

研究会だより

第75回岡山実験動物研究会例会

平成30年6月29日(金)午後1時30分から午後5時40分まで岡山大学理学部31講義室で竹内 栄先生(岡山大学理学部)のお世話で開催された。受付で記帳された参加者数は49名であった。

国枝哲夫会長による開会のあいさつの後、一般講演が行われた。一般講演1は「ヌートリア *Myocastor copus* を用いた試験と実験2」と題して、紺野弘毅氏、小林秀司先生ら(岡山理科大学理学研究科・理学部動物学科)が講演された。一般講演2は「内耳蝸牛管上皮組織における H^+ /myo-inositol transporter および aquaporin 4 の局在解析」と題して、小林春也氏、安藤元紀先生ら(岡山大学大学院教育学研究科・細胞生理学研究室)が講演された。上記の2題の座長は松山 誠先生(重井医学研究所・分子遺伝部門)が担当された。

一般講演3は「Mulberry modulates the gut microbial flora and inhibits the DSS-induced ulcerative colitis」と題して、Yang Wang 氏、畑生俊光先生(岡山大学大学院環境生命科学研究科)が講演された。一般講演4は「ラットの経時的採血におけるストレッチハンドリングのストレス軽減効果の検討」と題して、平山晴子先生、樫木勝巳先生ら(岡山大学自然生命科学研究支援センター動物資源部門)が講演された。この2題の座長は安藤元紀先生(岡山大学大学院教育学研究科)が担当された。

一般講演5は「岡山大学自然生命科学研究支援センターに搬入される家畜ブタのE型肝炎ウイルス感染状況について」と題して、小川寛人先生、平山晴子先生、矢田範夫氏、樫木勝巳先生ら(岡山大学大学院医歯薬学総合研究科病原ウイルス学分野、岡山大学自然生命科学研究支援センター)が講演された。座長は畑生俊光先生(岡山大学大学院環境生命科学研究科)が担当された。

一般講演5が終了した後、休憩を取った。その後、事務局(会長)から会務報告があった。なお、会務報告は平成30年度第1回理事会の記載内容(67~69頁)を参照下さい。

会務報告後、一般講演6に移った。

一般講演6は「ツメガエル属における Adrenomedullin 5 の局在と免疫に関する機能」と題して、御興真穂先生、相澤清香先生、竹内 栄先生、高橋純夫先生ら(岡山大・理・生物・岡山大・院・自然科学)が講演された。

一般講演7は「GONAD法を用いた簡便ゲノム編集マウス・ラット作製法」と題して、松山 誠先生、古家野孝行先生ら(重井医学研究所 分子遺伝部門)が講演され、この2題の座長は工藤季之先生(就実大学薬学部)が担当された。

特別講演は「色素細胞系—生命機能発現機構解明の1モデルシステム」と題して、山本博章先生(長浜バイオ大学バイオサイエンス学部)が講演され、座長は竹内 栄先生(岡山大学理学部)が担当された。



本研究会 HP より引用
上段左より 国枝先生、紺野氏、小林氏
中段左より Yang Wang 氏、平山先生、小川先生
下段左より 御興先生、松山先生、山本先生

特別講演が終わった後、閉会のあいさつがあり、その後、大学生協ピーチユニオン4階に会場を移して、懇親会が午後6時から持たれた。はじめに、会長の国枝哲夫先生の開会のあいさつがあり、続いて名誉会員の佐藤から乾杯の発声があった。

閉会のあいさつは理事の樫木勝巳先生がなされ、会を締めくくられた。特別講演、一般講演の講師の先生方や学生さん、会員との親睦と交流を深めることができた。

一般講演1

ヌートリア *Myocastor copus* を用いた試験と実験2

紺野弘毅¹、齋藤 香³、里見春奈³、
宮崎多恵子²、河村功一²、小林秀司³

¹岡山理科大学理学研究科 ²三重大学生物資源学部 ³岡山大学理学部動物学科

【はじめに】ヌートリア *Myocastor coypus* は、特定外来生物に指定され、完全防除の対象になっているが、防除のために必要な生物的特性の研究は進んでいない。演者らの研究室では、

2009 年以来、岡山県環境保健センターと共同で疫学調査を開始したのを皮切りに、三重大学などと共同でヌートリアにかんする生物学的な研究を行っている。今回は、本研究会での発表機会を頂いたので、飼育下にあるヌートリアで行った感覚特性の解明実験の中から三つの例について紹介する。

【聴覚特性解明のための試験 1 -実験装置に対する馴致実験-】学習能力を利用したヌートリアの可聴域の解明を行う予備実験として、成獣雌 1 頭を用いて、オペラント条件付けによる実験装置への馴致実験を行った。実験装置は、通常飼育のケージに、実験スペースとして小型ケージを接続したもので、この小型実験スペースに左右の区画をもうけ、さらに区画最奥部それぞれに音源となるスピーカーを取り付けた。音源は 500Hz の正弦波を用い、左右区画の一方からランダムに音を流して、音源の区画へ侵入した場合に正解として報酬を与えた。実験開始当初は音源とは無関係に左右どちらかの区画を先に決めて進入し、餌がなければもう一方の区画に移動する（正答率 50%）という行動を示したが、この試験を一か月間繰り返すことで、音と報酬の関係性を学習し、音が流れる区画を選択するようになった（正答率 80%以上）。

【聴覚特性解明のための試験 2 本試験】

馴致試験の装置をさらに改良し実験スペースに侵入する際に音源から等距離になるように通路をもうけた（右図）。成獣雌 1 頭を用いて十分に馴致実験を行い、正答率が安定して 80%を越えた段階で可聴域測定のための本実験に移行した。その結果、20Hz の正弦波を使用した場合 31%の正答率（13 試行）であったが、200Hz および 5kHz の正弦波に対するセッションの正答率は、30 試行中どちらも 80%を越え、明らかに音が流れていることを認識していると考えられた。10kHz、15kHz の正弦波に関しては、全く無反応で、実験スペースそのものに入ってもなかった。これらのことからヌートリアの聴覚特性は、齧歯類一般のそれとは大きく異なり、比較的低音域に偏る傾向があると考えられる。

【有効視野の測定試験】

ヌートリアの視覚特性を調べるため、成獣雄 1 頭を用いて、オペラント条件付けや馴化脱馴化法などの手法を用い、直径 1.5m の半円形の実験スペース内に等間隔に設置した 10 個の電球のうち、光の消えた電球を選ばせる弁別学習



の実験系を確立後、視野の測定をおこなった。その結果、個体の正中正面から左右に約 20° の範囲は反応がほとんどなく（20%未満）、有効な視界が得られていない可能性が高かった。一方、正中正面から左右に約 30° ～90° の範囲は、90%以上の正答率があり、良好な視界が得られていると思われる。つまり、ヌートリアは体の側方に関しては広い視界を有しているが、正面は全く見えていない可能性が高い。

本研究は文部科学省科学術研究基金助成金（課題番号：25440235, 16K07514）の助成を受けて行われた。

一般講演 2

内耳蝸牛管上皮組織における H^+ /myo-inositol transporter および aquaporin 4 の局在解析

小林春也¹, 宮本歩実¹, 池田理佐², 安藤元紀^{1,2}

¹岡山大学大学院教育学研究科・細胞生理学研究室

²岡山大学大学院環境生命科学研究科・動物生理学研究室

【背景と目的】哺乳類の聴覚機能を担う内耳蝸牛は、前庭階・中央階・鼓室階の 3 つの区画に分かれており、それぞれ内・外リンパ液で満たされている。内リンパ液で満たされた中央階は蝸牛管側壁・コルチ器・ライスネル膜から成る。これらの構成組織は、聴覚機能の発現に必須の内リンパ液の産生・維持を担い、高い代謝活性に裏打ちされた活発なイオン輸送の場となっている。難聴の多くは、こうしたイオン輸送機構や付随する浸透圧・pH 調節機構のバランスが崩れることにより発症する。本研究では、内耳蝸牛管においてその遺伝子発現が認められた H^+ /myo-inositol transporter (HMIT) の発現部位について特にコルチ器周辺に着目した解析を行った。内耳でその発現部位が明らかとなっている aquaporin 4 (AQP4) を指標として、HMIT 分子の局在を調べた。

【材料と方法】実験にはマウスおよびラットを用いた。麻酔下、化学固定液で経心灌流を行い、側頭骨から蝸牛を摘出し脱灰処理後、Tissue-Tek®に置換して凍結包埋した。凍結切片を作製し免疫組織化学法を適用した。一次抗体として polyclonal goat anti HMIT antibody (sc-244166, Santa Cruz biotechnology) および polyclonal rabbit anti AQP4 antibody (AB3594, Chemicon), 二次抗体として Alexa488 donkey anti goat IgG (A-11055, Life technologies) および Cy3 donkey anti rabbit IgG (711-165-152, Jackson Immuno Research)

を用いた。観察には共焦点レーザー顕微鏡 (FV1200, Olympus) を用い、コルチ器を含む外ラセン溝から内ラセン溝に至る上皮組織における HMIT および AQP4 分子の局在解析を行った。

【結果と考察】成獣における抗 AQP4 抗体の強い陽性部位は Hensen's cells (HC), inner sulcus cells (ISC) の領域であること、および蝸牛の回転に依存した陽性部位の違いはないことが確認され、これまでの報告と一致した (Eckhard et al., 2012; Miyabe et al., 2002; Huang et al., 2002)。これらの結果を指標として、HMIT 分子の局在を調べたところ、特に強い陽性部位は outer sulcus cells (OSC), Deiters' cells (DC), ISC であることが分かった。また、生後発達段階における局在変化の有無を確認するため、幼若 (生後 7~11 日齢) と成獣で比較を行ったところ、HMIT 分子の局在について大きな変化は認められなかった。以上の結果から、コルチ器周辺における HMIT の主な発現部位は OSC, DC, ISC 領域であること、および AQP4 の発現部位との比較においては ISC 領域を除いて異なる局在を示すことが分かった。ISC 領域では両分子の発現が確認されたが AQP4 は基底板側、HMIT は内リンパ側で細胞極性に応じた違いが認められた。HMIT は H^+ と *myo*-inositol の共輸送体であることから、内リンパ液の pH および浸透圧調節に関与していることが示唆される。OSC 領域においては Cl^-/HCO_3^- exchanger である pendrin の発現が報告され、pendrin KO により内リンパ水腫による難聴が誘発されるとされる (Wangemann et al., 2007)。HMIT が pendrin と同じ OSC 領域に発現していることは、即ち H^+ と HCO_3^- の輸送経路が同じ細胞領域で機能していることが示唆され、極めて興味深い。今後も内耳機能維持の解明に向けて、複数の膜輸送体分子の協働の仕組みに視点を置いた解析を進めていく必要がある。

一般講演 3

Mulberry modulates the gut microbial flora and inhibits the DSS-induced ulcerative colitis

Yang Wang and Toshimitsu Hatabu
Graduate school of Environmental and Life Sciences, Okayama University

Introduction

Mulberry belongs to the genus of *Morus* and is used as a traditional medicine. This fruit has many biological functions such as antioxidant, anti-inflammation, and immune-modulating because of containing

rich ingredients such as polyphenols, which including anthocyanin, flavonoid derivatives, and phenolic acids.

Inflammatory bowel disease (IBD) which characterized chronic inflammation and the ulcerative colitis increases worldwide lately. However, the pathogenesis is unclear. Furthermore, the gut microbiota plays a key role in immune homeostasis and autoimmunity, and it is possible reason that the changing of gut microbiota compositions in the IBD patient. Those bacteria may affect some inflammasomes, for example NLRP6 and NLRP3, which alleviate inflammation of colonic epithelial cells by modulating some cytokines expression. Anti-inflammation drugs have been the drug of choice for the treatment of this disease, but it is difficult to use for its side-effects. At present, the development of new drugs and the use of supplements in combination are the important approaches.

Hence, the aim of this study was to evaluate the inhibitory effect of mulberry against the ulcerative colitis and influence to the composition of gut microbiota in Dextran Sulfate Saline (DSS)-induced colitis mouse.

Materials and Method

Male BALB/c mice (7 weeks old) were randomly divided into 6 groups (n=3/group). The diet with (Group 1 to 4) or without (Group 5 and 6) mulberry juice freeze-dried powder (MFP) were daily supplied for 3 weeks. After 3 weeks maintenance, the mice (Group 1, 3, and 5) were supplied water containing 5% (w/v) DSS for 1 week and body weight and fecal condition in mice were daily monitored. At the end of this week, the colon was collected and made hematoxylin-eosin staining specimens for evaluation of the degree of colonic inflammation. The disease activity index (DAI) was calculated according to the loss of body weight and symptoms of disease. The feces were also collected to determine the bacterial composition by RT-qPCR.

Results and Discussion

The severe body weight loss (about 25%) was observed in Group 5 mice, but not in mice with MFP (Group 1 and 3). DAI score in Group 5 mice was indicated at 3.5, whereas DAI score in mice fed with MFP was significantly decreased. Especially, the score in Group 1 mice was observed lower than it in Group 3. The colon length in Group 1 was longer than Group 3. The tissue damages in Group 5 mice were

observed severe compared with it in Group 1 mice. The results of real-time qPCR indicated that total bacterial population was 10^{9-10} copies/g in colon. The significantly decrease was observed for *Bifidobacterium* and *Clostridium perfringens* population in both Group 3 and 5 compared with Group 1 mice. On the other hand, the significantly increase was observed for *Bacteroides* spp. population in group 5 compared with Group 3 mice. Furthermore, the significantly decrease was observed for *Bacteroides* spp. population in group 2 compared with mice in both Group 4 and 6.

There is known that *Bacteroides* spp. is as one of factor which leads the severe IBD disease. We observed the decrease of *Bacteroides* population by mulberry treatment. On the other hand, the results in this study indicated that the significantly increase of *Bifidobacterium* population was observed. The bacteria in *Clostridium perfringens* group was also increased in mice fed with MFP. These two bacteria populations were known as good factor by modulating cytokine production and oxidative stress for IBD. These results may indicate that mulberry inhibits the DSS induced ulcerative colitis by a change of gut microbial flora.

一般講演 4

ラットの経時的採血におけるストレッチハンドリングのストレス軽減効果の検討

○平山晴子¹⁾、中村綾花²⁾、樫木勝巳¹⁾

¹⁾岡山大学自然生命科学研究支援センター動物資源部門 ²⁾岡山大学大学院医歯薬学総合研究科

【目的】実験動物のストレス軽減は、実験動物の福祉向上の観点に加え、動物実験のクオリティ確保の観点からも重要視されるべきものである。実験動物が受忍しているストレスは様々であるが、その中でも実験者が動物に接触することに起因するストレスは小さいものではない。このため、実験動物への事前の接触や声かけといった馴化処置が古くから行われてきたが、近年、実験動物に対して強制的な運動を課し、全身の骨格筋を脱力させる「ストレッチハンドリング」が第47回日本実験動物技術者協会総会（岡山総会）において紹介された。この処置を行ったラットでは無抵抗な状態になることから、従来からいわれてきたハンドリングによる馴化処置よりも実験処置が実施しやすいようにみえる。しかし、そのストレス軽

減効果については未知数である。そこで、これら馴化方法の違いによるストレス軽減効果について検討した。

【方法】5週齢のWistar雄ラットを、ストレッチハンドリング群（Stretch群）、従来からいわれてきたハンドリング群（Caress群）、無ハンドリング群（Control群）の3グループに分け、無麻酔下で経時的に（ハンドリング開始3日前、ハンドリング開始0、3、6、12日目）頸静脈より採血を実施した。採取した血液を用いて、ストレス指標であるコルチコステロンおよびノルアドレナリンの血中濃度測定、また、各種生化学検査を実施し、採血時の各種ハンドリングによる生体応答の差について調べた。

【結果および考察】本研究の結果から、Stretch群におけるコルチコステロンおよびノルアドレナリンの血中濃度の平均値が他群に比べ最も低値を示し、ストレッチハンドリングによって頸静脈採血を行うための保定操作によるストレスが軽減されていることが示された。逆に予想とは異なり、Control群ではこれらの値はほぼ一定に保たれ、Caress群では高い値を示したことから、従来からの処置馴化方法ではストレスの軽減を図れないという結論になった。したがって、ストレッチハンドリングは動物実験における実践的な動物馴化法であり、実験動物の福祉向上への一助となることが強く示唆された。

一般講演5

岡山大学自然生命科学研究支援センターに搬入される家畜ブタのE型肝炎ウイルス感染状況について

○小川寛人¹⁾、平山晴子²⁾、田中爽暉¹⁾、矢田範夫²⁾、難波ひかる¹⁾、山下信子¹⁾、米満研三³⁾、前田 健³⁾、樫木勝巳²⁾、山田雅夫¹⁾

1. 岡山大学大学院医歯薬学総合研究科病原ウイルス学分野
2. 岡山大学自然生命科学研究支援センター
3. 山口大学共同獣医学部 獣医微生物学教室

【背景】ブタはヒトとの解剖学的・生理学的類似点から医学研究のモデル動物として使用されており、研究にはマイクロミニブタやミニブタだけでなく、養豚農場で飼育されている家畜ブタも広く使用されている。E型肝炎ウイルス（HEV）はヒトの急性肝炎（E型肝炎）の原因であり、豚肉やジビエ肉の喫食により感染する人獣共通感染症起因ウイルスとして知られている。ブタから高率に検出され、喫食のみならず血液を介した感染等もあるため、養豚農場で飼育された家畜ブタを動物実験に用いる際

は針刺し事故や外傷事故に注意が必要である。本研究では、岡山大学自然生命科学研究支援センター動物資源部門鹿田施設に搬入された家畜ブタの HEV 感染状況を調査した。

【材料と方法】2012 年から 2016 年に鹿田施設に搬入された 2-3 ヶ月齢の家畜ブタ 73 頭、陰性対照として HEV フリーの実験用家畜ブタ 3 頭およびミニブタ 3 頭から採取した血漿を使用した。ELISA 法および RT-PCR 法を用いて抗 HEV IgG 抗体とウイルスゲノムの検出を試みた。また同一農場の家畜ブタ 4 頭から採材した肝臓からウイルスゲノムの検出も試みた。

【結果】搬入後の ELISA 検査では、79 頭のうち 24 頭 (30.4%) から IgG 抗体が検出された。血漿からウイルスゲノムは検出されなかったが、肝臓 4 検体中 2 検体でウイルスゲノムが検出された。系統学的解析からこれらのウイルスは遺伝子型 G3 に属する事が明らかとなった。

【考察】同一農場のブタ肝臓で HEV ゲノムが検出されたことから、農場内でウイルス感染サイクルが成立しており、若齢ブタで IgG 抗体価が上昇しているものと考えられた。また施設での飼育管理中に陽転した個体がいことから、ウイルス感染直後に施設に搬入されるケースが一定数あることも考えられた。調査結果を術者や飼育管理者と共有し、家畜ブタの取り扱いに注意を促す必要があると考える。

一般講演 6

ツメガエル属における Adrenomedullin 5 の局在と免疫に関する機能

御輿真穂^{1, 2}, 山浦晋平¹, 青柳康太², 荒木文平², 相澤清香^{1, 2}, 竹内 栄^{1, 2}, 高橋純夫^{1, 2}

¹岡山大学・理・生物・²岡山大学・院・自然科学

アドレノメデュリン (Adrenomedullin, AM) ファミリーは、脊椎動物において最大 5 種類の遺伝子 (AM1~AM5) からなるホルモンファミリーである。ファミリーの中で AM1 は機能の解析が進んでおり、降圧作用や血管新生など多くの機能が報告されているのに対し、それ以外のメンバーについては研究例が乏しい。本研究では、Adrenomedullin 5 (AM5) に注目して解析を行った。AM5 遺伝子は硬骨魚類から哺乳類まで多くの系統群において保存され、脊椎動物の進化を通じて重要な役割をもつと考えられるにも関わらず、ヒトやチンパンジーでは欠失変異を生じ、機能を失っている。本研究では、両生類 ネットアイツメガエル (*Xenopus tropicalis*) およびアフリカツメガエル

(*Xenopus laevis*) を用いて、AM5 遺伝子の局在と機能を明らかにすることを目的とした。

2 種のツメガエルにおいて AM5 遺伝子 (*am5*) のコード領域の配列を決定し、リアルタイム PCR によって成体の各組織における mRNA の発現分布を調べたところ、脾臓において高い発現がみられた。また、ネットアイツメガエルの胚を用いた *in situ* hybridization の結果、*am5* が腹部血島に発現することが明らかとなった。成体の脾臓および胚の腹部血島は、血球細胞が多く集まる組織である。さらに成体の血液においても *am5* の発現がみられたことから、血球における発現をより詳細に解析した。

ネットアイツメガエルの血液を密度勾配法によって赤血球群と白血球群に分画し、*am5* の発現量を比較したところ、*am5* は赤血球群よりも白血球群でより高発現する傾向がみられた。また、アフリカツメガエルの組織における AM5 抗体を用いた免疫組織化学法でも、白血球に免疫陽性反応が観察された。これらの結果から、*am5* は白血球の分化や産生に関与することが示唆された。

白血球に発現する *am5* が免疫に関与する可能性を検証するため、炎症反応を誘導した際の *am5* の応答について解析した。炎症性サイトカインの分泌を促す炎症誘発剤であるリポ多糖 (Lipopolysaccharide, LPS) をネットアイツメガエルに投与し、4 時間後および 24 時間後に組織を採取して遺伝子発現を解析した。その結果、LPS 投与後 4 時間の群において、脾臓、肝臓および肺で有意に *am5* の発現量が増加した。同時に炎症性サイトカイン *il-6* の発現も増加していたことから、*am5* は炎症反応時の自然免疫に関与することが示唆された。

一般講演 7

GONAD 法を用いた簡便ゲノム編集マウス・ラット作製法

小林朋絵、難波真澄、古家野孝行、松山 誠
重井医学研究所 分子遺伝部門

CRISPR-Cas9 に代表されるゲノム編集技術の発展により、これまで遺伝子改変が困難であった生物においてもゲノム編集が行われるようになった。ラット (*Rattus norvegicus*) は腎臓病や高血圧など様々な疾患モデル動物として古くから利用されてきた。マウスよりも個体サイズが大きく、扱いやすいなど実験的利点がある一方で、2010 年まで ES 細胞が樹立されず、ノックアウトラットの作製や遺伝的解析を行う上での欠点となっていた。ゲノム編集技術を利用した遺伝子改変ラットの作製法が発達

し、遺伝的解析の有用なモデル動物となりつつある。しかし、実際の作製過程においては、*ex vivo*での受精卵の取り扱いやマニピュレーターによるマイクロインジェクションなど非常に高度かつ専門的な技術が必要とされる。

最近私たちは、マウスにおいて受精卵を体内から取り出すことなく、簡便にゲノム編集可能な*i*GONAD法を開発した¹⁾。*i*GONAD法は卵管内にある着床前の受精卵に対して、核酸・タンパクをエレクトロポレーションによって導入し、ゲノム編集を行う方法である。さらに、*i*GONAD法を応用・発展させ、新たな遺伝子改変ラット作製法*r*GONAD法を開発した²⁾。本発表では、*r*GONAD法を用いた遺伝子改変マウス・ラットの作製法および、この作製法を利用した新規疾患モデルラットについて紹介したい。

文献

1) Ohtsuka *M et al.*, *Genome Biol.*, 2018

2) Kobayashi T *et al.*, *BMC Biotechnol.*, 2018

特別講演

色素細胞系—生命機能発現機構解明の1モデルシステム

山本 博章

長浜バイオ大学 バイオサイエンス学部

哺乳動物は発生学的に 2 系譜のメラニン色素細胞をもつ。一方は、発生中の脳に由来する網膜色素上皮細胞であり、視覚機能に必須である。他方は、脊椎動物特異的に形成される神経冠(堤)に由来し、高い移動能をもって皮膚など様々な組織や器官に定着するメラノサイトである。我々はこのメラノサイトの機能に興味を持ってきた。

皮膚に定着すれば、メラノサイトはそのメラニン色素合成能で皮膚色発現や紫外線防御に深く関わることはよく知られている。それでは皮膚以外ではどのような組織・器官に分布し、彼らはそこで何をしているのであろうか？強い光にさらされることのない環境において、例えば、内耳や心臓に棲息するメラノサイトに特別な機能はあるのだろうか？またそのような場所でも当該細胞のアイコン的な性質であるメラニン合成能は役立っているのだろうか？

この疑問を解く端緒として、メラノサイトを発生させることが出来ないマウス変異体を用いた解析を始めたのはもうしばらく前になる。小眼球症遺伝子 *Mitf* (*Microphthalmia-associated transcription factor*)は、塩基性領域-ヘリックス・ループ・ヘリックス-ロイシ

ンジッパー (bHLH-LZ) 構造を持つ転写因子をコードする。数多く記載されたアレルの表現型から、当該遺伝子は、2 系譜のメラニン色素細胞すべての発生に必須の遺伝子であることがわかっている。中でも *bw* (black-eyed white) と呼ばれる潜性(劣性)のアレルである *Mitf^{mi-bw}* のホモ接合体は、網膜色素上皮の発生に支障はないものの、メラノサイトを発生できなくなる。今回は、この黒眼白毛色マウス変異体が示す表現型の解析について主に紹介させていただきたい。

内耳においてもメラノサイトを欠損する *Mitf^{mi-bw/mi-bw}* マウス変異体は難聴である。内耳メラノサイトが聴覚に関与することは、当該細胞が発現する K⁺ channel (Kcnj10) が蝸牛内電位の維持に必須との説明にとどめを刺されているように思われるが、当該細胞の機能は果たしてそれだけであろうか？我々は、この内耳メラノサイトに *Gsta4* (glutathione S-transferase alpha 4) の特異的で高い発現を見出した。*Gsta4* はグルタチオンと異物 (xenobiotics) の結合を触媒し、「解毒酵素」として機能することがよく知られており、たとえば、脂質の過酸化で生じる 4-HNE (4-hydroxynonenal) をグルタチオンと結合させて細胞から除外する際に機能し、結果的に酸化ストレスを緩和する。

遺伝学的な解析結果は、聴覚にメラノサイトは必須であるが、メラニン合成は必須とは言えないことを示している。なぜならメラニン合成の鍵酵素である *Tyrosinase* の活性を欠損するアルビノマウス(メラノサイトは分化する)は聴覚をもつからである。しかしながら、雑音を聞かせたげっ歯類の内耳に高いメラニン合成を観察した報告や *Gsta4* の高い発現、さらには、表皮における炎症にตอบสนองして通常はメラニン合成の亢進が観察されること、等を考慮すると、生態学的ストレスにตอบสนองするメラノサイトとメラニン合成能の進化的意義の全体像を理解するにはまだ時間が必要である。

ところで、視覚に必須の網膜色素上皮の外側に形成される脈絡膜ではよく発達した血管網が観察される。その血管をびっしりと覆うように位置するのが脈絡膜メラノサイトである。先述のマウス変異体は、この組織のメラノサイトも欠損するので、組織構造を観察してみたところ、どういうわけか血管がひしゃげているように見える。成体におけるこの領域の脈管系は、眼球への養分補給等、眼の恒常性維持に重要な役割を担っている。おもに組織化学的な解析結果ではあるが、この領域に生息するメラノサイ

＜高脂肪食摂取にともなう腸内細菌叢の変化は SIgA 結合量と相関関係にある＞

これまでの報告と同様に、高脂肪食の摂取により腸内細菌叢構成は大きく変化し、Firmicutes 門に属する *Clostridiaceae*、*Mogibacteriaceae*、*Turicibacteraceae* が有意に増加する一方で、Bacteroidetes 門に属する S24-7 が有意に減少していた。また、腸内細菌の代謝産物の指標である盲腸内容物中の酢酸および酪酸濃度は高脂肪食摂取群で有意に減少した。SIgA 結合量と各菌群の占有率および短鎖脂肪酸濃度の相関関係について Pearson の相関分析により検討したところ、*Clostridiaceae*、*Mogibacteriaceae*、*Turicibacteraceae*、*Bifidobacteriaceae* の占有率は SIgA 結合量と有意な負の相関を、*Desulfovibrionaceae* の占有率および酢酸・酪酸濃度は SIgA 結合量と有意な正の相関を示した。これらの結果から、SIgA の腸内細菌への結合活性は各菌群の占有率の増減や代謝産物の生成に影響を及ぼしていることが示唆された。

特別講演 2

ヒト受精胚のタイムラプス観察から知り得た現象

大月 純子

岡山大学 生殖補助医療技術教育研究センター 准教授

岡山大学 環境生命科学研究科（農学）准教授（兼任）

岡山大学 リプロダクションセンター 副センター長（兼任）

近年、ヒト生殖補助医療においてインキュベーターと一体型の連続経時的観察（タイムラプス）システムが開発され広く用いられるようになってきた。これまでの点観察では知り得ることが出来なかったヒト初期胚発生過程に起こる様々な経時的変化が明らかになり、胚評価および良好胚選別の一助として臨床応用されつつある。本講演では、我々が今までに行ってきたタイムラプス解析によって知り得た以下の項目について述べる。

1. ヒト減数分裂時の染色体凝集期間 (AC-phase: aggregated chromosome phase)

ヒト生殖医療の分野では第一極体放出＝MII 期であると定義され、顕微授精は第一極体放出を確認することのみにより行われていた。しかしながら、ヒトでは第一減数分裂開始後の卵核崩壊 (GVBD) から MI の紡錘体形成までの間に染色体が凝集している期間 (AC-phase) があり、この AC-phase は第一極体放出開始後

の TI-MII 間にもあることが判明した (Otsuki et al., RBMOnline 2007)。本発見により、MII 期紡錘体形成確認後に顕微授精を行うことが重要となり、受精率向上へ寄与した。

2. 出産に至る胚選別法

マウス雄性前核は雌性前核より大きいことが知られているが、ヒトにおいて出産に至る胚の雄性前核と雌性前核サイズ差は経時的に縮まり核膜消失直前にはほぼ同サイズになることが判明し (Otsuki J. et al., RMB. 2017)、新たな胚選別法確立の一助となった。

3. ヒト一絨毛膜二羊膜性双胎となる胚の特徴

一卵性一絨毛膜二羊膜双胎 (MD 双胎) は ART で起こる率が高いことが報告されている。胚盤胞内細胞塊 (ICM) に注目したタイムラプス解析を行い、ICM 細胞間結合のゆるみが一卵性 MD 双胎発生頻度を上げる一因である可能性が示唆された (Otsuki J. et al., F&S 2016)。

4. ヒト卵の形態異常（滑面小胞体凝集塊：sERC）と細胞分裂失敗の関係

sERC はヒト卵子に出現する異常形態の一つであり、sERC(+)卵由来胚の移植による異常児の出産と妊娠率低下が報告されている一方、健常児を得ることができ、sERC(+)卵由来胚の移植は議論の分かれるところである。タイムラプス解析において sERC(+)卵では受精後の第二減数分裂、胚発育時の細胞分裂失敗頻度が有意に高いことが判明し、sERC(+)卵由来胚移植へ更なる警笛を鳴らした (Otsuki et al., JARG. 2018)。

特別講演 3

核医学の遺伝子発現イメージング

犬伏 正幸

川崎医科大学 放射線核医学

分子生物学の分野では古くからレポーター遺伝子が *in vitro* 実験で用いられてきた。レポーター遺伝子とは発現を容易に検出できる遺伝子のことで、下村 脩先生がノーベル賞を受賞したことで有名な緑色蛍光蛋白 (Green Fluorescent Protein; GFP) の遺伝子はその代表である。GFP 蛋白は紫外線を当てると蛍光を発することから、GFP 遺伝子の発現は紫外線によって容易に検出できる。しかしながら紫外線や蛍光は生体組織内を透過する力が弱いいため、主に遺伝子や細胞レベルの実験で使用され、ヒトはもちろん動物実験で用いるにも限界がある。

一方、私は普段は放射線科の医師として核医

画されている。第75回例会は11月22日(木) 13:30～、加計学園50周年記念館ホール4階(岡山理科大学)で目加田和之先生(岡山理科大学)のお世話で特別講演・記念講演・懇親会を企画していただくことになった。

②会報第34号の発行(4月)、送付(5月)、贈呈(5月)、100頁、130部。

岡山大学学術成果リポジトリ等へのコンテンツ登録、特定非営利活動法人医学中央雑誌(医中誌)刊行会及び科学技術振興機構(JST)への贈呈。

③会報第35号の編集(2019年4月発行予定) あいさつ、記念講演要旨・特別講演要旨、寄稿、施設めぐり、賛助会員による広告の原稿依頼、募集。

④会員の拡大

⑤会員の異動(1月1日～6月28日)

入会 2名:

橋本春菜氏(岡山大学自然生命科学研究支援センター動物資源部門鹿田施設)

坂本浩隆氏(岡山大学理学部附属臨海実験所)

退会 5名:

秋山耕陽氏(岡山大学自然生命科学研究支援センター動物資源部門津島南施設)

荒川雅行氏(岡山大学自然生命科学研究支援センター動物資源部門鹿田施設)

上山和貴氏(岡山大学自然生命科学研究支援センター動物資源部門鹿田施設)

秋田昌彦氏(徳島文理大学薬学部)

高橋 徹氏(福岡女子大学人間環境学部)

⑥研究会ホームページの再構築

システムの都合により、本研究会の従来のホームページは2018年4月に公開終了となり、新アドレスにて公開を開始した。

⑦次期役員の選任(役員の任期:2019～2020年)と事務局の移転

会則 第6条(役員)・第7条(役員の選任) 第9条(役員の任期)

事務局

〒700-8558 岡山市北区鹿田町2-5-1

岡山大学自然生命科学研究支援センター

動物資源部門鹿田施設

矢田範夫 TEL:086-235-7446、FAX:- 235-7433

E-mail:yata-n@md.okayama-u.ac.jp

<連絡先>

動物資源部門津島南施設

佐藤勝紀

TEL:086-251-8382(津島南施設)

E-mail:ksato@cc.okayama-u.ac.jp

⑧今後も学生・院生・若手の研究者・技術者が研究発表できる機会を作る。

⑨近隣大学・中四国動物実験施設、地区研究会などとの連携協力、情報交換を図る。

⑩理事会・常務理事会の開催(各2回)

常務理事会 5月10日、10月予定

理事会 6月29日、11月22日予定

⑨その他

4. 平成30(2018)年度の会計収支中間報告

1月1日～6月26日までの会計収支中間報告は収入の部として前年度繰越金483,641円、会費(17人27口)27,000円、賛助会費(6社)180,000円、寄付金0円、郵便貯金利子0円、収入総額は690,641円となり、一方、支出の部として、印刷費(第34会報)15,915円、通信費9,758円、第75回例会謝金0円・補助0円、第76回例会謝金0円・補助0円、雑費5,896円、支出総額175,569円で、残高は515,072円である。なお、雑費の内訳は振替手数料(5社)550円、収入印紙(200円×7)1,400円、ハブ・LANケーブル3,996円である。

5. 平成31(2019)年度の活動計画

①研究会例会の開催(2回)

○第77回研究会例会(会員持ち回り会場)

世話役: 樺木勝巳・矢田範夫(岡山大学自然生命科学研究支援センター動物資源部門鹿田施設)

共催: 岡山大学自然生命科学研究支援センター動物資源部門

会場: 岡山大学鹿田地区・医療系キャンパス内Jホール

日時: 2019年6月28日(金) 13:30～17:30

企画: 一般講演6～7題、記念講演1題予定 [懇親会: 18:00～19:40]

○第76回研究会例会(岡山理科大学)

世話役: 目加田和之先生(岡山理科大学)

会場: 加計学園50周年記念館ホール4階(岡山理科大学)

日時: 11月中旬～12月上旬(金)

企画: 特別講演、記念講演、懇親会予定

②会報第35号の発行(4月予定)、送付、贈呈

③会員の拡大

④ホームページの維持・管理

⑤学生・院生・若手研究者・技術者が発表できる機会を作る。

⑥近隣大学・中四国地区動物実験施設・地区研究会などとの連携協力、情報交換を図る。

⑦理事会・常務理事会の開催(各2回)

⑧その他

「第53回日本実験動物技術者協会総会 in 松山」の協力

2019年10月24日(木)～26日(土)

松山市総合コミュニティセンター

理 事

工藤季之（就実大学・薬学部・薬学科・准教授）
 国枝哲夫（岡山大・大学院環境生命科学研究科・動物遺伝学・教授）
 紅林淳一（川崎医科大・中央研究センター・医用生物研究ユニット・ユニット長）
 嶋村三智也（㈱クラレ・くらしき研究センター・構造・物性研究所・主管）
 竹内 栄（岡山大・大学院自然科学研究科・生体統御学分野・教授）
 松山 誠（重井医学研究所・分子遺伝部門・室長）
 山下光治（㈱エイチ・エス・ピー・取締役・研究開発部長）
 山下広美（岡山県立大・保健福祉学部・栄養学科・教授）

常務理事

安藤元紀（岡山大・大学院教育学研究科・細胞生理学研究室・教授）
 小野朋子（㈱エイチ・エス・ピー・研究開発部・研究員）
 杉本幸雄（岡山大・大学院医歯薬学総合研究科・国際共同創薬基盤センター・准教授）
 鶴田剛司（岡山大・大学院環境生命科学研究科・動物栄養学・准教授）
 内藤一郎（今治明德短期大学・ライフデザイン学科・教授）
 古本佳代（倉敷芸術科学大・生命科学部・生命動物科学科・准教授）
 三上崇徳（川崎医科大・中央研究部・中央研究センター・技術員）
 目加田和之（岡山理科大・理学部・動物学科・准教授）
 矢田範夫（岡山大・自然生命科学研究支援センター・動物資源部門・技術専門職員）
 若井拓哉（岡山大・大学院環境生命科学研究科・動物生殖細胞工学・准教授）

監 事

河田哲典（岡山大・大学院教育学研究科・家政教育講座・教授）
 林 泰資（ノートルダム清心女子大・大学院人間生活学研究科・教授）

事務局

〒700-8558 岡山市北区鹿田 2-5-1
 岡山大学・自然生命科学研究支援センター・動物資源部門鹿田施設

矢田範夫 TEL:086-235-7446,
 E-mail: yata-n@md.okayama-u.ac.jp

国枝会長から上記の次期役員（案）と事務局の移転が提案され、承認された。

4. 平成 31 (2019) 年度の活動計画

1) 研究会例会の開催

○第 77 回研究会例会（会員持ち回り会場）
 共催：岡山大学自然生命科学研究支援センター動物資源部門鹿田施設
 世話役：樺木勝巳先生・矢田範夫氏（岡山大・自然生命科学研究支援センター・動物資源部門）

日時：6 月 28 日（金）13:30～17:30
 [懇親会:18:00～19:40]

会場：岡山大学鹿田地区・医療系キャンパス内 J ホール

企画：一般講演 6～7 題・特別講演 1 題等

○第 78 回研究会例会

世話役：目加田和之先生（岡山理科大学・理学部）

日時：11 月中・下旬（金）13:30～

会場：加計学園 50 周年記念館ホール 4 階（予定）

企画：特別講演・記念講演等・懇親会（予定）

2) 研究会報第 35 号の発行 4 月、送付・贈呈、第 31 号～第 35 号の製本 5 月

あいさつ、特別講演要旨、寄稿、施設めぐり、賛助会員による広告の原稿の作成依頼と確認、参考資料、研究会だより、会員名簿、組織・会則などの原稿は事務局が作成。製本冊子は国会図書館、岡山大学中央図書館に寄贈。

3) 講習会（岡山大学自然生命科学研究支援センター動物資源部門との共催）の開催

4) 会員の拡大

5) 研究会ホームページの維持・管理の継続

6) 学生・院生・若手の研究者・技術者が研究発表できる機会を作る。

7) 近隣大学・中四国地区動物実験施設・地区研究会などとの連携協力、情報交換を図る。

8) 『第 53 回日本実験動物技術者協会総会 in 松山』への協力

日時：2019 年 10 月 24 日（木）～26 日（土）

会場：松山市総合コミュニティセンター（愛媛県松山市湊町 7-5）

大会長 矢田範夫氏、 実行委員長 柳原裕太氏、 事務局長 三上崇徳氏

9) 理事会・常務理事会の開催（各 2 回）

10) その他

第 76 回例会以降の活動報告

第 75 回例会の特別講演の講師、山本博章先生（長浜バイオ大学）及び第 76 回例会の特別講演の講師、鶴田剛司先生（岡山大学）・大月純子先生（岡山大学生殖補助医療技術教育研究セン

ター）・犬伏正幸先生(川崎医科大学)並びに施設めぐりの執筆者、佐加良英治先生(兵庫医科大学)に講演要旨の投稿をお願いし、会員にも寄稿いただくよう依頼した。

参考資料「地区研究会の活動報告」の作成のために、HPにまだ掲載されていない平成30年度の活動について地区研究会の事務局に問合せを行った。

第76回例会の開催状況については本研究会のHPに掲載されている。

今年1月に入って、津島郵便局において、事務局並びに会計に関する引継ぎ業務の手続きを行った。

会員の異動として、昨年12月14日に小林謙一先生(ノートルダム清心女子大学人間生活学部食品栄養学科)が入会された。一方、同月に愛甲博美先生(前岡山理科大学理学部)が退会された。今年に入って、小野朋子さん(榊エイチ・エス・ピー)、嶋 雄一先生(川崎医科大学解剖学教室)が入会された。一方、4月に入って、高山 修先生(岡山大学生殖補助医療技術教育研究センター)と古本佳代先生(倉敷芸術科学大学生命科学部)が転勤のため、退会された。古本先生から常務理事の辞退のお申し出があり、了承された。

第76回例会以降の会計報告

平成30(2018)年度の会計収支中間報告に変更のあった項目と金額のみを下記に記す。収入額は会費(41人63口)63,000円、収入総額は823,706円、一方、支出額は通信費27,004円、第76回例会謝金10,000円、補助60,000円、支出総額は328,205円となり、残額は495,501円となった。前年度より11,860円多く繰り越すことになった。

平成30(2018)年度の会計収支報告(1月1日～12月31日)は、平成31(2019)年1月16日(水)に監事の河田哲典先生・林 泰資先生によって会計監査が行われた。