

実験動物セミナー第26回研究成果発表会抄録

Abstract of the 26th Seminar of Laboratory Animal Center

日時：平成27年12月17日（木）14：00～17：00

場所：山形大学医学部 山形医学交流会館 大会議室

【一般講演 1】

促進性グルコース輸送体GLUT1阻害は癌幹細胞の自己複製能と腫瘍創始能を抑制する

岡田雅司*, 澁谷慶太*, 鈴木修平**, 清野学***,
武田弘幸**, 北中千史* (*山形大学医学部腫瘍分子医学講座,
山形大学医学部臨床腫瘍学講座, *山形大学医学部産婦人科学
講座)

癌の特質の一つとしてグルコース代謝の亢進が認められている。近年の研究では、癌幹細胞は非癌幹細胞と比較してグルコース代謝がさらに亢進しており、また、癌幹細胞が解糖系によって維持されていることが明らかとなりつつある。しかしながら、癌幹細胞の自己複製能および腫瘍創始能の維持・制御に対してグルコース代謝の役割は未だ明らかにはされていない。加えて、グルコース代謝関連因子群を含む癌幹細胞の制御因子についてもいまだ不明な点が多い。

このような中で我々は、膀胱癌幹細胞、卵巣癌幹細胞およびグリオーマ幹細胞を用いた実験から、促進性グルコース輸送担体の一つとして知られるGLUT1がこれらの癌幹細胞の幹細胞性維持に必須である事を明らかにした。中でも特筆すべき点はGLUT1特異的阻害剤であるWZB117が各種癌幹細胞の生存や増殖に対し影響をおよぼすことなく、自己複製能および腫瘍創始能を抑制する事を示した点である。さらに、*in vivo*においてWZB117をヌードマウスに投与することで、癌幹細胞の移植による腫瘍創始が生体に影響をおよぼすことなく抑制されることも見出した。我々が見出した知見より、GLUT1依存的グルコース代謝は癌幹細胞の幹細胞性の維持に重要な役割を果たしており、GLUT1が癌幹細胞標的治療法の標的因子となりうる可能性を示唆している。

【一般講演 2】

精子形成過程におけるレドックス因子ペルオキシレドキシシン4の機能解析

石井直樹*, 本間拓二郎*, 倉橋敏裕*, 浜島真司*, 白澤信行**,
井内良仁***, 藤井順逸* (*山形大学大学院医学系研究科生化学・分子生物学, **元)山形大学医学部解剖学第一講座, ***山口大学農学部食品機能化学)

ペルオキシレドキシシン (Prdx) ファミリーは、ペルオキシダーゼ活性を有する一群のタンパク質で、Prdx4はN末端に分泌シグナルを有して合成され、分泌・小胞体となる唯一の分子である。Prdx4はペルオキシダーゼ活性に加えて、システイン間にジスルフィド結合を導入しタンパク質の酸化的折畳みを助けるチオールオキシダーゼとしても働く。Prdx4は全身に広く発現し、特に膵臓や大腸そして精巣に高い。我々はこれまでにPrdx4遺伝子のプロモーター／第1エクソン（分泌シグナル配列をコードする）を欠く全身性欠損マウスを樹立し、その表現型を解析した。その結果、他の臓器には顕著な異常はなく、精巣の萎縮が認められた。このPrdx4欠損マウスでは野生型マウスに比較して精子数が若齢で少なく、性成熟が遅延していたが、成熟した雄マウスの生殖能はほぼ正常であった。その後の解析から、精巣に特異的な転写産物Prdx4tが発現していることが分かった。精巣特異的Prdx4tでは、シグナル配列をコードしている全身性Prdx4の第1エクソンをもち、代わりにその上流の親水性アミノ酸に富む配列をコードする第1エクソンをもち、Prdx4よりも高分子量を示す。Prdx4のプロモーター／第1エクソンを欠くことでPrdx4tの発現低下が見られ、それが性成熟の遅延に関与する可能性が考えられた。

今回我々は、性的に未成熟な3週齢から、十分に成熟した8週齢までの

野生型 (C57BL/6) およびPrdx4欠損マウスの各週齢におけるPrdx4tのタンパク質量をウェスタンブロット法により検討した。その結果、Prdx4欠損マウスでは、Prdx4tの発現は3週齢では認められず、4週齢から検出されて週を追うごとに増加した。若齢では野生型マウスの精巣に比べて発現量は少なく、週齢が進むと同レベルに達することから、精巣の成熟に相関することが明確になった。Prdx4t特異的な抗体を用いて性成熟した雄の精巣切片を免疫組織染色したところ、Prdx4tは精子への分化過程にある精子形成細胞のみに特異的に発現していた。全身型Prdx4および精巣型Prdx4tのC末端側にGFPを付加した融合タンパク質をHeLa細胞に一過性に発現させ、その局在を共焦点レーザー顕微鏡で観察すると、全身型Prdx4は主に小胞体に、Prdx4tは細胞質または核に局在することが分かった。精子形成細胞が精子に分化する過程で、核の中ではヒストンがプロタミンに置き換わり、その後プロタミンのシステインが酸化架橋される。チオールオキシダーゼ活性を有するPrdx4tが核にも局在することは、プロタミンのシステイン残基間のジスルフィド結合の形成に関与する可能性を示唆している。今後は時期特異的に精巣のPrdx4tを欠損するコンディショナルノックアウトマウスを樹立し、その可能性を検証する予定である。

【一般講演 3】

精子形成過程におけるシステントランスポーター・xCTの機能解析

浜島真司*, 本間拓二郎*, 倉橋敏裕*, 石井直樹*, 佐藤英世**,
藤井順逸* (*山形大学大学院医学系研究科生化学・分子生物学,
**新潟大学医学部保健学科生化学・分子生物学)

雄性配偶子（精子）は、高い運動能を保持しながら、体外でさらされる高酸素による酸化障害から自らを護る必要がある。哺乳類の精子は、レドックス反応を巧みに利用することで、こうした問題を克服している。精子形成過程において、核の塩基性タンパクであるヒストンがプロタミンに置換される。精巣から精巣上体に移行し成熟精子となる過程で、プロタミンのシステイン残基の間にジスルフィド結合が形成されることで、クロマチンの凝集による核の体積圧縮が運動能を高め、DNAが酸化傷害を受けやすくなる。ヒストンはシステインをごくわずかに含まないのに対し、プロタミンは多数のシステインを含むため、この置換過程には大量のシステインを必要とする。通常、細胞内のシステイン濃度は他のアミノ酸に比べ低く保たれているため、精子形成細胞は短期間に大量のシステインを確保する必要がある。

シスチン（酸化型システイン）は、アミノ酸の輸送担体であるxCTとその膜移行を助ける4F2hcのヘテロダイマーからなるシステントランスポーター・xc⁻系により、グルタミン酸との交換輸送により細胞内に取り込まれる。細胞内でシスチンはシステインに還元され、タンパク質や抗酸化物質であるグルタチオンの合成に利用される。げっ歯類においては、xCTは胸腺や脾臓などの免疫組織や脳の髄膜で強く発現している。精巣での発現も確認されているものの、xCTの生理的な機能は不明なことから、今回我々は、xCTがプロタミン合成に必要なシステインの供給を担っているとの仮説に基づいて検討を行った。

まず、性的に未成熟な3週齢から、成熟した8週齢までの野生型 (C57BL/6) およびxCT欠損マウスの各週齢における精子数を計測したところ、ともに6週齢から精子が観察されたが、xCT欠損マウスでは野生型マウスに比較して精子数は有意に少なかった。野生型マウスの精巣におけるmRNAの発現量をRT-PCRにより解析したところ、xCTならびにプロタミンは3週齢から既に発現しており、xCTについては8週齢ではさらに発現が増加していた。ペルオキシレドキシシン4 (Prdx4) は、Prdxファミリータンパク質に共通するペルオキシダーゼ活性に加えて、タンパク質の酸化

的折畳みを担うチオールオキシダーゼとしても働く。Prdx4には分泌シグナル配列をもって合成され小胞体に局在する全身型に加えて、精巣にのみ発現し分泌シグナル配列をもたないバリエーション・Prdx4tの2種類がある。我々はこれまで、全身型Prdx4の欠損マウスを作製しており、雄成獣マウスの生殖能はほぼ正常であるものの、性成熟遅延を示すことを報告した。精巣型Prdx4tは未成熟な精巣では発現しておらず、性成熟に伴って発現が増加することから、プロタミンの酸化架橋反応に関与していると推測している。そこで、野生型およびxCT欠損マウスの各週齢における精巣型Prdx4tのタンパク質量を調べたところ、いずれの遺伝子型マウスでも3週齢では検出されず、4週齢では検出されるもののxCT欠損マウスでは野生型マウスに比べて有意に低かった。

以上の結果は、xCTを欠損することで細胞内システインの供給能が低下し、それに伴いプロタミンの合成が遅れるためPrdx4tの発現も遅れ、精子形成の遅延が起こることを示唆している。

【一般講演4】

SOD1欠損マウスではシトクロームP450活性が抑制される結果チオアセトアミド誘発肝障害が軽減する

白土貴也, 本間拓二郎, 倉橋敏裕, 李在勇, 藤井順逸 (山形大学大学院医学系研究科生化学・分子生物学)

【目的】Superoxide dismutase 1 (SOD1) は、細胞質とミトコンドリア膜間腔に存在し、酸素が一電子還元を受けて最初に生じる活性酸素種のスーパーオキシドを消去する抗酸化酵素である。SOD1を欠損したマウスの肝臓では酸化ストレスが増大する結果、小胞体ストレスを伴う軽度の肝障害が惹起され、脂質合成の亢進とリポタンパク質の分泌抑制が起こり脂肪肝となる。チオアセトアミド (TAA) は肝障害を誘導し肝線維化モデルを作製する際の薬剤として頻用され、その過程には酸化ストレスが関わると考えられている。本研究では、酸化ストレスとTAA誘導性肝障害の関係を調べる目的で、SOD1欠損マウスと野生型マウスにTAAを投与して検討を行った。

【方法】10週齢以上の野生型 (C57BL/6) およびSOD1欠損雄マウスに、致死量の500 mg/kgもしくは致死には至らない200 mg/kgを腹腔内投与した。500 mg/kg TAAを投与したマウスについては、120時間まで観察して生存率を確認した。200 mg/kg TAAを投与したマウスについては、24時間後に剖検を行い、血漿中ALT値の測定と、肝臓を採取して組織学的ならびに生化学的解析を行った。ウェスタンブロット法により次のタンパク質の発現量を解析した；抗酸化酵素、肝薬物代謝酵素CYP2E1、脂肪滴表面の膜タンパクであるPerilipin 2 (PLIN2)。また野生型マウスにSOD1阻害剤テトラチオモリブデン酸アンモニウム (ATTM) を腹腔内投与した後、1時間後にTAAを500 mg/kgの濃度で投与して生存期間を観察した。

【結果】高濃度 (500 mg/kg) のTAA投与では、野生型マウスは36時間以内に全て死亡したのに対し、SOD1欠損マウスは全個体が観察期間を通して生存した。200 mg/kg TAAを投与した場合の血漿中ALTは、SOD1欠損マウスでは野生型マウスと比較して低値であった。また野生型マウスではTAA投与によりSOD1の発現量が減少したが、ほかの抗酸化酵素についてはSOD1欠損および野生型マウスのいずれでも変化はなかった。同様に、TAA投与によりCYP2E1の発現量は野生型マウスにおいて減少したが、SOD1欠損マウスでは投与前後における変化が認められなかった。野生型とSOD1欠損マウスのいずれにおいてもPLIN2が増加したが、SOD1欠損マウスで顕著であった。野生型マウスにSOD1阻害剤を前投与すると、SOD1阻害剤非投与群に比べて致死量のTAA投与によっても延命が認められた。

【考察】酸化ストレス状態であるSOD1欠損マウスが、野生型マウスに比べてTAAによる肝障害に対して耐性であった。SOD1欠損マウスでは肝薬物代謝酵素CYP2E1活性が低下しているために、アセトアミノフェン肝障害に対して耐性であることが報告されていることから、今回肝障害誘発剤として用いたTAAについてもCYP2E1活性の低下が原因と考えられる。

TAAによる脂肪蓄積の分子機構と合わせて今後の検討を予定している。

【一般講演5】

Prdx4 and SOD1 double knockout mouse as a useful tool for exploring oxidative and ER stress-induced hepatic disorder

Ryusuke Akihara, Takujiro Homma, Toshihiro Kurahashi, Jaeyong Lee, Junichi Fujii (Department of Biochemistry and Molecular Biology, Graduate School of Medical Science, Yamagata University)

Among multiple factors, oxidative stress and endoplasmic reticulum (ER) stress are promising causes for developing steatosis and the progression of non-alcoholic steatohepatitis (NASH). It has been reported that mice deficient for superoxide dismutase 1 (SOD1), a superoxide-detoxifying enzyme, spontaneously develop steatosis. We have previously demonstrated that the coordinate action of oxidative stress and following ER stress caused by SOD1 deficiency are the underlying mechanism for lipid droplet accumulation using primary cultured hepatocytes. Meanwhile, peroxiredoxin 4 (Prdx4) works on coupling hydrogen peroxide catabolism with oxidative protein folding in ER and hence exerts protection against oxidative stress via elimination of hydrogen peroxide. In fact transgenic overexpression of human Prdx4 protects mice against the progression of NASH that is triggered by feeding a methionine- and choline-deficient (MCD) diet. In the current study, we generated Prdx4 and SOD1 double knockout (*Prdx4^{-/-} Sod1^{-/-}*) mice and examined if the combined deletion of Prdx4 and SOD1 aggravated NASH compared to single knockout. As results, spontaneous liver damage characterized by caspase-3 activation and plasma ALT elevation was evident in the developing *Prdx4^{-/-} Sod1^{-/-}* mice, which showed increased incidence of premature death before adulthood, and was effectively ameliorated by supplementing vitamin C (ascorbic acid). Then we explored nutritional factors that might ameliorate NASH using *Prdx4^{-/-} Sod1^{-/-}* mice. The double knockout mice fed with the MCD diet developed hepatic steatosis with further increase in plasma ALT. The liver damage was markedly attenuated by genistein, a soy isoflavone with antioxidant and anti-inflammatory properties. Thus, *Prdx4^{-/-} Sod1^{-/-}* mice will be a useful pathological animal model for studying NASH development and testing other potential treatments.

【一般講演6】

マウス受精卵 in vitro 低温培養系で観察される胚発生阻害に対する、ヘム合成前駆体5-アミノレブリン酸 (ALA) の防護作用

中野博*, 高橋究**, 田中徹**, 中島元夫**, 中島修* (*山形大学医学部メディカルサイエンス推進研究所遺伝子実験センター, **SBIファーマ)

不妊治療に用いる体外受精胚のミトコンドリア (Mt) 呼吸活性は、産子を得るための“品質”の指標となることが報告されており、正常な胚発生には十分なATP産生能が必要であると考えられる。好氣的呼吸におけるATP合成に与るMtの電子伝達系 (呼吸鎖) のタンパク質群のうちComplex II, III, IVおよびシトクロームcが、補欠分子として、ヘムを必要とすることから、正常な胚発生において、十分なヘムの供給は重要な因子と推定される。一方、低体温のため不妊となる場合、低温によるMt呼吸活性の低下が原因で、受精後の胚発生に異常が生じている可能性がある。そこで、Mt呼吸活性上昇を期待して、ヘム合成前駆体5-アミノレブリン酸 (ALA) を補充することにより、低温での胚発生障害が改善されるかを検証するために、我々は、マウス受精卵 in vitro 培養系において、ALA未添加、またはALA添加条件で、35℃または35.5℃で低温培養を行い、培養96時間後で

の胚盤胞への発生率を解析した。

体外受精により得られたC57/BL6受精卵を用いて、発生用培地として、mWMMを用いた場合、2細胞期を基準とした、培養96時間後での胚盤胞への発生率は、正常な培養温度の37°Cで83%であったのに対し、35.5°Cで53%、35°Cで25%へと、温度に依存して有意に低下することが観察され、本実験系で低温培養により発生障害が起こることを確認した。一方、35.5°C培養の1 μ ALA添加群では、胚盤胞への発生率は70%に、35°C培養の1 μ ALA添加群で53%に達し、ALA添加により、低温での胚盤胞への発生率が有意に上昇した。本研究により、低温でのマウス受精卵の胚発生と、類似した低温ストレスが掛かった状態、すなわち、低体温のヒト不妊症において、ALA服用により改善される可能性があることが示された。

【一般講演7】

唾液分泌低下に対するケア開発を目指したマウス唾液腺培養モデル構築における増殖因子の効果について

早坂勇人*, 野川宏幸**, 関亦正幸***, 関亦明子* (*山形大学医学部看護学科, **千葉大学大学院理学研究科, ***福島県立医科大学医学部)

【背景と目的】がん治療において、放射線治療等により唾液腺は不可逆的に障害を受けることがある。唾液腺は中程度の放射線感受性を持ち、強度変調放射線治療 (IMRT) 等により有害事象が最小限に止められたとしても、唾液分泌は治療前の40~50%にしかもどらない¹⁾、という報告がある。それにもかかわらず、唾液分泌の低下については、予防策がほとんど行われておらず対症療法が主になっている。そこで我々はがん治療、特に放射線療法による唾液分泌低下の予防や軽減を目指し、唾液腺防護剤の探索と同等を目的としたマウス唾液腺の培養モデル構築を開始した。本研究においては、マウス顎下腺上皮の体外での培養条件を検討するため、各種増殖因子の効果を観察した。

【方法】顎下腺は妊娠13日目のマウス胎児から摘出した。摘出した顎下腺から間葉組織を除去して上皮組織のみとし、増殖因子 (NRG1, TGF- α , FGF1) を加えた培地で培養した。培養初日を0日として24時間ごとに3日間形態を観察した。また、培養3日目に唾液分泌細胞のマーカー、Aquaporin5 (AQP5) を発現している細胞 (AQP5+細胞) と、幹細胞マーカー、c-Kitを発現している細胞 (c-Kit+細胞) の割合をフローサイトメーターで解析した。

【結果】NRG1, TGF- α をそれぞれ単独で添加した培地では顎下腺上皮の小葉の増殖が観察されたが、FGF1のみでは導管の伸長が観察された。次に2つの増殖因子を組み合わせたところ、NRG1+TGF- α では小葉の増殖が、FGF1を加えたNRG1+FGF1, TGF- α +FGF1では、導管と小葉の増殖が観察された。3つすべての増殖因子を組み合わせると、小葉の増殖が観察されると共に顎下腺上皮は全体に大きく成長した。これらの結果と唾液腺前駆細胞が主に介在導管周辺に局在し、分化した細胞が腺房 (小葉部分) に局在するという報告²⁾から、導管部分を伸長させたFGF1の添加では、c-Kit+細胞が増加するのではないかと予想した。結果はFGF1単独の添加では、c-Kit+細胞は1.4倍程度の増加であったが、NRG1と組み合わせる (NRG1+FGF1) ことで2.8倍に増加した。これに対し、小葉を増殖させたNRG1のみの添加では、AQP5+細胞の割合が2.7倍に増加した。

【考察とまとめ】これらの結果から、マウス顎下腺の体外培養における細胞の継代・維持にはNRG1+FGF1を組み合わせることで培養し、化合物検索時に細胞を唾液分泌細胞に分化誘導させたい時にはNRG1のみとすることで唾液腺防護剤等の検索に用いる培養モデルを構築できる可能性が本研究によって示された。

- 1) Vissink A. *et al.* (2010) *Int. J. Radiat. Oncol. Biol. Phys.*, 78, 983-991
- 2) Pringle S. *et al.* (2013) *Stem Cells*, 31, 613-619

【一般講演8】

アレルギー性接触皮膚炎におけるIL-21の働き

奈良英利*, 小松美華子**, 武田裕司*, 荒木明美*, AKHTER Narin*, 浅尾裕信* (*山形大学医学部免疫学講座, **山形大学医学部医学科)

【目的】アレルギー性接触皮膚炎は遅延型アレルギーである。その発症にはT細胞やマクロファージの活性化が関与している。インターロイキン (IL-) 21は、主に活性化ヘルパー T細胞から産生され、キラー T細胞やマクロファージを活性化する。その一方で、抗原提示細胞である樹状細胞の成熟を抑制することも知られる。このことは、IL-21が接触皮膚炎を増悪させる可能性も、改善する可能性もあることを示唆している。しかし、これまでに接触皮膚炎におけるIL-21の働きはわかっていない。そこで、IL-21 isoformトランスジェニックマウス (IL-21iso-Tg) に接触皮膚炎のマウスモデルであるcontact hypersensitivity (CHS) 反応を誘導し、IL-21のCHSへの影響を検討した。

【方法】実験には6-9週齢のBALB/cマウスを使用した。抗原にはfluorescein isothiocyanate (FITC) または2,4-dinitrofluorobenzene (DNFB) を用いた。剃毛した腹部に抗原を塗布し、翌日にも同様に抗原を塗布し感作を行った。最初の感作から5日後に耳介に抗原を塗布し、翌日に耳介の肥厚を測定後、材料を採取した。

【結果】どちらの抗原でもIL-21iso-Tgにおいて、CHSの指標である耳介の肥厚は野生型マウスよりも減弱した。それに伴い、耳介での炎症性サイトカインのレベルも低下していた。所属リンパ節の細胞数やCD69を指標としたリンパ球の活性化レベルには差がなかったが、樹状細胞の割合はIL-21iso-Tgで減少していた。またIL-21iso-Tgでは、炎症患部において、記憶T細胞の活性化に関与するinducible-skin associate lymphoid tissue (iSALT) の形成を促すCXCL2の発現が低下していた。

【考察】IL-21は樹状細胞の所属リンパ節への移行を阻害するとともに、耳介での炎症患部においてiSALTの形成を抑制し、記憶T細胞の活性化を抑制することで、CHS反応を軽減する可能性が示唆された。

【一般講演9】

肺高血圧モデルマウスにおける増殖因子Midkineの発現

木下大資, 宋戸哲郎, 渡部哲, 久保田功 (山形大学医学部内科学第一講座)

【背景】肺高血圧症は、肺血管リモデリングにより肺血管抵抗が徐々に上昇する進行性の疾患であり、根本的治療は見つかっていない。肺血管平滑筋細胞の過剰な増殖が肺血管リモデリングの主病態の一つであり、近年様々な増殖因子の関与が報告されている。Midkineはヘパリン結合性の増殖因子であり、その作用は血管形成、炎症細胞浸潤、癌細胞増殖など多岐にわたるが、肺血管リモデリングにおける機能は十分に解明されていない。

【方法・結果】C57BL/6野生型マウスを使用し、低酸素下 (FiO₂ 0.1) で4週間飼育することにより肺高血圧モデルマウスを作成した。Midkineは肺組織において、RNAレベルおよび蛋白レベルで上昇した。蛍光免疫染色では、肺血管および肺胞上皮においてMidkineの発現を認めた。次に肺血管リモデリングを評価するため、肺組織をElastica-Masson染色し、100 μ m未満の末梢血管で中膜 (内弾性板と外弾性板の間) の厚さを測定した。低酸素暴露群では有意に中膜の肥厚が増加した。肺血管リモデリングにより肺高血圧を来すと右室は肥大するため、右室肥大の指標である右室重量 (RV) と左室重量 (LV) の比 (RV/LV) を測定したところ、RV/LVは低酸素暴露群で有意に増加した。ウェスタンブロッティングでは、低酸素暴露群で細胞増殖を促進するErk1/2のリン酸化が有意に上昇しており、また増殖活性の高い平滑筋細胞マーカーであるOsteopontin、および細胞周期マーカーであるCyclin B1の有意な上昇を認めた。次に我々は肺血管平滑筋細胞を用いて、Midkineの細胞に与える効果を検証した。Midkineを肺動脈平滑筋細胞に投与することにより、Erk1/2のリン酸化は促進され、細

胞増殖分析ではMidkine投与群で有意に肺動脈平滑筋細胞の増殖を認めた。

【結論】増殖因子Midkineは肺血管リモデリングに関与している可能性が示唆された。

【一般講演10】

亜鉛鉱物の創傷治癒効果の検討

益子大樹, 山本修 (山形大学大学院理工学研究科応用生命システム分野)

【緒言】カチオン放出性セラミックス材料は、生体内で水分と接触することで生理活性金属イオンを放出し、硬組織および軟組織の再生を促進することが知られている^[1]。そこで、生理活性金属の一つでありマトリックスメタプロテアーゼ (MMPs) の補助因子として機能する亜鉛イオンに注目し、亜鉛イオンを含む亜鉛鉱物を創傷部位に適用することにより、酵素反応を介して創傷治癒を促進できると考えた。そこで本研究では、亜鉛鉱物粉末を創傷部位に塗布し、ラットを用いた*in vivo*実験により創傷治癒効果を評価した。

【実験】本研究には塩素および水酸基を含む亜鉛含有物質の粉末を用いた。この粉末を紫外線滅菌し、創傷部位に塗布することとした。亜鉛鉱物の創傷治癒効果は、以下の手順で行った。まず、麻酔下におかれたラットの腹部側に円形トレフィンバーを用いて皮膚全層欠損創を作成し、亜鉛鉱物を塗布した後に医療用創傷被覆材 (Duo active ET[®]) で保護した。これをSample群とした。一方、Control群はDuo active ET[®]のみで保護した。1および2週間経過後、再上皮化率の算出と組織染色を行い、創傷治癒効果を評価した。また、本動物実験は山形大学動物実験委員会の承認を得て行った。

【結果と考察】ラット皮膚創傷部に亜鉛鉱物を適用し、1および2週間経過後の再上皮化率をFig.1に示す。1週間後の再上皮化率は、Sample群およびControl群ともに約33%であり、2群間での有意差は認められなかった。これに対して、2週間後の再上皮化率はSample群で約77%、Control群で約40%となり、2群間で有意差が認められた。2週間後に再生した皮膚を染色した結果、Control群ではコラーゲンがランダムであったのに対して、Sample群ではコラーゲンの著しい配向性が見られた。コラーゲンの配向性は、正常皮膚に良く観察される。この結果より、亜鉛鉱物は創傷治癒に対して有効であると考えられる。

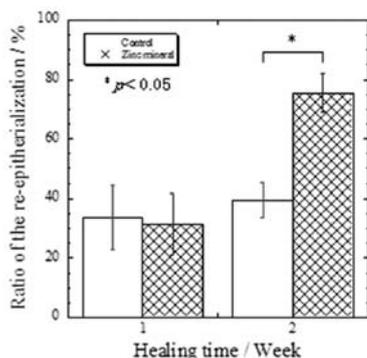


Fig.1 Re-epithelialization rate with healing time.

【参考文献】 [1] Hench, L, J. Matter. Sci; Mater. Med., 26:86(2015)

【一般講演11】

クロム修飾型インプラントの骨結合性

今井美樹, 山本修 (山形大学大学院理工学研究科応用生命システム分野)

【緒言】現在、齶蝕・歯周炎や事故等が原因で歯を喪失した患者に対し、歯科用インプラントの埋入治療が行われている。インプラントの歯根部で

あるフィクスチャーには主にチタンが用いられている。インプラント埋入後、その周囲に形成される歯槽骨は初期段階でコラーゲンの配向に規則性のない線維性骨となり、骨リモデリングによってコラーゲン線維が配向性を示すようになる。骨の有機成分の約90%はコラーゲンであり、インプラント界面における配向性コラーゲンの生成は骨結合強度の増加を導くと推定されている。そこで本研究では、チタンインプラントにコラーゲンの架橋形成を促進させる機能を持たせ、配向性のコラーゲン線維をインプラント表面に沿って形成させることで、骨とインプラントの結合力の強化を最終目的とし、コラーゲン同士を架橋形成させる役割がある生体内微量元素のクロムを修飾させたチタンインプラントを作製した。本報告では、*in vivo*で骨結合評価し、クロムによる骨結合能を明らかにした。

【材料作製と実験手順】硝酸クロム・丸水化物を濃度4.0 mol/Lの水酸化ナトリウム水溶液を加え、濃度0.05 mol/Lのヘキサヒドロキソクロム酸含有水溶液を調製した。調製した溶液にインプラント基材を60°Cで12時間浸漬を行い、洗浄・乾熱滅菌することでクロム修飾型チタンインプラント (以下CrTi) を作製した。また、チタンインプラント (以下Ti) はCrTi基材と同一の洗浄・滅菌を行い、コントロール基材として用いた。CrTiの表面の化学結合状態はX線光電子分光分析装置 (XPS) で明らかにした。骨とインプラントの結合力は、麻酔下におかれた日本白ウサギ (体重約2.0 kg) の大腿骨に2mmの孔を作成し、TiおよびCrTiを孔内に埋入した。4~12週飼育後に大腿骨を摘出した。摘出した骨を用いて骨-基材間の結合に関連する最大荷重を万能試験機 (AGS-J : SHIMAZU) より求め、産出された剪断強度を骨結合強度の指標とした。本動物実験は、山形大学動物実験委員会の承認のもとで行った。骨結合強度試験後、全ての基材の付着物は走査型電子顕微鏡 (SEM)、ラマン分光分析 (Raman) およびXPSによって調べられた。最後にインプラント周囲の骨組織をヘマトキシリン・エオジン染色し、観察した。

【結果および考察】CrTi表面には-Ti-O-Cr-(OH)₂基が存在することがXPS分析から明らかとなった。剪断強度試験の結果をFig.1に示す。全ての埋入期間において、CrTiはTiより有意な骨結合強度を示した。剪断強度試験後に骨から取り出したCrTi表面を観察した結果、埋入期間全週におけるCrTiの表面には膜状生成物が観察された。

この膜状生成物をラマン分光測定した結果、CrTi表面の膜状生成物には、コラーゲン由来のフェニルアラニン、amideI、amideIII、CH₂のピークが検出された。膜状生成物をXPSで測定したところ、PとCaに相当するピークが認められた。これに対してTi周囲には石灰化由来のリン酸塩、炭酸塩がRamanより検出された。これらの結果から、Ti周囲の骨組織と比較して、CrTi周囲の骨組織にコラーゲンとわずかな石灰化が存在し、結果としてインプラント周囲のコラーゲンの生成が骨結合性に関与していると考えられた。

クロム修飾型チタンインプラントの骨結合能を*in vivo*で評価した結果、優れた骨結合性を有することが確かめられ、臨床インプラントより高い結合を示すことがわかった。

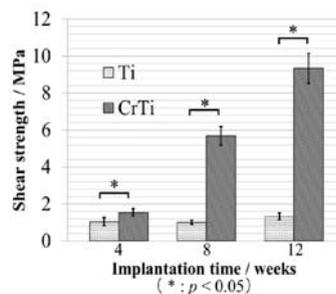


Fig.1 Implant-bone shear strength with implantation time.

【一般講演12】

慢性アルコール投与による恐怖条件づけ学習への影響

田中博, 齋藤弘毅, 佐藤健徳, 加藤夏生, 富田源, 藤原浩樹,
阿部駿, 山田隆明, 藤井聡 (山形大学医学部生理学講座)

【背景】アルコールの急性的な摂取によるアルコール性記憶障害は一般に広く知られているが、アルコールの慢性投与による影響に関しては不明な点が多い。本実験では、恐怖条件づけを用いて、記憶の記録と想起に重点を置いて検討する。条件刺激には光刺激、無条件刺激には電撃を対呈示し、消去では条件刺激のみの呈示を行い、アルコールの慢性投与が記憶にあたえる影響について検討した。

【方法】被験体はウィスター系雄性ラットを用いた。被験体の飼育環境は22±2℃、湿度50±10%、12/12時間の明暗サイクル(午前6時の点灯)で維持した。被験体は7日間、食餌と水は自由摂取状況下で飼育され、被験体は約3か月間、アルコール飼料またはコントロール飼料の食餌制限下で飼育した。

実験に先立ってすべての被験体はハンドリングを経験した。

恐怖条件づけでは、被験体は16週齢ウィスター系雄性ラットを用いた。

【結果】恐怖条件づけでは、慢性アルコール投与が記憶の記録、想起に影響を及ぼすか検討した。条件づけでは、慢性アルコール投与の有無では差が認められなかったが、試行回数が増加するごとに恐怖が獲得された。よって、アルコールの慢性投与は記憶の記録に影響しなかった。また、消去手続きでコントロールに比べ慢性アルコール投与が恐怖記憶の想起されにくいことが示された。

恐怖条件づけでは、慢性アルコール摂取が恐怖記憶の想起を悪くしたと結論した。慢性アルコール投与により恐怖記憶の想起に影響を及ぼすことが示された。

【一般講演13】

音響暴露を用いた内耳障害モデルの作成

新川智佳子, 伊藤史, 千葉真人, 久畑誠治 (山形大学医学部耳鼻咽喉・頭頸部外科学講座)

現在、突発性難聴をはじめとする感音難聴ではステロイドを用いた治療が一般的であるが、その治癒率は30%程度と低く、有効な治療法が確立されていない。また、誰しもがなり得る加齢性難聴においては補聴器に頼らざるを得ず、十分な補聴効果が得られないことも少なくない。そこで内耳研究の第一歩として、音響暴露を用いた内耳障害モデルの作成を行った。動物は250~350gのHartley系モルモットを用いた。モルモットは蝸牛が中耳腔に突出しており、内耳への外科的アプローチがしやすいという利点がある。モルモットの聴力評価には聴性脳幹反応(Auditory brain stem response, 以下ABR)を用いた。はじめに全身麻酔下のモルモットのABRを施行し正常聴力であることを確認。その後モルモットに4~8kHz、125dB(A)のband noiseを3時間暴露し、2週間聴力の変化をみた。我々は予備実験において音響暴露後の聴力は約2週間で固定し、それ以降は改善しないことを確認している。音響暴露翌日には聴力は聾~高度難聴を示すものの、暴露後2週間では聴力は高度~中等度難聴にまで自然回復した。次に組織学的検討を行うためにモルモットを深麻酔下に還流固定し、断頭した後に蝸牛を含む側頭骨を採取した。迅速脱灰器を用いて0.25M EDTA内に3日間浸けることで脱灰し切片を作成した。有毛細胞のマーカーとしてMyosin7a、支持細胞マーカーとしてSox2を用い、免疫組織学的評価を行った。音響暴露による内耳障害モデルは、主として外有毛細胞が障害されることが知られているため、内毛細胞に対する外有毛細胞の消失率と、コルチ器の構造を維持するために重要な役割を果たす支持細胞の生存率を計算した。コルチ器において、暴露した4~8kHzの担当領域では、音響暴露後3日の急性期には約60%程度の外有毛細胞の脱落が見られ、また暴露後2週後には約70%程度の外有毛細胞の脱落が確認された。しかしいずれも、支持細胞は85%程度が維持されていた。

現在、このモデルを用いて、幹細胞移植によって聴力の回復が得られる

か、検討を重ねている。

【動物センターからのお知らせ】

1. ウサギにおける3種混合麻酔の有効性について

福田直樹 (山形大学医学部メディカルサイエンス推進研究所動物実験センター)

3種混合麻酔薬によるマウスやラットの麻酔は、ケタミンやペントバルビタールナトリウム等を用いた麻酔に代わる簡便な方法として利用報告が増えている。しかしウサギに対して3種混合麻酔薬を用いた報告例は少ない。そこで今回、ウサギに対する3種混合麻酔薬の有効性について検討したので、紹介する。

3種混合麻酔薬として、ドルベネ注(塩酸メドミジン; 共立製薬㈱, MED)、ドルミカム注射液(ミダゾラム; アステラス製薬㈱, MID)、ベトルファール(ブトルファール; Meiji Seika ファルマ㈱, BUT)を混合した。各薬剤の混合率は、ラット用混合率(MED:MID:BUT = 0.15mg/kg b.w.: 2mg/kg b.w.: 2.5mg/kg b.w.)を基準とした。上記の混合率で混合した薬剤は、基準値の0.5、1、1.5、2倍量を各1匹ずつウサギの筋肉内に投与し、麻酔作用を検討した。麻酔作用の評価項目は、心拍数、呼吸数、直腸温、麻酔深度とし、それぞれ10分おきに2時間測定した。麻酔深度の指標として正位反射、四肢の痛覚反射、皮膚痛覚反射、角膜反射を用い、それぞれ1点として評価した。その結果、30分程度の麻酔をウサギに施したい場合、ラットの麻酔に必要な麻酔量の半分が適当であると判断された。

ケタミンは数年前に麻酔指定されたため厳密な管理を必要とし、またペントバルビタールナトリウムは鎮痛作用がほとんど無く、さらに麻酔に必要な投与量の安全域が狭いとされる。これらに代わる麻酔薬として3種混合麻酔薬は、ウサギに対しても十分に有効である。

2. 当センターにおけるミニブタ飼育の実際と技術支援の紹介

尾崎順子 (山形大学医学部メディカルサイエンス推進研究所動物実験センター)

当センターでは平成27年3月からミニブタの飼育を開始しております。今回はミニブタの飼育管理の紹介とミニブタの実験に関連する技術支援および当センターの技術支援業務を紹介いたします。

実験動物としてミニブタの特徴は①ヒトへの外挿性が高い部分が多い(皮膚、循環器系、消化器系、泌尿器系など)こと、②欧米では各分野の生物医学研究において長年利用され、現在も使用数は増加しており豊富なBackgroundが検索可能であること、③成長曲線が緩やかであり、おとなしい性格である、などがあげられます。

またミニブタは社会性を持つ非常に賢い動物です。日々コミュニケーションを図ることで実験処置もスムーズに行うことができるようになることから動物にとって快適でストレスのない飼育環境づくりに努めております。また現在はゲッチングミニブタの飼育を行っておりますが、クラウン系ミニブタ、マイクロミニブタ等にも対応可能ですので実験内容に併せてご利用ください。

現在のところミニブタの実験は半年以上の飼育を伴う慢性実験が行われており、処置および手術の際の技術支援は全て無償で行っております。当センターではミニブタにかかわらず全ての実験動物に関する適正な実験手技を提供すべく(社)日本実験動物協会の認定する実験動物技術指導員、実験動物一級技術者、実験動物二級技術者の有資格者がおります。各手技のトレーニングに関しましてはすべて無償となっておりますのでぜひお気軽にお声がけください。その他、技術支援業務には実験動物・遺伝子改変動物の授受、検査検査、実験動物の清浄化、凍結保存などがあります。詳しい技術支援の内容は当センターHPに掲載しておりますのでご参照ください。

今後とも利用者の皆様の実験動物に関する情報提供を行うとともに、実験動物に関する技術支援を充実させ、利用者の皆様によりよい実験環境を

提供していきたいと考えております。

3. マウス・ラットの微量採血における新しい採血具の紹介

伊藤恒賢（山形大学医学部メディカルサイエンス推進研究所動物実験センター）

マウス・ラットの微量採血は尾静脈から注射シリンジで吸引する方法や、尾静脈および尾動脈を切開する方法（切開法、カミソリ法）がある。また、眼窩静脈叢から採血する方法もこれまで用いられてきた。尾静脈や尾動脈を切開する方法は、尾部皮膚とともに動静脈の切断により滴下する血液を回収する方法であるが、切口が大きいために過度に出血して血液ロスが多くなりマウスが貧血になる等の身体的負荷が大きい。さらに傷口から流出した血液は空気に触れるため血液凝固する場合がある。また、眼窩静脈叢からの採血は、動物の下眼瞼結膜と眼球の間にガラス毛细管を入れ、下眼瞼に沿って目頭から目尻に向けてねじるようにガラス毛细管を刺

入する方法であるが、技術に熟練を要すること、麻酔が必須なこと、並びに血液以外の物質（涙など）が混入することなどから、現在は動物実験に用いる技術としての賛否が分かれる。

一方、尾静脈からシリンジを用いて微量採血する方法は、無麻酔下の動物から採血でき、熟練すれば短時間に簡単かつ無菌的に採血することが可能である。

しかし、尾静脈からのシリンジ採血は動物実験初級者には難しい手技であるため、実験方法として本学ではなかなか定着しない。

日本全薬工業株式会社の村上らは、熟練を要することなく短時間で効率良く採血することができるマウス・ラット用の顔回採血が可能な採血具を考案した。（特許【公開番号】特開2006-223334（P2006-223334A））

本研究成果発表会では、この採血具を用いたマウス・ラットの採血方法の実際を動画で紹介する。