

2018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. 29



# 生物科学総合研究所紀要 29 号

## 目次

<b>生物科学総合研究所概要</b> .....	1
生物科学総合研究所教職員.....	2
生物科学総合研究所組織図.....	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
<b>研究部門の活動状況</b> .....	13
<b>研究総括</b> .....	14
プロジェクト No. P16-01 .....	14
プロジェクト No. P16-03 .....	17
プロジェクト No. P16-04 .....	20
プロジェクト No. P17-01 .....	22
プロジェクト No. P17-03 .....	24
<b>共同利用施設部門</b> .....	31
<b>共同利用各施設部門</b> .....	32
研究部門 .....	32
各施設部門.....	32
動物実験施設.....	32
検疫動物飼育施設.....	32
SPF 動物実験施設 .....	32
Clean 動物飼育施設 .....	33
Conventional 動物飼育施設 .....	33
感染実験施設.....	33
化学物質毒性実験施設.....	33
水生生物飼育施設.....	33
ラジオアイソトープ実験施設.....	33
遺伝子組換え実験施設.....	33
<b>テーマ別活動状況</b> .....	37
<b>麻布大学バイオセキュリティー教育講演</b> .....	73



# 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 (学術支援課)	課 長		角野 由香
		主 査		新 篤志
主 査			青野 和憲	

## 【研 究 部 門】

部門長 : 佐原 弘益 (獣医学部 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～令和 2 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～令和2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）

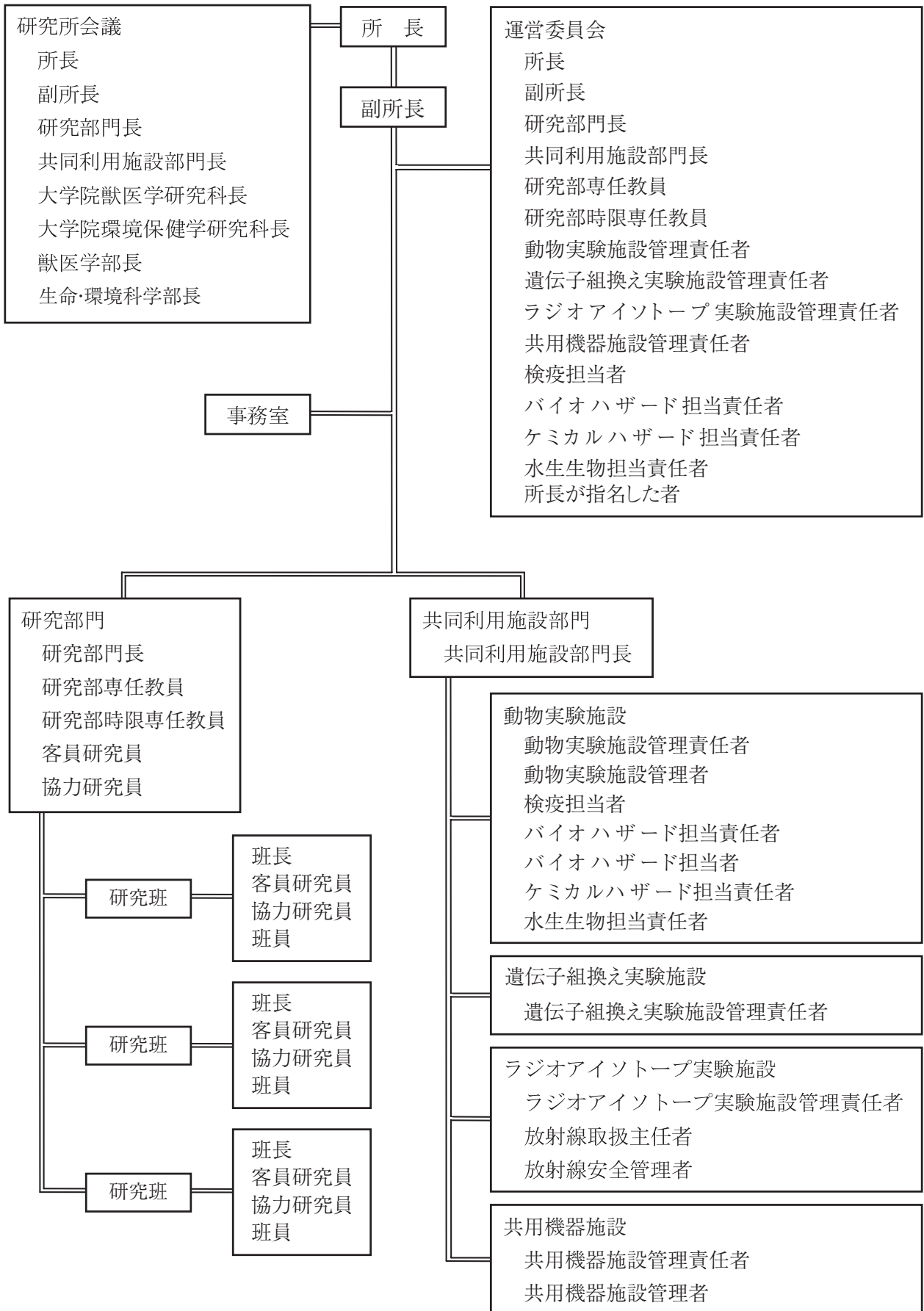
プロジェクト班員： 高木 敬彦（獣医学部 教授）

プロジェクト班員： 猪股 智夫（獣医学部 教授）

【 共 同 利 用 施 設 】

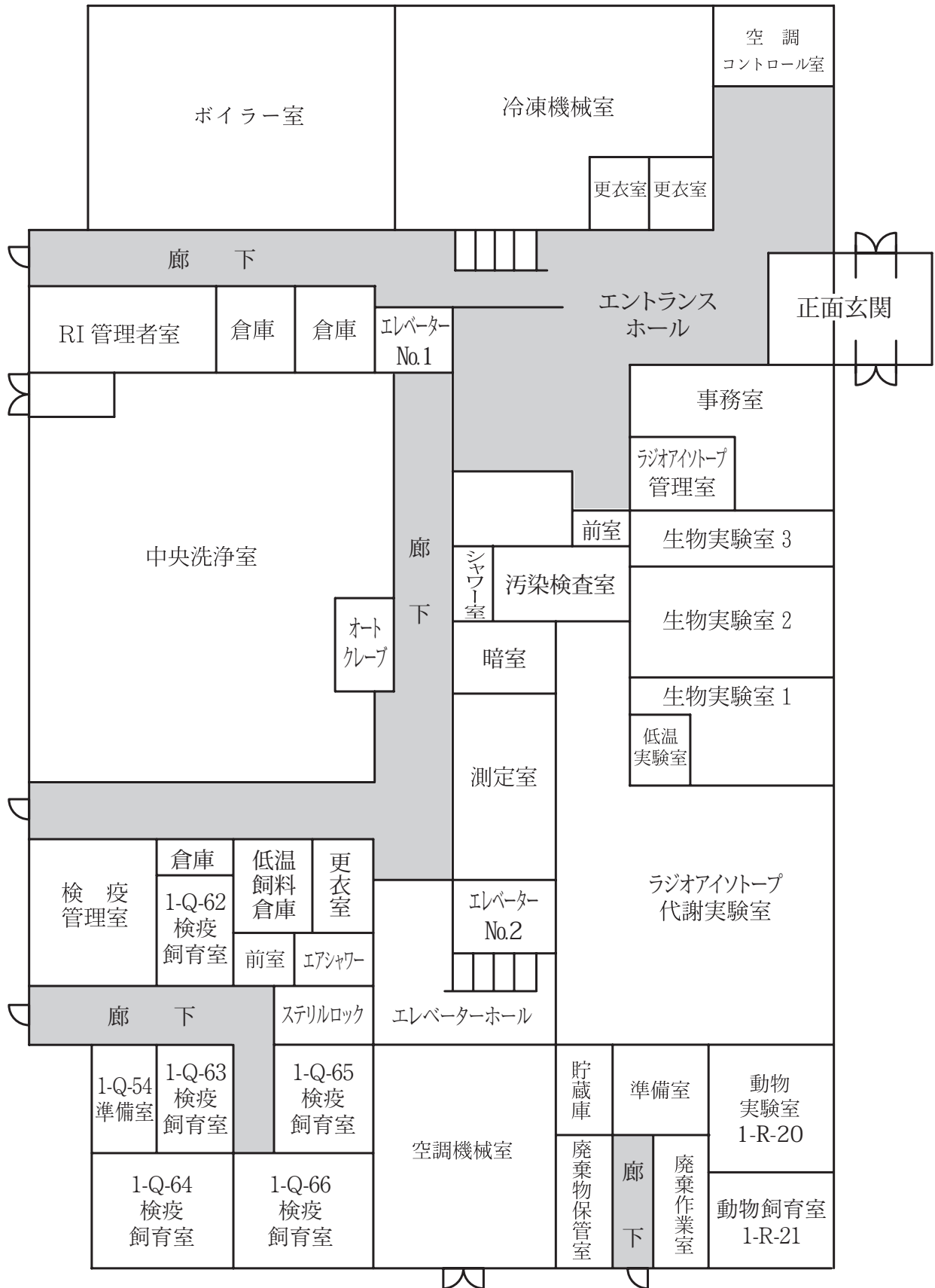
共同利用施設	氏 名	職 名
<b>共同利用施設部門</b> 共同利用施設部門長	白井 明志	獣 医 学 部 准教授
<b>動物実験施設</b> 動物実験施設管理責任者 動物実験施設管理者 検疫担当者 バイオハザード担当責任者 バイオハザード担当者 ケミカルハザード担当責任者 水生生物担当責任者	田原口智士 須永 藤子 須永 藤子 平 健介 須永 藤子 白井 明志 松井 久実	獣 医 学 部 教 授 獣 医 学 部 准教授 獣 医 学 部 准教授 獣 医 学 部 准教授 獣 医 学 部 准教授 獣 医 学 部 准教授 獣 医 学 部 講 師
<b>組換え DNA 実験施設</b> 組換え DNA 実験施設管理責任者	佐原 弘益	獣 医 学 部 教 授
<b>ラジオアイソトープ実験施設</b> ラジオアイソトープ実験施設管理責任者 放射線取扱主任者 放射線安全管理者	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
<b>共用機器施設</b> 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 教 授

# 生物科学総合研究所組織図





# 生物科学総合研究所見取図 1階



# 生物科学総合研究所見取図 2階

2-S-2 飼育室		前室	空調機械室	前室	前室	2-A-32 飼育室
前室	2-S-4 飼育室	前室		前室	前室	2-A-34 飼育室
廊下	2-S-7 飼育室	前室	エレベーター No.1	エレベーター ホール	前室	2-A-40 飼育室
	2-S-9 飼育室	前室			2-A-41 飼育室	
	2-S-11 飼育室	前室	ステリルロック	2-A-42 飼育室		
	2-S-13 飼育室	前室	2-A-44 飼育室		前室	2-A-45 実験室
	2-S-15 飼育室	前室	2-A-36 飼育室			
	2-S-17 飼育室		前室	2-A-38 飼育室		前室
			更衣室	飼料倉庫		
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

# 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

(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. 遺伝子組換え実験施設

遺伝子組換え実験施設には、遺伝子組換え実験を管理・統括するため、遺伝子組換え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。

附則

この規則は、平成31年1月24日に改正し、平成31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5件の研究テーマについて、平成30年度の研究成果ならびにプロジェクトの概要を報告する。

### ○プロジェクト No. P 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、腸内細菌叢が肝疾患と密接な関係性をもつことが示唆されている。非アルコール性脂肪性肝疾患では *Lactobacillus* spp. の増加<sup>1)</sup>、*Bifidobacterium* spp. の減少<sup>1)</sup>、アルコール性肝障害では Firmicutes、Parabacteroides の増加<sup>2)</sup>、肝硬変では *Bifidobacterium* spp.、*Lactobacillus* spp. の増加<sup>3)</sup>、肝臓癌では *Clostridium* sp. の増加<sup>4)</sup> 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）8匹を Lieber-Decarli 手法<sup>5)</sup>により、アルコール含有液体飼料（オリエンタル酵母工業）あるいはその等カロリーを炭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=4：アルコール群）及びコントロール液体飼料給餌（n=4：コントロール群）の計2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開腹を行い、門脈採血、腹部大動脈採血後、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、小腸・大腸を摘出し350 µl の滅菌生理食塩水を加えホモジネイトを行った。

血清は、腹部大動脈採血後6mL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3,000 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<sup>6)</sup>。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ールを用いた。

## 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。

## エンドトキシンの検討

トキシノメーター® ET-Mini (和光純薬工業) で測定した。

## 門脈の細菌同定

血液培養装置は BACTEC FX (ベクトン・ディッキンソン)、血液培養ボトルは BD BACTEC Peds Plus/F Culture Vials (ベクトン・ディッキンソン) を使用した。菌名の同定は MALDI バイオタイパー (ブルカー・ジャパン) を用いて質量分析にて実施した。

## 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2群間で8週間後に有意な差を認めなかった。

腸内細菌叢の解析において、小腸では *Firmicutes* 門、特に *Clostridium sp.* でコントロール群及びアルコール群でそれぞれ  $0.0 \pm 0.0\%$ 、 $5.7 \pm 1.1\%$ 、*Morganella sp.* でコントロール群及びアルコール群でそれぞれ  $1.0 \pm 0.5\%$ 、 $24.4 \pm 14.5\%$ 、*Proteus sp.* でコントロール群及びアルコール群  $7.0 \pm 3.4\%$ 、 $24.4 \pm 14.5\%$  と増加がみられた。大腸では *Firmicutes* 門、特に *Clostridium sp.* でコントロール群及びアルコール群でそれぞれ  $0.0 \pm 0.0\%$ 、 $6.2 \pm 1.2\%$ 、*Morganella sp.* で  $0.3 \pm 0.4\%$ 、 $11.8 \pm 5.8\%$ 、*Proteus sp.* で  $0.8 \pm 0.9\%$ 、 $21.1 \pm 6.9\%$  と増加がみられた。

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コントロール群とアルコール群では、アルコール群全ての肝臓組織像で脂肪滴を呈し、アルコール性肝障害を確認した。

エンドトキシン濃度はコントロール群で  $0.2 \pm 0.1$  EU/mL、アルコール群で  $2.7 \pm 0.4$  EU/mL と有意な差がみられた。

門脈血の血液培養ではアルコール群で *Alcaligenes faecalis*、*Clostridium difficile*、*Encherichia coli*、*Enterococcus faecium*、*Klebsiella oxytoca*、*Morganella morganii*、*Proteus mirabilis* の7菌種が分離され、特に8週間飲酒させたラット全てに *Clostridium difficile* が分離された。

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。今後コントロールラットに *Clostridium difficile* を感染させ肝障害が生じるが検証していく予定である。

## 【参考文献】

1. Nobili V, Putignani L, Mosca A, et al.: Bifidobacteria and lactobacilli in the gut microbiome of children with non-alcoholic fatty liver disease: which strains act as health players? Arch Med Sci. 14: 81-87, 2018.
2. Grander C, Adolph TE, Wieser V, et al.: Recovery of ethanol-induced Akkermansia muciniphila depletion ameliorates alcoholic liver disease. Gut. 67: 891-901. 2018.
3. Dubinkina VB, Tyakht AV, Odintsova VY, et al.: Links of gut microbiota composition with alcohol dependence syndrome and alcoholic liver disease. Microbiome. 5: 141. doi: 10.1186/s40168-017-0359-2. 2017.
4. Loo TM, Kamachi F, Watanabe Y, et al.: Gut Microbiota Promotes Obesity-Associated Liver Cancer through PGE2-Mediated Suppression of Antitumor Immunity. Cancer Discov. 7: 522-538. 2017.
5. Lieber CS, Decarli LM: Liquid diet technique of ethanol administration. Alcohol&Alcoholism. 24: 197-211, 1989.

6. 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 P 16 — 03

### 研究テーマ

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

研究期間：平成 28 年 4 月 1 日～平成 31 年 3 月 31 日

プロジェクト班長：田中 和明 (獣医学部准教授)

プロジェクト班員：滝沢 達也 (獣医学部教授)

#### 【研究概要】

我々は、ヒトの多因子性てんかんの自然発症モデルマウスである EL 系統の感受性量的形質遺伝子座 (QTL) を C57BL/6J 系統 (以後 B6) に導入したコンジェニック系統 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。特に、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 が存在する。平成 29 年度は、放り上げ刺激によるけいれん発作モデルを作成し、上記マイクロサテライトマーカーに最も近位に存在するグリア型グルタミン酸トランスポーター (*Slc1a2*) 遺伝子の mRNA の発現レベルの変化を、嗅球、大脳皮質および海馬を対象に行った。しかし、測定結果に個体差が大きく、発作との明確な関連を示す事が出来なかった。この一因に、放り上げ刺激誘発モデルでは、環境要因の制御が困難であることが考えられた。平成 30 年度は、環境要因を減少させる目的で、けいれん発作の誘発方法を、GABA 受容体を遮断する化学物質であるペンチレンテトラゾール (PTZ) 単回投与に変更し、発作による遺伝子発現の変化を解析した。さらに、解析対象とする遺伝子を、2 番染色体の QTL が存在する区間内に存在する *Chrna4*, *Scn1a*, *Kcnq2*, *Pdyn*, *Slc4a10*, *Slc1a2* の 6 遺伝子に広げて、mRNA 発現レベルを調査した。また、発現測定の内部標準遺伝子を TATA 結合タンパク質 (*Tbp*) から  $\beta$  アクチン (*Actb*) に変更した。発現を解析した 6 遺伝子の中で、PTZ を投与して発作を誘発した個体では、*Slc4a10* 遺伝子の発現が比較対象である生理食塩水と投与群に比べて約 2 倍 ( $p < 0.05$ ) に上昇していた。*Slc4a10* の産物は、抑制性ニューロンで発現する  $\text{Na}^+$  依存  $\text{Cl}^-$ - $\text{HCO}_3^-$  トランスポーターである。このトランスポーターは、細胞内への重炭酸イオンの取り込みを介して興奮性の抑制に強く関与することが知られている。*Slc4a10* は、本研究で解析した候補遺伝子の中で、PTZ 誘発けいれんに対して、遺伝子発現が最も顕著に変動したことから、てんかんの原因遺伝子の候補として重要である事が示唆された。

#### 【背景と目的】

EL 系統は、ヒトの多因子性特発性全般てんかんの疾患モデルとして広く利用されている (Suzuki, 2004)。EL 系統のてんかん発作に関与する主要な量的遺伝子座 (QTLs) が、2 番および 9 番染色体に連鎖していると報告がされている (Rise et al., 1991)。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、これらのコンジェニック系統は、B6 に比べて、放り上げ刺激誘発けいれん発作を、おこし易いことを明らかにした。各コンジェニック系統は、保有する EL 系統由来のゲノム領域が異なることから、個々の QTL の表現型に与える影響を鋭敏に評価できるものと期待される。

本研究は、3 つのコンジェニック系統に対する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、コンジェニック系統を用いた連鎖解析によって、QTL の詳細な位置を決定し、責任遺伝子の特定、および、複数の QTL 間の相互作用を明らかにすることを目的とした。

#### 【材料および方法】

Cg2 系統の雄を用いた。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。8 週齢のマウスを用いて、PTZ 誘発モデルと、対照群として生理食塩水投与群を作成した。

両群について、採材する時間を、腹腔投与 3 時間後と 24 時間後にわけ、合計 4 つの群をそれぞれ 4 匹ずつ準備した。

ベンチレンテトラゾール (PTZ：東京化成工業) を 3 mg/ml の濃度で生理食塩水に溶解した。実験日当日に調製した PTZ 溶液を、マウス体重 1 g 当たり 20  $\mu$ L 腹腔内に投与することで、PTZ 発作モデル (PTZ の投与量：マウス体重 1g 当たり 60  $\mu$ g) を作成した。比較対象には、同量の生理食塩水を腹腔内投与した。投与後、1 頭ごとにケージに入れ、ビデオ撮影により 1 時間行動観察をした。PTZ 投与群では、大発作までの潜時と 1 時間当たりの発作回数を記録した。

脳組織の採材は、過剰量のペントバルビタールナトリウム (200 mg/kg) を腹腔内投与後による安楽死後に脳を摘出した。摘出したマウスの脳から、Hagihara ら (2009) の方法に従って、海馬を分離した。組織は、RNA Later (Thermo Fisher Scientific) に浸漬し RNA 抽出まで  $-20^{\circ}\text{C}$  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、*Chrna4*, *Scn1a*, *Kcnq2*, *Pdyn*, *Slc4a10*, *Slc1a2* の 6 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、 $\beta$  アクチン (Actb) 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】

*Slc1a2* と *Slc4a10* では、PTZ 投与によってコントロール群に比べて遺伝子の発現が増加する傾向が認められた。特に *Slc4a10* では、投与後 3 時間群で 2 倍、24 時間群では 3 倍の発現量を示し、いずれも有意に異なっていた (図 1)。*Slc4a10* の産物は、抑制性ニューロンで発現する  $\text{Na}^+$  依存  $\text{Cl}^-$ - $\text{HCO}_3^-$  トランスポーターである。このトランスポーターは、細胞内への重炭酸イオンの取り込みを介して興奮性の抑制に強く関与することが知られている。PTZ 誘発けいれんに対して、*Slc4a10* 遺伝子の発現が最も顕著に変動したことから過剰神経活動に反応することが示唆された。ヒトでは、*SLC4A10* の機能不全が、精神遅滞を伴う複雑部分発作の原因となることが報告されている (Gurnett et al., 2008)。また、この遺伝子をヘテロでノックアウトしたマウスでは、神経興奮性が増加する事から、*Slc4a10* がニューロンの興奮性を減衰させる働きがある事が示されている (Sinning et al., 2015)。また、*Slc1a2* は、5% 有意水準に達しなかったが、PTZ 投与群の平均はコントロール群に比べて、平均 1.7 倍の発現量を示した。*Slc1a2* は、放り上げ刺激の累積によって生じる発作においても発現が有意に増加することから脳の過剰な興奮によって発現が増加する事が示された。*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)。

これに対して、*Chrna4*, *Scn1a*, *Kcnq2*, *Pdyn* では、PTZ 誘発発作による発現の変動は認められなかった。これらの 4 つの遺伝子の産物は興奮の伝達に関与している。今回の解析からは、2 番染色体のてんかん感受性遺伝子を導入したコンジェニック系統では、興奮の抑制に役割を持つ遺伝子の発現が変動する事が示唆された。以上の事か本研究で使用しているコンジェニック系統を用いた研究焦点は、ニューロンの興奮抑制である事が示唆された。

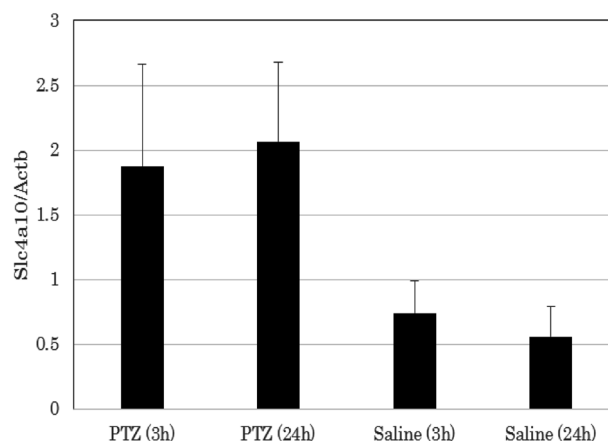


図 1. マウス海馬における *Slc4a10* 遺伝子の発現量の比較。ActB 遺伝子を内部標準として相対発現量を示している。

## 【引用文献】

- Frankel WF, Coffin JM, Dietrich WF, Johnson EW, Lutz CM, Valenzuela A. 1995a. New seizure frequency QTL and the complex genetics of epilepsy. *Mammalian Genome*. 6:830-838.
- Frankel WN, Johnson EW, Lutz CM. 1995b. Congenic strains reveal effects of the epilepsy quantitative trait locus, El2, separate from other El loci. *Mammalian Genome*. 6:839-843.
- Gurnett CA, Veile R, Zempel J, Blackburn L, Lovett M, Bowcock A. 2008. Disruption of sodium bicarbonate transporter SLC4A10 in a patient with complex partial epilepsy and mental retardation. *Arch Neurol*. 265:550-553.
- 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.
- Sinning A, Liebmann L, Hübner CA. 2015 Disruption of Slc4a10 augments neuronal excitability and modulates synaptic short-term plasticity. *Front Cell Neurosci* 9:223.
- 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 P 16－04

### 研究テーマ

#### 生体における糖脂質・糖鎖機能に関する研究

研究期間：2016年4月1日～2019年3月31日

プロジェクト班長名：山下 匡（獣医学部 生化学研究室）

プロジェクト班員名：永根 大幹（獣医学部 生化学研究室）

プロジェクト班員名：田原口 智士（獣医学部 微生物学第二研究室）

プロジェクト班員名：藤野 寛（獣医学部 微生物学第二研究室）

**研究概要：**固形腫瘍の低酸素領域は、細胞増殖と血管新生の不均衡によって生じることが知られている。腫瘍内の一部のがん細胞はこの低酸素環境に適応し、抗がん剤や放射線に抵抗性を示す上に、転移や浸潤・再発の原因となると考えられている。第三の生命鎖とよばれる糖鎖は、発生・細胞分化・疾患等でダイナミックに代謝が変化することが古くから明らかとなっている。ガングリオシドはシアル酸を有するスフィンゴ糖脂質であり、細胞膜や小胞体において形質膜を介したシグナル伝達を修飾し、小胞体ストレスやアポトーシスに関与している。近年、低酸素において細胞膜抗原の変化が誘導されることが報告されているが、ガングリオシドをはじめとした糖脂質代謝との関連は未だ明らかとなっていない。そこで本研究では、ガングリオシド共通の前駆物質である GM3 合成酵素と低酸素環境における発現と放射線・酸化ストレスに対する抵抗性について検討した。

**研究目的：**腫瘍内において治療抵抗性を示す低酸素領域に着目し、糖脂質合成酵素およびガングリオシド合成の共通の基質である GM3 合成酵素の発現を検討するとともに、がん治療におけるその機能について明らかにする。

**材料と方法：**本研究ではマウス悪性黒色腫 B16F10 細胞を使用した。低酸素環境はアネロパックケンキ 5%、または塩化コバルトによる化学的低酸素の誘導を用いて作出した。遺伝子発現は RT-qPCR によって解析した。タンパク質の発現は Western blot 法によって解析した。細胞内におけるタンパク質局在は免疫細胞化学によって検討した。腫瘍内低酸素領域の検出は Hypoxiprobe を使用し、免疫組織化学蛍光抗体法によって行った。GM3 合成酵素欠損細胞は CRISPR/CAS9 法によって作出した。過酸化水素に対する感受性の評価は、WST-1 アッセイによって行った。放射線照射は直線加速器を使用し、2 Gy/min の線量率で照射した。放射線感受性はコロニー形成試験によって評価した。細胞浸潤能の評価は、Matrigel Invasion Assay によって評価した。

**結果：***In vitro* において低酸素におけるガングリオシド合成を担う代謝酵素の遺伝子・タンパク質発現変化を検討したところ、GM3 合成酵素について有意な発現減少が観察された。また、移植腫瘍モデルにおいても低酸素領域にて GM3 合成酵素発現の減少が観察された。そこで、GM3 合成酵素欠損細胞を用いて、放射線・酸化ストレスに対する感受性を検討したところ、GM3 合成酵素欠損株において抵抗性が観察された。また放射線照射および過酸化水素刺激後のシグナル伝達経路を検討したところ、GM3 合成酵素欠損株において ERK のリン酸化が亢進した。以上の結果より、腫瘍内低酸素環境はガングリオシド GM3 合成酵素を制御し、また ERK のリン酸化を介して、治療抵抗性を獲得していることが示唆された。

*In vitro* において低酸素におけるガングリオシド合成を担う代謝酵素の遺伝子・タンパク質発現変化を検討したところ、GM3 合成酵素について有意な発現減少が観察された。また、移植腫瘍モデルにおいても低酸素領域にて GM3 合成酵素発現の減少が観察された。そこで、GM3 合成酵素欠損細胞を用いて、放射線・酸化ストレスに対する感受性を検討したところ、GM3 合成酵素欠損株において抵抗性が観察された。また放射線照射および過酸化水素刺激後のシグナル伝達経路を検討したところ、GM3 合成酵素欠損株において ERK のリン酸化が亢進した。以上の結果より、腫瘍内低酸素環境はガングリオシド GM3 合成酵素を制御し、また ERK のリン酸化を介して、治療抵抗性を獲得していることが示唆された。

**考察：**腫瘍は腫瘍細胞と免疫担当細胞、血管細胞、線維芽細胞などの間質細胞からなり、がん細胞を取り巻く微小環境において様々な宿主因子との相互作用ががんの悪性化において重要な役割を果たす。なかでも腫瘍内低酸素領域は、がん細胞の無秩序な細胞増殖が血管新生を上回ることで生じ、この酸素分圧の低下した一領域は抗がん剤や放射線に耐性を示し、治療抵抗性に寄与する。スフィンゴ糖脂質は、脂質ラフトに局在する糖脂質であり、膜タンパク質を介した細胞膜シグナル伝達を行うことが知られている。スフィンゴ糖脂質は脊椎動物のほぼ全ての細胞や組織に普遍的に発現する分子群であるが、細胞・組織の分化、老化、がん化等で糖鎖代謝が大きく変化することが知られている。なかでも、がん化に関しては、腫瘍免疫学的な面からも多くのがん関連糖鎖抗原の報告がなされており、糖鎖発現メカニズムの解析も行われている。また、いくつかはがん免疫療法の標的と考えられている。しかしながら、腫瘍微小環境におけるスフィンゴ糖脂質の代謝の変化に着目した報告はなされていない。ガングリオシドは、シアル酸を糖鎖に1つ以上持つスフィンゴ糖脂質であり、古くから神経外胚葉由来のがんや白血病のマーカーとして考えられてきた。また、ガングリオシドはがんの悪性形質を制御する分子であることも知られている。そこで本研究では、低酸素下におけるスフィンゴ糖脂質合成酵素および、ガングリオシド共通前駆物質である GM3 の合成を触媒する GM3S の発現と GM3S の治療感受性における役割を検討した。

本研究では、ガングリオシド共通の基質である GM3 合成酵素に着目し、治療感受性への影響を検討した。細胞の顔や第三の生命鎖と呼ばれる糖鎖は、疾患や細胞分化・増殖と密接な関連を示すことが古くより明らかとなっているため、低酸素が与える糖鎖合成および分解への影響は、生物学的に重要なものであると考えられる。また、スフィンゴ糖脂質は、400 種以上にのぼることから、それらがダイナミックに発現を変化させることで、がん悪性形質を制御しているものと考えられる。

#### 参考文献：

- Iwamori, M. (2016) [Structure and function of glycolipids]. *Seikagaku* 88, 354-368.
- Hakomori, S. (2003) Structure, organization, and function of glycosphingolipids in membrane. *Curr Opin Hematol* 10, 16-24.
- Iwabuchi, K., Handa, K. and Hakomori, S. (1998) Separation of "glycosphingolipid signaling domain" from caveolin-containing membrane fraction in mouse melanoma B16 cells and its role in cell adhesion coupled with signaling. *J Biol Chem* 273, 33766-33773.
- Yamamura, S., Handa, K. and Hakomori, S. (1997) A close association of GM3 with c-Src and Rho in GM3-enriched microdomains at the B16 melanoma cell surface membrane: a preliminary note. *Biochem Biophys Res Commun* 236, 218-222.
- Yamashita, T., Hashiramoto, A., Haluzik, M., Mizukami, H., Beck, S., Norton, A., Kono, M., Tsuji, S., Daniotti, J. L., Werth, N., Sandhoff, R., Sandhoff, K. and Proia, R. L. (2003) Enhanced insulin sensitivity in mice lacking ganglioside GM3. *Proc Natl Acad Sci U S A* 100, 3445-3449.
- Hashiramoto, A., Mizukami, H. and Yamashita, T. (2006) Ganglioside GM3 promotes cell migration by regulating MAPK and c-Fos/AP-1. *Oncogene* 25, 3948-3955.
- Furukawa, K., Ohkawa, Y., Yamauchi, Y., Hamamura, K. and Ohmi, Y. (2012) Fine tuning of cell signals by glycosylation. *J Biochem* 151, 573-578.



## ○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：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・動物繁殖学研究室）

プロジェクト班員：柏崎 直巳（獣医学部・動物繁殖学研究室）

プロジェクト班員：久松 伸（生命環境科学部・環境遺伝子工学研究室）

### 【目的】

ほとんどの動物において受精時には卵内  $\text{Ca}^{2+}$  イオンの上昇が起こるが、最近の研究でマウスやヒトの受精時には、 $\text{Zn}^{2+}$  イオンの一過性の卵外放出（亜鉛スパーク）も起こっていることが報告されている。亜鉛イオンの輸送は亜鉛トランスポーター（Zip）によって制御されていることから、本研究では卵特異的に発現する Zip を明らかにするとともに、Zip 遺伝子欠損マウスを作製し、解析した。

### 【方法】

データベースからマウス卵に発現する Zip 遺伝子を調べた。候補となった Zip に関して、マウス卵を用いて RT-PCR および免疫蛍光染色を行い、mRNA およびタンパク質レベルでの発現を調べた。さらに候補となった Zip10 遺伝子に関しては、Cre/loxP システムを用いて卵特異的 Zip10 遺伝子欠損マウス ( $Zp3^{\text{Cre/+}}\text{Zip10}^{\text{lox/lox}}; \text{Zip10}^{\text{d/d}}$ ) を作製した。Zip10<sup>d/d</sup> 雌マウスを雄マウスと交配させ、妊孕性の確認を行った。対照区マウスは Zip10<sup>ff</sup> ( $Zp3^{\text{+/+}}\text{Zip10}^{\text{lox/lox}}$ ) とした。

### 【結果】

データベースおよび RT-PCR の結果から、マウス卵では Zip6 および Zip10 の発現が高いことが示された。このうち Zip10 に関してはタンパク質レベルでも発現していた。さらに Zip10<sup>d/d</sup> 雌マウスは、交尾はするものの平均産子数は  $3.0 \pm 0.9$  匹であり、Zip10<sup>ff</sup> ( $7.2 \pm 1.8$  匹) と比較して著しい妊孕性の低下が認められた。その理由を明らかにするため、体外受精して受精率を確認したところ、Zip10<sup>d/d</sup> マウスの受精率は約 35% であり、Zip10<sup>ff</sup> マウスの 85% と比べて著しく低下していた。

### 【結論】

以上のことから、マウス卵において亜鉛トランスポーター Zip10 が発現していること、また受精において Zip10 は重要な役割をもっていることが初めて明らかとなった。

### 【研究成果】

#### 招待講演

1. 伊藤 潤哉

哺乳動物における生殖メカニズムの解明とヒト生殖医療への応用 平成 30 年 7 月 24 日 第 10 回病態分子薬理学セミナー 徳島文理大学

2. 伊藤 潤哉

不妊症の現状とその克服に向けた亜鉛シグナルの解明 平成 31 年 2 月 2 日 亜鉛栄養治療研究会 新大阪丸ビル新館

#### 論文

- Tai Kawahara, Naoki Okamoto, Seido Takae, Megumi Kashiwagi, Mariko Nakajima, Atsushi Uekawa, **Junya Ito**, Naomi Kashiwazaki, Yodo Sugishita, Nao Suzuki (2018)  
Aromatase inhibitor use during ovarian stimulation suppresses growth of uterine endometrial cancer in xenograft mouse model. **Human Reproduction** 127: 2815-2828.
- Kento Miura, Shogo Matoba, Narumi Ogonuki, Takafumi Namiki, **Junya Ito**, Naomi Kashiwazaki, Atsuo Ogura (2018)  
Application of Auxin-Inducible Degron Technology to Mouse Oocyte Activation with PLC $\zeta$ . **Journal of Reproduction and Development** 64: 319-326.

5. Takafumi Namiki, **Junya Ito\***, Naomi Kashiwazaki (2018)  
Molecular mechanisms of embryo implantation in mammals: Lessons from the gene manipulation of mice.  
***Reproductive Medicine and Biology*** Review 17: 331-342.
6. 伊藤 潤哉\* (2019)  
受精時におけるカルシウムイオン制御機構 亜鉛栄養治療 (Review article) 29: 146-154.

○プロジェクトNo. P17ー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

**Lectins histochemical analysis of in rat Leydig cells  
after prenatal di(n-butyl) phthalate exposure; part II**

Shin Wakui

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

Original Article

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

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, lectins (ConA, DBA, SBA, LPA, WGA, UEA, PNA, GS1, ACG, PSL1a, 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, ACG, and PSL1a 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** Testis. Rats. Leydig cell. Lectins. Prenatal DBP exposure

## INTRODUCTION

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. 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 disruptors (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).

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  $22 \pm 2^\circ\text{C}$  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  $\sim 0.5$  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 CO<sub>2</sub> 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 ( $10^4 \text{ um}^2$ ) 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- $\text{H}_2\text{O}_2$  (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  $-80^\circ\text{C}$  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**

The affinities of the 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. 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, ACG, PSL1a, and LPA. 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.

## DISCUSSION

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. 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 aphaGalNAc and terminal/internal alphaMan, and for WGA, indicating the presence of terminal (GlcNAc-beta-(1,4)-GlcNAc)<sub>1-4</sub> (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, *Luminulus 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 ACG, PSL1a, and LPA at 14 and 17 weeks old in the vehicle group, while that of the DBP group was positive for ACG, PSL1a, and 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 ACG, PSL1a, and LPA are a useful histochemical marker for fetal and adult LCs during testicular differentiation and development of the rat.

## 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 glycoconjugates in human testis. A histochemical study using fluorescein- and rodamine-conjugated lectin. *Andrologia* **19**, 322-332.
- Malmi, R., Frojzman, K. and Soderstrom, 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, M.F., 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., Muto, 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.Toxicol.* **77**, 561-567
- Ueno, K., Ohyama, M. and Lim, D.J., (1992): Expression of sialic acids in developing murine tubotympanum. *Acta. Otolaryngologica.* **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  $\alpha$ ,  $\beta$ , 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、 $\gamma$ -カウンター、安全キャビネットなどがある。

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

### ○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 30 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 30 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 30 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 30 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	水生動物	
4月	2,961	381	0	18	0	2	10	0	222	3,594	
5月	2,946	315	0	18	0	2	10	0	223	3,514	
6月	2,960	385	0	18	0	2	10	0	216	3,591	
7月	2,977	380	0	18	0	2	0	0	250	3,627	
8月	2,845	509	0	18	0	2	0	0	265	3,639	
9月	3,284	614	0	18	0	2	0	0	265	4,183	
10月	3,448	444	0	18	0	2	0	0	258	4,170	
11月	3,458	384	0	18	0	2	20	0	260	4,142	
12月	3,241	550	3	18	0	2	0	0	282	4,096	
1月	3,545	478	3	18	0	2	0	0	241	4,287	
2月	3,632	397	3	18	0	2	0	0	237	4,289	
3月	3,483	473	2	18	0	2	12	0	240	4,230	
合計 (匹数)	38,780	5,310	11	216	0	24	62	0	2,959	47,362	

・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. 18—03

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

使用申請者 守口 徹

利用実験エリア 組み換え DNA エリア

### 平成 30 年度の研究概要と成果

多価不飽和脂肪酸組成の異なる人工乳を作製し、出生 2 日齢より人工哺育したマウスを 9 週齢から、自発運動量、運動協調性試験、水迷路試験等の行動試験を実施して脳機能を評価している。

飼育期間中の成長は、以前の実験と同様の、アラキドン酸 (ARA) を含む人工乳や飼料を与えた群で Wild type (WT) 群と同等の体重増加が観察されている。

現在、行動試験の統計学的に評価可能な 1 群  $n=10$  となるように、交配を繰り返し雄性ホモ (-/-, KO) マウスを作製している。

### 研究成果報告

学会発表 Moriguchi T and Harauma A, ARA and DHA functions in  $\Delta 6$  desaturase knockout mice: Teasing apart their separate functions using artificial rearing, Satellite 2: Arachidonic and docosahexaenoic acids in infant development, Satellite Symposium, The 13th meeting of the international society for the study of fatty acids and lipids, Oral, May 27-31 (2018) Las Vegas, USA

## ○ No. 18—04

研究テーマ マウスを用いた天然物由来食品素材の機能性評価

使用申請者 守口 徹

### 平成 30 年度の研究概要と成果

糖尿病モデルの作製に糖尿病誘発性物質 (ストレプトゾトシン, STZ) を用いた。

○予備検討

通常飼料で飼育管理した ICR マウス (8 週齢) に、PBS に溶解した STZ を① 20 mg/10 ml/kg で 2 日間、② 40 mg/10 ml/kg で 3 日間、③ 80 mg/10 ml/kg で 1 日間、④ 80 mg/10 ml/kg で 2 日間、腹腔内に連続投与し、血糖値の上昇を確認するとともに、軽微な糖尿病モデルマウスを作製した。本試験には、投与後 2 週目から血糖値の上昇が観察され、血糖値 150~200 mg/dL で安定した④を本試験に用いることとした。

○本実験

AIN93M に朝鮮ニンジンエキスを 1 または 3% 添加した飼料で 4 週間飼育した ICR マウス (8 週齢) に予備検討で得られた STZ 至適量を腹腔内投与し、毎週の体重、血糖値の変化を観察した。最終評価時には、HbA1c, GPT, GOT, TG, T-CHO, CRE の測定も行った。

サボニンの吸収率を上げるために発酵させたエキス群よりも、未処理のエキス群の方が血糖値や GOT, GPT の上昇を抑制した。

### 研究成果報告

なし

○ No. 18—06

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

平成 30 年度の研究概要と成果

犬用デンタルガムを2週間にわたり健常犬6頭に給与した。試験期間中に副作用は認めず、便や歯周病の臨床スコアは変動しなかった。口腔内細菌叢に対する主成分分析では、給与前後での有意な変動を認めなかった。LEfSe法で菌種ごとの変化を解析すると、口腔内の乳酸菌群が有意に増進し、歯周病の病原性菌が有意に減少した。以上より、デンタルガムによる口腔内細菌叢の改善効果が示唆された。

研究成果報告

なし

○ No. 18—07

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 30 年度の研究概要と成果

多包虫の二次包虫を小型実験動物に投与した。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. 18—08

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 30 年度の研究概要と成果

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. 18—09

研究テーマ 広東住血線虫 *Angiostrongylus cantonensis* 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 30 年度の研究概要と成果

広東住血線虫をラットなどの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. 18—10

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 30 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、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. 18—11

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 30 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. 18—12

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 30 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. 18—13

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 30 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。これら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. 18—14

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 30 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. 18—15

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 30 年度の研究概要と成果

肝蛭をラットおよびウサギなどの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. 18—16

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 30 年度の研究概要と成果

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. 18—17

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

利用実験エリア 感染エリア

平成 30 年度の研究概要と成果

自己血を経口投与した後の糞便を採取し試料とした。糞便を前処理し ELISA による測定に供した結果、便潜血を検出することができた。しかし、糞便の採取時期あるいは採取部位により大きなバラツキが認められた。今後、経時的な推移を追跡できるよう糞便の前処理方法等に改良が必要と考えられた。

研究成果報告

なし

## ○ No. 18—18

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 30 年度の研究概要と成果

ラットに不活化した *Aspergillus fumigatus* あるいは *Candida albicans* を免疫して得た抗血清を用いて、*A. fumigatus* あるいは *C. albicans* の簡易な抗体価測定法について検討した。この間接蛍光抗体法を応用した抗体価の測定は、可能であると考えられる。しかし、現状では蛍光所見が鮮明ではなく、判定が困難であることがあり、さらなる改良の必要があると考えられた。

### 研究成果報告

なし

## ○ No. 18—19

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 30 年度の研究概要と成果

生体膜を構成する脂質は、その機能ドメインとして脂質ラフトが存在する。ガングリオシドは、スフィンゴ糖脂質に 1 つ以上のシアル酸が付加したものである。本研究では、バックグラウンドを C57BL/6 とする STGAL5 KO、ST8SIA1 KO、B4GALNT1 KO を用い、胎児の解析を行った。その結果、2 種類の DKO マウスの分子的な差異は、シアル酸 1 分子が存在するかしないかの違いであり、ガングリオシドを構成するシアル酸はマウスの初期発生に必須であることが示唆された。一方、T 細胞特異的 UGCG KO マウスを用いて、炎症性大腸炎である IBD の解析を行った結果、生存率の低下がみられた。IBD モデルでは体重減少の促進もみられた。また、組織学的解析では T 細胞特異的 UGCG WT マウスでは炎症が軽度であったのに対し、T 細胞特異的 UGCG KO マウスでは重度の炎症が観察された。

### 研究成果報告

学会発表 1 船戸このか、永根大幹、村田拓馬、古川玲美、森元美紗子、山下匡 ガングリオシド GM3 のシアル酸は初期発生に必須である 第 161 回日本獣医学会 9 月 13 日～15 日 つくば 口演発表

学会発表 2 水野愛理、永根大幹、引山由那、相原尚之、上家潤一、岡本まり子、山下匡 自己免疫性疾患におけるグルコシルセラミド合成酵素の機能解析 第 162 回日本獣医学会 9 月 10 日～12 日 つくば 口演発表



## ○ No. 18—20

### 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 30 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。

T細胞特異的な糖脂質欠損マウスにおいて抗腫瘍作用が得られることが明らかとなったよって、脂質ラフトの構成成分により、腫瘍免疫が抑制されることが示唆された。本研究は令和元年度に論文・学会発表予定である。また関連する知財は出願済みである。

上記に加えて、新規制がん剤およびデバイスの開発に関する共同研究を実施した。

#### 研究成果報告

学会発表 1 The role of UDP-glucose ceramide glucosyltransferase in T cells in tumor immunity, 第 47 回日本免疫学会学術集会, 2018 年 12 月 10 日、福岡、ポスター発表

学会発表 2 がんにおけるスフィンゴミエリン合成酵素 2 の機能解析、第 26 回 日本血管生物医学会学術集会、2018 年 12 月 7 日、東京、ポスター発表

学会発表 3 血管内皮細胞の糖脂質ガングリオシド GM3 は腫瘍血管新生を制御する、第 26 回 日本血管生物医学会学術集会、2018 年 12 月 7 日、東京、ポスター発表

## ○ No. 18—22

### 研究テーマ In vitro における星状膠細胞分化に関する研究

使用申請者 坂上元栄

学内共同実験者 小澤秋沙

#### 平成 30 年度の研究概要と成果

星状膠細胞をはじめとする神経膠細胞の分化や増殖に影響を与える因子を探索するため、in vitro での実験を行う目的で in vitro での星状膠細胞の培養条件検討を行った。市販のキットでの分離では、実験に要する細胞数には至らなかった。先行研究にて報告のある方法で星状膠細胞の分離を行い、実験に要する十分な細胞数がとれることがわかった。今後、この方法を用いて星状膠細胞を分離するとともに他の星状膠細胞の分離の条件検討を行うとともに、これらの細胞の分化や増殖に影響を与える因子を探索する予定である。

#### 研究成果報告

なし

○ No. 18—23

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

学内共同実験者 小澤秋沙

平成 30 年度の研究概要と成果

動物の体表には模様があり、その模様は種によって異なる。組織学的には色素細胞の有無もしくは細胞密度によって模様相違が説明されている。しかしながら、その模様を決定する色素細胞の有無及び細胞密度を決定する機序は明らかとなっていない。本研究では、その機序を解明することを目的として、模様を持つマウス JF-1/Ms を用いて実験を行った。まず、基礎的データを得るため、JF-1/Ms の背側部について毛周期を観察した。先行研究で報告のある C57BL6 系統と比較検討し、毛周期がほぼ同一であることが明らかとなった。

研究成果報告

なし

○ No. 18—24

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

学内共同実験者 小澤秋沙

平成 30 年度の研究概要と成果

グリア線維性タンパク (GFAP) のプロモータを持つ Enhanced green fluorescent protein (EGFP) 遺伝子を導入した C57BL/6CrSlc-Tg(GFAP-EGFP)09Shb トランスジェニックマウスから星状膠細胞等の神経膠細胞の初代培養を行い、遺伝子発現への制御因子の直接関与等を検討することを目的として研究を行う予定であったが、同トランスジェニックマウスのホモ個体で妊孕性がない可能性があったことから、現在、妊孕性について詳細に確認中である。

研究成果報告

なし

○ No. 18—25

研究テーマ マウスにおける長時間イソフルラン吸入麻酔に関する研究

使用申請者 塚本篤士

平成 30 年度の研究概要と成果

本研究では長時間におけるイソフルラン吸入麻酔の安全性をバイタルサインから評価し、その最適濃度を検討した。8 週齢の雄 C57BL/6J マウスを各濃度にてイソフルラン吸入麻酔を 6 時間実施した。各個体におけるバイタルサインの変動と覚醒時間、死亡率を評価検討した。その結果、いずれの群のマウスにおいても、麻酔関連死は認められなかった。直腸温度の低下は 2.0% 群で顕著であった。呼吸回数の顕しい低下を認め、この低下は濃度依存性であった。一方、SPO2 や心拍数はいずれの群でも比較的安定していた。本研究では 1.0~1.5 MAC の濃度の範囲内で安全性評価を行った。その結果、いずれの濃度でもバイタルサインの変動は許容範囲であると考えられた。しかしながら、濃度依存性の呼吸回数の低下が認められることから、使用目的を考慮しながら麻酔濃度をできる限り低下させることが重要であると考えられた。

研究成果報告

なし

○ No. 18—26

研究テーマ 情動伝染の麻酔感受性に及ぼす影響

使用申請者 塚本篤士

平成 30 年度の研究概要と成果

本研究では他個体とのインタラクションが、周術期における麻酔感受性や術後疼痛にどのような影響をおよぼすか検討し、動物実験や医療分野における周術期管理の向上に向けた基盤情報を提供することを目的とする。ラットを群飼育し、片方のラットをデモンストレーター、もう片方のラットをオブザーバーとした。デモンストレーターに開腹手術を行った後、オブザーバーと同居させた。同居後のオブザーバーにおいて、麻酔感受性ならびに術後の疼痛レベルの変化を検討することで、痛みの情動伝染が成立したかを検証した。その結果、デモンストレーターとの同居によるオブザーバーの麻酔感受性・術後疼痛レベルの変化が認められており、痛みの情動伝染が成立した可能性が示唆された。

研究成果報告

なし

○ No. 18—27

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 田澤花菜

平成 30 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 1 佐原弘益、田辺敦、古屋綾乃、田澤花菜、田口正行 イヌ癌細胞における CD44 バリエントと xCT の機能解析 第 161 回 日本獣医学会学術集会 2018, 9.11-13, つくば市口演発表

学会発表 2 Tanabe A, Tazawa H, Furuya A, Ichige J, Kawanami K, Yamaga H, Sahara H Functional analysis of CD44 variants and xCT in canine cancer cells. 77<sup>th</sup> Annual Meeting of the Japanese Cancer Association, Sep 27-29, 2018, Osaka. ポスター発表

○ No. 18—28

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 河南輝大

学内共同実験者 小出智子

平成 30 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にする。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、実験に用いた。それらの骨髄細胞は抗原提示細胞として T 細胞アッセイに用いたり、cDNA ライブラリーの作成に用いたり、抗原の細胞内局在をレーザーコンフォーカル顕微鏡で調べることに用いた。【結果】 IL4I1 抗原が小胞輸送されて MHC classII に提示されることを明らかにした。

研究成果報告

なし

○ No. 18—29

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 古屋綾乃

学内共同実験者 市毛樹梨

学内共同実験者 山我仁志

#### 平成 30 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

使用申請者 茂木一孝

学内共同実験者 菊水健史

学内共同実験者 野元謙作

利用実験エリア 組み換え DNA エリア

### 平成 30 年度の研究概要と成果

マウスの母仔間に相互認知があることを示した。仔マウスに実の母マウスと別の母マウスを同時に提示すると、実の母とより長く過ごした。また母マウスに実の仔マウスの超音波領域の鳴き声と別の仔マウスのものを同時に再生すると、実の仔マウスのものをより素早く探査した。雄マウスは雌マウスと出会うと超音波領域で歌構造をもつ発声をするが、この雄マウスの歌の役割を明らかにした。雌マウスは、手術により歌発声ができない雄マウスと比較して、歌える雄マウスへの接近頻度が高いことがわかった。また、この歌を聴いた雌マウスの脳内では、性腺刺激ホルモン放出ホルモンの分泌を促進するキスペプチンニューロンが活性化することもわかった。雌マウスでは妊娠初期に交尾相手以外の雄マウスとの接触により流産してしまうブルース効果という現象が知られている。この現象には雄フェロモンである ESP1 の雄間の分泌量の違いが関与していることがわかった。

### 研究成果報告

- 論文 1 K. Mogi, A. Takakuda, C. Tsukamoto, R. Ooyama, S. Okabe, N. Koshida, M. Nagasawa, T. Kikusui Mutual mother-infant recognition in mice: The role of pup ultrasonic vocalizations. *Behavioral Brain Research*, 325, Part B: 138-146 (2017)
- 論文 2 A. Asaba, T. Osakada, K. Touhara, M. Kato, T. K. Mogi, T. Kikusui Male mice ultrasonic vocalizations enhance female sexual approach and hypothalamic kisspeptin neuron activity. *Hormones and Behavior* 94: 53-60 (2017)
- 論文 3 T. Hattori, R. Oyama, N. Horio, T. Osakada, K. Mogi, M. Nagasawa, S. Haga-Yamanaka, K. Touhara, T. Kikusui Exocrine gland-secreting peptide 1 is a key chemosensory signal responsible for the Bruce effect in mice. *Current Biology* 27(20): 3197-3201 (2017)
- 学会発表 1 M. Nakamura, K. Mogi, T. Koide, T. Kikusui · Identification of social cues in emotional contagion of pain using MSM/Ms and C57BL/6J strains of mice. · Koudou 2017 · 2017 年 8 月 · 東京 · ポスター発表
- 学会発表 2 町田暁洋、廣井昇、茂木一孝、菊水健史 · 自閉症モデルマウスにおける社会認知能力の解析 · Koudou 2017 · 2017 年 8 月 · 東京 · ポスター発表

○ No. 18—31

研究テーマ 社会環境変化による行動神経発達メカニズムの解明

使用申請者 茂木一孝

学内共同実験者 菊水健史

平成 30 年度の研究概要と成果

母性行動が社会的経験によって発達するメカニズムの一端を明らかにした。未経産のメスマウスが見知らぬ仔マウスと過ごす時間を操作して仔マウス感作量を変化させ、その後に仔マウスを巣に引き戻す行動を調べるレトリビングテストを実施した。その結果、仔マウス感作量に比例してレトリビング行動が増加することがわかった。その神経科学的背景として、脳内の視床下部では仔マウス感作に比例してオキシトシンが分泌され、それにより母性行動の中枢として知られる視索前野がより活性化しやすくなるためであることが示唆された。

研究成果報告

論文 1 S. Okabe, Y. Tsuneoka, A. Takahashi, R. Oyama, A. Watarai, S. Maeda, Y. Honda, M. Nagasawa, K. Mogi, K. Nishimori, M. Kuroda, T. Koide, T. Kikuui Pup exposure facilitates retrieving behavior via the oxytocin neural system in female mice. *Psychoneuroendocrinology* 79: 20-30 (2017)

学会発表 1 茂木一孝・マウスの社会行動発達におけるオキシトシンの役割 シンポジウム「社会」を創る個と個のつながり：神経ペプチドから社会性神経科学を俯瞰する」・第 40 回日本神経科学大会・2017 年 7 月・幕張・口演発表

学会発表 2 度会晃行、目黒拓也、犬東歩、茂木一孝、菊水健史・産後うつをもたらず神経基盤・第 40 回日本神経科学大会・2017 年 7 月・幕張・ポスター発表

学会発表 3 度会晃行、目黒拓也、犬東歩、茂木一孝、菊水健史・The medial prefrontal cortex-paraventricular thalamus circuit decreases maternal behavior during the stressful postpartum.・Koudou 2017・2017 年 8 月・東京・ポスター発表

○ No. 18—32

研究テーマ 母ラットへの高脂肪食とタウリンの給与が産子の体脂肪量と脂肪酸代謝に及ぼす影響

使用申請者 勝俣昌也

平成 30 年度の研究概要と成果

8 週齢の雌ラットを妊娠させ対照区、対照タウリン給与区、高脂肪食区、高脂肪食タウリン給与区の 4 区にわけた。対照区には日本クレア社の CE2、高脂肪食区には Research Diet 社の高脂肪食 D12451 を不断給餌した。対照区と高脂肪食区には水道水、対照タウリン給与区と高脂肪食タウリン給与区にはタウリン含有水（タウリン濃度 1.5%）を給与した。供試した雌ラットは産子が 3 週齢で離乳するまでこの条件で飼育した。高脂肪食を給与した雌ラットの産子は、3 週齢時の腎周囲脂肪組織と肝臓の重量が重かった。さらに、肝臓のトリアシルグリセライドとコレステロールの含量も、高脂肪食を給与した雌ラットの産子が高かった。これらのうち、肝臓のコレステロールのみタウリン給与の影響があり、タウリンを給与した雌ラットの産子は、給与した飼料にかかわらず肝臓のコレステロール含量が低かった。

研究成果報告

なし

## ○ No. 18—33

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 感染エリア

利用実験エリア 組み換え DNA エリア

### 平成 30 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。昨年度、乳酸菌における OVA の産生が低いと考えられたので、OVA 産生能の高い乳酸菌の作成を試みたが、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。今年度も分泌型・結合型とも OVA 産生の高いものが得られなかつたため、本年度も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. 18—35

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 30 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、ZNF131floxed/ERT2Cre マウスを用いて、タモキシフェンにより ZNF131 を誘導した。このマウスから分離した T 細胞において、活性化に伴う MTOC の形成と移動が強く障害された。
- 2、B 細胞特異的に ZNF131 を欠失させたマウスを、p53 欠失マウスと交配することにより、ZNF131 欠失による B 細胞分化の初期である proB 細胞の過程での分化障害が p53 欠失により救済されることを示した。ZNF131 と p53 が相反する機能を持つことを *in vivo* で示せた。

GATA3 変異マウスに関しては、 $\Delta$ 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いる。さらに LAG3 欠失を導入するために、凍結受精卵を入手し、融解作業を行っている。

### 研究成果報告

なし



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

利用実験エリア RI 実験施設エリア

平成 30 年度の研究概要と成果

【背景】乳牛の周産期疾患である乳熱は、乳汁合成のための急激な Ca の喪失に対して、骨吸収の遅れが主因で生じる Ca 恒常性維持の破綻によって発症する。そこで、乳熱発症牛の乳汁ミネラル濃度に対して PTHrP が影響を与えているのか検討した。【材料と方法】分娩当日、あるいは翌日の乳熱罹患牛の乳汁を採取し PTHrP 濃度を測定した。さらに主要なミネラルである Ca や P、微量ミネラルの濃度も測定し、健康牛の乳汁と比較検討した。【結果と考察】その結果、分娩当日でも分娩翌日でも、乳熱発症牛の血清 Ca 濃度は非発症牛よりも有意に低値を示したが、乳汁中 PTHrP 濃度に差は認められなかった。乳汁中ミネラル濃度においては、乳熱発症牛で Mg のように有意に高値を示すものが複数観察された。乳熱の発症に対する PTHrP の関与は明確に出来なかったが、乳熱罹患牛の乳汁中微量ミネラルの変動は本疾患の病態に影響する可能性が示唆された。

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静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. 牛の腹腔鏡下卵巢摘出術における経直腸卵巢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. 18—38

### 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 30 年度の研究概要と成果

チーズより分離した乳酸菌株のうち、炎症抑制効果をもつプロバイオティクス乳酸菌株の探索を行った。人工消化液への耐性を示した乳酸菌株 4 菌株 (Lactobacillus curvatus, Lactobacillus sakei, Lactobacillus brevis と同定された菌株) および各標準菌株 (比較対照として) とし、各菌株を凍結乾燥および加熱処理を施し、菌体粉末を作製した。本研究では、潰瘍性大腸炎モデルマウスとして、C57BL/6N マウスにデキストラン硫酸ナトリウム 1% 水溶液 (DSS) を自由給水させ、実験動物として調製した。DSS 投与マウスに各乳酸菌株懸濁液を経口投与し、DSS 投与による体重減少を抑制する乳酸菌株の探索を行った。その結果、DSS 投与による体重減少を抑制する、乳酸菌株を見出すことはできなかった。また各群のマウス結腸の長さについて評価を行ったが、健常マウスと比較して、いずれも短縮していることを確認した。従って本年度の研究より、新たなプロバイオティクス乳酸菌株を見出すには至らなかった。

#### 研究成果報告

なし

## ○ No. 18—39

### 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 30 年度の研究概要と成果

アガリクスブラジリエンシス KA21 (以下アガリクス) の冷および熱水酸化ナトリウム抽出物 (APS-CA、APS-HA) の抗インフルエンザウイルス効果を調査し、その結果を AE、APS、さらにオセルタミビルによる抗インフルエンザウイルス効果と比較した。また、AE、SE、APS-HA について、C57BL6/SLC マウスと BALB/c マウスを用いて in vivo における抗インフルエンザウイルス効果を評価した。

in vitro において、自然露地栽培したアガリクス KA21 の熱水抽出由来の抽出物 (AE、APS) は有意にインフルエンザウイルスの増殖を抑制した一方で、水酸化ナトリウム抽出物 (APS-CA、APS-HA) とシイタケ熱抽出物 (SE) では、有意なインフルエンザウイルス増殖抑制は見られなかった。また、in vivo において、アガリクス抽出物ならびに各種ポリサッカライドは、体重減少の抑制、生存率の上昇、肺のウイルス価の減少といった抗インフルエンザウイルス効果は認められなかった。

#### 研究成果報告

学会発表 1 伊藤 寛人、元井 益郎、元井 章智、Thanasut Khompakorn、小林 真名、藤野 寛、田原口 智士、アガリクスブラジリエンシス KA21 の熱水抽出物及び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、第 161 回日本獣医学会学術集会、2018.9 月、つくば、口頭発表

○ No. 18—40

研究テーマ 抗マウスノロウイルス活性物質の検索および効果判定

使用申請者 田原口智士

利用実験エリア 感染エリア

平成 30 年度の研究概要と成果

細菌の生死を区別するプロピウムモノアジド（PMA）を用いた Real Time PCR がウイルスにも有効であるとの報告がなされている。そこで今回はマウスノロウイルス（MNV）を異なる処理によって不活化し、PMA-qRT-PCR およびブラック法によってそれぞれウイルス量・力価の測定を行い、その評価を試みた。

PMA-qRT-PCR による MNV の感染型ウイルスと不活化ウイルスの識別は、ブラック法と相関することが示唆されたが、完全に不活化されたウイルスであっても PMA-qRT-PCR では検出される可能性が残るため、総合的な評価が必要であることが考えられた。

研究成果報告

なし

○ No. 18—41

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

使用申請者 田原口智士

平成 30 年度の研究概要と成果

ネコカリシウイルス持続感染猫からのウイルス分離を行ったが、変異を確認することは出来なかった。

研究成果報告

なし

○No. 18—42

研究テーマ ウイルスの病原性獲得要因の解析

使用申請者 田原口智士

平成 30 年度の研究概要と成果

鶏アデノウイルス (FAV) の血清型 1 である JM1/1 株に含まれるオープンリーディングフレーム (ORF)10 のクローニングを行い、その配列を確認した。

ORF10 は分子量 24kDa 相当のたんぱく質を発現することが分かった。また、ORF10 を過剰発現することで FAV のウイルスコピー数が減少すること、ORF10 を siRNA で抑制することで、逆に FAV のウイルスコピー数が増加することから、ORF10 が FAV の増殖の制御に関与していると考えられた。ORF10 組み換え蛋白を免役したが、目的の抗体を得ることは出来なかった。

研究成果報告

学会発表 1 石田 起也、Khompakorn Thanasut、藤野 寛、田原口 智士、筋胃びらん材料から分離された鶏アデノウイルス (FAV) 血清型 1 の JM1/1 株に含まれる ORF10 の機能解析, 第 161 回日本獣医学会学術集会, 2018.9 月, つくば, 口頭発表

○No. 18—43

研究テーマ ウイルスの病原性獲得要因の解析

使用申請者 田原口智士

平成 30 年度の研究概要と成果

ヘルペスウイルス科に属するオーエスキー病ウイルス (PRV) の前初期遺伝子から発現される唯一の蛋白質として知られる IE180 は、ウイルス遺伝子発現の制御に必須の役割を果たす。IE180 の N 末端の 1-34 位アミノ酸 (AA) に対するモノクローナル抗体 (mAb) を作製し、その特性を明らかにした。IE180 の 1-34AA を Balb/c マウスに免疫し、定法に従いハイブリドーマを得た。また、ハイブリドーマから抽出した全 RNA 遺伝子を基に、mAb の H 鎖および L 鎖の遺伝子塩基配列を決定した。IE180 と反応する mAb 産生ハイブリドーマを 3 種類樹立し、そのうちのひとつである 1S6H7G が産生する mAb の解析を実施した。本抗体のアイソタイプは IgG1 であることを ELISA によって決定された。PRV 感染細胞を用いた WB および IFA によって、本抗体は IE180 と同一分子量付近の抗原と結合し、IE180 の細胞内局在と同様に核内に集積する抗原と結合することが確認された。エピトープマッピングを行なった結果、本抗体のエピトープは、10-29AA 中に存在する事が明らかとなった。

研究成果報告

学会発表 1 高木 翔矢、藤本 佳万、高瀬 日穂子、藤野 寛、田原口 智士、小野 悦郎、オーエスキー病ウイルス前初期蛋白質 (IE180) の 1-34 位アミノ酸に対するモノクローナル抗体の作製, 第 161 回日本獣医学会学術集会, 2018.9 月, つくば, 口頭発表

○ No. 18—45

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

学内共同実験者 長井 誠

利用実験エリア 感染エリア

平成 30 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. 18—46

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

学内共同実験者 長井 誠

利用実験エリア 感染エリア

平成 30 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. 18—48

### 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 組み換え DNA エリア

利用実験エリア RI 実験施設エリア

#### 平成 30 年度の研究概要と成果

細胞内のリン酸濃度とリン酸の代謝に極めて重要な犬の Na<sup>-</sup> 依存性リン酸輸送体の一つである SLC34A1 の構造を決定した。638 アミノ酸からなりヒトと 92% 一致した。322 番目と 323 番目のアミノ酸に特徴的な配列があり現在機能解析の面で着目している。RT-PCR により腎と筋に多くの発現があることが確認された。

#### 研究成果報告

なし

## ○ No. 18—49

### 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 30 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 (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、S- ニトロシル化や硫化水素の産生が関与していることが示唆された。

#### 研究成果報告

学会発表 1 黒川健太、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における S- ニトロシル化の影響・第 161 回獣医学会学術集会・つくば国際会議場・2018 年 9 月・口頭発表

学会発表 2 藤本真理、並木湧佑、宮崎陽子、田中和明、滝沢達也・ラット脂肪組織幹細胞の神経分化に及ぼす硫化水素の影響・第 161 回獣医学会学術集会・つくば国際会議場・2018 年 9 月・口頭発表

○ No. 18—50

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 30 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 (H<sub>2</sub>S) 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 H<sub>2</sub>S 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 H<sub>2</sub>S 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. 18—51

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 30 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おり、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ことを目的として、マウスでトラネキサム酸誘発性けいれんモデル確立に向けて実験を実施した。薬物誘発性けいれんに対するトラネキサム酸の増強効果も検討したが、トラネキサム酸誘発性けいれん発作促進作用を評価できる実験系は確立できなかった。

研究成果報告

なし

○No. 18—52

研究テーマ ラットにおける椎間板ヘルニアの電鍼治療効果メカニズム解明

使用申請者 折戸謙介

#### 平成 30 年度の研究概要と成果

ラットの脊髄損傷モデルにおいて、電気生理学的評価（体性誘発電位：SEP）と行動評価にて電鍼刺激が神経機能回復効果を有することを明らかにした。この電鍼の効果は、リドカインで坐骨神経伝導を麻痺させると消失した。また脊髄損傷後に、神経順行性トレーサー試薬である Biotinylated dextran amine（BDA）を大脳運動感覚皮質に注入し、脊髄に到達した BDA を免疫染色して確認した。電鍼による脊髄神経再生作用については、本試験の解析結果をもとに評価する。

#### 研究成果報告

なし

○No. 18—53

研究テーマ 食品素材が性機能におよぼす作用

使用申請者 折戸謙介

#### 平成 30 年度の研究概要と成果

以前行ったラットの実験において、食品素材のオピエースが性機能増強作用を有することを確認した（特許出願済）。本年は、海綿体をラットから単離し、オーガンバス（マグヌス管）に懸垂した。単離海綿体は、アドレナリン  $\alpha$  作動薬フェニレフリンによる収縮に対して電気刺激を与えると頻度依存性の弛緩反応を引き起こした。今後は、本実験系を用いて作用メカニズム解明実験を行う予定である。

#### 研究成果報告

なし



○ No. 18—54

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 30 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. 18—55

研究テーマ ウイルス感染における糖鎖の役割

使用申請者 藤野 寛

利用実験エリア 感染エリア

#### 平成 30 年度の研究概要と成果

組み換えウイルスを用いてグルコシルセラミド合成酵素阻害薬である PPMP 処理によるボルナ病ウイルスに対する影響を確認した所、PPMP 処理によりレポーター活性の減少が確認できた。このことから以前のインフルエンザウイルスの結果と同様に糖脂質はボルナ病ウイルスにおいてもウイルスの増殖に関与することが示唆された。

#### 研究成果報告

論文 K Fujino, Y Yamamoto, T Daito, A Makino, T Honda, K Tomonaga Generation of a non-transmissible Borna disease virus vector lacking both matrix and glycoprotein genes. Microbiology and immunology 61 (9), 380-386 (2017)

○ No. 18—56

研究テーマ 外来遺伝子を発現するボルナ病ウイルスベクターの利用と作製

使用申請者 藤野 寛

利用実験エリア 感染エリア

平成 30 年度の研究概要と成果

G 遺伝子及び M 遺伝子欠損ウイルスを作成し、組み換えウイルスの回収を行った。その結果、M・G の両方を欠くウイルスにおいても細胞に持続感染を成立させることが明らかとなった。この結果から、ボルナ病ウイルスは転写複製に際して G タンパク質や M タンパク質が必須ではないことが判明した。

研究成果報告

論文 K Fujino, Y Yamamoto, T Daito, A Makino, T Honda, K Tomonaga Generation of a non-transmissible Borna disease virus vector lacking both matrix and glycoprotein genes. Microbiology and immunology 61 (9), 380-386 (2017)

○ No. 18—57

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 30 年度の研究概要と成果

昨年度に引き続き、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。雄性 SD ラットに異物代謝酵素を誘導する薬剤 ( $\beta$  ナフトフラボン、フェノバルビタール) を投与後、と殺し、肝 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 1 並木 萌香、水沼 佳奈、田邊 正耀、関本 征史. Bhas 42 細胞由来レポーター細胞株の作成とその有用性評価. 第 4 回次世代を担う若手のためのレギュラトリーサイエンスフォーラム、2018 年 9 月 15 日、中野、ポスター発表
- 学会発表 2 清水英喜、樋口友里、橋本知子、松野研司、遠藤治、関本征史. キナゾリン化合物 AK-01 の抗変異原活性. 第 4 回次世代を担う若手のためのレギュラトリーサイエンスフォーラム、2018 年 9 月 15 日、中野、ポスター発表
- 学会発表 3 並木 萌香、水沼 佳奈、田邊 正耀、稲葉 一穂、関本 征史. Bhas42 細胞由来レポーター細胞株を用いた遺伝毒性の評価. 日本環境変異原学会第 47 回大会、2018 年 11 月 1-3 日、京都、ポスター発表
- 学会発表 4 水沼佳奈、小西 良子、関本征史、遠藤治. ケール抽出物の抗変異原活性: Ames 試験と Bhas 42 形質転換試験による検討. 日本環境変異原学会第 47 回大会、2018 年 11 月 1-3 日、京都、ポスター発表
- 学会発表 5 樋口友里、清水英喜、橋本知子、遠藤治、松野研司、関本征史. キナゾリン化合物 AK-01 の抗変異原活性: Ames 試験による検討. 日本環境変異原学会第 47 回大会、2018 年 11 月 1-3 日、京都、ポスター発表

○ No. 18—58

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 30 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 30 年度は動物実験を実施しなかった。

研究成果報告

なし

○ No. 18—59

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 30 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、無菌化してあるホテイアオイへの遺伝子導入法の検討を計画している。仮にこの無菌ホテイアオイの形質転換体が得られた場合、将来的にはその形質転換体を非無菌環境下で栽培する必要があるため、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非無菌環境下における馴化と栽培条件の検討を行っている。これまで数種類の LED 光源を使用し、その光源からの距離を変化させることで光量の違いを検討してきたが、栽培中に発生する藻の影響によりホテイアオイの生育が著しく阻害されてしまうため、水槽内の水を頻繁に交換する等の対策を行った。形質転換したホテイアオイは植物工場などでの栽培を視野に入れているため、浄化装置などを導入すると栽培コストがかかるため、低コストで藻の発生を防ぐ方策を引き続き検討していく。

研究成果報告

なし

○ No. 18—60

研究テーマ センダイウイルス抗原接種 IgA 腎症マウスモデルの病理発生機序の解明

使用申請者 相原尚之

利用実験エリア 感染エリア

#### 平成 30 年度の研究概要と成果

センダイウイルス感染により、マウスで IgA 腎症が発症することが報告されている。本研究は、不活化済センダイウイルス抗原を用いることで、感染によらない IgA 腎症マウスモデルを確立し、その病理発生機序を解明することを目的としている。H30 年度は適切な抗原接種経路及びアジュバント選定のための予備検討を行い、接種計画及び使用アジュバントを決定した。今後、決定した条件により本試験を実施し、病態を解析する予定である。

#### 研究成果報告

なし

## ○ No. 18—61

### 研究テーマ マウス精子形成期における生殖細胞特異的エピゲノム形成機構の解明

使用申請者 前澤 創  
学内共同実験者 片桐昌樹  
学内共同実験者 船越万結花  
学内共同実験者 多田羅麻由  
学内共同実験者 永井里香  
学内共同実験者 佐藤太芽  
学内共同実験者 磯部裕太  
学内共同実験者 泉谷紗希

### 平成 30 年度の研究概要と成果

生殖細胞特有の現象である減数分裂は、種の多様性を生み出し、配偶子形成に不可欠なプロセスである。生殖細胞が分化し減数分裂期へ移行する際には、体細胞型の遺伝子発現プロファイルから生殖細胞特有の遺伝子発現プロファイルへと切り替わる。この変化は、生殖細胞特異的なエピゲノム変化及びクロマチン構造変化によってもたらされるが、詳細な機序は不明である。本研究は、減数分裂期への移行及び進行に伴うクロマチン構造及びエピゲノム変化を解析し、減数分裂開始機構の解明を目的とした。本年度は、減数分裂期前後の4つの分化ステージの生殖細胞の単離し、RNA-seq法を用いた遺伝子発現解析、及びATAC-seq法を用いたクロマチン開閉状態の解析を行った。未だ解析途中であるが、減数分裂期への移行に伴う段階的なクロマチン構造変化と遺伝子発現変化の関連が明らかになった。今後、当解析を進めると共にそれらの制御機構の解明を目指す。

### 研究成果報告

- 論文1 Maezawa S\*, Hasegawa K, Alavattam KG, Funakoshi M, Sato, Barski A, and Namekawa SH\*. SCML2 promotes heterochromatin organization in late spermatogenesis. *J. Cell Sci.* : 2018 : 131 (17) : pii: jcs217125. \*corresponding authors
- 論文2 Maezawa S\*, Alavattam KG, Tataru M, Nagai R, Barski A, and Namekawa SH\*. A rapidly evolved domain, the SCML2 DNA-binding (SDB) repeats, contributes to chromatin binding of mouse SCML2. *Biol. Reprod.* : 2019 : 100(2) : 409-419. \*corresponding authors
- 論文3 Alavattam KG, Maezawa S, Sakashita A, Khoury H, Barski A, Kaplan N and Namekawa SN. Attenuated chromatin compartmentalization in meiosis and its maturation in sperm development. *Nat. Struct. Mol. Bio.* : 2019 : 26(3) : 175-184
- 学会発表1 Maezawa S, Yukawa M, Chen X, Alavattam KG, Weirauch MT, Barski A, Namekawa SH. Genome-wide establishment of meiotic super-enhancers drives expression of spermatogenesis-specific genes. 3R&3C Symposium ; Kanazawa, November 2018 (口頭発表)
- 学会発表2 前澤 創、湯川 将之、Alavattam Kris、Barski Artem、行川 賢、マウス精子形成期におけるクロマチン構造変化による遺伝子発現制御機構、第41回日本分子生物学会年会、2018年11月、横浜 (ポスター発表)
- 学会発表3 前澤創. 生命の連続性に迫る—生殖細胞のエピゲノム形成機構. 形態解析ワークショップ—多様な顕微鏡を用いて. 品川, 3月2019年 (口頭発表)

## ○No. 18—62

### 研究テーマ 腸内細菌叢による行動神経系の変化の解析

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 野元謙作  
利用実験エリア 感染エリア

#### 平成 30 年度の研究概要と成果

近年、動物の腸管内に生息している細菌群（腸内細菌叢）が宿主行動や内分泌系を調節することが解明されつつある。腸の神経系や自律神経を通して脳と腸が双方向に影響をおよぼすことを脳腸相関という。脳腸相関には動物の腸管内に生息している細菌群（腸内細菌叢）が強く関与しており、特に発達期の腸内細菌叢はストレス応答性や免疫の発達において重要な役割を担っていることが報告されている。これらのことを踏まえ、申請者は生後初期の細菌叢が宿主の内分泌と行動の発達に重要な役割を担っていると仮説を立て、無菌マウスの発達期における経時的な性腺ステロイドホルモンの測定を実施した。さらに、無菌の雌マウスの雄マウスの匂いに対する匂い嗅ぎ行動を測定することによって、性嗜好性の発達を評価した。無菌マウスの糞便中のエストラジオール、プロゲステロン、およびコルチコステロンのレベルは、SPF マウスのものより非常に低かった。匂いによる性嗜好性試験では、雌の無菌マウスは雄の臭いよりも雌の匂いに嗜好性を示した。このことから、共生細菌叢が宿主内分泌系の発達、ならびにマウスにおける匂いの嗜好性において重要な役割を果たすことを見出した。

#### 研究成果報告

論文 1 Itsuka Kamimura, Akiyuki Watarai, Takuma Takamura, Atsushi Takeo, Kyoko Miura, Hidetoshi Morita, Kazutaka Mogi, and Takefumi Kikusui Gonadal steroid hormone secretion during the juvenile period depends on host-specific microbiota and contributes to the development of odor preference. *Dev Psychobiol.*2019 Jul; 61(5): 670-678.

## ○No. 18—63

### 研究テーマ オオサンショウウオ雄の生殖生理におけるプロジェステロンの生理機能

使用申請者 松井 久実

#### 平成 30 年度の研究概要と成果

三重県名張市から譲渡されたオオサンショウウオ（交雑種・雄・5 個体）を、2018 年 9 月に水生生物飼育室に搬入した。ポータブルエコーを用いた精巣組織構造の探索を定期的に行い、各個体の精巣の生殖生理状態を確認した。同時期の野生個体の精巣の組織状態と比較すると、どの個体も顕著な精巣収縮があり、精子形成は確認されなかった。譲渡を受けたオオサンショウウオは名張市の河川で捕獲された後、譲渡を受けるまで地域のプールで飼育管理されており、河川との棲息環境の違いが個体にストレスを与えていることが考えられた。以上から、当初の研究計画を実施するための前提となる個体の生理状態が整っていないことが明らかになったため、飼育管理を続けながら個体のコンディションの回復を追跡することとした。

#### 研究成果報告

なし

○ No. 18—64

研究テーマ マンソン裂頭条虫の各発育・成熟段階における石灰小体の組織学的再検討

使用申請者 栗林尚志

学内共同実験者 川上 泰

学内共同実験者 坂西 梓

利用実験エリア 感染エリア

平成 30 年度の研究概要と成果

感染させる予定であるマンソン裂頭条虫が入手できず、実験を行うことができなかった。来年度以降、入手でき次第着手する予定である。

研究成果報告

なし

○ No. 18—67

研究テーマ ピレノシン A の抗腫瘍効果の検証

使用申請者 紙透伸治

学内共同実験者 佐原弘益

平成 30 年度の研究概要と成果

ピレノシン A は培養細胞に対して単極紡錘体というユニークな現象を引き起こし、がん細胞の増殖を抑制する。そこで本研究ではがん細胞を移植したヌードマウスを用いて、ピレノシン A が抗腫瘍効果を示すかどうかを検証した。ヌードマウスにヒト結腸癌細胞 HCT16 を皮下注射し、固形腫瘍形成させた。その後 2 群に分け、生理食塩水に溶かしたピレノシン A を 0, 20 mg/kg の投与量で 14 日間毎日腹腔内に投与し、腫瘍の体積を測定した。その結果、統計的有意差は見られなかったが、ピレノシン A によって腫瘍の成長が抑制される傾向が見られた。今後は、他のがん細胞を用いてピレノシン A の抗腫瘍効果を検証する予定である。

研究成果報告

なし

## ○ No. 18—68

研究テーマ ラットにおける術後の疼痛レベルに関する研究

使用申請者 塚本篤士

### 平成 30 年度の研究概要と成果

本研究では、ラットにおいて各種麻酔法が術後疼痛にどのような影響を及ぼすか検討した。ラットにそれぞれメデトミジン - ミダゾラム - ブトルファノール (M/M/B; 0.15 mg/kg, 2 mg/kg, 2.5 mg/kg, ip)、ケタミン - キシラジン (K/X; 80mg/kg, 10mg/kg, ip)、イソフルラン吸入麻酔 (導入濃度 5.0%、維持濃度 2.0%)、を使用して麻酔を行い、開腹手術を実施した。術後疼痛の指標として、RGS スコアを経時的に測定するとともに、血中コルチコステロン濃度を術後 24 時間に測定した。イソフルランは術後の疼痛レベルが多剤よりも高く、鎮痛薬の併用が望ましいと考えられた。一方、ケタミン・キシラジンは術後初期における疼痛レベルが低いものの、疼痛レベルのピークが後期に見られることが明らかとなった。本研究で得られた知見はラットの術後管理における基礎的情報を提供するものとして有用であると考えられた。

### 研究成果報告

なし

## ○ No. 18—69

研究テーマ 環境中化学物質曝露がアレルギー病態に及ぼす影響評価

使用申請者 福山朋季

利用実験エリア 化学物質毒性エリア

### 平成 30 年度の研究概要と成果

本研究では、ヒトへの健康影響が懸念されているビスフェノール A (BPA) の経口曝露が食物アレルギー病態の進行にどのように寄与しているかを調査した。雄性 BALB/c マウスと ovalbumin (OVA) を用いて食物アレルギーモデルマウスを作製し、BPA 曝露が食物アレルギーの成立に直接的に影響しているかを調査した。結果、アナフィラキシー症状の指標である直腸温低下と食物アレルギーの指標である軟便が BPA の濃度依存的に観察された。さらに脾臓中のヘルパー T 細胞数および IgE 産生 B 細胞数も BPA 濃度依存的に増加しており、それに伴う血清中 IgE 量の増加も認められた。また、アレルギー病態の悪化に関わる IL-13 および IL-17 産生量も BPA 濃度依存的に増加しており、BPA の経口曝露がマウスモデルにおける食物アレルギーの進行を増悪させる可能性が示唆された。

### 研究成果報告

なし



○ No. 18—70

研究テーマ 登攀性捕食者となるヘビに対する新型電気柵の有効性評価

使用申請者 塚田英晴

平成 30 年度の研究概要と成果

ヘビに対する電気柵の効果を検討するため、電気柵を巻いたポールをヘビに登らせる実験を行った。はじめに電気柵に通電せず馴化実験を行った。実験では、5回連続でポールをヘビが登った場合を馴化完了とした。現在飼育中の12匹（アオダイショウ7匹、シマヘビ5匹）のうち、8匹（アオダイショウ5匹、シマヘビ3匹）を供試し、3匹（アオダイショウ2匹、シマヘビ1匹）で馴化が完了した。その他のヘビも順調にポールを登っており、非通電時にヘビがポールを登ることが明らかにされつつある。

研究成果報告

なし

○ No. 18—71

研究テーマ カビ毒（デオキシニバレノール及びその類縁体）のマウス免疫系に及ぼす影響の検出

使用申請者 三宅司郎

学内共同実験者 福山朋季

利用実験エリア 化学物質毒性エリア

平成 30 年度の研究概要と成果

本研究ではデオキシニバレノール（DON）の経口投与が皮膚アレルギー病態にどのような影響を及ぼすかを調査する目的で、アレルギー性皮膚炎モデルマウスを用いた検討を実施した。雌性 BALB/c マウスに 2,4-トルエンジイソシアナート（TDI）を反復経皮投与する事でアレルギー性皮膚炎モデルマウスを作製し、TDI 最終惹起 48 時間、24 時間、1 時間前に 0.1, 0.3, 1 mg/kg の DON を経口投与し、DON 曝露が皮膚アレルギーの成立に直接的に影響しているかを調査した。結果、皮膚炎症は DON 濃度依存性に有意に増加し、リンパ節中のヘルパー T 細胞数、樹状細胞数、IgE 陽性 B 細胞数も DON 投与群で有意に増加した。IL-4 および IL-13 産生量も DON 投与群で有意に増加しており、DON 曝露がマウスモデルにおいてアレルギー性皮膚炎を直接的に増悪させていることが示唆された。

研究成果報告

なし

○ No. 18-72

研究テーマ 自発症てんかんを有する NER ラットの電気生理学的検討

使用申請者 井上真紀

#### 平成 30 年度の研究概要と成果

てんかんを自発症する近交系 NER ラットを実験用に系統維持する。発作を起こしやすいものを選抜自家繁殖する。必要ラットのみを搬出して研究室で実験を行うが、2月から繁殖しており、ラットが実験適性月齢の5～6か月令に達したところである。

#### 研究成果報告

なし



## 「麻布大学バイオセキュリティ」 教育講演

平成30年6月5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。動物由来感染症の紹介と、中でも最近話題となっている中東呼吸器症候群（MERS）や重症熱性血小板減少症候群（SFTS）について最新の研究成果についてわかりやすく説明していただきました。

## 麻布大学バイオセキュリティ 教育講演

### 動物由来感染症の脅威

—動物由来の致死性感染症を知っていますか？—

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30年6月5日（火） 18:00-20:00

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環になっていますが、学部生等の受講も歓迎いたします。

---

---

## 麻布大学附置生物科学総合研究所 紀要第29号

(作成基準日：平成30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 新 篤志・青野 和憲

---

---



No. 29