動物学）

プロジェクト班員：茂木一孝（獣医学部 伴侶動物学）

プロジェクト班員：永澤美保（獣医学部 伴侶動物学）

Abstract:

Acoustic signals are widely used as courtship signals in the animal kingdom. It has long been known that male mice emit ultrasonic vocalizations (USVs) in the presence of female mice or in response to female secretions. This observation led to the hypothesis that male USVs play a role in courtship behavior. Although previous studies showed that female mice have a social partner preference for vocalizing males, it is not known if they exhibit a sexual partner preference when given a choice. To address this issue, we examined the copulatory behaviors of female mice with either devocalized males (with or without the playback of the USVs) or sham-operated males in two different behavioral paradigms: free interaction paradigm in the home cage of a male mouse (without choice of mating partners) or the mate-choice paradigm in a three-chambered apparatus (with choice of mating partners). In the free interaction paradigm, female mice exhibited comparable sexual receptivity with sham-operated and devocalized males. In addition, we found that female mice showed more approach behavior towards devocalized males when male USVs were played back. In the mate-choice paradigm, female mice visited more frequently and stayed longer with sham-operated than devocalized males. Furthermore, we showed that female mice received more intromissions from sham-operated males than devocalized males. In summary, our results suggested that, although female mice can copulate equally with both devocalized and vocalizing males when given no choice of mating partner, female mice exhibit both sexual and social partner preferences for vocalizing males in the mate-choice paradigm.

Introduction

Acoustic signals are used as courtship signals by males in many species, including insects, frogs, and birds. Male mice have long been known to emit ultrasonic vocalizations (USVs) in the presence of females or in response to female urine (Whitney et al., 1973; Nyby et al., 1977). Recent studies showed that mice USVs exhibited a song-like structure in the sense that they consisted of several syllables, and the structure of male USVs were innate and variable between individuals (White et al., 1998; Holy & Guo, 2005; Kikusui et al., 2011; Sugimoto et al., 2011). These results suggested that male USVs play a role in copulatory behavior, perhaps serving as a courtship song.

In accordance with this hypothesis, previous studies found that female mice preferred to stay longer with vocalizing males than with devocalized males, and female mice approached the source of male USVs (Pomerantz et al., 1983; Hammerschmidt et al., 2009; Asaba et al., 2017). These results indicated that female mice have a social partner preference for vocalizing males. However, since it has never been examined in the mate-choice paradigm, it remains unclear whether a social partner preference is eventually translated into a sexual partner preference.

The present study aimed to determine if female mice have a sexual partner preference for vocalizing males. If a female mouse had more copulations with one male compared to with another male in the behavioral experiment, we considered that the female mouse had a sexual partner preference towards the former male (Winslow, 2003; Zinck & Lima, 2013). In Experiment 1, a female mouse was paired with either a single devocalized male mouse (with or without the playback of the USVs) or a sham-operated male mouse (a choice of mating partner was not allowed), and their social interactions were examined. We tested if the presence of actual USVs or the playback of the USVs affected female sociosexual behavior. A previous study showed that the sexual partner preference of female mice for a different strain

of mice was only revealed in the mate-choice paradigm, but not in the no-choice paradigm (Zinck & Lima, 2013). Thus, in Experiment 2, we further tested the effects of male USVs on female sociosexual behavior in the mate-choice paradigm, where a female mouse was able to freely choose a mating partner between a devocalized or a sham-operated male mouse.

Materials and Methods

Animals

We used C57BL/6 female mice and Jcl:ICR male mice (purchased from Japan Clea; maintained in the laboratory). These two different strains were chosen because of their different body size. Jcl:ICR mice are generally bigger than C57BL/6 mice. In Experiment 2, to restrict males' movements between behavioral chambers, we used tunnels so narrow that only female mice, but not male mice, could pass. In Experiment 1, we obtained the data by using 16 males (age: 3–6 months old) and 63 females (age: 3–5 months old). In Experiment 2, we reported the data from 7 triads, each of which consisted of one female and two males. Thus, we used 7 females (age: 2–3 months old) and 14 males (age: 2–4 months old). Females were housed in groups, and males were individually housed (temperature: 23 °C; humidity: 50 %; 12:12 light/dark cycle; lights on 06h00). Food and water were available ad libitum.

In Experiment 1, female mice were ovariectomized using the standard procedures, implanted with a silicone tube containing 17β -estradiol (sealed at both ends; inner diameter: 1 mm; outer diameter: 2 mm; length: 10 mm), and allowed at least two weeks for recovery (Ström et al., 2012). Female mice were primed with progesterone (0.03 ml at a concentration of 10 mg/ml, Wako, Japan) four hours prior to the behavioral experiment. Female sexual receptivity was hormonally induced because we aimed to examine the effects of male USVs on female sexual behavior. If a female mouse received any intromissions during the behavioral experiment, this female was not used in the subsequent experiments. Thus, all female mice were sexually naive. In Experiment 2, female mice were sexually naive and naturally cycling, and their estrous stages were monitored daily. We used a different method to induce female sexual receptivity because we would like to examine the effects of male USVs on female sociosexual behavior in longer time scale in Experiment 2. In both Experiments, males were sexually experienced by allowing him to have copulations with a female that was not used in the following behavioral experiments. The females used for male sexual training were novel to the male. All procedures were performed in accordance with the guidelines of "Policies Governing the Use of Live Vertebrate Animals" of Azabu University, and were approved by The Ethical Committee for Vertebrate Experiments of Azabu University (ID #160303-6).

Experiment 1

Apparatus

Behavioral experiments were performed in the home cage of a male mouse (17.5 cm × 24 cm × 12.5 cm). The experiments were videotaped using a camera that was located above the arena. A USVs-sensitive microphone (Day 1) or the USVs emitter (Day 3 and Day 4) was placed next to a metal-mesh hole (diameter: 5 cm) on the cage. A red tag (1 cm × 1 cm) was glued to the neck of the male mouse to facilitate offline behavioral analyses.

Experimental procedures

All male mice underwent five behavioral experiments for five consecutive days. In each experiment (one hour each), a male mouse was paired with a female mouse that was novel to the male during the light phase of the day. As described in the previous section, all female mice were sexually naive, and hormonally primed to induce sexual receptivity. Each experiment was conducted in a sound-attenuated box.

The behavioral experiments started on Day 1. Male and female mice were allowed to have social interactions and copulations freely prior to the devocalization procedures. Then, in the afternoon of Day 1, half of the males were devocalized via dissection of the inferior laryngeal nerve (Nunez et al., 1985; Asaba et al., 2014). The remaining half of the males were subjected to sham surgeries. The behavioral experiments were repeated from Day 2 to Day 5. For devocalized

males, their own USVs, which were recorded on Day 1 (during the first five minutes of the experiment; before the devocalization procedures), were played back during the first five minutes of the experiment on Day 3 and Day 4, while the USVs were not played back on Day 2 and Day 5.

USVs playback

USVs were recorded on Day 1 using a USVs-sensitive microphone (sampling rate: 300,000 Hz; bandpass filtered between 20,000 Hz and 145,800 Hz; Condenser Ultrasound Microphone CM16/CPA; Avisoft Bioacoustics, Germany), and recordings were stored on a PC through A/D conversion (Avisoft-UltraSoundGate 416-200, Avisoft Bioacoustics, Germany). USVs signals were digitally edited to remove environmental noises. The first five minutes of the prerecorded USVs signals were played back (Avisoft UltraSoundGate National Instruments Acquisition, Avisoft Bioacoustics, Germany), amplified, and transmitted to a nanocrystalline silicon (nc-Si) emitter as previously described (Uematsu et al., 2007).

Analysis

Behavioral videos were analyzed using EthoVision software (Noldus, The Netherlands), and then manually annotated. Several behavioral measures, including the number of approaches, were calculated based on the positions of two mice tracked by EthoVision. Furthermore, we manually annotated the occurrence of sniffing behavior (body and anogenital), grooming, mounting attempts, and intromissions. For each experiment, the receptivity index of each female mouse was calculated as the ratio of the number of successful intromissions to the number of total mounting attempts. The receptivity index reflected how sexually receptive a female was in response to male's mounting attempts. To assess the amount of male USVs, male USVs on Day 1 were automatically detected (peak frequency, 20,000–250,000 Hz; minimum duration, 5 ms), and the total duration of male USVs was calculated by commercial software.

We performed a generalized linear mixed model (GLMM) analysis on behavioral measures using the `glmmTMB` package in R. Briefly, for each behavioral measure, the appropriate distribution (normal, negative binomial, or binomial distributions) was specified with a canonical link function. The parameters were estimated based on maximum likelihood estimations using a Laplace approximation or a restricted maximum likelihood estimation. The parameter estimates were tested using a Wald z-test with a significance level of 0.05. Regarding the fixed effects, we used the following four explanatory variables: (1) if a male mouse was devocalized or sham-operated; (2) if USVs were played back or not; (3) whether a mouse already received surgery; and (4) the order number of the experiment (as a categorical variable). Since the male mice were used in multiple experiments, the identities of male mice were used as the random effect.

Experiment 2

Apparatus

The apparatus consisted of three chambers. The largest chamber (14 cm × 30.5 cm × 20 cm) was designated as the “neutral zone”. Two smaller chambers (24.8 cm × 14.3 cm × 20 cm) housed males. The largest chamber was connected to the smaller chamber with a transparent tunnel (2.2 cm × 2 cm × 6.2 cm), which was so narrow that only females were able to pass through it. The room light was continuously on to enhance the quality of video recordings. Each mouse was provided with three or four food pellets, and water was available ad libitum.

Experimental procedures

Diestrus females were used in the experiment because our previous study showed that female mice exhibited a robust social partner preference in the diestrus stage (Asaba et al., 2014). The estrous stages of female mice were monitored daily between 09h00 and 11h00. If a female was in the proestrus stage, she was isolated on the next day, and the experiment started two days later when the female would be in the diestrus stage, which was confirmed by histological

examination of vaginal lavage. The female mouse was introduced into the neutral chamber at 09h00, and was habituated for two hours. The examined female mice did not show a preference for a particular chamber during habituation (data not shown). Sham-operated and devocalized male mice were introduced into their own small chambers at 11h00. The experiment was conducted in a sound-attenuated box for 48 hours, during which social interactions were videotaped by two motion-activated cameras (Angel eye HD; YK Musen). Because the cameras were activated upon motion detection, the movement of a male mouse or social interactions between a female and a male were recorded in real time.

Analysis

We analyzed behavioral videos, including social interactions between males and females. Several behavioral measures such as female visits, mounting attempts, and intromissions were manually annotated. We did not analyze ejaculation because of its rare occurrence. The entire 48-hour period was divided into four 12-hour time windows, which corresponded to the light/dark cycle to which mice had been accustomed. For each time window, the occurrence of behavior, total duration of visits, and receptivity index were calculated. We could not define the receptivity index for three mice (one sham-operated and two devocalized males), because these mice did not attempt to mount the female mouse. We performed the GLMM analysis on behavioral measures. In addition to the statistical models used in Experiment 1, we used the zero-inflated model for the numbers of mounting attempts and intromissions, since there were considerable numbers of zero-valued observations. In some analyses, we set the offset term as the logarithm of total visit time to correct the count data for total visit time. Regarding the fixed effects, we used the following two explanatory variables: (1) if the male mouse with which the behavior occurred was devocalized or sham-operated; and (2) the order number of the time window (as a categorical variable). Since female mice can perform copulatory behaviors with both sham-operated and devocalized males, the identities of female mice were used as the random effect.

Results

Experiment 1

We first examined if the amount of male USVs affects mouse sexual behavior by analyzing the data on Day 1 when all male mice were intact. We found that the total duration of male USVs was not significantly correlated with the number of mounting attempts (Pearson's $r = 0.35$, $P = 0.1835$), the number of intromissions (Pearson's $r = 0.35$, $P = 0.1825$), and the receptivity index (Pearson's $r = 0.31$, $P = 0.2471$).

Next, we examined the effects of the devocalization procedures and the playback of the USVs by using the GLMM analysis. The results indicated that the devocalization procedures did not affect the number of mounting attempts (parameter estimate (β) = 0.7569; standard error (SE) = 0.8192; $z = 0.924$; $P = 0.36$; negative binomial distribution 1) or the number of intromissions ($\beta = 0.39592$; SE = 0.83762; $z = 0.473$; $P = 0.64$; negative binomial distribution 1). Notably, the receptivity indexes associated with sham-operated males were not significantly different from those of devocalized males ($\beta = 0.2701$; SE = 1.1589; $z = 0.233$; $P = 0.82$; binomial distribution). Sham-operated males sniffed female bodies shorter ($\beta = 88.061$; SE = 42.771; $t = 1.997$; $P = 0.050$; normal distribution) than devocalized males.

The females showed significantly more approaches towards males when male USVs were played back, compared to when male USVs were not played back (Figure 2A; $\beta = 1.9250$; SE = 0.8150; $t = 2.362$; $P = 0.022$; normal distribution). When male USVs were played back, the females sniffed male genitals more frequently ($\beta = 0.62284$; SE = 0.30665; $z = 2.031$; $P = 0.042$; negative binomial distribution 1), and groomed males more frequently ($\beta = 0.61009$; SE = 0.27885; $z = 2.188$; $P = 0.029$; negative binomial distribution 1).

We observed that the occurrence of several behaviors decreased between behavioral tests. This observation was supported by the result that significant effects associated with the order number of the experiment and surgery on several behaviors were detected.

Experiment 2

We then examined the effects of male USVs on mouse sociosexual behaviors in the mate-choice paradigm. The results of the GLMM analysis indicated that female mice visited the chambers of sham-operated male mice more frequently than the chambers of devocalized male mice ($\beta = 0.6655$; SE = 0.1370; $z = 4.857$; $P = 1.2e-06$; negative binomial distribution 2). The total duration spent in the chambers of sham-operated males was longer than that spent in the chambers of devocalized males ($\beta = 0.64116$; SE = 0.18830; $z = 3.40$; $P = 0.00066$; negative binomial distribution 2). These results suggest that female mice have a social partner preference for vocalizing male mice.

Furthermore, female mice were subjected to significantly more mounting attempts ($\beta = 0.9474$; SE = 0.3271; $z = 2.896$; $P = 0.0038$; zero-inflated negative binomial 1) and intromissions ($\beta = 1.3462$; SE = 0.4256; $z = 3.163$; $P = 0.0016$; zero-inflated negative binomial 1) by sham-operated males than devocalized males. When the data was corrected for total visit time, while female mice received mounting attempts equally from both sham-operated and devocalized males ($\beta = 0.5678$; SE = 0.3783; $z = 1.501$; $P = 0.13$; zero-inflated negative binomial 1 with the offset term), female mice were subjected to significantly more intromissions by sham-operated males than devocalized males ($\beta = 1.0239$; SE = 0.4706; $z = 2.716$; $P = 0.030$; zero-inflated negative binomial 1 with the offset term). However, there was no significant difference between the receptivity indexes associated with sham-operated and devocalized males ($\beta = 0.3075$; SE = 0.3274; $z = 0.939$; $P = 0.35$; binomial distribution). Taken together, the results indicated that female mice received more intromissions from sham-operated than devocalized male mice, thus suggesting that female mice exhibit a sexual partner preference for vocalizing males in the mate-choice paradigm.

We observed that the occurrence of several behaviors decreased with time within the behavioral test. This observation was supported by the result that significant effects associated with the order number of the time window on several behaviors were detected.

Reference

- Asaba A, Osakada T, Touhara K, Kato M, Mogi K, Kikusui T (2017). Male mice ultrasonic vocalizations enhance female sexual approach and hypothalamic kisspeptin neuron activity. *Hormones and Behavior* 94, 53–60.
- Hammerschmidt K, Radyushkin K, Ehrenreich H, Fischer J (2009). Female mice respond to male ultrasonic “songs” with approach behavior. *Biology Letters* 5, 589–92.
- Holy TE, Guo Z (2005). Ultrasonic songs of male mice. *PLoS Biology* 3, e386.
- Kikusui T, Nakanishi K, Nakagawa R, Nagasawa M, Mogi K, Okanoya K (2011). Cross fostering experiments suggest that mice songs are innate. *PLoS ONE* 6, e17721.
- Nyby J, Wysocki CJ, Whitney G, Dizinno G (1977). Pheromonal regulation of male mouse ultrasonic courtship (*Mus musculus*). *Animal Behaviour* 25, 333–41.
- Pomerantz SM, Nunez AA, Bean NJ (1983). Female behavior is affected by male ultrasonic vocalizations in house mice. *Physiology & Behavior* 31, 91–6.
- Sugimoto H, Okabe S, Kato M, et al. (2011). A role for strain differences in waveforms of ultrasonic vocalizations during male-female interaction. *PLoS ONE* 6, e22093.
- Whitney G, Coble JR, Stockton MD, Tilson EF (1973). Ultrasonic emissions: do they facilitate courtship of mice. *Journal of Comparative and Physiological Psychology* 84, 445–52.
- White NR, Prasad M, Barfield RJ, Nyby JG (1998). 40- and 70-kHz vocalizations of mice (*Mus musculus*) during copulation. *Physiology & Behavior* 63, 467–73.
- Winslow JT (2003). Mouse social recognition and preference. *Current Protocols in Neuroscience* 8.16.1–8.16.16.
- Zinck L, Lima SQ (2013). Mate choice in *Mus musculus* is relative and dependent on the estrous state. *PLoS ONE* 8, e66064.

○プロジェクト No. 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 : 2015年4月1日～2018年3月31日

プロジェクト班長: 菊水健史 (獣医学部 伴侶動物学)

プロジェクト班員: 茂木一孝 (獣医学部 伴侶動物学)

プロジェクト班員: 永澤美保 (獣医学部 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. 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：2015年4月1日～2018年3月31日

プロジェクト班長：菊水健史（獣医学部 伴侶動物学）

プロジェクト班員：茂木一孝（獣医学部 伴侶動物学）

プロジェクト班員：永澤美保（獣医学部 伴侶動物学）

概要

本研究では、マウス痛み情動伝染時に Fiber Photometry を行うことで、痛み情動伝染における帯状回の機能解明を目標とした。

先行研究では C57BL/6J（以下 B6）を用いていたが情動伝染の指標となる恐怖反応が弱かったため、B6 メスと、恐怖反応は強いが扱いが困難である MSM/Ms 系統オスとの F1（以下 M6）を新たに作出した。M6 は MSM より扱いやすく、B6 より恐怖反応が強かった。

Fiber Photometry は、光を用いて脳内の特定神経活動をリアルタイムで測定する技術である。神経活動依存的に蛍光強度が変化するタンパク質（GCaMP6s）を特定神経細胞に発現させ留置した光ファイバーを介して光を照射し、GCaMP6s からの蛍光を測定することで神経活動をリアルタイムで測定した。自ら痛み刺激を受けている時は神経活動の強い上昇がみられた。また、他個体の痛みを観察している時にも活動の上昇がみられた。このことは、帯状回の活動が痛み情動伝染に関与していることを示唆する。

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、神経細胞の活動をリアルタイムで可視化する技術を用いた。具体的には、帯状回の神経細胞にカルシウムセンサーの蛍光タンパク質を AAV ベクターを用いて感染させ、行動中のマウスの帯状回にファイバーを移植、ファイバフォトメトリを用いて、神経活性を計測した。他者の痛みを観察している個体のリアルタイム解析による情動伝染の神経回路の同定を目指した。

材料と方法

供試動物

供試動物として、麻布大学生物科学総合研究所3階の3-T-04飼育室にて育てられたC57BL/6系統（以下、B6）の未去勢オスマウスと、国立遺伝学研究所（日本：静岡県）から購入し繁殖維持したMSM/Ms系統（以下、MSM）のメスマウスとのF1である、MSMB6F1（以下、M6）を使用した。供試動物は生後4週程度で離乳、雌雄を分離し、1ケージ2匹以上で飼育した。実験時はすべて8週齢以降であった。

飼育環境

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消灯）に調節された室内で、ケージ（18.4 cm × 33.2 cm × 14.7 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。

Foot Shock 実験

実験には、仕切板を含めたFoot Shock実験箱、Foot Shock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。

実験箱は、実際にFoot Shockを受ける個体が入るDemonstrator（Demo）エリア（14 cm × 9 cm × 11 cm）と、Foot Shockを受けない個体が入るObserver（Obs）エリア（16 cm × 10 cm × 26 cm）の二区画構造とした。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（厚さ5 mm）で仕切られており、仕切板には穴（直径2 mm）が72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7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0.5 mAを2秒間 × 12回の18秒間隔で与えた。

実験の13分間を終えた後、DemoとObsを2匹とも淘汰した。

実験スケジュール

マウスの右前帯状皮質（ACC）にAAV9.Syn.Flex.GCaMP6s.WPRE.SV40（UPENN）とAAV1.pmSyn1.EBFP.Cre（Addgene）とを同量ずつ混ぜたものを1.2 μ L、毎分0.1 μ Lの間隔でインジェクションし、同時にFiber Photometryを行うためのカニューラも装着した。

術後2週間通常通り飼育した後、Fiber Photometryを取りながら、Foot Shock実験を行い、還流固定し脳を取り出した。

インジェクション

マウスにイソフルラン（1.0%~2.0%）（和光純薬工業株式会社：東京：日本）の吸引で麻酔をかけ、小動物用脳定位固定装置（バイオリサーチセンター株式会社：名古屋：日本）に頭を固定し行った。座標は、投薬がBregmaよりAP+0.5mm、ML-0.4mm、DV-1.4mmであり、カニューラ（3.0 mm）（Doric）は投薬と同じ平面座標かつDV-1.39mmに、スーパーボンドC&Bセット（サンメディカル株式会社）とデンタルセメント（ピクトプラス HP36、日本歯科商社）を用いて固定した。

インジェクションを終えた後は、アロンアルファA（第一三共株式会社：東京：日本）で皮膚を癒合させ、ホームケージに戻した。

結果

先行研究の結果によると、B6はDemoが受けた電撃が最大の0.99 mAであったにもかかわらず、ObsのFreezing率が最も高いものでも37.5%しか発現せず、10%にとどかない個体もいた。MSMでは反応性が高いためDemoであるB6が受ける電撃を弱めたものの、preからすでにFreezing率が50%を超え、shock・postでは90%以上を維持し続けた。しかしM6では、preではあまりFreezingをしていないがDemoがショックを受けている間にObsのFreezing率が上昇して30%を超え、post始めの1分間で再びFreezing率が下がるという結果が得られた。

M6を用いて、観察個体のACCにおける神経活性を計測した。術式の成功した4例について、すべての個体で、Demoがフットショックを受けている最中にACCに特異的な活性が観察された。また、この活性は自身がショックを受けている際にも観察された。しかし、これらの神経活性は、マウスのすくみ行動とは相関しなかった。このことから、ACCには苦痛を受容する感覚情報が統合されて送られてくることが示唆された。

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：2016年4月1日～2019年3月31日

プロジェクト班長：曾川一幸（生命・環境科学部講師）

【研究概要】

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。

近年、腸内細菌叢の16S rRNA 遺伝子解析やメタゲノム解析結果により、腸内細菌叢が健康および疾患と密接な関係性をもつことが示唆されている。大腸癌では *Fusobacterium* sp. の増加¹⁾、炎症性腸疾患では Enterobacteriaceae の増加²⁾、そして肥満では Bacteroides および Firmicutes の比率の変化³⁾ などが報告されている。

飲酒におけるヒトの腸内細菌叢変化についてのデータはあるが、マウスやラットなどの実験動物についてのデータは十分ではない。よって本研究では、腸内細菌叢とアルコール性肝障害との関連性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）9匹を Lieber-Decarli 手法⁴⁾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週間の pair-feeding を行った。8週間の5%エタノール含有液体飼料給餌（n=3：アルコール群）及びコントロール液体飼料給餌（n=3：コントロール群）、最初の4週間は5%エタノール含有液体飼料給餌、残りの4週間はコントロール液体飼料給餌（n=3：禁酒群）の計3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週間与えた。飼育終了時に1%イソフルランによる吸入麻酔下にて心採血後、開腹を行い、すぐに肝臓を摘出し、中性緩衝ホルマリン液で固定した。また、大腸を摘出し350 μ l の滅菌生理食塩水を加えホモジネイトを行った。

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1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℃に凍結保存し、使用する際に室温で溶解した⁵⁾。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、エンドトキシンの検討

生化学検査項目は血液を遠心分離して得た血清を用いて、富士ドライケム 700Z（富士フィルム）で aspartate aminotransferase（AST）、alanine aminotransferase（ALT）、alkaline phosphatase（ALP）、total cholesterol（TCHO）値を測定し、肝機能を評価した。

エンドトキシンはトキシノメーター® ET-Mini（和光純薬工業）で測定した。

腸内細菌叢の解析

切り出した大腸をホモジネイト後、簡易 DNA 抽出キット Version 2（株式会社カネカ）で DNA を抽出し、PCR を行い 16S rRNA 遺伝子の V3V4 領域を増幅した。その後、次世代シーケンサー MiSeq® System（イルミナ）を用い分析を行い、Qiime ソフトで解析した。

【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 週間後に有意な差を認めなかった。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 群ではほぼ同様であった。

HE 染色による病理組織像では、アルコ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。禁酒群はコントロール群と変わらない肝組織像を呈した。

血清 AST 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、禁酒群で、それぞれ 181.0 ± 32.1 U/L、 272.3 ± 85.8 U/L、 155.0 ± 14.3 U/L であり、3 群間で有意な差が認められた。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、禁酒群で、それぞれ 25.2 ± 6.7 U/L、 50.0 ± 14.9 U/L、 27.0 ± 4.5 U/L であり、3 群間で有意な差が認められた。血清 ALP 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。血清総コレステロール値は、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、禁酒群で、それぞれ 66.8 ± 4.6 mg/dL、 92.0 ± 12.6 mg/dL、 71.0 ± 8.0 mg/dL であり、3 群間で有意な差が認められた。

Firmicutes 門ではコントロール群に比べアルコール群で約 1.7 倍増加が見られ、特に *Clostridium* sp. において変化がみられた。アルコール群では *Clostridium* sp. が約 20.3 倍、*Lactobacillus* sp. が約 4 倍増加し、*Parabacteroides* sp. は約 0.4 倍低下した。また、*Clostridium* sp. の割合とエンドトキシン濃度の相関関係は $R^2=0.7945$ と強い相関がみられた。

今回の研究では肝臓組織の脂肪化に伴う腸内細菌叢の変化に着目し、HE 染色による病理組織像では禁酒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。アルコール群で、*Lactobacillus* sp. やエンドトキシンを産生する Firmicutes 門の *Clostridium* sp. に増加がみられ、*Parabacteroides* sp. では低下という有意な変化がみられた。

今回の検討ではアルコール性肝障害において腸内細菌叢、特に *Clostridium* sp. で有意な変化がみられた。ヒトやマウスの腸内細菌叢のデータとは異なっているので、再現性を確かめさらに検討していく。

【参考文献】

1. Castellarin M, Warren RL, Freeman JD, et al.: Fusobacterium nucleatum infection is prevalent in human colorectal carcinoma. Genome Res. 22: 299-306, 2012.
2. Qin J, Li R, Raes J, et al.: A human gut microbial gene catalogue established by metagenomic sequencing. Nature. 464: 59-65, 2010.
3. Ley RE, Bäckhed F, Turnbaugh P, et al.: Obesity alters gut microbial ecology. Proc Natl Acad Sci U S A. 102: 11070-11075, 2005.
4. Lieber CS, Decarli LM: Liquid diet technique of ethanol administration. Alcohol&Alcoholism. 24: 197-211, 1989.
5. Umemura H, Nezu M, Kodera Y, et al.: 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. 406: 179-180, 2009.

○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 を導入したコンジュニック系統の形質解析 (II)

研究期間 : 2016年4月1日～2019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 系統の感受性 QTL を C57BL/6J 系統 (以後 B6) に導入したコンジュニック系統 Cg2 および Cg9 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。前年度前の研究成果から、2 番染色体のマイクロサテライトマーカー *D2Mit397* の近傍 (動原体より 54cM から 60cM の位置) に、LOD 値 10.1 の極めて有意な連鎖を示す QTL の存在を明らかにした。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、グリア型グルタミン酸トランスポーター (*Slc1a2*) 遺伝子が存在した。そこで、*Slc1a2* 遺伝子を対象に、発作閾値の低下を生じさせる刺激を反復負荷した時に、B6 系統、Cg2 系統および、Cg9 系統における発現の変化を測定した。その結果、*Slc1a2* 遺伝子の発現量に統計的有意な差は認められなかった。しかし、発作を誘発する刺激を反復して加えた時に、嗅球と大脳皮質での発現レベルにおいて発作感受性を持たない B6 系統が、感受性を持つ Cg 系統に比べて高い傾向を示した。これは *Slc1a2* が、発作を抑制するという先行研究と矛盾しない。このため、放り上げ刺激が、*Slc1a2* 遺伝子の発現に影響を及ぼすか否かについて、さらなる検証を必要とする。

【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)。我々は、生物研プロジェクト研究 (No.XII) において、C57BL/6J (以後 B6) 系統を背景として、EL 系統 2 番染色体 D2Mit365-D2Mit280 間の約 118.3Mb の領域を持つ [B6.EL-(D2Mit365-D2Mit280)/Azab] 系統、D2Mit156-D2Mit266 間の約 124.8Mb の領域を持つ [B6.EL-(D2Mit156-D2Mit266)/Azab] および、9 番染色体の D9Mit89-D9Mit182 間の約 71.2Mb 領域保持する [B6.EL-(D9Mit89-D9Mit182)/Azab] を確立することができた。また、これらのコンジュニック系統は、B6 に比べて、放り上げ刺激誘発けいれん発作を、おこし易いことを明らかにした。各コンジュニック系統は、保有する EL 系統由来のゲノム領域が異なることから、個々の QTL の表現型に与える影響を鋭敏に評価できるものと期待される。

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

本年度の研究では、Cg2 系統の発作感受性 QTL の近傍に存在する *Slc1a2* 遺伝子の発現に注目して実験を行った。*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、シナプス間隙に放出されたグルタミン酸を回収する働きがある。*Slc1a2* 欠損マウスは、致死性の自発てんかん発作を生じる (Tanaka et al., 1997)。さらに、*Slc1a2* を活性化させると、ピロカルピン誘発発作が軽減されることから、*Slc1a2* は、グルタミン酸による過剰な興奮から神経細胞を保護する作用を持つことが示されている (Kong et al., 2012)。ゆえに、*Slc1a2* の発現制御異常が、Cg 系統の発作感受性に影響を与えていると仮説を立てた。

【材料および方法】

B6 系統、Cg2 系統および、Cg9 系統の雄を用い、非刺激群、放り上げ刺激単回負荷群、放り上げ刺激反復負荷群の 3 つの群 (各 4 匹) を作成した。マウスは生後 21 日～24 日 (3 週齢) で離乳し、同性 4 匹を中型ケージに同居させ 1 週間

ごとにケージ交換を行った。非刺激群は、ケージ交換の時を除き動物に触れないように飼育し、10週齢に到達した時点で採材した。放り上げ刺激は、マウスを1匹ずつ空の小ケージに入れ、30秒間に20回、約15cmの振幅で上下動させ、その後、ケージを水平な台の上に戻し10分間観察した。刺激を加えた後のマウスは、飼育用中型ケージに戻して飼育を継続した。放り上げ刺激を単回負荷した群は、9.5週齢（9週齢に到達した3～4日後）に、1度のみ放り上げ刺激を負荷し、その3日後に採材した。放り上げ刺激を10回負荷した群は、5週齢到達時から3～4日間隔で放り上げ刺激を反復負荷し、9.5週齢に到達したときに10回目刺激を完了し、最終の刺激日の3日後に採材した。脳組織の採材は、過剰量のペンタバルビタールナトリウム（200mg/kg）を腹腔内投与後に脳を摘出し、Hagiharaら（2009）の方法に従って、嗅球、大脳皮質、海馬を分離した。組織は、RNA Later（Thermo Fisher Scientific）に浸漬しRNA抽出まで-20℃で保存した。総RNAの抽出は、ISOGENE II（ニッポンジーン）を用いた。抽出した総RNAを鋳型として、逆転写酵素 SuperScript III（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発現量を定量的RT-PCR法によって測定した。発現量測定の内部標準には、TATA結合タンパク質（*Tbp*）遺伝子を用いた。発現量の統計解析は、Tukey-Kramer法を用いた。

【結果および考察】

嗅球、大脳皮質および、海馬における *Slc1a2* のmRNA発現量を図1に示した。Tukey-Kramer法を用いて、各群の発現量の平均値の差を検定したが、統計的に有意な差はみつからなかった。しかし、嗅球では、発作に抵抗性を持つB6系統が、発作感受性を持つCg2、Cg9系統に比べて、発現量が高い傾向を示した。また、大脳皮質では、けいれん発作の閾値低下を生じさせる刺激を10回反復した時に、B6系統で *Slc1a2* のmRNAの発現量の増加傾向が認められた。しかし、海馬では、群間で発現量に一定の傾向は認められなかった。

今回の解析からは、てんかん発作感受性を持つCg2、Cg9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、B6系統では、大脳皮質において *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ตอบสนองして発現量が増加することが示唆された。

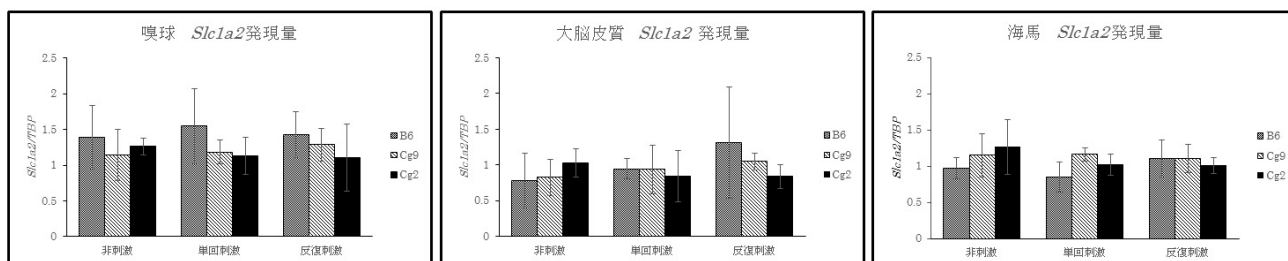


図1 マウス嗅球、大脳皮質、海馬における *Slc1a2* 遺伝子の発現量。 *Tbp* 遺伝子を内部標準として相対発現量を示した。

【引用文献】

- Frankel WF, Coffin JM, Dietrich WF, Johnson EW, Lutz CM, Valenzuela A. 1995a. New seizure frequency QTL and the complex genetics of epilepsy. *Mammalian Genome*. 6: 830-838.
- Frankel WN, Johnson EW, Lutz CM. 1995b. Congenic strains reveal effects of the epilepsy quantitative trait locus, El2, separate from other El loci. *Mammalian Genome*. 6: 839-843.
- Kong Q, Takahashi K, Schulte D, Stouffer N, Lin Y, Lin CLG. 2012. Increased glial glutamate transporter EAAT2 expression reduces epileptogenic processes following pilocarpine-induced status epilepticus. *Neurobiology of Disease*. 47: 145-154
- 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*, 276: 1699-1702

○プロジェクト No. 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：2016年4月1日～2019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：

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、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。研究成果：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、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。

研究目的：

細胞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脂質ラフトが存在し、受容体を介した細胞の情報伝達などに関与している。スフィンゴ糖脂質はセラミドに糖鎖が付加された糖脂質であり、シアル酸を有するスフィンゴ糖脂質を特にガングリオシドファミリーという。GM3はガングリオシドファミリーの中で最も幅広く存在しガングリオシド共通の前駆物質となる。我々はこれまで、GM3合成酵素（GM3S）欠損マウスにおいて、T細胞活性の亢進（Nagafuku M *et al.*, PNAS, E336-E342., 2012）や自己免疫性疾患（Lee H *et al.*, Mol. Cells: 37(2): 161-171., 2014）への関与を報告した。さらに、リウマチ関節炎モデルマウスにおいてはGM3S欠損がTh17のIL-17産生増加により炎症性関節炎を悪化させるという知見を得た（Tukuda Y *et al.*, PLoS One., 7(6): e40136., 2012）。以上より、GM3と免疫機能の密接な関係が示唆される。そこで本研究ではアレルギー性皮膚炎におけるGM3Sの関与を検討した。

材料と方法：

C57BL/6系統野生型（WT）マウスおよびガングリオシドGM3合成酵素欠損（GM3S-KO）マウスを使用した。耳介部および背部にコナヒョウダニアレルゲン軟膏を3週間塗布し、アレルギー性皮膚炎を誘発した。炎症スコアは発赤・出血・痂皮・乾燥および耳介部の厚みにより評価した。耳介部と背部の組織切片を作製し、HE染色およびトルイジンブルー染色により、組織学的に解析した。成熟肥満細胞における機能評価のため、WTおよびGM3S-KOより骨髓細胞を採取し、IL-3、IL-4、SCF含有培地で1ヶ月間培養した。得られた成熟肥満細胞をin vitroで刺激し、脱顆粒の指標である β ヘキサミンダーゼ放出率を測定した。また、電子顕微鏡写真で内部の微細構造を確認した。

結果：

GM3S KOにおいて背部での皮膚炎の亢進が観察された

コナヒョウダニ由来アレルゲン軟膏を1回100mg、週2回、合計6回、背部と耳介部に塗布し、21日間観察した。実体顕微鏡写真において、GM3S KOマウスではWTマウスと比較して試験開始後3日目と7日目に表皮の発赤と痂皮形成が著しく観察された。また、この実体顕微鏡写真を元にした炎症スコアに関しても、GM3S KOマウスではWTマウスと比較して試験開始後3日目と7日目にスコアが2～3ポイント高くなった。以上より、GM3S KOマウスにおいて背部における皮膚炎の亢進が観察された。

GM3S KO において耳介部の肥厚の亢進が観察された

実体顕微鏡写真において、WT マウスと GM3S KO マウスを比較すると、両系統ともに、血管の腫脹がわずかにみられた。しかし、WT マウスと GM3S KO マウスにおいて大きな変化は観察されなかった。また、耳介部の肥厚割合を 21 日間測定した。これは、GM3S KO マウスと WT マウスそれぞれの初日の耳の厚みを 1 として、そこからの相対値で示した。GM3S KO マウスでは WT マウスと比較して試験開始後 7 日以降に有意な耳の肥厚が観察された。

GM3S KO において表皮の著しい肥厚が観察された

皮膚を組織学的に解析したところ、WT マウスにおいて、試験開始後 0 日、7 日目、14 日目では、それぞれわずかに表皮の肥厚がみられたが、大きな肥厚は観察されなかった。一方、GM3S KO マウスでは試験開始後 0 日の表皮と比較して、7 日目の皮膚では、表皮が著しく肥厚していることが観察された。また、同じ試験開始後 7 日目の GM3S KO マウスの皮膚と WT マウスの皮膚を比較しても、GM3S KO マウスの皮膚の肥厚が顕著であった。以上より、GM3SKO マウスにおいて表皮の著しい肥厚が観察された。

GM3S KO において肥満細胞数の増加が観察された

前述の通りにトルイジンブルー染色を行った。WT マウスにおいて、試験開始後 0 日の表皮と比較して、7 日目、14 日目と、肥満細胞数に大きな変化は観察されなかった。一方、GM3S KO では試験開始後 0 日の表皮と比較して、7 日目に肥満細胞数の増加が観察された。

GM3S KO において好酸球の浸潤が観察された

特に炎症が強かった背部の試験開始後 7 日目の真皮を 400 倍で観察した。WT の真皮では、示す線維芽細胞の浸潤が多く観察された。一方、GM3S KO の真皮では、好酸球の浸潤が多く観察された。また、結果には示していないが、好中球群の浸潤も GM3SKO において多く観察された。

GM3S KO と WT において肥満細胞の分化度と増殖度における差異は観察されなかった

分化度は肥満細胞の細胞膜上に存在するマーカーである $Fc\epsilon R$ と c-kit に対する蛍光免疫法を使用して、骨髓由来肥満細胞の分化度をフローサイトメトリーで測定した。WT においては、培養開始後 7 日目で 28%、14 日目で 35%、21 日目で 48%、28 日目で 94%、35 日で 97% の分化度を示した。GM3S KO においては、培養開始後 7 日目で 27%、14 日目で 33%、21 日目で 54%、28 日目で 80%、35 日で 91% の分化度を示した。35 日間の分化度においては、有意差が観察されなかった。増殖度はトリパンブルー染色後、生細胞数を計数し、総生細胞数を比較した。生細胞数計数開始後 WT においては、培養開始後 0 日目と比較して、7 日目で 0.6 倍、14 日目で 2.7 倍、21 日目で 5.6 倍、28 日目で 6.6 倍、35 日で 11.5 倍に増殖した。GM3S KO においては、培養開始後 0 日目と比較して 7 日目で 0.5 倍、14 日目で 1.8 倍、21 日目で 3.4 倍、28 日目で 5.0 倍、35 日で 9.6 倍に増殖した。GM3S KO と比較して WT のほうがわずかに増殖度が大きい傾向があったが、有意差はなかった。このため、以降の実験では 35 日間培養したものを使用した。

GM3S KO において無刺激状態における脱顆粒の亢進が観察された

β -ヘキソサミニダーゼを測定することで脱顆粒の放出率を観察した。WT において、無刺激では 23% の細胞で脱顆粒を観察した。IgE 刺激では 69.9%、IM 刺激では 74.9% の割合で刺激に対して脱顆粒する反応が観察された。一方で GM3SKO においては、無刺激の状態でも 66.4%、IgE 刺激では 75.1%、IM 刺激では 79.9% の脱顆粒が観察された。一方、GM3S KO において WT と比較して無刺激で有意な脱顆粒の亢進が観察された。

GM3S KO において MAPK 経路のリン酸化の亢進が観察された

肥満細胞の脱顆粒機構において、MAP キナーゼ経路におけるリン酸化が重要であることが報告されている。そこで、成熟肥満細胞の MAP キナーゼのリン酸化状態を解析した。ERK、p-38、JNK についての 3 つの検討を行った。ERK と p-38 においては、WT と GM3S KO においてリン酸化に変化は観察されなかった。一方、JNK では、WT 由来肥満細胞では CT と比較して IM 刺激によりリン酸化の亢進が観察された。GM3S KO 由来肥満細胞においては CT で既にリン酸

化の亢進が観察され、IMにおいてはリン酸化の亢進が観察されなかった。以上より、GM3S KOの肥満細胞ではJNKのリン酸化の亢進が観察された。

GM3S KOにおいて肥満細胞の顆粒分布の差が観察された

成熟肥満細胞を、電子顕微鏡写真で観察した。WT由来肥満細胞においては顆粒が肥満細胞内の細胞質内に均一に分布していることが観察された。一方、GM3S KO由来肥満細胞においては、顆粒が肥満細胞内の細胞質内の辺縁に偏在していることが観察された。これより、GM3S KOにおいて顆粒分布の差が観察された。

考察：

アレルギー性皮膚炎とは、花粉やダニなど、本来、体にとって害のないものに、体の免疫機能が過剰に反応し、その炎症症状が発赤やかゆみ、腫脹などが皮膚で生じることである。近年このアレルギー性皮膚炎は社会問題となっている。GM3と免疫機能の密接な関係はこれまで多く示唆されてきた。しかし、アレルギー性皮膚炎をはじめとする、アレルギー性皮膚炎におけるガングリオシドGM3と免疫機能の関連は、未だ報告がされていない。そこで本研究ではアレルギー性皮膚炎におけるGM3の関与を検討した。

アレルギー様皮膚炎誘発試験では、GM3S KOマウスにおいて、試験開始後早期に発赤と痂皮形成を主症状とする皮膚炎の重症化が観察された (Fig. 3 A)。また、同時に炎症スコアでも肉眼所見と同様に、GM3S KOマウスにおいて、試験開始後早期に炎症スコアが上昇した。これより、GM3S KOマウスにおいて、背部における皮膚炎の重症化を観察した。同様に、耳介部においても、肉眼的な変化は見られなかったが、耳介部の厚みはGM3S KOマウスにおいて、試験顕著な耳介の肥厚が観察された。これらの観察から、GM3S KOマウスではアレルゲンに対して感受性が高いことが示唆された。背部ではアレルギー様誘発試験後3日後にピークがあり、その後症状が軽減されたのに対し、耳介部では時間経過とともにその肥厚し続けた。この時間経過による皮膚炎の臨床症状の推移の差は、背部と耳介部で主体となる炎症が異なっていることが考えられる。アレルギー性皮膚炎は、肥満細胞を介した即時型反応による皮膚の発赤・腫脹・搔痒をはじめとして、慢性経過をたどり、遅延型炎症反応へと移行する。背部において早期にGM3S KOマウスの炎症スコアが高値を示したのは、背部においては即時型炎症反応が強かったからと考えられる。一方、耳介部におけるGM3SKOマウスの試験開始後7日目以降の肥厚は、慢性炎症反応が主体となったためと考えられる。アレルギー性皮膚炎は、誘発を繰り返していくうちに慢性化し、憎悪と寛解を繰り返すため、このような結果になったと考えられる。

背部の表皮を観察したHE染色からは、GM3SKOマウスにおいて、WTと比較して、表皮の著しい肥厚が観察された (Fig. 5)。真皮に炎症細胞が浸潤し、ケモカインなどの肥満細胞を始めとする炎症細胞の誘引が関与していると考えられる。背部のトリジンブルー染色では、WTでは肥満細胞数の増加は観察されなかった。一方で、GM3SKOではWTと比較して試験開始後7日目に肥満細胞数の増加が観察された。肥満細胞数が増加したとことで、アレルギー反応の主体を担う、即時型炎症反応が助長されたと考えられる。

背部真皮のHE染では、WTの皮膚においては線維芽細胞が浸潤していた。一方、GM3S KOの皮膚においては好酸球が浸潤していた。これより、GM3SKOマウスにおける肥満細胞の浸潤と好酸球の浸潤より、GM3SKOマウスにおいては、アレルギー反応以外の炎症反応においても過剰に反応することが示唆された。

肥満細胞はアレルギー疾患において最も重要な細胞で、その脱顆粒は、細胞表面に発現している高親和性IgE受容体 (Fc ϵ RI) にIgEが結合し、これらの複合体が抗原により架橋が形成されることで起こる反応である。これにより肥満細胞が活性化され、SrcファミリーチロシンキナーゼLynがリン酸化されることで、一連のシグナル伝達が開始され、その結果として脱顆粒、サイトカイン産生などが観察される。血清IgE値が高い個体において様々なアレルギー性疾患が併発することから、IgEそのものがアトピー素因であるという概念も最近提唱されている。これを裏付けるものとして、抗原の非存在下においてIgE単独で肥満細胞の生存日数を延長したり)、サイトカイン産生や遊走能を亢進することなどが報告されている。

成熟肥満細胞を用いた実験では、GM3KOとWTでは、分化度と増殖度に差異はないが、GM3KOでは無刺激状態で脱顆粒の亢進 (Fig. 9)、およびJNKのリン酸化の亢進が観察された。さらに電子顕微鏡写真では顆粒分布の差が観察された。以上より、この肥満細胞の異常はJNKを中心としたシグナル伝達異常であると考えられる。しかし、このMAPK

経路の解析は今後タイムコースを取るなど、他の MAPK に対し、詳細な解析を行って、さらに細かい検討を行う必要がある。

また、 β ヘキサミニダーゼ測定試験では、無刺激状態からの脱顆粒亢進を示したが、これは、無刺激ではなく、弱い、通常は刺激と認識しないような刺激に対して過剰に反応している結果、顆粒を放出していると考えられる。

肥満細胞の詳細なシグナル解析が今後必要である。また、他の炎症細胞にも着目して解析を行い、肥満細胞以外の免疫細胞における解析を行う必要がある。

本研究は未だ発展途上であり、今後シグナル解析を中心としたさらなる解析を進めることで GM3SKO における肥満細胞の異常だけでなく、他の免疫細胞の異常も観察することが出来ると示唆される。さらに、実験対象をマウスに限らず、犬をはじめとする哺乳類において行い、最終的に人に応用することが出来れば、難治性疾患であるアレルギー性皮膚炎の病態解明と新たな治療に繋がる可能性がある。

参考文献：

1. Nagafuku M, Okuyama K, Onimaru Y, Suzuki A, Odagiri Y, Yamashita T, Iwasaki K, Fujiwara M, Takayanagi M, Ohno I, Inokuchi J (2012) CD4 and CD8 T cells require different membrane gangliosides for activation. PNAS. 109(6): E336-42. doi: 10.1073
2. Elizabeth C. Jury, Panagiotis S. Kabouridis, Fabian Flores-Borja, Rizgar A. Mageed, and David A. Isenberg (2004) Altered lipid raft-associated signaling and ganglioside expression in T lymphocytes from patients with systemic lupus erythematosus. Journal of Clinical Investigation. Vol 113, Issue 8, pages 1176-1187
3. Yukinori Tsukuda, Norimasa Iwasaki, Naoki Seito, Masashi Kanayama, Naoki Fujitani, Yasuro Shinohara, Yasuhiko Kasahara, Tomohiro Onodera, Koji Suzuki, Tsuyoshi Asano, Akio Minami, and Tadashi Yamashita (2011) Ganglioside GM3 Has an Essential Role in the Pathogenesis and Progression of Rheumatoid Arthritis. PLoS ONE 7(6): e40136. doi: 10.1371
4. 古江増隆、佐伯秀久、古川福実 (2008)：日本皮膚科学会アトピー性皮膚炎診療ガイドライン、日皮会誌、118: 325-342. 5)
5. Schafer T, Heinrich J, Wjst M, Adam H, Ring J, Wichmann HE (1999): Association between severity of atopic eczema and degree of sensitization to aeroallergens in schoolchildren, J Allergy Clin Immunol, ; 104: 1280—1284. 84
6. Fonacier LS, Aquino MR (2010): The role of contact allergy in atopic dermatitis, Immunol Allergy Clin North Am, 30: 337—350. 85)
7. Giordano-Labadie F, Rance F, Pellegrin F, Bazex J, Dutau G, Schwarze HP (1999): Frequency of contact allergy in children with atopic dermatitis: results of a prospective study of 137 cases, Contact Dermatitis, 40: 192—195. 86)
8. Breternitz M, Kowatzki D, Langenauer M, Elsner P, Fluhr JW (2008): Placebo-controlled, double-blind, randomized, prospective study of a glycerol-based emollient on eczematous skin in atopic dermatitis: biophysical and clinical evaluation. Skin Pharmacol Physiol. ;21:39-45.
9. Maintz L, Novak N. (2011) Modifications of the innate immune system in atopic dermatitis. J Innate Immun. ; 3(2): 131-41.
10. Kido M, Takeuchi S, Esaki H, Hayashida S, Furue (2010) M. Scratching behavior does not necessarily correlate with epidermal nerve fiber sprouting or inflammatory cell infiltration. J Dermatol Sci. May; 58(2): 130-5.
11. Mina Yamamoto, (2007); A Novel Atopic Dermatitis Model Induced by Topical Application with Dermatophagoides Farinae Extract in NC/Nga Mice. Allergology International ; 56: 139-148
12. Funaba M, Nakaya K, Ikeda T, Murakami M, Tsuchida K, Sugino H. (2006) Requirement of Smad3 for mast cell growth. Cell Immunol; 240(1): 47-52.
13. Jamur MC, Grodzki ACG, Berenstein EH, Hamawy MM, Siraganian RP, Oliver C. (2005) Identification and characterization of undifferentiated mast cells in mouse bone marrow. Blood ; 105(11): 4282-9.
14. Cookson WO, Sharp PA, Faux JA, Young RP, Nakamura Y, Lathrop GM, Cookson WO, (1989) Linkage between

immunoglobulin E responses underlying asthma and rhinitis and chromosome 11q, *Lancet*, 1(8650): 1292-1295

15. Metzger, H. (1992) *Immunol. Rev.* 125, 37-48. 2.
16. Turner, H. & Kinet, J. P. (1999) *Nature* 402, B24-B30. 3.
17. Hsu, C. & MacGlashan, D., Jr. (1996) *Immunol. Lett.* 52, 129-134. 4.
18. Yamaguchi, M., Lantz, C. S., Oettgen, H. C., Katona, I. M., Fleming, T., Miyajima, I., Kinet, J. P. & Galli, S. J. (1997) *J. Exp. Med.* 185, 663-672
19. Jiro Kitaura, Jinming Song, Mindy Tsai, Koichi Asai, Mari Maeda-Yamamoto, Attila Mocsai, Yuko Kawakami, Fu-Tong Liu, Clifford A. Lowell, B. George Barisas, Stephen J. Galli, and Toshiaki Kawakami (2003) Evidence that IgE molecules mediate a spectrum of effects on mast cell survival and activation via aggregation of the FcRI . ; *PNAS* October 28, 2003 vol. 100 no. 22 12911-12916 IM

○プロジェクトNo. P17ー01

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：2017年4月1日～2020年3月31日

プロジェクト班長：伊藤潤哉(獣医学部)

プロジェクト班員：柏崎直巳(獣医学部)

プロジェクト班員：久松 伸(生命・環境科学部)

Polyvinyl alcohol を用いた無血清保存液を適用してガラス化保存した C57BL/6J マウス前核期胚の体内および体外発生能

序論

実験動物として多くの分野で用いられるマウスにおいて、近交系である C57BL/6J 系統は全ゲノムシーケンズが行われていることから、Tg、ノックインおよびノックアウトなどの遺伝子改変マウスの作製に用いられる。これまで遺伝子改変マウスの作製は胚性幹細胞を用いる方法が主流であったが、ゲノム編集技術の開発により短期間で簡便に遺伝子改変マウスを作出することが可能となった。

これらの方法による遺伝子改変マウスの作出には多くの前核期胚が必要となる。前核期胚を採取するためには雌マウスに過剰排卵処置を施し、雄マウスと自然交配、もしくは未受精卵を回収して体外受精を行う必要がある。しかしこれらの方法は多くのドナーマウスと時間を要するだけでなく、採取できる前核期胚数が不確定であり、効率的に顕微注入を行うことができない。そこで前核期胚を超低温保存しておくことで、加温後すぐに顕微注入操作ができることや必要数の供試胚を準備できることから、効率的に遺伝子改変マウスを作出することができる。したがって、ゲノム編集の対象として利用可能な C57BL/6J 系統マウス前核期胚の超低温保存は今後さらに重要な技術となる。

本研究は、非血清添加保存液におけるガラス化保存法の改良を目的とし、FCS の代替として PVA を添加し、またさらなる発生能の向上のために CPA として COOH-PLL を添加した保存液をもちいてガラス化保存した C57BL/6J 系統マウス前核期胚の加温後の生存および発生能について検討した。

材料および方法

成熟卵子の採取には 4-8 週齢の C57BL/6J 系統雌マウスを、体外受精に用いた精子の採取には 12 週齢以上の C57BL/6J 系統雄マウスを、それぞれ実験に供した。7 週齢以上の ICR 系統雌マウスを胚移植のレシピエントに、精管結紮を施した 12 週齢以上の ICR 系統雄マウスを偽妊娠誘起に用いた。これらのマウスは日本チャールス・リバー株式会社(横浜, 神奈川, 日本)で購入した。また、これらのマウスは麻布大学附置生物科学総合研究所で、気温 $23 \pm 2^\circ\text{C}$ 、湿度 $55 \pm 5\%$ 、光制御(点灯時間: am 6:00-pm 18:00)、飼料と水は不断給餌の環境下で飼育した。前培養、共培養には human tubal fluid (HTF) を基礎培地として用いた。前培養には HTF に PVA を添加した PVA-HTF + methyl- β -cyclodextrin (M β CD) 0.4 mM、共培養には HTF にウシ血清アルブミン (BSA) を添加した mHTF + glutathione-SH (GSH) 1.25 mM を使用した。その後の体外発生培養には KSOM-aa を使用した。前核期胚の保存液には、PB1 (PB1 (+)) を作製した。前核期胚の洗浄には、PB1 + FCS (ライフテクノロジーズジャパン株式会社, 東京, 日本) または PVA を用いた。平衡液として PB 1 + FCS または PVA + 15% CPA (7.5% EG + 7.5% COOH-PLL)、ガラス化液として PB1 + FCS または PVA + 30% CPA (15% EG + 15% COOH-PLL) + Sucrose 0.5M を用いた。加温に用いる希釈液として、PB1 + FCS または PVA + Sucrose 0.5M を使用した。洗浄液、平衡液、ガラス化液、希釈液の高分子として 20% FCS を添加したものを control 区、同様に PVA 0%, PVA 0.01%, 0.1% を添加したものをそれぞれ PVA 0 区, PVA 0.01 区, PVA 0.1 区とした。CPA として Raffinose 18%, skim milk (和光純薬工業株式会社, 大阪, 日本) 3% 液 (以下 R18S3) を使用した。それぞれを計量して Milli-Q 水に加え、60°C の水温中で攪拌、溶解した。これを遠心処理 (15 分, 室温, 20,000 x g) し、上澄みを 0.22 μm Millipore 水 Filter により濾過滅菌を行い、1.5ml チューブに分注して -30°C で保存した。C57BL/6J 系統の成熟雄マウスを安楽死させ、精巣上体尾部を採取、滅菌濾紙上で脂肪、血管および血液を除去後、100 μl の R18S3 スポッ

ト内で眼科剪刀を用いて5~6回切り裂き、遮光下で1分間静置し、精子をR18S3中に分散させた。その後、精巢上部尾部を取り除き、精子懸濁液を0.25 ml プラスチックストロー (IMV technologies, フランス) に10 μ l ずつ封入し、ストローパウダー (富士平工業, 東京, 日本) で栓をした。封入後、液体窒素表面から2 cm の所で10分間の予備凍結を行い、液体窒素中に投下して凍結保存した。C57BL/6J 系統雌マウスに、妊馬血清性腺刺激ホルモン (eCG; 1000 単位: 日本全薬工業株式会社, 福島, 日本) 5 IU を含む0.05 ml の生理食塩水 (テルモ株式会社, 東京, 日本) を腹腔内投与し、eCG 投与から48時間後にヒト絨毛性腺刺激ホルモン (hCG; 3000 単位: ノバルティス アニマルヘルス株式会社, 東京, 日本 または、あすかアニマルヘルス株式会社, 東京, 日本) 5IU を含む0.05 ml の生理食塩水を腹腔内投与することで、過剰排卵処置を施した。hCG 投与から12~14時間後に、雌マウスを安楽死させて卵管膨大部を採取した。卵管膨大部はパラフィンオイル (関東化学株式会社, 東京, 日本) 上で切り裂いて、卵丘細胞卵子複合体 (以下 COCs) をパラフィンオイルで覆われた80 μ l の mHTF スポット内に回収した。なお、COCs の回収は精子の前培養と終了時間が同時になるように行った。

凍結保存精子ストローは液体窒素中から取り出し、37°C のウォーターバス内に15分間浸漬させて融解し、直径35 mm のプラスチックディッシュに精子懸濁液を排出した。精子懸濁液のうち5 μ l を、パラフィンオイルで覆われた200 μ l の PVA-HTF スポットに移し、生存性および運動性を確認し、インキュベーター内で1時間の前培養を行った。インキュベーター内の培養条件は全て37.5°C, 5% CO₂, 湿度飽和の条件下で行った。前培養中に、精子は、4% NaCl 中で運動性を失わせ、トーマ (式) 血球計算盤により最終濃度が 2.0×10^5 sperm/ml になるように計算を行った。前培養後、COCs を含む mHTF スポットに精子を加え、インキュベーター内で6時間の共培養を行った。

共培養後、COCs を KSOM - aa に移動し、優しくピペッティングすることで卵丘細胞を取り除いた。卵子は KSOM-aa で3回洗浄を行い、その後パラフィンオイルで覆われた50 μ l の KSOM-aa スポット内に移動し、位相差顕微鏡を用いて受精判定を行った。雌雄両前核を確認できたものを受精卵、すなわち前核期胚として、パラフィンオイルで覆われた50 μ l の KSOM-aa スポット内に回収し、ガラス化保存を行った。Cryotop 法は Shibao らの方法を一部改変することで行った。前核期胚を37.5°C の洗浄液にて3回洗浄し、室温の平衡液で3分間静置、室温のガラス化液に浸漬後1分以内に Cryotop (北里バイオファルマ, 静岡, 日本) の先端シートに充填し、液体窒素中に投入し、一週間以上保存した。体外発生培養は Kohaya らの方法に従って行った。Cryotop 先端シートを37.5°C の希釈液に3分間浸漬させ胚を回収し、室温の洗浄液に5分間静置した。その後37.5°C の KSOM-aa で3回洗浄し、パラフィンオイルで覆われた50 μ l の KSOM-aa スポット内に移動し、インキュベーター内で体外発生培養を行った。加温から1時間後に細胞膜が明瞭なものを生存、細胞膜が不明瞭なものを死亡として、細胞膜の形態により生存判定を行い (図), 24時間後に2細胞期胚, 96時間後に胚盤胞への発生を実体顕微鏡下で観察した。

ガラス化保存後の産仔への発育能を評価するために、加温した前核期胚を2細胞期まで体外発生培養後、胚移植を行った。また、胚移植は Shibao らによって報告されたものを一部改変することで行った。レシピエントに用いる ICR 系統雌マウスを精管結紮 ICR 系統雄マウスと交配させることで偽妊娠を誘起した。これを Day 0 として Day 1 の am 9:00-pm 0:00 に、膣栓が確認できたレシピエントに5~10個の2細胞期胚を各卵管に移植した。Day 20 の朝にレシピエントから分娩もしくは帝王切開によって得られた産仔を調べ、正常な表現型を示した産仔を確認した。試験区として、control 区、PVA 0.01 区由来の前核期胚を使用した。統計処理は、全ての実験は3回以上繰り返し行った。全てのデータはアークサイン変換後に Statcel4 (オーエムエス出版, 埼玉, 日本) 一元配置分散分析法 (one-way analysis of variance: ANOVA) により P 値を算出した。さらに、Scheffe's F test による多重比較検定により群間を検討した。また、P<0.05 を統計上有意味な差があるとした。

結果

FCS あるいは PVA を添加した保存液を用いて前核期胚のガラス化保存を行った。その加温後の生存率および発生率を表5に示す。生存率は PVA 0.01 区 (96.6%), PVA 0.1 区 (98.1%) において control 区 (91.5%) と同等の高い値を示し、有意な差はなかった (P>0.05)。2細胞期胚への発生率も同様に、PVA 0.01 区 (89.7%), PVA 0.1 区 (92.3%) において control 区 (87.8%) と同程度の高い値を示した (P>0.05)。胚盤胞率においても PVA 0.01 区 (78.4%), PVA 0.1 区 (51.9%), では control 区 (75.6%) と差のない値を示し、特に PVA 0.01 区では control 区と同程度の高い値を示した

($P>0.05$). PVA 0 区では生存率 (71.0%), 2細胞期率 (57.1%) において control 区, PVA 0.01 区, PVA 0.1 区に, また胚盤胞期率 (24.2%) において control 区, PVA 0.01 区に比べて有意に低い値を示した ($P>0.05$).

FCS あるいは PVA を添加した保存液を用いてガラス化保存した前核期胚を加温後 2 細胞期まで体外発生培養し, 胚移植を行った. その産仔への発育率を表 6 に示す. control 区では 88 個の胚を 6 匹のレシピエントに移植し, 41 匹の産仔が得られた (46.6%). PVA 0.01 区では 28 個の胚を 2 匹のレシピエントに移植し, 10 匹の産仔が得られ (35.7%), 産仔率において有意な差はなかった ($P>0.05$).

結論

本研究から, C57BL/6J マウス前核期胚のガラス化保存液において FCS の代替として 0.01% PVA を用いることができることが明らかにされた. 本研究の成果は, 効率的な遺伝子改変動物の作製に応用できると考えられる.

○プロジェクトNo. P 17 — 03

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：2017年4月1日～2020年3月31日

プロジェクト班長：和久井 信

プロジェクト班員：村上 賢

プロジェクト班員：高木 敬彦

プロジェクト班員：猪股 智夫

Histochemical analysis of lectins in rat Leydig cells after prenatal di(*n*-butyl) phthalate exposure

Shin Wakui^{1,*}

¹Department of Toxicology, Azabu University School of Veterinary Medicine, Kanagawa, Japan;

Original Article

Running title: lectin histochemistry in rat Leydig cells after prenatal DBP exposure

Category: A10, B9, C2, D5

和久井信 麻布大学獣医学部比較毒性学 〒252-5201 神奈川県相模原市中央区淵野辺 1-17-71
042(754)7111 wakuidvm@t.toshima.ne.jp

ABSTRACT

Recently we reported that prenatal injection of di(*n*-butyl) phthalate (DBP) into pregnant rats induced hyperplastic proliferation of Leydig cells (LCs) in postnatal puberty to adult stages in male offspring. The effects of complex carbohydrate chains on the structure and function of glycoconjugates in many major biological processes have been well documented. Thus, nine lectins (ConA, DBA, SBA, LPA, WGA, UEA, PNA, GS1, and BPA) conjugated with biotin were employed to analyze the glycoprotein staining patterns of LCs of 7-, 9-, 14-, and 17-week-old SD (srl) rats whose dams had been intragastrically administered 100 mg DBP/kg/day or the vehicle (corn oil) from days 12 to 21 post-conception. Compared to the vehicle group, the numbers of LCs in the DBP group was significantly increased at 9 and 14 weeks, and hyperplastic LCs were observed at 17 weeks. Although histochemical expressions of Con A, WGA, and GS1 were similar in the LCs of the DBP and vehicle groups at 7 through 17 weeks, those of the DBP group revealed that LPA, a sialic acid-specific lectin, apparently increased at 9 through 17 weeks of age. The present study indicates that prenatal DBP exposure induced up-regulation of sialic acid, and it might be involved the LC hyperplastic proliferation from puberty to adulthood in rats.

Keywords Rats. Testis. Leydig cell. Lectins. Prenatal DBP exposure

INTRODUCTION

Phthalates are chemicals used to improve the flexibility and durability of polyvinyl chloride (PVC) and comprise up to 40% of the volume of the plastic. They are classified as environmental endocrine disrupters (Silva *et al.*, 2003). Recently we

reported that prenatal injection of di(n-butyl) phthalate (DBP) into rats induced the hyperplastic proliferation of Leydig cells (LCs) in postnatal puberty to adult stages (Wakui *et al.*, 2013a,b, 2014).

Cellular glycoconjugates play important roles in cell recognition and interactions, affecting normal embryogenesis and postnatal development, including differentiation. Due to a unique capacity for recognition of the stereochemical configuration, charge, and accessibility of glycoconjugate determinants, lectins occupy an important place in modern carbohydrate histochemistry research (Sharon, 2007; Roth, 2011; Dan *et al.*, 2015). Lectins have a specific binding affinity for the sugar residues of glycoconjugates; therefore, they are used as histochemical reagents to investigate the distribution of glycoconjugates in various tissues and cells at various stages of differentiation and maturation and the ontogeny and phylogeny of various organs and tissues (Arya and Vanha-Peerttula, 1984, Arya and Vanha-Peerttula, 1986; Damjanov, 1987; Malmi *et al.*, 1990; Kume *et al.*, 2017). Lectin histochemistry has been used to study spermatogenic cells in many mammalian species, such as the rat (Arya and Vanha-Peerttula, 1984; Malmi *et al.*, 1990), mouse (Lee and Damjanov, 1985), cow (Arya and Vanha-Peerttula, 1985; Ertl and Wrobel, 1992), goat (Kurohmaru *et al.*, 1991), shrew (Kurohmaru *et al.*, 1995), and man (Lee and Damjanov, 1985; Malmi *et al.*, 1987). However, investigation of the lectin histochemistry of LCs has been limited.

Although it is thought that prenatally injected DBP does not act directly on postnatal LCs (Motohashi *et al.*, 2016a,b), it is not clear at this time whether DBP acts directly on fetal LCs or on the production of molecules by other testicular cell populations that alter glycoconjugates in the LCs. Although we previously reported that prenatal exposure to DBP increases the number of LCs in adult rats (Wakui *et al.*, 2013a,b, Shirai *et al.*, 2013), little information has been available on lectin-binding patterns during the development of LCs (Wakui *et al.*, 2013a,b,). The present study aimed to determine the age-related glycoconjugates of LCs after prenatal exposure to DBP.

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=8) were procured from SRL Co. (Shizuoka, Japan) on gestation day 0; the day of copulation was confirmed. Upon arrival, animals were distributed into dose groups using body weight randomization. Animals were individually housed in polycarbonate cages containing wood chip bedding in a high efficiency particulate air (HEPA)-filtered, mass-air-displacement room maintained on a 12-h light-dark cycle at approximately 22 ± 2 °C with a relative humidity of $55 \pm 5\%$. Animals were fed a conventional diet and had free access to food and water (MF, Oriental Yeast, Osaka, Japan). All experimental procedures were conducted under the approval of the Animal Care and Use Committee at Azabu University School of Veterinary Medicine; medical guidelines established by the National Institutes of Health and Public Health Service Policy on the Humane Use and Care of Laboratory Animals were followed. Pregnant rats (n=4 per group) were intragastrically (i.g.) administered DBP in ~0.5 ml corn oil (Nacalai Tesque Inc., Osaka, Japan)/animal at 0 (vehicle group) or 100 mg/kg/day on gestation days 12 to 21. Dose solutions were prepared fresh every morning and administered at 9:00 am. The regimen was based on previous studies that demonstrated adverse effects of DBP on fetal male rats at 100 mg/kg/d (Mylchreest *et al.*, 2002; Barlow and Foster, 2003; Wakui *et al.*, 2013a, b; 2014; Shirai *et al.*, 2013; Kume *et al.*, 2017). Offspring were weighed and sexed at birth. Litters were reduced to 10 offspring, 5 males and 5 females per dam, with a mother not given DBP or corn oil. Weaning was carried out at 21 d postpartum, and pups were then removed from mothers. Offspring were housed in polycarbonate cages (n=5 per cage; single sex) with wood chips as bedding that was replaced every 5 d. All animals were weighed at birth and again at 7, 9, 14, and 17 wks of age. For each time point, five males (one male per cage of each dose group) were randomly selected, weighed, anesthetized, and euthanized via CO₂ overdose. The testes were removed, weighed, and representative samples fixed in Bouin's buffered formalin for routine light microscopy observation.

Light microscopy morphometry

To count LCs, light microscope images were captured with a 40x objective on an Olympus BX53 microscope with a CCD attachment DP73 (Olympus Co., Tokyo, Japan). Because LCs are located within the interstitial tissue areas without seminiferous tubules, the number of LCs per unit square of interstitial tissue area (104 μm^2) was calculated using Image-pro plus v.7.0.1 (Media Cybernetics, Rockville, MD); to avoid sampling bias, we examined 50 randomly selected sites from each of 10 different specimen blocks per testis in each group.

Lectin histochemistry

Lectin histochemistry was performed using biotinylated lectins, avidin-biotin peroxidase complex, and 3,3'-diaminobenzidine tetrahydrochloride-H₂O₂ (Arya and Vanha-Perttula, 1984). The sections were counterstained with hematoxylin. Table 1 lists the lectins (biotinylated lectins were from EY Laboratories, Inc., San Mateo, CA, USA) used in this study, their abbreviations, the lectin concentration used, and their major sugar specificities. Concentrations were sufficient to detect relatively low levels of specific sugar residues. Some sections were treated with neuraminidase (0.1 units/ml of type VI from *Clostridium perfringens*, Sigma, USA) to remove terminal N-acetyl neuraminic basic residues (Jones *et al.*, 1995). The following controls were used: (1) replacement of the lectin by the corresponding buffer; (2) except SNA and MAA, replacement with its competing sugar (Ueno *et al.*, 1992; Wakui *et al.*, 1996; Jones *et al.*, 1995), and (3) prior to incubation with SNA and MAA, sections were preincubated with neuraminidase (Sigma) using the methods of Jones *et al.* (1993).

Statistical analysis

For each data set, the mean value, standard deviation, and standard error of the mean were calculated and compared by a chi-square test or Scheffé's F test using the computer statistical analysis system Stat View-J 5.0. A p value of less than 0.05 was regarded as statistically significant (Abacus Concepts, CA, USA).

Testosterone level analysis

Testicular T levels of individual testes from four male rats per group at each endpoint were measured by radioimmunoassay as described previously (Mylchreest *et al.*, 2002). After dissection, testes were snap frozen on liquid nitrogen and stored at -80°C before analysis. Testes were defrosted and homogenized individually in 0.5 ml PBS; aliquots of this solution were then extracted with 2 ml diethyl ether, shaken for 5 min, and then placed in a bath of methanol cooled with dry ice. The nonaqueous portion of the extract was then decanted, dried overnight in a fume hood, and reconstituted in assay buffer. The limit of detection of assay was 40 pg/testis.

Statistical analysis

For each set of mean values, standard deviation, and standard error of means were calculated and compared using Scheffé's F test with the statistical computer analysis system Stat View-J 5.0 (Abacus Concepts).

RESULTS

Pregnant dams were intragastrically (i.g.) administered DBP at 0 mg (control) or 100 mg DBP/kg/day in corn oil on gestation days 12 to 21. At post-birth weeks 7, 9, 14, and 17, no statistical differences regarding average body weight (g), litter size, pup survival rate, or sex ratio were observed for any group on any day examined (data not shown). The 100 mg/kg dose group displayed a statistically significant decrease in testicular weight after 9 weeks post-birth, although animal weights for all dose groups were similar to those of the vehicle group throughout the entire study. Light microscopy observation revealed that the number of LCs in the 100 mg/kg group was significantly higher (LC hyperplasia) than in the control group at 9, 14, and 17 weeks; all other groups at all ages were similar to those of the vehicle group. Testicular

testosterone levels of the DBP group at 9, 14, and 17 weeks were significantly lower than those of vehicle group.

The affinities of the nine lectins gave typical and consistent staining patterns in the LCs of vehicle and DBP-treated groups. With specific inhibitory sugars for each lectin, the staining was abolished. Each lectin is separately described, and the staining patterns are compiled in Table 1. The strongest stainings of lectins in the cytoplasm of LCs in both groups were observed with ConA, WGA, and GS1 at 7 through 17 weeks, but 9-, 14-, and 17-week-old rats of the DBP group showed reactions with LPA. In the testis, positive LPA staining was present in the LCs of the DBP group at 9, 14, and 17 weeks. The Leydig cells were immunohistochemically positive for ConA, WGA, GS-1, and LPA.

DISCUSSION

Phthalates are ubiquitous contaminants of the environment. Humans and animals are inevitably exposed to these chemicals, and testicular Leydig cells (LCs) are a primary target of them (Mylchreest *et al.*, 1998; Barlow and Foster, 2003; Wakui *et al.*, 2013a,b;2014). LCs strongly stained with lectins ConA and WGA also have been previously reported in Wistar rats, as well as negative staining for DBA, SBA, and UEA1 (Arya and Vanha-Perttula, 1984; Malmi *et al.*, 1990). LCs express cytoplasm binding sites for lectin ConA, indicating the presence of oligosaccharides with terminal alphaGalNAc and terminal/internal alphaMan, and for WGA, indicating the presence of terminal (GlcNAc-beta-(1,4)-GlcNAc)1-4 (Damjanov, 1987). In the present study, LCs of SD rats were negative for DBA, SBA, UEA1, PNA, and SPA, while GS1 binding sites were positive in cytoplasm; these results indicate that certain glycoconjugates bearing D-galactose, N-acetyl-D-galactosamine, and N-acetyl-D glucosamine residues are expressed on the cytoplasm of LCs. Therefore, ConA, WGA, and GS1 showed the same binding pattern in which all three lectins bound to the plasma membrane and cytoplasm of LCs from 7 through 17 weeks in both DBP and vehicle groups.

A simple and rapid method for isolation of the sialic acid-specific lectin, *Limulus polyphemus* hemagglutinin (LPA), from the hemolymph of *Limulus polyphemus* has been described for use as a cytochemical and biochemical probe (Meresam, 1982). LPA binding sites were distributed in the cytoplasm of all DBP groups at 9 through 17 weeks of age. Moreover, LC hyperplasia induced by in utero exposure of rats to DBP was positive for sialic acids at 17 weeks of age. Sialic acids are members of a large family of carboxylated sugars frequently found as terminal units of glycoconjugate oligosaccharide chains. These sugars confer a negative charge to the cell surface and are responsible for the intercellular and/or intermolecular recognition phenomena as specific ligands (Sharon, 2007). It has been reported that the expression of cellular sialic acid correlated to malignant cellular transformation (Malmi *et al.*, 1987, 1990; Jones *et al.*, 1993). It is known that changes occur in the structure of sialic acid secreted by malignant colorectal epithelium (Ajioka *et al.*, 1997), and sialic acid is detectable in cancerous and precancerous lesions but not in normal colorectal mucosa (Ajioka *et al.*, 1997). The results of our present study may indicate a decrease in the stainability of LPA at 14 and 17 weeks old in the vehicle group, while that of the DBP group was positive for LPA. It seemed that prenatal DBP exposure induced sialic acid up-regulation, and it might be involved in the hyperplastic proliferation of LCs from puberty to adulthood in rats. It revealed that LPA is a useful histochemical marker for fetal and adult LCs during testicular differentiation and development of the rat.

Our previous study revealed that prenatal exposure of rats to DBP induced a gradual increase in testicular disorders concomitant with postnatal maturation, and thus the effects of prenatal DBP exposure on rat testis might be a delayed effect (Wakui *et al.*, 2013a,b; 2014). In utero exposure to phthalates caused a notable reduction of serum T during puberty to adulthood in that study (Wakui *et al.*, 2013a,b; 2014). It has been shown that reduced T production was due to either decreased steroidogenic enzyme activity or lower cholesterol-transporting protein levels after in utero phthalate exposure (Wakui *et al.*, 2013a,b; 2014). The cause of the increase adult LC numbers after in utero exposure is unclear. Further studies are necessary to correlate the glycoproteins of the epididymal fluid with those attached to the spermatozoan surface and their affinity for different lectins.

ACKNOWLEDGMENT

This study was partially supported by a research project grant award by the Azabu University Research Services Division, and the Promotion and Mutual Aid Corporation for Private Schools of Japan, a Grant-in-Aid for Matching Fund Subsidy for Private Universities, provided funding for this project. This study was supported by Grants-in-Aid (C) #21580371 from the Ministry of Education, Culture, Sports, Science and Technology of Japan.

Conflict of Interest

The authors declare that there is no conflict of interest.

REFERENCES

- Ajioka, Y., Xing, P.X., Hinoda, Y. and Jass, J.R. (1997): Correlative histochemical study providing evidence for the dual nature of human colorectal cancer mucin. *Mole. Histol.* **29**, 143-153.
- Arya, M. and Vanha-Perttula, T. (1984): Distribution of lectin binding in rat testis and epididymis. *Andrologia* **16**, 495-508.
- Arya, M. and Vanha-Perttula, T. (1985): Lectin-binding pattern of bull testis. *J Androl.* **6**, 230-242.
- Arya, M. and Vanha-Perttula, T. (1986): Comparison of lectin-staining pattern in testis and epididymis of gerbil, guinea pig, mouse and nutria. *Am. J. Anatomy* **175**, 449-469.
- 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.
- Damjanov, I. (1987): Biology of disease. Lectin cytochemistry and histochemistry. *Lab. In.* **57**, 5-20
- Dan, X., Lui, W. and Hg, T.B. (2015): Development and applications of lectins as biological tools in biomedical research. *Med. Res. Rev.* **36**, 221-247.
- Ertl, C. and Wrobel, K. H. (1992): Distribution of sugar residues in the bovine testis during postnatal ontogenesis demonstrated with lectin-horseradish peroxidase conjugates. *Histochemistry* **97**, 131-171.
- Jones, C.J.P., Morrison, C.A. and Stoddart, R.W. (1993): Histochemical analysis of rat testicular glycoconjugate. 3. Non-reducing terminal residues in seminiferous tubules. *Histochemical. J.* **25**, 711-718.
- Jones, H.B., Garside, D.A., Liu, R. and Roberts, J.C. (1995): The influence of phthalate esters on Leydig cell structure and function in vitro and in vivo. *Exp. Mole. Pathol.* **58**, 179-193.
- Kume, E., Okayama, Y., Sugiyama, M., Takahashi, H., Mutou, T., Wempe, M.F., Ikegami, M., and Wakui, S. (2017): Quantitative morphometric analysis of vimentin filaments in Sertoli cells of rats after in utero DBP exposure. *Fundamental Toxicologic Sciences* **4**, 85-93.
- Kurohmaru, M., Kanai, Y. and Hayashi, Y. (1991): Lectin-binding patterns in the spermatogenic cells of the shiba goat testis. *J. Vet. Med. Sci.* **53**, 893-987.
- Kurohmaru, M., Kobayashi, H., Kanai, Y. and Hayashi, Y. (1995): Distribution of lectin binding in the testes of the musk shrew *Suncus Murimus*. *J. Anatomy* **187**, 323-329.
- Lee, M.C. and Damjanov, I. (1985): Lectin binding sites on human sperm and spermatogenic cells. *Anat. Res.* **212**, 282-287.
- Malmi, R., Kallajoki, M. and Souminen, J. (1987): Distribution of glyconconjuates in human testis. A histochemical study using fluorescein- and rodamine-conjuated lectin. *Andrologia* **19**, 322-332.
- Malmi, R., Frojzman, K. and Soderstom, K.O. (1990): Differentiation-related changes in the distribution of glycoconjugates in rat testis. *Histochemistry* **94**, 387-395.
- Meresam, V., Iwanij, V., Smith, Z.D.J. and Jamieson, J.D. (1982): Purification and use of limulin: a sialic acid-specific lectin. *J. Histochem. Cytochem.* **30**, 938-946.
- Motohashi, M., Wempe, MF, Mutou, T., Takahashi, H., Kansaku, Ikegami, M., N., Inomata, T., Asari, M., and Wakui, S. (2016a): Male rats exposed *in utero* to di(n-butyl) phthalate: age-related changes in Leydig cell smooth endoplasmic reticulum and testicular testosterone-biosynthesis enzymes. *Proteins Reprod. Toxicol.* **59**, 139-146

- Motohashi, M., Wempe, M.F., Mutou, T., Okayama, Y., Kansaku, N., Takahashi, H., Ikegami, Asari, M., and Wakui, S. (2016b): *In utero*-exposed di(*n*-butyl) phthalate induce dose dependent, age-related changes of morphology and testosterone-biosynthesis enzymes/associated proteins of Leydig cell mitochondria in rat. *J. Toxicol. Sci.* **41**, 195-206
- Mylchreest, E., Cattley, R. and Foster, P.M. (1998): Male reproductive tract malformations in rats following gestational and lactational exposure to di(*n*-butyl) phthalate: an antiandrogenic mechanism? *Toxicol. Sci.* **43**, 47-60
- Mylchreest, E., Car, M.,Wallace, D.G., and Foster, P.M.D. (2002): Fetal testosterone insufficiency and abnormal proliferation of Leydig cells and gonocytes in rats exposed to di(*n*-butyl) phthalate. *Reprod. Toxicol.* **16**, 47-60.
- Roth, J. (2011): Lectin for histochemical demonstration of glycans. *Histochem. Cell Biol.* **136**, 117-130.
- Sharon, N. (2007) Lectin: Carbohydrate-specific reagents and biological recognition molecules. *J Biol. Chem.* **282**, 2753-2764.
- Shirai, M., Wakui, S., Wempe, MF., Muto, T., Oyama, N., Motohashi, M., Takahashi, H., Kansaku, N., Inomata, T., Hano, H. and Endou, H. (2013) Male Sprague-Dawley rats exposure to in utero di(*n*-butyl) phthalate: dose dependent and age-related morphological change in Leydig cells smooth endoplasmic reticulum. *Toxicol. Pathol.* **41**, 984-981.
- Silva, D.M., Barr, D.B., Reidy, J.A., Kato, K., Malek, N.A., Hofge, C.C., Hurtz, D., Calafat, A.M., Needham, L.L., and Brock, J.W. (2003): Glucuronidation patterns of common urinary and serum monoester phthalate metabolites. *Arch.Toxol.* **77**, 561-567
- Ueno, K., Ohyama, M. and Lim, D.J., (1992): Expression of sialic acids in developing murine tubotympanum. *Acta. Otolargologica.* **112**, 824-830.
- Wakui, S., Furusato, M., Takahashi, H., Motoya, M., and Ushigome, S. (1996) Lectin histochemical evaluation of glycoconjugates in dog efferent ductules. *J. Anat.* **188**, 541-546
- Wakui, S., Takahashi, H., Muto, T., Shirai, M., Jutabha, P., Anzai, N., Wempe, M.F., Kansaku, N., Hano, H., Inomata, T. and Endou, H. (2013a): Atypical Leydig cell hyperplasia in adult rats with low T and high LH induced by prenatal di(*n*-butyl) phthalate exposure. *Toxicol. Pathol.* **41**, 480-486
- Wakui, S., Motohashi, M., Satoh, T., Shirai, M., Muto, T., Takahashi, H., Wempe, M.F., Endou, H., Inomata, T., and Asari, M. (2013b) Nuclear morphometric analysis of Leydig cells of male pubertal rats exposed *in utero* to Di(*n*-butyl) phthalate. *J. Toxicol. Pathol.* **26**, 439-446.
- Wakui, S., Shirai, M., Motohashi, M., Muto, T., Oyama, N., Wempe, M.F., Takahashi, H., Inomata, T., Ikegami, M., Endou, H., and Asari, M. (2014) Effect of in utero exposure to di(*n*-butyl) phthalate for estrogen receptor α , β , and androgen receptor of Leydig cell on rats. *Toxicol. Pathol.* **42**, 877-887

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（2018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

水生生物飼育施設は、爬虫類以下の脊椎動物や貝類など軟体動物、水生植物などを個別の環境条件で飼育・実験するための施設である。

生物科学総合研究所本館とは別棟に位置する。個々に温度・照明の調節管理ができる飼育室4室と共通利用できる前室、ユニット型低温室1室からなる。

○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。

○遺伝子組換え実験施設

遺伝子組換え実験施設は、BSL 1と2に対応したバイオハザードレベルの実験が可能で、本学の遺伝子組換え研究を支援するためのものである。本学遺伝子組換え実験安全委員会が主催する遺伝子組換え実験のための教育訓練を受けた教員もしくは学生がこの施設を利用できる。

平成 29 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 29 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 29 年 4 月現在

利用場所	種類	利用者 (円/日) (ケージ・水槽等)	1 ケージ当たり 最大収容匹数	内 訳 (円)	
				基本料金	飼料費
S P F	マウス	16	3	10	6
	ラット	30	3	20	10
	ウサギ	47	1	30	17
ク リ ー ン	マウス	11	3	5	6
	スナネズミ	17	3	10	7
	ハムスター	24	2	15	9
	ラット	20	3	10	10
	モルモット	17	2	10	7
	ウサギ	31	1	17	14
毒 性	マウス	11	3	5	6
	スナネズミ	17	3	10	7
	ハムスター	24	2	15	9
	ラット	20	3	10	10
	モルモット	17	2	10	7
	ウサギ	31	1	17	14
コ 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 29 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	スズメ	ナミ	ネコ	ニワトリ	ウズラ	
4月	2,573	501	0	18	0	5	0	2	374	3,473
5月	2,567	586	1	18	0	5	20	2	383	3,582
6月	2,523	472	2	17	0	4	10	2	384	3,414
7月	2,640	437	2	17	0	3	0	2	266	3,367
8月	2,703	519	1	17	0	3	0	0	262	3,505
9月	2,698	738	0	17	0	3	0	0	261	3,717
10月	2,826	824	0	16	0	3	0	0	268	3,937
11月	2,670	516	0	16	0	3	0	0	266	3,471
12月	2,853	356	0	16	0	3	0	0	264	3,492
1月	2,889	255	0	17	0	2	0	0	263	3,426
2月	2,916	263	0	18	0	2	10	0	261	3,470
3月	2,901	393	0	18	0	2	10	0	259	3,583
合計 (匹数)	32,759	5,860	6	205	0	38	50	8	3,511	42,437

・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

○ No. 17—01

研究テーマ 糖鎖機能の解明に関する研究

使用申請者 山下 匡

学内共同実験者 永根大幹

利用実験エリア 組み換え DNA エリア

平成 29 年度の研究概要と成果

研究概要：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、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。研究成果：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、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。

研究成果報告

- 学会発表 1 横森瑛美, 永根大幹, 森元美紗子, 岡本まり子, 池田輝雄, 山下匡・ガングリオシド GM3KO マウスにおけるアレルギー性皮膚炎を促進する原因は肥満細胞である・日本獣医学会・2017 年 9 月・口頭発表
- 学会発表 2 山下匡, 永根大幹, 横森瑛美, 森元美紗子, 柴田悠貴, 斉場遼介, 岡本まり子, 上家潤一, 池田輝雄・ガングリオシド GM3 はマクロファージの機能に影響を与える・第 14 回 バイオオプティクス研究会・2017 年 9 月・招待講演
- 学会発表 3 斉場遼介, 永根大幹, 石川三友紀, 山下匡・皮膚バリア機能における SMS1、2 の役割・日本生化学会・2017 年 12 月・ポスター発表

○ No. 17—02

研究テーマ 疾患における糖鎖・糖脂質合成酵素の役割の解明

使用申請者 永根大幹

学内共同実験者 山下 匡

利用実験エリア 組み換え DNA エリア

平成 29 年度の研究概要と成果

本年度は、疾患のうち腫瘍性疾患に関する研究を実施した。脂質ラフトは細胞膜上のマイクロドメインであり、さまざまな機能を制御していると考えられるが、その詳細は不明である。

ガングリオシド GM3 合成酵素欠損マウスにおいて腫瘍内の血管新生が亢進した。また、スフィンゴリエリン合成酵素欠損マウスでは反対に血管新生が抑制された。よって、脂質ラフトの構成成分により、血管新生レベルが制御されることが示唆された。本研究は平成 30 年度に論文・学会発表予定である。

また、新規制がん剤およびデバイスの開発を実施した。

研究成果報告

論文 Nagane M, Kanai E, Shibata Y, Shimizu T, Yoshioka C, Maruo T, Yamashita T. Sulfasalazine, an inhibitor of the cystine-glutamate antiporter, reduces DNA damage repair and enhances radiosensitivity in murine B16F10 melanoma. PloS one. 2018; 13(4): e0195151.+C34

学会発表 和田 崇彦、永根 大幹、岸 和寿、金井 詠一、柴田 悠貴、中村 晴彦、山下 匡、悪性黒色腫における GHz 帯マイクロ波によるがん温熱療法の基礎的検討、日本放射線影響学会学術集会、10月27日、千葉、ポスター

○ No. 17—03

研究テーマ 膜輸送体の構造解析による疾病機序の解明

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 29 年度の研究概要と成果

イヌのコリン輸送体 CTL1～5 についてその構造を前回報告した。本年度はその組織局在について解析した。その結果は CTL1～3 は報告されていた発現様式を示していたが、CTL4、5 については他の種と異なることが示唆された。現在、その組織内における 4、5 の詳細な局在を特異抗体を用いて解析している。

研究成果報告

なし

○ No. 17—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 29 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討した。

ホルスタイン種乳牛を基礎飼料に 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 2 週間前から分娩後 3 週目まで VK3 を給与し、分娩後 4 週まで実験を行った。血中骨型アルカリフォスファターゼ濃度は投与群が高値を示す傾向にあり、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

○ No. 17—05

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 29 年度の研究概要と成果

Helicobacter pylori に対するウシ免疫初乳抗体をヒトへ応用することを想定し、牛乳と免疫初乳抗体を混合した投与液を感染させたスナネズミへ反復経口投与し除菌率を評価する実験を検討している。現在、免疫初乳抗体と牛乳を混合したものの除菌効果を *in vitro* で検討している。この結果を基にスナネズミでの実験に使用する投与液の免疫初乳抗体と牛乳との混合割合など条件を決定する予定である。

研究成果報告

なし

○ No. 17—06

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 29 年度の研究概要と成果

Aspergillus fumigatus あるいは *Candida albicans* をラットへ免疫して得た抗血清を用いて間接蛍光抗体法を応用した簡易な抗体価測定法について検討している。*C. albicans* を結合させたラテックス粒子を無蛍光スライドガラスに固定し、系列希釈した抗血清を反応させた。反応終了後に FITC 標識抗ラット IgG 抗体を反応させ、蛍光顕微鏡で観察した。蛍光が認められない 1 つ前の希釈倍率を終価とした。抗血清の抗体価を求めることができたが、バックグラウンドが汚いため、ラテックス粒子の塗抹方法などを再検討している。

研究成果報告

なし

○ No. 17—07

研究テーマ 胎仔期から育成期にかけての ω 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 29 年度の研究概要と成果

C57BL/6 雌マウスを α リノレン酸を主とした ω 3 系列脂肪酸を給与する区と無給与区の 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。6 週齢の産仔の腓腹筋の酸化的筋線維の割合を NADH 脱水素酵素活性を用いて観察したところ、母マウスへの ω 3 系列脂肪酸の給与の影響はなかった。また、腓腹筋のミオシン重鎖タンパク質のアイソフォームの mRNA 発現量を調べたところ、母マウスへの ω 3 系列脂肪酸の給与の影響はなかった。以上から、 α リノレン酸を主とした ω 3 系列脂肪酸の母マウスへの給与の有無では、産仔の筋肉の筋線維構成は影響を受けないと考えられた。

研究成果報告

なし

○ No. 17—08

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 29 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、離乳時に採取した産子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が、腓腹筋のミオシン重鎖タンパク質各アイソフォームの mRNA 発現量に及ぼす影響はなく、個々の筋線維の太さにも影響はなかった。以上の結果から、妊娠期ならびに授乳期の雌ラットへのタウリン給与は、産子の筋肉を小さくするが、筋線維構成には影響しないと考えられる。

研究成果報告

学会発表 高橋知也、鈴木武人、勝俣昌也・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・沖縄県那覇市・ポスター発表

○ No. 17—11

研究テーマ 乳酸菌投与による潰瘍性大腸炎モデルマウスへの影響

使用申請者 竹田志郎

学内共同実験者 山下 匡

学内共同実験者 永根大幹

平成 29 年度の研究概要と成果

潰瘍性大腸炎モデルマウス（デキストラン硫酸ナトリウム 1% 水溶液自由摂取 C57BL/6 マウス）へ、食肉製品由来の *Lactobacillus (L.) sakei* または *L. curvatus* に属する乳酸菌殺菌菌体を 10 菌株各々投与することにより、同マウスにおける乳酸菌株の効能について評価した。評価項目として、マウスの体重減少の動向ならびに結腸の長さについて観察した。その結果、供試した食肉由来乳酸菌株では対照区（水投与群）と比較して、有意に体重減少および結腸の長さの収縮を抑える菌株は認められなかった。なお比較のために使用した、*L. curvatus* の標準菌株 NBRC15884 株では対照区に比べ、有意な体重減少の抑制が認められた。従って、潰瘍性大腸炎モデルマウスにおいて、投与する乳酸菌株レベルで、マウスへの効能が異なる可能性が考えられた。

研究成果報告

なし

○ No. 17-12

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

使用申請者 恩田 賢

利用実験エリア 組み換え DNA エリア
RI 実験施設エリア

平成 29 年度の研究概要と成果

胎盤組織は泌乳期乳腺組織に次いで PTHrP の遺伝子発現量が多く、胎子の成長に重要な役割を果たしていると考えられているが、母牛の周産期疾患への関与も疑われている。そこで昨年度に引き続き、乳牛の難産の際に臍帯動脈の採血と胎盤節の採取を行い (3 頭から 12 頭に増加)、胎子と母牛の血中 PTHrP 濃度の測定と、PTHrP 遺伝子の発現量の解析を行った。その結果、臍帯動脈血液中 PTHrP 濃度は 2 ~ 6 pM 程度であったが、母牛の血液中には以前と同様、PTHrP を検出することは出来なかった。また胎盤節子宮側では胎盤節胎子側よりも PTHrP 遺伝子の発現が有意に高かった。帝王切開の際ではあるが、胎子血中で PTHrP が検出されるのに対し、母牛の末梢血中では検出されないことから、胎盤停滞や乳熱などの周産期疾患への胎盤由来 PTHrP の関与の可能性は低いと考えられた。

研究成果報告

- 論文 1 R. Sato, E. Kanai, G. Kitahara, M. Noguchi, K. Kawai, Y. Shinozuka, A. Tsukamoto, H. Ochiai, K. Onda, A. Steiner. Transrectal guidance of the ovaries reduces operative time during bovine laparoscopic ovariectomy. *J. Vet. Med. Sci.* 79 (12) :2019-2022, 2017.
- 論文 2 K. Kawai, Y. Shinozuka, I. Uchida, K. Hirose, T. Mitamura, A. Watanabe, K. Kuruhara, R. Yuasa, R. Sato, K. Onda, H. Nagahata. Control of *Pseudomonas mastitis* on a large dairy farm by using slightly acidic electrolyzed water. *Anim. Sci. J.* 88 (10) :1601-1605, 2017.
- 論文 3 R. Sato, Y. Une, H. Madarame, H. Hanami, E. Kanai, H. Murakami, A. Tsukamoto, T. Suzuki, H. Ochiai, M. Kikuchi, H. Tanaka, K. Onda. A nasal osteoma with an acute course in a Japanese Black heifer. *J. Vet. Med. Sci.* 79 (7) :1220-1224, 2017.
- 論文 4 R. Sato, K. Onda, M. Murakami, D. Ito, H. Madarame. Congenital anterior staphyloma associated with Peters' anomaly and aphakia in a Holstein calf. *J. Vet. Med. Sci.* 79 (7) :1151-1154, 2017.
- 論文 5 R. Sato, T. Sumiyoshi, A. Tsukamoto, E. Kanai, K. Kawai, Y. Shinozuka, H. Ochiai, K. Onda. A Holstein heifer that delivered following amputation of a fractured limb. *Large Animal Review* 23 (3) :115-117, 2017.
- その他の雑誌、報告書 恩田賢, 安井喬. 乳牛における分娩性低カルシウム血症の予防. *家畜診療* 64 (1) : 5-14, 2017.
- 学会発表 1 末元和輝, 西尾卓馬, 杉田和俊, 佐藤礼一郎, 恩田賢. ホルスタイン種乳牛における母子間と臍帯動脈血間のミネラル濃度の差異. 第 160 回日本獣医学会学術集会, 2017 年 9 月 15 日, 鹿児島. 口演.
- 学会発表 2 佐藤礼一郎, 金井詠一, 野口倫子, 恩田 賢. 牛の腹腔鏡下卵巣摘出術における経直腸卵巣ガイドが手術時間に及ぼす影響. 第 160 回日本獣医学会学術集会, 2017 年 9 月 15 日, 鹿児島. 口演.

○No. 17-13

研究テーマ 神経膠細胞の機能に関する研究

使用申請者 坂上元栄

平成 29 年度の研究概要と成果

アセチルコリン関連酵素とグリア細胞の機能との関連を明らかにするため、C57B6 マウスに脳損傷処置を行い、グリア細胞を活性化させたときの、これらの関連酵素の発現について免疫組織化学的手法を用いて検討した。脳損傷処置により星状膠細胞と小膠細胞の活性化が観察され、これらの細胞に、抗アセチルコリンエステラーゼ抗体、および抗コリンアセチルトランスフェラーゼ抗体の陽性反応が観察された。以上のことから、星状膠細胞と小膠細胞が活性化に伴い、アセチルコリン関連酵素の発現が増加すると考えられた。

研究成果報告

学会発表 1 ○堀尾 朋世, 小澤 秋沙, 池本 美貴, 中内 維彌, 佐藤 幸妃, 豊田 紗千乃, 坂上 元栄, “脳損傷モデルマウスにおける astrocyte・microglia での acetylcholinesterase および choline acetyltransferase 局在” 第 123 回 日本解剖学会総会・全国学術集会, 2018 年 3 月, 東京. ポスター発表

○No. 17-14

研究テーマ マウスにおける表皮色素細胞の分布決定因子同定に関する研究

使用申請者 坂上元栄

平成 29 年度の研究概要と成果

国立遺伝学研究所 哺乳動物遺伝研究室より導入し、JF1/MS マウスを繁殖して、個体数を増やしつつある。個体を増やしつつ、発生学的な毛包形成と表皮色素細胞の分布、毛周期を観察するため、胎齢 7 日から生後 12 週齢までを目安にサンプリングを行っている途中である。

研究成果報告

なし

○ No. 17—16

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

平成 29 年度の研究概要と成果

本研究では、人の口臭を測定する目的で開発されたポータブル・ガスクロトグラフィーであるオーラルクロマを用いて、犬の口臭に含まれる揮発性硫化物（硫化水素（H₂S）、メチルメルカプタン（CH₃SH）、硫化メチル（CH₃）₂SH）量を測定し、その実用性を評価した。本研究の成績は、犬の呼気サンプルを用いたオーラルクロマによる揮発性硫化物の濃度測定は、侵襲性のない、迅速かつ定量的な口臭測定法として獣医基礎研究のみならず臨床研究にも有用であることを示唆するものである。

研究成果報告

論文 Iwashita N, Sugita K, Shirai M, Murata S, Yanagisawa S, Goto S, Takagi Y, Asai F: Application of a portable gas chromatographic measurement of canine oral malodor. *Fundam Toxicol Sci*, 4; 23-29, 2017.

学会発表 岩下直樹、杉田和俊、白井明志、村田彩也香、柳澤志穂、後藤純雄、高木敬彦、浅井史敏：ポータブル・ガスクロマトグラフィーを用いたイヌ口臭の定量的測定：第 160 回 日本獣医学会、2017 年 9 月 13 日、鹿児島、口演

○ No. 17—17

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

平成 29 年度の研究概要と成果

本研究では、肥満を伴う 2 型糖尿病モデル WBN/Kob-Leprfa（以下 fa/fa）ラットにおいて高食塩負荷による 2 型糖尿病発症に対する影響を調べることにより、2 型糖尿病と食塩の関連性について検討した。fa/fa ラットにおける高食塩負荷は、食塩感受性による高血圧を発症するとともに、肥満を改善し、高血糖の発症を抑制することが示された。また高血糖の発症を抑制した機序として、高食塩食によるインスリン抵抗性の改善および過食の抑制によることが示唆された。

研究成果報告

論文 Takagi Y, Kadowaki H, Kobayashi I, Ito K, Ito K, Shirai M, Asai F: The effects of high-sodium intake on systemic blood pressure and vascular responses in spontaneously diabetic WBN/Kob-Leprfa/fa rats. *Clin Exp Pharmacol Physiol*, 44; 305-312, 2017.

○ No. 17—19

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 29 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, Cu を選択し、水槽中でそれぞれ 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し、ICP-MS で微量金属を測定したところ、Fe は褐虫藻へ取り込まれた後、軟体組織に取り込まれ、他の元素と異なる挙動を示した。

研究成果報告

論文 A. Itoh, N. Kabe, S. Kuwae, E. Oura, S. Hisamatsu, Y. Nakano, Y. Zhu, Bull. Chem. Soc. Jpn., 90 (5), 520-526 (2017). Multi-Element Profiling Analyses of Symbiotic Zooxanthellae and Soft Tissues in a Giant Clam (*Tridacna crocea*) Living in the Coral Reefs and Their Intake Process of Zn and Cd in the Coral Reefs and Their Intake Process of Zn and Cd

○ No. 17—20

研究テーマ 異物代謝酵素を含んだ細胞内画分の調製

使用申請者 関本征史

平成 29 年度の研究概要と成果

雄性 SD ラットに異物代謝酵素を誘導する薬剤（ β ナフトフラボン、フェノバルビタール、デキサメタゾン、ピラゾール）を投与後、と殺し、肝臓から異物代謝酵素を含んだ細胞内画分（S9）を調製した。このラット S9 を、ヒトやイヌ S9 とともに用い、その異物代謝酵素活性を測定するとともに、間接変異原性物質（PhIP、IQ および 2-AA）の代謝活性化への影響を Ames 試験により検討した。その結果、ラット S9 とヒト、イヌ S9 間では異物代謝酵素活性および変異原性物質の代謝活性化能に相違が見られた。

研究成果報告

学会発表 並木萌香、高橋波輝、野田篤、遠藤治、関本征史・イヌ肝 S9 による変異原物質の代謝活性化：ラット S9 との比較・日本薬学会第 138 年会・金沢・ポスター発表

○ No. 17—21

研究テーマ 環境水で飼育した水生生物での遺伝子発現変動の解析

使用申請者 関本征史

学内共同実験者 松井久美

学内共同実験者 伊藤彰英

平成 29 年度の研究概要と成果

環境水中で水生生物の飼育と、体内での遺伝子発現変動を検討していたが、実験の準備が整っていなかったため、平成 29 年度は実施しなかった。

研究成果報告

なし

○ No. 17—22

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 29 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、その神経細胞への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 1 黒川健太、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 S-ニトロシル化の関与・ConBio2017・2017 年 12 月 7 日・ポスター発表

学会発表 2 並木湧佑、藤本真理、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硫化水素の関与・ConBio2017・2017 年 12 月 7 日・神戸ポートアイランド・ポスター発表

○ No. 17—23

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 29 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これまで困難であった。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、移動などの細胞動態と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

なし

○ No. 17—24

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

使用申請者 滝沢達也

平成 29 年度の研究概要と成果

ラット子宮では一酸化窒素 (NO) が産生されていることが知られている。近年、NO と硫化水素 (H₂S) の相互作用が知られていることから、ラット子宮における H₂S 合成酵素 (Cbs, Cse, 3Mst, Cat) 遺伝子の経日的発現を検討した。子宮筋層及び子宮頸管において、Cbs mRNA 発現は非妊娠及び卵巣摘出群 (OVX) と比較して、それぞれ妊娠 13 日、妊娠 17 日をピークに有意に増加した。特に子宮筋層における Cbs mRNA 発現は非妊娠と比較し、妊娠 17 日は数十倍の発現増加が見られ、その後、妊娠 21 日で急激に減少した。Cbs タンパク質発現では妊娠 13 日をピークに有意な増加が見られた。これらの結果より、ラット子宮平滑筋の弛緩と収縮の調節に CBS を介した H₂S 産生が関与している可能性が示唆された。今後、両者の相互作用を検討したい。

研究成果報告

なし

○ No. 17—25

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 29 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により球状の細胞塊を形成させ、形成された細胞塊（ニューロスフィア）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、ラットの胎児の中枢神経から神経幹細胞が採取できることが確認できた。さらに、同様の手法を用いて、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. 17—26

研究テーマ イヌにおける便潜血の検出法に関する検討

使用申請者 栗林尚志

学内共同実験者 安藤暖香

学内共同実験者 水井悠華

学内共同実験者 佐原直和

学内共同実験者 大槻潤実

学内共同実験者 伊東玲奈

利用実験エリア 感染エリア

平成 29 年度の研究概要と成果

ビーグル犬へ自己血あるいはウシの血液を経口投与し、経時的に糞便を採取した。糞便中の赤血球成分に対する濃度は ELISA により測定した。自己血を投与後の糞便中濃度は 2 例で投与 2 日後、2 例で投与 5 日後に最高濃度を認めた。ウシ血液を経口投与した後における糞便中濃度は、2 例で濃度推移に変化を認めなかったが、2 例で血清濃度の上昇を認めた。これらの結果から、本測定法で糞便中の赤血球成分を測定することにより、便潜血を検出できると考えられた。しかし、ウシの血液投与後に糞便中濃度が上昇した個体が認められたことから、両者の赤血球には共通抗原性を示す成分があると推定され、本測定法を確立するためにはさらに検討する必要があると考えられた。

研究成果報告

なし

○ No. 17—28

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

平成 29 年度の研究概要と成果

通常のマウス飼育ケージを仕切り板で3分割した小空間に ω 3系脂肪酸欠乏飼料を与えて飼育・繁殖したマウスを4匹入れて8週間、群飼育したのちに、体重変化とともに情動行動を評価した。対照群としては、 ω 3系脂肪酸含有飼料で飼育し、同様に小空間で群飼育した正常マウスや、仕切り板のない通常の飼育ケージで飼育した群を用意した。

飼育期間中の各群の体重変化では、小空間飼育ストレス負荷では、 ω 3系脂肪酸欠乏群、正常群ともに対照群と比較して体重減少（体重増加抑制）が観察され、その傾向は、 ω 3系脂肪酸欠乏群が大きかったが、有意なものではなかった。また、情動行動の評価として、自発運動量や高架式十字迷路試験、新奇環境摂食抑制試験を実施したが、大きな差異は観察されなかった。今回準備した小空間によるマウスへの負荷は小さいと判断されたので、今後再検討する際には、群飼育の匹数などを考慮する必要がある。

研究成果報告

なし

○ No. 17—29

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 29 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. 17—30

研究テーマ 多包虫 *Echinococcus multilocularis* 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 29 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. 17—31

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 29 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. 17—32

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 29 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. 17—33

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 29 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. 17—34

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 29 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. 17—35

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 29 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必要に応じて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. 17—36

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 29 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. 17—37

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 29 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. 17—45

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
学内共同実験者 田辺 敦
学内共同実験者 沖廣 瞭
学内共同実験者 木村健人
学内共同実験者 松浦美紗希

平成 29 年度の研究概要と成果

【目的】 癌化形質に関与した遺伝子の発現動態を解析するために、ヌードマウスにヒト腫瘍細胞ならびにそれらに遺伝子改変を加えた腫瘍細胞を移植し、イソフランによる吸入麻酔下で安楽死させたヌードマウスから腫瘍を回収し、固形癌の癌化形質に関わる遺伝子群の発現を調べる。さらには、病理組織科学や免疫組織科学などの形態学的解析においても癌化関連遺伝子の機能を解析する。

研究成果報告

なし

○ No. 17—46

研究テーマ 哺乳動物の移植拒絶抗原遺伝子の提示機構解析

使用申請者 佐原弘益
学内共同実験者 田辺 敦
学内共同実験者 佐藤典明
学内共同実験者 田淵賢佑

平成 29 年度の研究概要と成果

【目的】 骨髄由来の抗原提示細胞における主要組織適合性複合体 MHC class II 分子拘束性に提示される、内在性の自己抗原がどの細胞小器官内にて処理されるのかを明らかとする。そのため、近郊系マウス (C57BL/6J や B6C3F1 など) をイソフラン麻酔下で安楽死させ、骨髄細胞を採取、培養し、さらにモノクローナル抗体の作成のために、抗原タンパク質をタイターマックス (フナコシ社) によって乳化させ、ペントバルビタール麻酔下の Wistar ラットのフットパットに免疫して、イソフランによる吸入麻酔下で安楽死させ、採血と脾臓摘出を行う。摘出した脾臓細胞はラットミエローマ細胞と融合し、ハイブリドーマを作出する。【結果】 本年度は組換え抗原遺伝子の作成のみで、上記のマウスを使った実験は行わなかった。

研究成果報告

学会発表 木村健人、田辺敦、田淵賢佑、田口正行、納谷裕子、荻原喜久美、佐原弘益・イヌ癌細胞における CD44 バリエーションの同定・日本獣医学会・2017,9,12-15・鹿児島大学・口演発表

○No. 17-47

研究テーマ イヌ CD44 バリエントフォーム分子に対するモノクローナル抗体作成

使用申請者 佐原弘益

学内共同実験者 田辺 敦

学内共同実験者 木村健人

平成 29 年度の研究概要と成果

【目的】 本研究ではイヌ CD44v8-10 の分子レベルでの発現を調べるために、モノクローナル抗体を作成することを目的とする。組換え抗原タンパク質をタイターマックス（フナコシ社）によって乳化させ、近郊系マウス（BALB/c）の腹腔に免疫して、イソフランによる吸入麻酔下で安楽死させ、採血と脾臓摘出を行う。摘出した脾臓細胞はラットミエローマ細胞と融合し、ハイブリドーマを作出する。【結果】 本年度は組換え抗原遺伝子の作成のみで、上記のマウスを使った実験は行わなかった。

研究成果報告

学会発表 木村健人、田辺敦、田淵賢佑、田口正行、納谷裕子、荻原喜久美、佐原弘益・イヌ癌細胞における CD44 バリエントの同定・日本獣医学会・2017,9,12-15・鹿児島大学・口演発表

○No. 17-48

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

学内共同実験者 永澤美保

平成 29 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。前年度、人口哺乳マウスの成長後の社会性を評価し、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を認めた。今年度は、その要因の探索を実施し、1) 身体刺激、2) 母乳中オキシトシン、3) 母乳中アミノ酸、4) 母乳中細菌叢、の関与を調べるため、刺激物質の選定と投与の予備実験を実施した。現在、4) に注力して進めている。

研究成果報告

なし

○ No. 17—54

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 29 年度の研究概要と成果

猫カリシウイルス（FCV）の細胞吸着性の効率を調査した。低温下では単層細胞よりもウイルスの吸着率が高いと報告されている浮遊細胞を用いて、低温下において吸着効率に影響が出るのかを調査した他、低温下での吸着効率の変化はウイルス側の要因によるものかを明らかにする目的で、その性状の固定化の可否を調べた。低温下で単層 CRFK 細胞と浮遊 CRFK 細胞ではほぼ同様に吸着効率の減少が確認された。また、低温下で吸着可能なウイルスを選別してもその性状は 固定化されず、吸着効率の減少はウイルス側の要因ではない可能性が示唆された。

研究成果報告

学会発表 高山 龍一、高橋 俊一、田中 将元、藤野 寛、田原口 智士・浮遊猫腎由来株化細胞（浮遊 CRFK 細胞）に対する猫カリシウイルス（FCV-F9）の低温時吸・日本獣医学会・2017 年 9 月・鹿児島・口頭発表
着効率の変化の調査

○ No. 17—55

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 29 年度の研究概要と成果

FCV 持続感染が予測される猫からウイルスの分離を試みたが、検出出来なかった。

研究成果報告

なし

○ No. 17—56

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

利用実験エリア クリーンエリア

平成 29 年度の研究概要と成果

FAV は多くの血清型が存在するため疫学調査などで、CK（鶏腎）細胞を用いた中和試験によって中和抗体価を検出する。この方法では、多段階希釈作業および CPE を目視で確認し判定を行なう必要があるため、時間を要し多検体を同時処理することは難しい。一般的に中和抗体は、抗体がウイルスに結合することで細胞へのウイルスの吸着阻害もしくは、脱核を阻害することで増殖を阻害するものである。今回我々は、増殖の阻害を CPE で判定するのではなくウイルス蛋白の発現の有無を蛍光抗体法で検出する事で判定した。

中和試験は従来法に従い FAV 血清型 1（JM1/1）と免疫血清（抗 JM1/1）を混和し 1 時間静置し、その血清感作ウイルスを 96 穴の CK 細胞に接種し、72 時間後に細胞における FAV の蛋白質の発現を FAV の組換え DBP をウサギに免役することで得た抗体を用いて蛍光抗体法で検出を行なった。また、野外血清に対し FAV 血清型 1 の中和抗体価を従来法ならびに新規手法で測定し比較した。

蛍光抗体中和法では、FAV の細胞におけるウイルス蛋白質による蛍光は血清濃度に依存し変化した。その新規手法の結果は、従来法で得られた中和抗体価と相関性を示した。また、野外血清の結果においても中和抗体を有するサンプルでは、FAV の細胞に感染して発現する蛋白質による蛍光は消失した。以上より中和試験で得られた結果と新規手法で得られた結果は野外血清においても相関性を持つことが示された。また、今回の新規手法は従来のものに比べ 96 穴プレートでの血清希釈並びに 96 穴の CK 細胞が使用できることから迅速で簡易かつ多検体の同時処理ができることが示唆された。

研究成果報告

論文 投稿中

学会発表 小倉 大紀、Thanasut Khompakorn、留場 寛子、石田 起也、久木田 理樹、押尾 麻貴、藤野 寛、田原口 智士・鶏アデノウイルスの蛍光抗体法を用いた中和抗体価の測定法の開発と野外血清での応用・日本獣医学会・2017 年 9 月・鹿児島・口頭発表

○ No. 17—57

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 SPF エリア

平成 29 年度の研究概要と成果

組換え IE180 抗原をマウスに免疫することで、抗体を得た。また、免疫したマウス脾臓とミエローマ細胞を細胞融合することで、IE180 に対するモノクローナルを得ることが出来た。

研究成果報告

なし

○ No. 17—58

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 29 年度の研究概要と成果

アガリクスブラジリエンシス (*Agaricus brasiliensis*) はハラタケ科ハラタケ属のキノコであり、免疫賦活作用や抗がん作用の報告がされている。我々はアガリクスの活性中心を明らかにする目的でアガリクスエキス (AE) からポリサッカライド (PS) を抽出し、その抗インフルエンザ効果を調査した。

自然露地栽培したアガリクス KA21 の乾燥した子実体を熱水抽出し、透析したものを AE とし、それをさらにエタノール沈殿処理によって抽出し PS を精製した。PS の抗インフルエンザ作用は MDCK 細胞にインフルエンザウイルス H1N1 (PR8 株) を吸着後、PS 存在下で培養し、感染数時間ごとのウイルス液を回収して、そのウイルス価を測定し調査した。さらに、PS とインフルエンザウイルスを混合し、そのウイルス価を測定することで PS のウイルスに対する殺ウイルス効果 (直接作用) を調査した。また、PS のインフルエンザウイルスに対する吸着・侵入への影響は、吸着は PS 存在下でウイルスを細胞に接種して、侵入では細胞にウイルスを吸着後、PS 存在下で培養を行い、プラック数を測定した。

自然露地栽培したアガリクス KA21 の PS は、対照と比較しインフルエンザウイルスの増殖を約 100 倍抑制した。このことから、アガリクス KA21 の抗インフルエンザウイルスの活性中心は PS である可能性が考えられた。また、PS には殺ウイルス効果ばかりではなく、吸着・侵入への影響もなかったことから、PS が細胞の自然免疫を活性化し、抗ウイルス作用を示した可能性が考えられた。

研究成果報告

学会発表 中嶋 紘子、Khompakorn Thanasut、伊藤 寛人、藤野 寛、元井 益郎、元井 章智、田原口 智士・アガリクスブラジリエンシス KA21 のポリサッカライドによる抗インフルエンザウイルス効果・日本獣医学会・2017 年 9 月・鹿児島・口頭発表



○ No. 17—60

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 29 年度の研究概要と成果

獣医学科 5 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使用するため原虫を継代維持した。

研究成果報告

なし

○ No. 17—61

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 29 年度の研究概要と成果

獣医学科 5 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るため、その原虫を維持した。

研究成果報告

なし

○ No. 17—62

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 29 年度の研究概要と成果

実験動物福祉に対する社会的関心や動物実験指針のグローバル化の波を受け、近年、げっ歯類の麻酔管理の標準化が求められている。これまでに、げっ歯類では様々な麻酔法が応用されてきたが、いずれも個体ごとの感受性差が存在する一方、それらの発現要因については解明されていない。本研究では「個体の生育環境」に焦点を当て、麻酔感受性に影響する環境因子を特定しすることを目的として研究を行った。マウスにおいて、さまざまな飼育環境下でイソフルラン吸入麻酔を行ったところ、飼育環境によって麻酔深度が変化することが明らかとなった。

研究成果報告

なし

○ No. 17—63

研究テーマ 情動伝染の麻酔感受性におよぼす影響

使用申請者 塚本篤士

学内共同実験者 安達明

平成 29 年度の研究概要と成果

麻酔は医療・獣医療・動物実験で、手術などの侵襲を伴う処置の際に鎮静催眠作用、筋弛緩作用、鎮痛作用を得ることを目的とする。これまでに様々な麻酔法が応用されてきたが、いずれの麻酔法も個体間での麻酔感受性差が認められている。しかし、麻酔感受性差の発現要因についてはヒトや実験動物を含め不明な点が多い。ヒトやげっ歯類において他個体の痛みの認知および共感、すなわち痛みの情動伝染が成立することが報告されている。本研究では周術期における痛みの情動伝染の成立要因について検討した。本研究の結果より、手術個体との同居によって麻酔感受性が変化する可能性が示唆された。

研究成果報告

なし

○ No. 17—64

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

利用実験エリア 組み換え DNA エリア

平成 29 年度の研究概要と成果

以前の実験においてオボアルブミン（OVA）産生遺伝子組換え乳酸菌（OVA 産生乳酸菌：分泌型乳酸菌）をマウス経口投与後、OVA とアラムの腹腔内投与を行った。しかし、OVA 産生乳酸菌群と非投与群において OVA 特異的 IgE に有意な差は認められなかった。乳酸菌における OVA の産生が低いと考えられたので、本年度は OVA 産生能の高い乳酸菌の作成を試みた。OVA を菌相表面に表現させる結合型 OVA 産生乳酸菌を作製したが、十分な産生が得られなかった。また、分泌型乳酸菌も新しく作製しなおしたが十分な産生能を有する乳酸菌が作成できなかった。そのため、本年度は新規にマウスへの接種実験を行うことができなかった。

研究成果報告

なし

○ No. 17—65

研究テーマ 筋ジストロフィーモデルマウス (mdx マウス) の新たな病態評価方法確立

使用申請者 折戸謙介

平成 29 年度の研究概要と成果

mdx において、当研究室で開発したマウス筋力測定装置を用いて筋力を測定した。その結果、成長するにつれてコントロールマウスより筋力が弱いことが明らかとなった。この筋力を回復する拮抗薬 / 作動薬を探索したが、有用なものを発見することはできなかった。

研究成果報告

なし

○ No. 17—66

研究テーマ トラネキサム酸の痙攣原性と相互作用物質の探求

使用申請者 折戸謙介

平成 29 年度の研究概要と成果

トラネキサム酸は、犬臨床で催吐剤として用いられている。その副作用としてけいれんが生じることがわかっている。誤飲物の中には興奮性を示すものも少なくない。そこで本研究では、誤飲物によりトラネキサム酸誘発性けいれんが出現する可能性について明らかにする。その第一歩として、マウスを用いた実験で、けいれん発作閾値の定量化方法を模索した。

研究成果報告

なし

○ No. 17—67

研究テーマ 食品素材が性功能におよぼす作用

使用申請者 折戸謙介

平成 29 年度の研究概要と成果

麻酔下ラットの海綿体神経を刺激した際に生じる海綿体圧上昇作用に対する食品素材の影響を観察した。その結果、性功能促進作用を有する食品素材を発見できた。この成果は、企業と特許を共同出願した（特許公開前であるため、企業名、素材名は非公表）。

研究成果報告

なし

○ No. 17—69

研究テーマ 動物用自動血球計数装置「LC-662」評価試験（再評価）

使用申請者 久末 正晴

学内共同実験者 根尾 櫻子

利用実験エリア コンベンショナル

平成 29 年度の研究概要と成果

動物用自動血球計数装置「LC-662」は、現在広く日本で用いられている。しかし、他の血球計算機との比較がなされておらず再度比較検討試験が必要となった。そこで犬および猫から血液を採取して、動物用自動血球計数装置の性能試験を実施する。麻布大学で飼育中の健常犬 10 頭および一般飼育の猫 5 頭について SysmexXT-2000iV との比較を行った。その結果、WBC 数、RBC 数、Hb 値、MCV、MCH、MCHC において正の相関が認められた。犬においては PLT 値は正の相関が見られたが、猫においては相関係数が $R = 0.78$ とやや低下傾向を示した。これは従来の血球計算機においても電気抵抗法を用いたものと同様の傾向を示していると解釈した。以上の結果より、LC-662 は従来の機器とほぼ遜色ない性能を有しているものと推察された。しかしながら猫における検体数が少なくより多くの検体での解析が今後必要である。

研究成果報告

なし

○ No. 17-70

研究テーマ ホテイアオイ（野生株）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 29 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を得られた場合、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ため、遺伝子を組換え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。平成 29 年度は、光源として 3 種類の LED ランプを使用した。その種類によってホテイアオイの生長に著しい差が生じることがわかった。また、栽培中に藻が大量発生し、その影響でホテイアオイの生長が阻害されたため、この藻の発生を防ぐ方策を見いだす必要があることがわかった。

研究成果報告

なし

○ No. 17-71

研究テーマ 転写因子 GATA3 を含むクロマチンタンパク質複合体の構造、機能、免疫疾患の病態機序への関与の解析

使用申請者 宮武昌一郎

利用実験エリア 組み換え DNA エリア

平成 29 年度の研究概要と成果

ZNF131 に関しては、以下の成果を得た。
1、マウス ZNF131 に対するウサギポリクローナル抗体を得た。ウェスタンブロット、免疫沈降、免疫染色が可能であることを示した。
2、マウス B 細胞における ZNF131 の機能解析を行い、B 細胞分化の初期である proB 細胞の過程で必須であることを見出した。proB 細胞の増殖に必須であること、また proB 細胞期で進行する免疫グロブリン重鎖の遺伝子再構成にも関与することを見出した。
GATA3 変異マウスに関しては、 Δ 2GATA3 変異マウス（ふたつの Zn finger の欠失）に、I-Ab deletion 及び CD4Cre トランスジーン、さらに Foxp3-hCD2 knockin の 3 種類のアレルの導入を行っており、ほぼ完了した。これにより Δ 1GATA3 変異マウス（一つの Zn finger の欠失）と、種々の形質を比較できるようになる。

研究成果報告

学会発表 Tomohiro Iguchi, Makiko Hirano, Shoichiro Miyatake; Dermatitis developed in GATA3 mutant mice. The 46th Annual Meeting of the Japanese Society for Immunology 2017.12 Sendai, Miyagi, poster presentation

○ No. 17-73

研究テーマ 近交系メダカの作出、メダカ腫瘍培養株の作成と放射線増感剤の検討

使用申請者 圓尾拓也

利用実験エリア 6号館水生生物飼育室

平成 29 年度の研究概要と成果

メダカの飼育を開始し、近交系を作出するために3代目を飼育中。環境は申し分ないものの不便なため獣医学部棟で飼育を行うこととなった。化学物質誘発性腫瘍の作成と放射線増感剤の検討は、近交系（20代継代）の確率が目処がたってから行う予定であり、着手できなかった。

研究成果報告

なし

○ No. 17-74

研究テーマ アミノ酸トランスポーター 1 を指標としたがんの悪性度評価および治療効果予測への展開

使用申請者 萩原喜久美

学内共同実験者 納谷裕子

学内共同実験者 堀口陽平

利用実験エリア 感染エリア

平成 29 年度の研究概要と成果

BALB/cAJcl-nu/nu マウス雄 5 週齢にイヌ肝細胞癌由来腫瘍細胞株（95-1044）を移植し、コントロール群およびアミノ酸トランスポーター（LAT）阻害群（LAT1 阻害剤 25mg/kg 腹腔内投与）に分け、体重および腫瘍容積を測定した。剖検後、HE 染色、免疫染色（抗 LAT1、抗 PCNA）を行い、LAT1 陽性率、PCNA 陽性率を算出、スコア化し、統計学的解析を行った。コントロール群と比較し、LAT1 阻害群において腫瘍増殖抑制、腫瘍組織の変性、壊死部増大および PCNA 陽性細胞の増数が認められた。統計学的解析において、LAT1 阻害群はコントロール群と比較して PCNA 陽性率が有意に低い結果を示した。

LAT1 強陽性腫瘍細胞株移植免疫不全マウスに LAT1 阻害剤を接種することで腫瘍増殖抑制、壊死部の増大および PCNA 陽性率の低下が認められたことから腫瘍細胞においてアミノ酸取込阻害による腫瘍増殖抑制効果が示唆された。

研究成果報告

なし

○ No. 17—80

研究テーマ 犬用デンタルガムが犬の口腔内・腸内細菌叢に与える影響の評価試験

使用申請者 五十嵐寛高

学内共同実験者 久末正晴

平成 29 年度の研究概要と成果

牛皮・米粉・チキンエキスで作成された犬用デンタルガム（無添加・無着色）および同様のガムにプロバイオティクスを配合したガムをクロスオーバー形式で 14 日間ずつ犬に給与した。試験期間中、特に副作用は認められず、また便臭スコア・口臭スコア・歯垢スコア・歯石スコア・歯肉炎スコア・便の硬さスコアに変動は認められなかった。現在、各デンタルガムの給与前後における口腔内・糞便内細菌叢の変化について解析中である。

研究成果報告

なし

麻布大学バイオセキュリティー 教育講演

平成 29 年 6 月 6 日（火）にコロンビア大学 感染免疫センター／ロッキーマウンテン研究所の奥村 敦先生を招聘し、教育講演を実施しました。感染力が極めて強く、現在アフリカで猛威をふるっているエボラウイルスについて、その最先端の研究状況をわかりやすく説明していただきました。さらに、BSL-4 の施設についてその構造、入退所システムの詳細について講演いただきました。

麻布大学バイオセキュリティー 教育講演

エボラウイルス感染症の最新研究 ー宿主免疫反応 vs. 病原性ー

講師：奥村 敦

コロンビア大学 感染免疫センター/
ロッキーマウンテン研究所 微生物研究室

日時：平成 29 年 6 月 6 日（火） 17:00-19:00
場所：麻布大学 8 号館 8601 講義室

主催：麻布大学 附置生物科学総合研究所
附属動物管理センター
動物実験委員会
病原体等安全管理委員会
組換えDNA実験安全委員会
感染症対策委員会

* 本講演は麻布大学大学院 獣医学研究科・環境保健学研究科
の大学院特別講義の一つになっております。

麻布大学附置生物科学総合研究所 紀要第28号

(作成基準日：平成29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



No. 28