研究会だより

第２７回岡山実験動物研究会

平成６年６月２５日（土）午後２時から、岡山県新技術振興財団との共催で岡山大学教育学部において、河田哲典先生のお世話で開催された。

はじめに会長の栗本雅司所長（（株）林原生物化学研究所・藤崎研究所）から開会の御挨拶があり、その後直ちに一般講演に移った。

一般講演（１）は「イヌの中枢刺激による胆汁排出と自律神経性胆汁排出調節」と題して川崎医大の古川直裕先生が講演された。この司会は亀井干晃先生（岡山大・薬学部）が担当された。

一般講演（２）は「ヒトＩＦＮ－αプロモーターを使用した糖蛋白質産生システム」と題して、佐藤美千代女史（（株）林原生物化学研究所・藤崎研究所）が講演された。この司会は山本敏男先生（岡山大・歯学部）が担当された。

一般講演（２）の終了後、休憩をとった後、事務局から会務報告があった。その内容を要約すると、①平成５年度の活動報告（第２５回，第２６回研究会の開催，会報１０号の発行，理事会・常務理事会の開催，名誉会員（矢部芳郎教授，田坂賢二教授）の推挙，関西実験動物研究会１０周年記念大会での話題提供）について，②平成５年度の会計決算報告及び監事の中永征太郎先生，河本泰生先生によって会計監査がなされたこと，③第２７回の研究会が岡山県新技術振興財団との共催で現在岡山大学教育学部で開催されていること，④第２８回の研究会は岡山県新技術振興財団との共催で１２月上旬に開催を予定していること，⑤第１１号の研究会報の発行を進めていること，などであった。

会務報告後、一般講演（３）に移った。「ムコ多糖症モデルラットにおける疾患原因遺伝子の解析」と題して国枝哲夫先生（岡山大・農学部）が講演された。この司会は片山泰人先生（岡山大・医学部）が担当された。

引き続き、特別講演が行われた。特別講演は「内分泌細胞における細胞増殖の調節」と題して、岡山大学理学部の高橋純夫先生が講演された。この司会は内藤一郎先生（重井医学研究所）が担当された。

この会には約５０名の参加者があり、盛会のうちに終えた。

一般講演の要旨は以下に示した。なお、特別講演の要旨は本文２～７頁に掲載しているので参照して下さい。

一般講演（１）

イヌの中枢刺激による胆汁排出と自律神経性胆汁排出調節

古川直裕（川崎医大・第二生理）・岡田博匡
（川崎医療福祉大・臨床栄養）

ヒトやイヌにおいては、コレシストキニン（ＣＣＫ）が胆嚢収縮とＯｄｄｉ括約部の弛緩を同時に誘発し、胆汁排出を促進することが知られているが、最近、迷走神経を介した中枢性の胆汁排出が報告され、また、臨床上の問題からも、自律神経の作用が重要視されだした。しかし、その作用、特に中枢性調節機構に関しては不明の点が多い。そこで我々は麻酔イヌを用い、中枢神経系の特定部位の刺激が肝外胆道系の運動、胆汁の排出に与える影響について検討した。

視床下部の電気刺激、あるいは化学刺激（細胞体刺激）により、肝外胆道系運動に種々のパターンの反応が得られたが、そのうち胆嚢収縮とそれに同期したＯｄｄｉ括約部の弛緩反応、胆汁排出の促進は前視床下野腹側部の刺激で発現し、また逆のパターンの反応と胆汁排出の抑制は後視床下野の刺激で誘発された。このとき血中ＣＣＫ濃度は変化せず、神経切断、投薬実験より、前者の反応は迷走神経、後者の反応は交感神経を介して発現していることが示された。

延髄の迷走神経背側核（ＤＭＶ）刺激によっても、種々のパターンの反応が得られたが、化学刺激による胆嚢収縮とＯｄｄｉ括約部の同時弛緩は誘発されず、視床下部が胆汁排出を統合的に調節しているのに対し、ＤＭＶは単なる出力系と考えられた。胆嚢、Ｏｄｄｉ括約部にそれぞれ促進、あるいは抑制を誘発するＤＭＶ領域には、ある程度の分化が認められた。

これまで行われてきた、ｉｎ　ｖｉｖｏでの外来神経の直接刺激、あるいはｉｎ　ｖｉｔｒｏにおける経壁刺激実験などでは、促進、抑制、知覚、局所調節に関与する壁内神経など種々の神経線維を同時に刺激するため、投薬のみでそれらを区別することは困難であった。しかし、中枢の特定部位の刺激では、より選択的に神経線維を働かせることができ、

そのような方法を用いて、1）迷走神経の促進、抑制性線維の肝外胆道系への末梢経路、2）胆嚢への迷走神経経路中にアトロピン感受性の促進と抑制の両者の経路が存在すること、3）迷走神経経路におけるムスカリン受容体のサブタイプなど、末梢機構についても明らかにされた。

一般講演（2）

ヒトＩＦＮ－αプロモーターを使用した糖蛋白質産生システム

佐藤美千代、森哲也、山本康三、太田恒孝、阪本知代、小出一広、村上欽俊、藤井光清、福田恵温、栗本雅司
（株）林原生物化学研究所　藤崎研究所

制御可能でかつ高レベルのヒト型有用糖蛋白質の産生システムとして、今回、ヒトＩＦＮ－α２プロモーター（ＩＦＰ）、ヒト白血病Ｂ細胞株－ＢＡＬＬ－１細胞、及びインビボ細胞増殖法の組み合わせにより、有効な産生システムを確立したので報告する。

ヒト白血病Ｔ細胞株－ＰＥＥＲ細胞より得たエリスロポイエチン（ＥＰＯ）のｃＤＮＡをＩＦＰの下流に配置してＥＰＯ発現ベクターを構築した。そのベクターをＩＦＰ取得細胞であるＢＡＬＬ－１細胞に導入し、組換え細胞を得た。組換え細胞は、センダイウイルスの刺激により高レベルのＥＰＯを産生した（６．８μｇＥＰＯ／ｍｌ）。親株であるＢＡＬＬ－１細胞もセンダイウイルスの刺激により高レベルのＩＦＮを産生するが、外来ＩＦＰによるＥＰＯ産生量は、内在ＩＦＰによるＩＦＮ（０．０３８μｇＩＦＮ－α／ｍｌ）の産生量を上回るものであった。組換え細胞のＩＦＮ産生量及び産生パターンは親株であるＢＡＬＬ－１細胞のそれと同様であったことより、外来ＩＦＰの導入は内在ＩＦＰによる物質産生に大きな影響を与えなかったと言える。さらに、得られた細胞はハムスターを用いたインビボ細胞増殖法－「ハムスター法（林原法）」の適用が可能であり、スケールアップを容易に行うことができた。組換え細胞を移植したハムスターは、若干の多血症を示したが、成長に大きな影響は与えられなかった。

組換え細胞で産生したＥＰＯについては精製し、その物理化学的性質及び生物活性を検討した。得られたＥＰＯは適切にプロセッシングされ、糖鎖も付加されており、生物活性を示した。

一般講演（3）

ムコ多糖症モデルラットにおける疾患原因遺伝子の解析

国枝哲夫（岡山大学農学部）

ムコ多糖症はライソゾームにおけるグリコサミノグリカン分解酵素の遺伝的欠損に起因する疾患の総称であり、ムコ多糖症Ⅵ型はそのうちアリルスルファターゼＢの欠損に起因し、多発性発育異常症を特徴とする疾患である。ＭＰＲラットは体型の小型化、頭部および鼻梁の短小化等の外観的特徴を持ち、組織学的、生化学的解析により、全身の各臓器の細胞に空胞化が観察され、尿中にデルマタン硫酸が排出され、またアリルスルファターゼＢの活性が低下していることが明らかとなっている。これらの特徴はヒトのムコ多糖症Ⅵ型と類似しており、本ＭＰＲラットがヒトのムコ多糖症Ⅵ型と同様にアリルスルファターゼＢ遺伝子の突然変異に起因することが推測された。そこで、ＭＰＲラットにおける突然変異を同定するため、ラットのアリルスルファターゼＢ遺伝子の解析を行った。

ラット肝臓ｃＤＮＡライブラリーを、ネコアリルスルファターゼＢｃＤＮＡをプローブとして用いてスクリーニングし、正常ラットアリルスルファターゼＢｃＤＮＡクローンを得て、その塩基配列を決定した。さらに、体細胞雑種法を用いて同遺伝子の染色体上の位置を決定したところ、ＭＰＲラットの疾患原因遺伝子と同一の第２染色体上に存在することが明らかとなり、染色体上の位置からもＭＰＲラットの疾患原因遺伝子がアリルスルファターゼＢ遺伝子であることが強く示唆された。そこで、次に正常ラットアリルスルファターゼＢｃＤＮＡの塩基配列に基づいて、肝臓のｍＲＮＡを用いたＲＴ－ＰＣＲ法により、ＭＰＲラットの同遺伝子の塩基配列を決定した。ＭＰＲラットの塩基配列を正常ラットと比較したところ、５０７番目の位置に１塩基の挿入が存在し、このフレームシフト突然変異の結果、２５８番目のコドンに終止コドンが出現していることが明らかとなった。この結果、ＭＰＲラットのアリルスルファターゼＢはＣ末端側の約半分が欠失していることになり、酵素活性は持たないことが強く示唆された。また、ＭＰＲラットコロニーの中の各個体において、発症個体はすべてこの突然変異をホモで持ち、正常個体はすべて野性型のホモかヘテロであり、遺伝子型と表現型は完全に一致していた。

以上の結果より、ＭＰＲラットにおけるムコ多糖症の原因遺伝子はアリルスルファターゼＢ遺伝子における突然変異であることが結論づけられた。

※※※※※※※※※※※※※※※※※※※※※※※※※※※※※※※※※※

第２８回岡山実験動物研究会

平成６年１２月２日（金）午後１時からメルパルクＯＫＡＹＡＭＡ郵便貯金会館において、岡山県新技術振興財団との共催で開催された。

はじめに会長の栗本雅司所長（（株）林原生物化学研究所・藤崎研究所）から開会の御挨拶があり、その後、特別講演に移った。

特別講演Ⅰは「実験動物とワクチンの品質管理」と題して（財）阪大微研会の小野耕一先生が講演された。この司会は内藤一郎先生（重井医学研究所）が担当された。

特別講演Ⅱは「遺伝子ノックアウトマウス作製と免疫応答解析への利用」と題して岡山大学工学部の高井俊行先生が講演された。この司会は片山泰人先生（岡山大・医学部）が担当された。

講演終了後、休憩をとり、事務局から会務報告があった。その内容を要約すると、①平成６年度の活動報告（第２７回，第２８回研究会の開催，会報１１号の発行，理事会・常務理事会の開催）について，②会則第７条による役員の選任について（本文49頁に岡山実験動物研究会役員名を掲載），③平成６年度（１月１日～１１月３０日）の会計中間報告について，④第２９回の研究会の開催予定について，⑤研究会報（第１２号）の発行について，などであった。

会務報告後、招待講演に移った。招待講演は「ケージサイズについて考える」と題して新潟大学医学部の佐藤徳光先生が講演された。この司会は倉林譲先生（岡山大・医学部）が担当された。

この会には８０名を越える参加者があり、盛会のうちに終了した。会終了後、懇親会が同会場で開かれ、名誉会員の矢部芳郎先生，田坂賢二先生も出席された。先生方にも御挨拶を頂き、同研究会の今後の発展を誓い合った。

特別講演，招待講演の要旨は本文8～25頁に掲載していますので、御参照下さい。

※※※※※※※※※※※※※※※※※※※※※※※※※※※※※※※※※※

平成６年度理事会報告

平成６年度の理事会は２回行われた。第１回目は６月２５日（土）午後１時３０分から５０分まで岡山大学教育学部で、第２回目は１２月（金）12時30分から50分までメルパルクOKAYAMA郵便貯金会館で行われた。

第１回理事会

①平成５年度の活動報告：２回（第２５回，第２６回）の研究会の開催，第１０号の研究会報の発行，常務理事会の開催（２回），関西実験動物研究会１０周年記念大会での話題提供の報告があった。

②研究会報１１号の発行：７月中に発行される予定であることが報告された。

③平成５年度の会計報告：平成５年度（１月１日～１２月３１日）の収入，支出，残高の状況について報告がなされ、中永征太郎先生，河本泰生先生の監事によって５月１７日に会計監査がなされた。

④平成６年度の活動計画：第２７回の研究会は本日岡山大学教育学部において，また第２８回は１２月上旬にいずれも岡山県新技術振興財団との共催で開催する予定であることが報告され、具体的な開催日時，内容などについては後日の常務理事会で検討することが了承された。

第２回理事会

①平成６年度の活動状況：第２７回の研究会が岡山大学教育学部で開催され，第２８回の研究会が本日（１２月２日）いずれも岡山県新技術振興財団との共催で開催されること，第１１号の研究会報が発行され、会員に送付されたことが報告された。

②平成６年度会計の中間報告：平成６年１月１日から１１月３０日までの収入，支出，残高の状況について中間報告があった。

③会則第７条に基づいて役員の選任が行われ、了承された。会長には栗本雅司所長（（株）林原生物化学研究所・藤崎研究所）が再選された。理事は従来のメンバーに加えて新たに新井成之氏（（株）林原生物化学研究所・藤崎研究所）と国枝哲夫氏（岡山大・農学部）が選出され、常務理事として活躍して頂くことになった。

④次回（第２９回）の研究会の開催：平成７年６月頃に会員持ち回りの会場で会員による一般講演を中心に開催することが討議された。

⑤第１２号の研究会報は平成７年に発行する予定。