

第28回東北動物実験研究会

講演要旨集

日時：平成29年11月17日（金）13:30～17:30

場所：東北大学医学部開設百周年記念ホール『星陵オーデトリウム』



主催：東北動物実験研究会

共催：日本実験動物技術者協会奥羽・東北支部

後援：東北大学

主管：東北大学大学院医学系研究科附属動物実験施設

第28回東北動物実験研究会プログラム

(敬称略)

日時：平成29年11月17日(金) 13:30~17:30

場所：東北大学医学部開設百周年記念ホール(星陵オーデトリウム)

〒980-8575 仙台市青葉区星陵町2-1 Tel: 022-717-8175

- | | |
|------------------------------------|-------------|
| 1. 役員会(星陵会館2階 小会議室1) | 12:30~13:30 |
| 2. 総会(星陵会館2階 星陵オーデトリウム) | 13:30~14:00 |
| 3. 研究会(星陵会館2階 星陵オーデトリウム) | 14:05~17:30 |
| 1) 開会の辞 | 14:05~14:10 |
| 2) 講演会(第28回東北動物実験研究会「病態モデル医学セミナー」) | |

講演Ⅰ 14:10~15:00

座長：三好 一郎(東北大学大学院医学系研究科附属動物実験施設)

「ゲノミクスの最近の流れ-動物実験に如何に使用するか-」

北村 浩(酪農学園大学獣医学群獣医学類獣医生理学ユニット)

講演Ⅱ(日本実験動物技術者協会第397回本部共催講演会) 15:00~15:50

座長：三好 一郎(東北大学大学院医学系研究科附属動物実験施設)

「CRISPR/Cas システムを用いた効率的遺伝子改変マウスの作製とその応用」

岡村 匡史(国立国際医療研究センター研究所動物実験施設)

休憩 15:50~16:05

講演Ⅲ 16:05~16:55

座長：原田 伸彦(東北大学大学院医学系研究科附属動物実験施設)

「これまでの味覚研究の進歩について ~味覚はどこまで解明されつつあるか~」

石田 雄介(東北医科薬科大学医学部解剖学教室)

情報提供

16:55～17:25

座長：原田 伸彦（東北大学大学院医学系研究科附属動物実験施設）

「精管結紮動物を用いない方法により作製した，

マウス（IVCS系），ラット（Wistar-Imamichi系）の偽妊娠動物の提供」

安部 寿幸（一般財団法人動物繁殖研究所）

3) 閉会の辞

17:25～17:30

4. 懇親会（東北動物実験研究会、日本実験動物技術者協会奥羽・東北支部合同）

日時：平成29年11月17日（金）18:00～20:00

場所：Di Verde 八幡

〒980-0871 宮城県仙台市青葉区八幡3-1-50

電話 050-3466-2549

会費：3,000円

要 旨

講演 I

「ゲノミクスの最近の流れ-動物実験に如何に使用するか-」

酪農学園大学獣医学群獣医学類獣医生理学ユニット

北村 浩

ゲノム(genome)とは2万以上もある遺伝子(gene)を総体としてとらえた概念であり、ゲノミクス(genomics)とはゲノムを解析する研究分野やその手法を指す。研究の手法には仮説を立てそれを検証するために実験をデザインする仮説主導型のアプローチ(hypothesis-driven study)と、網羅的に集積されたデータを客観的に俯瞰することで事実を導くデータ主導型のアプローチ(data-driven study)があるが、ゲノミクスはどちらかと言えば後者の立場に立っている。ゲノミクスにはゲノムの構造、即ち遺伝子の位置やDNA配列を調べる構造ゲノミクス(structural genomics)と、ゲノムの発現プロファイルを明らかにし、生体機能への影響を調べる機能ゲノミクス(functional genomics)があるが、共に実験動物分野とのつながりが深い。

実験動物分野において構造ゲノミクスは、化学物質や放射線照射によるミュータジェネシスや自然交配で生じたミュータント動物の表現型の原因となる遺伝子変異を検出する手法として用いられてきた。また構造ゲノミクスは、CRISPR/Cas9法によって新たな作製されるマウスモデルの評価にも必要である。というのは、CRISPR/Cas9法では目的としない遺伝子領域で編集が起こるというオフターゲット効果がしばしば問題となるからである。オフターゲット効果を否定するためには全ゲノム配列を確認するしか方法は無い。この高いハードルを従来のDNAシーケンス解読技術ではコスト面で越えるのが難しかったが、次々に世代が進むDNAシーケンサー技術の発展により、検体ごとの全ゲノムの構造解析(personal genomics)がラボ単位で運用可能な時代が近付いている。

動物福祉の観点から、3Rに則り、代替手段でアセスメントすることが望まれる。近年発達が目覚ましいマイクロ流路系やオルガノイドモデルを駆使した*in vitro*モデルはより生体内の反応に近いデータの取得を可能にしたが、まだまだ完全に代替するには至っていない。故に動物実験は疾患の病理の理解を進め、治療法の効果を評価するうえで依然として必要不可欠なアプローチである。3Rの観点から使用動物数を削減するためには、解析手法の洗練化も重要である。特に限られた個体から網羅的にかつ客観的な情報を得る機能ゲノミクスは動物福祉の観点からも推奨されるアプローチと言える。機能ゲノミクスの代表的な手法であるマイクロアレイを用いた網羅的なmRNA発現解析(トランスクリプトミクス)は、遺伝子改変動物の表現型や薬剤の作用の評価などに膨大な成果を挙げた。想定しなかった生体反応を明らかにし、その分子メカニズムの解明につながった例は数限りない。次世代シーケンサーによるmRNAの発現解析(RNAseq解析)も、解析コスト、正確性、処理速度、定量性などの面で進化を続けている。

本講演では、我々がマイクロアレイ法やビーズアレイ法を用いて得てきた成果を例に、ゲノミクスのこれまでとこれからの流れを概説する。

CRISPR/Cas システムを用いた効率的遺伝子改変マウスの作製とその応用

国立国際医療研究センター研究所 動物実験施設

岡村 匡史

遺伝子改変マウスは、遺伝子の機能解析および疾患モデル動物の開発等に、必要不可欠な研究ツールである。しかし、従来の ES 細胞を用いた方法は、高い生殖系列移行 (germline transmission) 効率を有する ES 細胞の維持に高い技術とコストが必要であり、高効率に遺伝子改変マウスを作製できる機関は限られていた。近年開発された、ZFN、TALEN および CRISPR/Cas システムなどのゲノム編集技術は、これまでの ES 細胞を用いた遺伝子改変技術よりも迅速・簡便かつ高効率にゲノムに変異を導入することができ、特に、CRISPR/Cas システムはコンストラクト作製の容易さと高い切断効率から新たなゲノム編集ツールとして急速に普及している。CRISPR/Cas システムが優れている点は、受精卵に遺伝子変異を導入する方法が複数あるため、各機関の設備および技術にあった方法を選択できることである。Cas9 mRNA と sgRNA をマウス受精卵前核あるいは細胞質へ顕微注入する方法、あるいは両者を同時に発現するプラスミドを、環状のままマウス受精卵前核へ顕微注入する方法を選択できる。また、マイクロマニピュレーターを用いた受精卵への遺伝子導入技術がない機関は、エレクトロポレーション法 (TAKE 法) による遺伝子導入、さらに最近は、化学合成した crRNA/tracrRNA およびリコンビナント Cas9 タンパク質を組み合わせることで、さらに高効率に遺伝子変異を導入することが可能となっている。

また、前核期受精卵の細胞質に顕微注入することで、C57BL/6、BALB/c、NOD、FBV および DBA/1 など様々な系統で、高効率に遺伝子変異を導入することができ、系統差を利用した修飾遺伝子の探索も容易となった。さらに、高効率に SNP、loxP あるいはレポーター遺伝子を導入することも可能である。現在、ゲノム編集技術は、標準的な遺伝子改変マウス作製法となっていることから、具体的な例を挙げながらその可能性について紹介したい。

講演Ⅲ

これまでの味覚研究の進歩について ～味覚はどこまで解明されつつあるか～

東北医科薬科大学医学部解剖学

石田 雄介

味覚は化学物質により惹起される感覚であることから化学感覚に分類される。他に化学感覚には例えば揮発性の化学物質で引き起こされる嗅覚があるが、味覚の特徴の1つとしては味覚を惹起する物質＝味物質の濃度が非常に高いことが挙げられると思われる。食事での味付けが一般的な生物学実験系で使用される濃度よりもずっと高いことから生理学的に矛盾しないのである。表現を変えると味覚の実験系では高濃度の刺激が当然のように認められている、と言えるかもしれない。

味覚に関与する神経は主に、鼓索神経（顔面神経）、舌咽神経、迷走神経となっており、舌や喉の限られた領域だけで12ある脳神経のうちの3つを使っている。味覚ではないが歯ごたえ等も大事ということで考えれば三叉神経も加わり、脳神経の3分の1に相当する4つの脳神経が食べる事に貢献していることになる。食べなければ生命を維持出来ないので、このように多くの神経を動員することは理に適っていると言える。

その一方で例えば旅行の場合、旅先のグルメは外せない所であろう。また入院し寝たきりになっても、その家族はせめて少しでも好きな物を患者に食べさせてあげたいと思うことが多い。さらにお祝い等の儀式でも多くの場合美味しい食べ物が登場し、これに期待し人々は参加する所があるであろう。

このように現在では味覚は生命を維持するための食物の識別だけでなく、もっと贅沢な美食までを受け持っていると考えられることから、私は重要な感覚であると思っている。

味覚には、甘味・酸味・苦味・塩味・うま味の5基本味がある。

1998年に初めて酸味受容体が報告されて以降、味覚の分子生物学的な研究が盛んになった。これまでに前出の5基本味の受容体が明らかになっているだけでなく、副味覚（この名はまだ浸透していないと思われるが時に使われることがある）である辛味や金属（イオン）の味まで解明されてきている。

発表者はこの味覚が解明されていく流れの真っ只中にいて、愚かで不器用でも懸命に実験をやってきたつもりである。

もちろん動物を用いた実験についてはこれまで所属した各大学の動物実験委員会で承認を受けており、生命倫理を重んじ法律・指針や学内の動物取り扱い規約に従って実施している。さらに動物実験委員会から頂けた助言に従って、真摯に慎重に生命の尊厳を守りつつ検討を行っている。

一所懸命に実験をしてきたが、望んだわけではなく 結果としてこれまでずっと地下活動をしてきた。味覚受容体のクローニングでも、*in vivo* 神経電気生理実験でも後塵を拝して来た。それだけでなくやっとの思いで得られた実験結果の解釈をめぐって 正しく愚直に考えてむしろ停滞していた。

本発表では そのような多くの成功者には必要のない失敗談を、もしかしたら現在 行き詰まっている人には役に立つかもしれない話をお伝えしたいと思っている。そして発表者の悪戦苦闘を聴いて下さった方々の笑いを誘い、そうすることで明日への気力が充実することをサポート出来れば発表者冥利に尽きると考えている。

情報提供

物理的刺激による方法で誘起させた偽妊娠 Wistar-Imamichi 系ラットについて

一般財団法人動物繁殖研究所

安部 寿幸

偽妊娠動物は、子宮切断術によらない受精卵移植による微生物クリーニング方法として、また、多数の同日生まれの個体を得るための方法として、さらには、遺伝子改変動物作製のレシピエントとして多用されている。

通常、偽妊娠動物の作成は、発情雌に精管結紮雄を同居させる方法で行われている。しかし、この方法だと、精管結紮雄の準備や飼育管理さらには飼育スペース面などで、手間やコストがかかる。また、多数の偽妊娠動物が必要な時には、予め、多くの精管結紮雄を作成しておく必要がある。

そこで、これらの問題を解消するために、当研究所で維持・生産している Wistar-Imamichi 系ラットの 4 日性周期が安定していることや発情前期の夕刻に、明確な発情兆候を示すこと、また、温和しく取扱い易いことなどの特性を活かし、精管結紮雄を用いない方法で偽妊娠動物の作成を試みた。

その結果、確実かつ安定的に偽妊娠を誘起させることに成功した。偽妊娠動物については、既に提供しており、高評価を得ている。

今回は、物理的刺激によって偽妊娠を誘起させた Wistar-Imamichi 系ラットについて紹介する。

第28回東北動物実験研究会実行委員会

研究会会長 三好 一郎（東北大学大学院医学系研究科附属動物実験施設）
実行委員長 原田 伸彦（東北大学大学院医学系研究科附属動物実験施設）
事務局長 小関 陽子（東北大学大学院医学系研究科附属動物実験施設）
委 員 須藤 知恵子（東北大学大学院医学系研究科附属動物実験施設）
末田 輝子（東北大学大学院医学系研究科附属動物実験施設）
大竹 誠一（東北大学大学院医学系研究科附属動物実験施設）
木伏 智美（東北大学大学院医学系研究科附属動物実験施設）
西尾 啓輔（東北大学大学院医学系研究科附属動物実験施設）
森川 正喜（東北大学大学院医学系研究科附属動物実験施設）

【謝辞】

第28回東北動物実験研究会開催にあたり、下記企業様よりご支援賜りました。ここに厚く御礼を申し上げます。

【ご協賛企業】

株式会社朝日工業社 東北支店
株式会社ウドノ医機
有限会社熊谷重安商店
株式会社シバタインテック
株式会社ジェー・エー・シー
株式会社セイミ
テクニプラスト・ジャパン株式会社
東北化学薬品株式会社 山形支店
東洋熱工業株式会社
株式会社夏目製作所
株式会社南部医理科
日本エスエルシー株式会社
日本クレア株式会社
日本チャールス・リバー株式会社
日本農産工業株式会社 ライフテック部
ハムリー株式会社

(五十音順、敬称略)

【広告掲載企業】

有限会社熊谷重安商店
株式会社シバタインテック
株式会社ジェー・エー・シー
テクノプラスト・ジャパン株式会社
東北化学薬品株式会社 山形支店
東洋熱工業株式会社
株式会社夏日製作所
日本エスエルシー株式会社
日本クレア株式会社
日本チャールス・リバー株式会社
ハムリー株式会社

(五十音順、敬称略)