実験動物ニュース

The Japanese Association for Laboratory Animal Science

目　次

特集：動物実験代替法の現状と課題 —肝臓を例に—

序文：動物モデルと NAMs のいまを考える 160
脂肪組織および肝臓由来細胞外小胞による多臓器ネットワーク 162
ヒト肝細胞キメラマウスの進展とヒト肝疾患モデルへの応用 165
創薬・安全性評価のための *in vitro* 肝臓モデルの構築と応用 171
農薬毒性試験データベースの構築と
機序情報を活用したリードアクロスによる発がん性予測 177

特集：先端遺伝子操作技術の生命科学研究への応用

序文：特集「先端遺伝子操作技術の生命科学研究への応用」によせて 182
多様化するゲノム編集技術の進化と深化 183
CRISPR-KO スクリーニングの開発と応用 190
多様化する動物モデルにおけるゲノム編集技術の展開 195
マウス個体における Tet-ON/OFF システムを用いた
時空間遺伝子発現制御の最適化 207

動物実験福祉に関する海外動向調査報告・オーストラリア（メルボルン） 214

研究室・施設便り

熊本大学生命資源研究・支援センター
動物資源開発研究施設　資源開発分野の紹介 219

維持会員便り

実技教育の新たな拠点として
— KAC 技術研修所の移転と新たな取り組み — 227

実験動物ニュース

The Japanese Association for Laboratory Animal Science



会員便り

「獣医保健看護学」と「実験動物」 231

あのころ憧れた研究者を目指して 233

日本実験動物学会からのお知らせ

2026 年度維持会員懇談会の開催について 238

動物実験の外部検証

令和 9 年度の実施に向けた事前説明会・個別相談会 239

アジア実験動物科学会議 in Japan（ACLAS2027）の開催 239

Experimental Animals 75(4) 収載論文和文要約集 240

維持会員名簿 i

編集後記 iii

特　集：動物実験代替法の現状と課題 —肝臓を例に—

序文：動物モデルとNAMsのいまを考える

北村　浩
東北大学医学系研究科医用動物学分野　教授

本特集は，第73回日本実験動物学会総会（2026年5月27日～29日）の最終日に企画された日本動物実験代替法学会との共催シンポジウムの内容を中心に構成した。2024年9月に鈴木真大会長から板垣宏日本動物実験代替法学会理事長（当時）へ依頼があり，何度かのワーキンググループでの議論を経て，共催が実現した。シンポジウムの構成は日本動物実験代替法学会からのワーキンググループメンバーであった北村と西川昌輝（東大）が担当した。総会ではシンポジウム以外に日本動物実験代替法学会のブースも設置し，日本動物実験代替法学会の様々な活動の紹介や，生体模倣システム（Microphysiological System, MPS）の実物展示などを行った。ブースには様々な分野のアカデミア，企業双方からの参加者が多数訪れた。一方で，本年度の国立大学法人動物実験施設協議会の教員・事務職員懇談会も「動物実験代替法の現状と課題」がテーマであり，拙見ながら代替法の概説を述べさせていただいた。このように動物実験代替法は動物実験関係者にとって今まで以上に意識するテーマになっており，実験動物学の一つの大きなトピックとして扱うべき段階に到達しているといえる。

近年，急速に動物実験代替法が注目を集めるようになったドライビングフォースとして，Translational Researchの分野での欧米の政策転換が挙げられる。米国は1938年以後，長年にわたって新薬の開発には動物実験を義務としてきたが，2022年のFDA Modernization Act 2.0の可決によって，その義務を撤廃した。現在審議中のFDA Modernization Act 3.0では*in silico*での検証に力を入れる内容となっており，動物実験を使用しない次世代の毒性評価（Next Generation Risk Assessment, NGRA）の推進を見据えている。一方，NIHもFDAと足並みをそろえた形で新たな代替法アプローチ（New Approach Methodologies, NAMs）の推進を謳っており，2025年には“NIH NAMs Challenge”というプログラムを立ち上げ，3年で7百万ドルの資金を投ずることを表明した。これに先立つ，“動物モデルのみでヒト疾患を研究しようとするテーマには資金提供しない”という方針とは対照的である。英国も段階的な動物実験の削減・廃止を表明しており，EUも化学物質の安全性評価における動物実験終了に向けたロードマップを描いている状況である。

これら政策の推進と連動する形で，NAMsの技術進歩は眼を見張るものがある。特にこの分野で注目を集めているのは，オルガノイドなどの3次元培養系や，チップ上で組織内の微小な環境を再現するMPSなどの*in vitro*の実験系が挙げられる。またAIを駆使し，コンピューター上の“仮想ヒト”で薬効や生理反応を推測する*in silico*の系や、生物を使用せず試験管内で被検物質を評価する*in chemico*の系も発展が著しい。これらNAMsはヒトを対象にデータを取得できることから，動物実験が常に抱えるヒト-動物間の種差の問題を解消できる（図1）。MPSやAIは初期投資が大きいが，最終的な研究・開発費の総額を考えると大幅な予算の圧縮が期待でき，Rocheなどの国際的な製薬企業はNAMsの導入に積極的である。また当然ではあるが、動物を使用しないことから，生命倫理面でもメリットがある。一方で，すべての動物実験が容易にNAMsに置き換わるかといえば，そう単純な話にはならない。哺乳類の行動や脳機能の完全な再現，がんの転移，移植免疫や生殖など複雑な高次反応をNAMsで完全に再現することは現在のテクノロジーでは難しい。また経過の長い疾患をNAMsで評価することも限界がある。加齢性疾患や生活習慣病など現在、医学で問題とされる疾

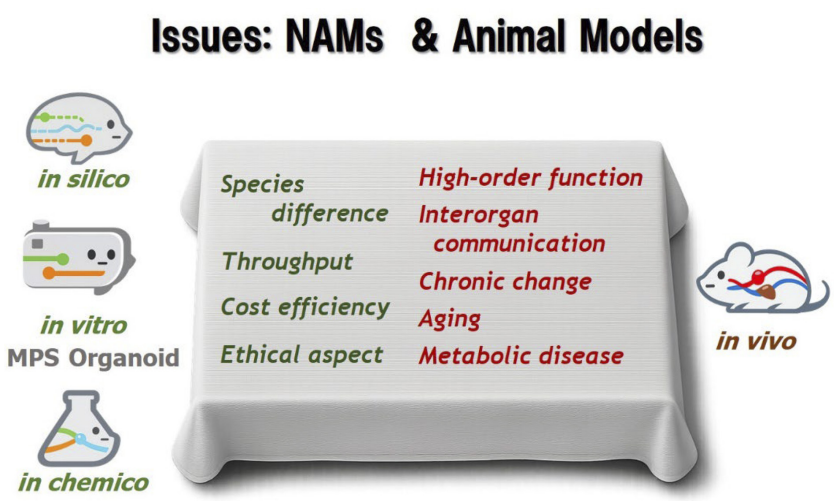


図1　NAMsと動物モデルの長所の比較

緑字で示した項目はNAMsにメリットがある点、赤字で示した項目は動物モデルにメリットがある点。ただし技術の革新により状況は変わるので注視し続ける必要がある。

患の多くは経過の長い疾患であることから，少なくとも近い将来に動物実験代替法が動物実験に完全に置換されるということは考えにくい。

そのような背景を踏まえ，動物モデルとNAMsの特徴を理解し，比較しやすくすることを目的に，シンポジウムでは同じ生体組織＝肝臓を対象とする研究を共通テーマとした。肝臓は薬物代謝，糖・脂質 ・ タンパク質代謝，炎症応答など多機能な臓器であるが，一方で液性因子や小胞を介して他の臓器の機能を遠隔制御する内分泌器官でもある。動物モデルならではの制御器官としての肝臓の役割を先ず取り上げることとした（江口の稿）。さらに種差という動物モデルの弱点を克服すると共に，NAMsの材料の調製にも役立つヒト化動物モデルの有用性について議論に含めた（立野の稿）。一方，*in vitro*の系で常に直面する生体との反応性の違いを解消するためのMPSなどのデバイスの開発や培地の改良などについて取り上げた（西川の稿）。また究極の代替法といえる*in silico*モデルの構築方法とその成績について，特に進んでいる薬物毒性の側面の例を挙げていただいた（吉成の稿）。

NAMsが広く市民権を得た時代の中で重要なのは，NAMsと動物モデルのそれぞれの長所・短所を正しく理解することだと考える。双方だけでなく，うまく併用しながらデータを取得することは，単に3Rsの推進にもつながるだけでなく，学術的にも効果的 ・ 効率的なアプローチと言える。動物実験代替法の分野でしばしば使用される“context of use（どのような状況 ・ 目的 ・ 環境時にどのようなアプローチをとるか）”を意識すれば，動物実験・実験動物関係者にも自ずとやるべきことは見えてくると考える。日本実験動物学会と日本動物実験代替法学会の連携は，本年度11月13日～15日に姫路で開催される日本動物実験代替法学会の第39回大会におけるシンポジウム（加齢と老化 ：動物モデルの現状と代替法の次の課題）に継承される。両学会のさらなる有機的な繋がりと，それによる研究開発の新たな展開を祈念してやまない。

特　集：動物実験代替法の現状と課題 —肝臓を例に—

脂肪組織および肝臓由来細胞外小胞による多臓器ネットワーク

江口暁子
三重大学大学院医学系研究科　消化器内科学
三重大学医学部附属病院　バイオバンクセンター

はじめに

代謝機能障害関連脂肪性肝疾患（MASLD; Metabolic Dysfunction-Associated Steatotic Liver Disease）は，過剰な栄養や肥満を主たる背景として発症・進展する多臓器連関型の代謝疾患である。肥満状態の脂肪組織からは，パルミチン酸をはじめとする遊離脂肪酸（FFA）の放出や，TNF-α・IL-6 などの炎症性サイトカインの増加や，アディポネクチンの低下といった液性因子のバランス破綻が生じる。これらが肝臓へ流入することで，インスリン抵抗性や肝細胞のストレスが惹起され，MASLD の病態の進展に関わる。MASLD の中でも肝炎症や肝線維化を伴う代謝機能障害関連脂肪肝炎（MASH; Metabolic Dysfunction-Associated Steatohepatitis），さらには肝硬変へと病態が進展すると，肝不全や門脈高血圧に伴い，肝性脳症，肝関連サルコペニア，肝腎症候群といった全身の遠隔臓器障害が惹起される。これらの発症要因としては，高アンモニア血症や全身性炎症，腸内細菌叢の変化，高エンドトキシン血症などの代謝や炎症性異常が報告されているものの，個々の臓器間クロストークを介した病態進展の全容は未だ解明されていない。

近年，こうした古典的な液性因子や代謝産物に加え，新たな臓器間病態情報伝達体として「細胞外小胞（Extracellular Vesicles: EVs）」が注目を集めている。実際に，肥満個体の脂肪組織由来の EV（Adi-EVs）が肝臓における炎症や代謝障害を増幅することや，障害を受けた肝臓由来の EV（Liver-EVs）が血流を介して遠隔臓器へと伝播し，脳や骨格筋などの合併症誘発に関与する可能性を見出している（図 1）。

本稿では，肥満を起点とした Adi-EVs による慢性肝疾患の病態進展への関与と，その臨床的モニタリング指標（バイオマーカー）としての可能性について概観する。併せて，これら精緻な臓器間相互作用を模倣・解析する上での生体モデルの意義と代替モデルの限界についても考察する。

脂肪組織由来 EV はマクロファージの活性化に関与する

肥満状態の脂肪組織では，ストレスや細胞死に瀕した脂肪細胞の周囲にマクロファージが集積し，「crown-like-structures（CLSs）」と呼ばれる構造を形

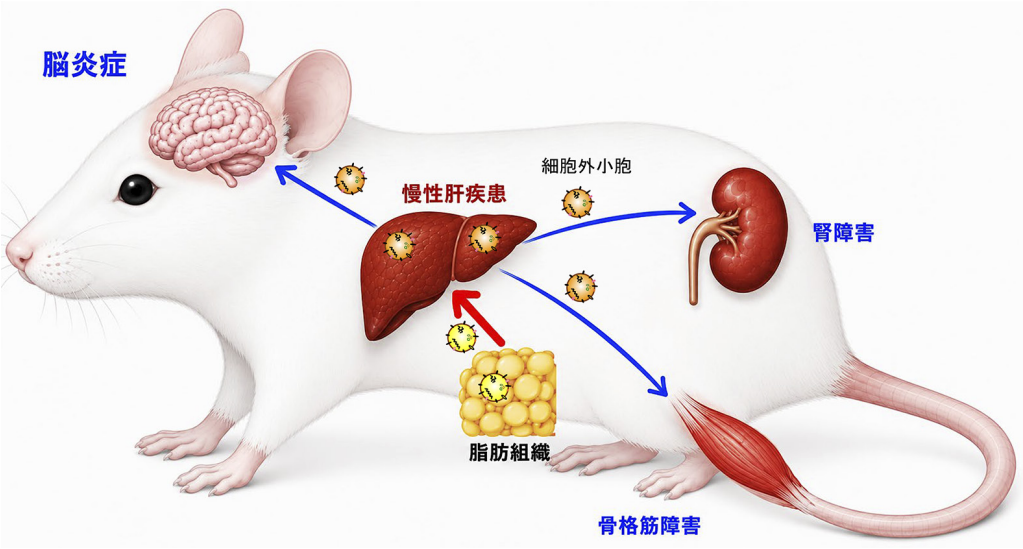


図 1　「脂肪－肝臓－脳・骨格筋・腎臓」にわたる複雑な多臓器クロストーク

成して慢性炎症を引き起こす。しかし，死にゆく脂肪細胞がどのようにして遠隔のマクロファージを引き寄せているのか，その分子メカニズムの全容は解明されていなかった。我々は，飽和脂肪酸（パルミチン酸）の負荷によってストレスを受けた肥大化脂肪細胞（3T3-L1 細胞使用）では，Caspase-3 および Rho kinase（ROCK）の活性化がおこり，培養上清中に Adi-EV が放出されることを見出した［1］。Adi-EVs は EV マーカーの一つである Annexin V を発現しており，FABP4 やアディポネクチン，Perilipin A/B といった脂肪細胞特異的なマーカータンパク質を包含していた。この Adi-EVs の免疫細胞活性化能を検討するため，Adi-EV を培養マクロファージやマウスから分離した初代培養マクロファージに添加したところ，マクロファージの走化性が有意に上昇した。なお，Adi-EV を除去した培養上清ではマクロファージの走化性上昇は見られなかったことから，Adi-EVs が免疫細胞の走化性を惹起する可能性が示唆された。そこで，マウス腹腔内に Adi-EVs を投与した数日後に腹腔内に集積した細胞の種類について解析したところ，マウス腹腔内には，CD11b 陽性の単球や F4/80 陽性のマクロファージが顕著に集積していること，一方で好中球は集積されないことが実証された。Adi-EV の網羅的な成分解析を行ったところ，単球 / マクロファージの活性化・分化を誘導する miR-21a，miR-125b，miR-155 といった特定の microRNA 群に加え，アラキドン酸や 5-Hydroxyeicosatetraenoic acid（5-HETE），9/13-Hydroxyoctadecadienoic acids（HODE）などの炎症性脂質成分が検出され，これらが複合的にマクロファージの集積に関与している可能性を見出した［2］。

脂肪組織由来 EV は肝炎症を惹起する臓器間病態伝達体である

培養細胞から得られた結果が肥満マウスの体内でも見られるかの検討をおこなった。高脂肪食負荷マウスや遺伝性肥満モデルである *ob/ob* マウスの血中 EV 数は，正常対照群と比較して顕著に増加しており，マウスの体重や精巣周囲脂肪組織の重量や全身のインスリン抵抗性の度合いと正の相関がみられた［2］。この際の血中 EV の Perilipin A 含有量も増加しており，血中 EV の主体は Adi-EVs と言える。この *ob/ob* マウスから得られた Adi-EVs が臓器連関に果たす役割を探求するため，正常な野生型マウスの尾静脈から投与し，全身もしくは肝臓内の炎症について検討した［1］。その結果，野生型マウスの血中における炎症性単球の増加とともに，肝組織にも炎症性単球の浸潤が観察された。この結果は，脂肪組織と肝臓の病態進展を繋げる因子の 1 つとして Adi-EVs が重要な役割を果たしていることを示唆している。

ヒトの肥満患者における血中 EV の臨床的意義

前述のマウスモデルで得られた知見をもとに，過体重および肥満患者における検討を実施した［2］。Body Mass Index（BMI）25 kg/m^2 を超える肥満群では循環血中 EV 数が有意に上昇しており，血清インスリン値およびインスリン感受性の指標である HOMA-IR と正相関していた。興味深いことに，これらの肥満患者に対して 3 ヶ月の食事療法（カロリー制限食）による減量介入を行うと，HOMA-IR の改善に同調して，血中 EV 数が有意に減少しただけでなく，血中 EV 内に含まれる脂肪細胞特異的タンパク質である Perilipin A の量が劇的に減少した。さらに重要な知見として，BMI が 25 kg/m^2 未満の非肥満者であっても，脂質異常症，高血圧，耐糖能異常などの代謝リスク因子を保有している場合，血中の EV 数は，血中中性脂肪値や ALT 値と密接に関連していることが明らかとなった［3］。これは，EV が単純な体脂肪量の指標ではなく，代謝ストレスの質的変化を鋭敏に反映するバイオマーカーとなり得ることを提示している。

この血中 EV の臨床的有用性は，小児・思春期世代の代謝異常解析においても一貫している［4］。小児肥満症例における血中 EV 数は中性脂肪レベルと相関するだけでなく，そのプロテオーム解析から，脂質・糖代謝，炎症・免疫応答，さらには神経発達や神経伝達物質放出に関連する多様なタンパク質群が網羅的に含有されていることが分かった。小児期からの過剰な EV 分泌と内容物の変化は，将来的な成人肥満への移行や，それに伴う多臓器合併症（MASLD の重症化や心血管イベントなど）の発症リスクを早期に捉える予測ツールとしての可能性を秘めている。

代替動物モデルにおける解析の限界

上述した Adi-EVs のみならず，慢性肝疾患モデルにおいては，肝障害に伴い Liver-EVs が放出され，血液循環を介して脳，骨格筋，腎臓へ集積し，脳炎症や筋肉量の低下，腎機能障害といった多臓器合併症を惹起する一因となっていることを示唆するデータを得ている。このような「脂肪－肝臓－脳･骨格筋･腎臓」にわたる複雑な多臓器間クロストーク（図 1）を再現・検証するにあたり，実験に使用するモデルを慎重に吟味する必要がある。近年，3Rs（動物実験の代替・削減・苦痛の軽減）の観点から Organ-on-a-chip やオルガノイド等の生体模倣システム（microphysiological system; MPS）が注目されている。しかし，がんにおける局所微小環境や単方向の臓器移行の解析とは異なり，本病態は長期間にわたる全身性ストレスの蓄積と，体液性・神経性を介した複雑な双方向フィードバックを基盤とする。現行の *in vitro* 代替モデルは，長期維持の困難さや網内系等による生体特有の EVs クリアランス機構の欠如といっ

た原理的限界を抱えている。したがって，このような慢性的かつ全身性の病態における EVs の真の病態生理学的意義を解明するためには，動物モデルを用いた統合的解析が極めて重要であるが，将来的に，このような長期の病態に適用できる MPS の開発も期待される。

おわりに

EVs は，脂肪組織と肝臓を中心とした代謝ネットワークを繋ぐキー分子であり，そのプロファイル解明は MASLD の病態理解および臨床における非侵襲バイオマーカー開発に大きく貢献する。血中 EV を介した遠隔臓器障害の全容解明と治療応用に向けては，生体特有の全身性応答や長期的病態を模倣できる動物モデルによる統合的解析を基盤としつつ，ヒト臨床検体による実証や，最先端のヒト多臓器チップ等を用いたメカニズムの相補的な検証を組み合わせていくアプローチが極めて有効である。今後は，これらの多角的な手法と臨床データの相互フィードバックを推し進めることで，患者個々の EV プロファイルに基づく病態層別化や，臓器間相互作用を標的とした革新的な予防・治療戦略の確立が望まれる。

参考文献

[1] A. Eguchi, A. Mulya, M. Lazic, D. Radhakrishnan, M.P. Berk, D. Povero, A. Gornicka, A.E. Feldstein, Microparticles release by adipocytes act as “find-me” signals to promote macrophage migration, PloS One 10(4) (2015) e0123110.

[2] A. Eguchi, M. Lazic, A.M. Armando, S.A. Phillips, R. Katebian, S. Maraka, O. Quehenberger, D.D. Sears, A.E. Feldstein, Circulating adipocyte-derived extracellular vesicles are novel markers of metabolic stress, Journal of Molecular Medicine 94(11) (2016) 1241–1253.

[3] Y. Kobayashi, A. Eguchi, M. Tempaku, T. Honda, K. Togashi, M. Iwasa, H. Hasegawa, Y. Takei, Y. Sumida, O. Taguchi, Circulating extracellular vesicles are associated with lipid and insulin metabolism, American Journal of Physiology. Endocrinology and metabolism 315(4) (2018) E574–E582.

[4] Y. Kobayashi, A. Eguchi, K. Imami, M. Tempaku, K. Izuoka, T. Takase, K. Kainuma, M. Nagao, N. Furuta, M. Iwasa, H. Nakagawa, T. Fujisawa, K. Togashi, Circulating extracellular vesicles are associated with pathophysiological condition including metabolic syndrome-related dysmetabolism in children and adolescents with obesity, Journal of Molecular Medicine 102(1) (2024) 23–38.

特　集：動物実験代替法の現状と課題 —肝臓を例に—

ヒト肝細胞キメラマウスの進展とヒト肝疾患モデルへの応用

菅原　豪
立野知世
株式会社フェニックスバイオ

1. はじめに

われわれは，これまでマウス肝臓の 70％以上がヒト肝細胞で置換されているヒト肝細胞キメラマウスを開発し，多くの製薬企業やアカデミアで利用されてきた。一方で，米国国立衛生研究所（NIH）および米国食品医薬品局（FDA）は，医薬品開発における実験動物の今後の位置づけに関して，薬効や安全性評価において，「動物実験中心」から「ヒトベース（New Approach Methodologies, NAMs）中心」への移行を推進している。また，医薬品開発におけるヒト化モデル動物の今後の位置づけとしては，ヒト化モデル動物はこの移行期において，動物実験とヒト研究のギャップを補完する役割として重要であると考えられているが，将来は NAMs へ移行するとされている。そのため，われわれは現時点において，ヒト化モデル動物は 3R の一つの動物数の Reduction に貢献していると確信しつつ，よりヒトに近い健常なヒト肝臓 / ヒト疾患患者肝臓を持つヒト化モデル動物の作製を目指している。キメラマウスでは，残存するマウス肝細胞由来の Cytochrome P450（CYP）活性が薬物代謝評価に影響を及ぼす可能性がある。この課題を克服するため，脂質ナノ粒子（LNP）に封入した mouse cytochrome P450 oxidoreductase（*Por*）-siRNA を投与してマウス CYP 活性を抑制し，ヒトの薬物代謝特性をより高精度に反映する新たなモデルマウスの開発について紹介する。加えて，ヒト肝疾患モデルの一例として，ornithine transcarbamylase（OTC）欠損症患者由来ヒト肝細胞を移植して作製したヒト肝細胞キメラマウスについても紹介する。

2. ヒト肝細胞キメラマウス

マウス肝臓がヒト肝細胞で置換されたキメラマウスを作製するためには，免疫不全と肝障害の性質が必要である。私たちは，免疫不全の性質として重度複合免疫不全（SCID）マウスを，肝障害の性質として urokinase-type plasminogen activator（uPA）を選択し，cDNA-uPA（mouse albumin enhancer/promoter-driven mouse uPA-cDNA transgenic）/SCID マウスをホストマウスとして利用している。3 週齢のホストマウスの脾臓からヒト肝細胞を注入すると，肝細胞は脾静脈から門脈を通じて肝臓に入り，uPA の作用でダメージを受けた類洞内皮細胞をヒト肝細胞が通り抜けて肝細胞索へ侵入し生着する。さらに，このホストマウスの肝細胞は uPA の作用により増殖が抑制されているため，生着したヒト肝細胞はマウスの成長と共に増殖し，18 週齢ではマウス肝臓の約 70％以上が置換されたマウスを 7–8 割の割合で作製することができる。これらのヒト肝細胞キメラマウスは，ヒトの薬物動態，肝毒性，抗肝炎ウイルス薬の薬効を評価する系として，多くの製薬会社やアカデミアで利用されている［1］。

3. マウス CYP 活性抑制キメラマウス

ヒト肝細胞キメラマウスでは，高度なヒト肝細胞置換が実現されたことにより，タンパク質発現，遺伝子発現および代謝活性がヒトに類似することから，薬物動態研究を中心に広く用いられてきた。一方で，残存するマウス肝細胞を完全に除去することは事実上困難であり，その代謝活性がヒトでの薬物動態予測を妨げる場合がある。特に，ヒトよりもマウスで代謝速度が速い化合物を評価する場合や，マウス特異的な代謝物が生成される場合には，残存マウス肝細胞の影響が顕在化してくる。この問題を解決するため，これまでにいくつかのアプローチが試みられてきた。

われわれはこれまでに，肝臓および小腸でマウス Cyp3a を発現しない Cyp3a クラスター KO マウスと uPA/SCID マウスを交配して Cyp3a KO/uPA/SCID ホストマウスを作製し，これにヒト肝細胞を移植することでヒト肝細胞キメラマウスを樹立した。このキメラマウスでは，残存マウス肝細胞由来の Cyp3a 活性を排除することにより，ヒト代謝物の予測性が向上することが示唆された［2］。また，Uehara らは，より広範にマウス CYP 活性を制限することを目的として，別系統のホストマウスである mouse albumin enhancer/promoter-driven herpes simplex virus type 1 thymidine kinase（TK）transgenic NOG（TK-NOG）マウスと NOG-Por^{tm1} Cyp3a11$^{tm1(Flpo)Jic}$ マウスを交配し，得られたホストマウスにヒト肝細胞を移植することで，肝臓の残存マウス肝細胞において CYP 活性に必

須の電子供与酵素である POR を conditional knockout したヒト化肝臓 TK-NOG マウス（POR cKO ヒト化肝臓マウス）を作製した。このモデルでは，残存マウス肝細胞の CYP 活性に起因する薬物代謝への干渉を最小限に抑えられることが示されている［3］。

これらの先行研究は，残存マウス肝細胞の代謝活性を制限することによって，ヒト肝細胞キメラマウスのヒト薬物代謝予測性を改善できることを示している。一方で，これらは新たな遺伝子改変ホストマウスを作製することの難しさも示している。Cyp3a KO/uPA/SCID キメラマウスでは，開発当初，移植後のヒト肝細胞への置換率が通常のキメラマウスと比較して著しく低く，uPA/SCID マウスへの連続的な戻し交配に加え，移植するヒト肝細胞数の調整および最適化が必要であった［2］。また，POR cKO ヒト化肝臓マウスでは，CYP が胚発生に必要なさまざまな内因性代謝経路に関与しており，全身性 POR 欠損が早期胚致死を示すことから，肝臓特異的な POR 欠損系を構築する必要があった。そのため，高度な遺伝子改変技術に加え，目的の遺伝子型を有する個体を得るための複雑な交配が必要となる。

近年のゲノム編集技術の発展により，新規遺伝子改変マウス系統の作製は以前より容易になりつつある。しかし，ヒト肝細胞移植を成立させるために必要な肝障害と免疫不全という特殊な背景を有するホストマウスに，新たな遺伝子改変を導入することは依然として容易ではない。遺伝子改変そのものがヒト肝細胞の生着や増殖に影響を及ぼす可能性があるほか，目的とする遺伝子型によっては動物自体の作製や維持が困難となる可能性もある。したがって，研究目的ごとに個別の標的遺伝子を改変したホストマウスを作製し，それぞれについてヒト肝細胞キメラマウスを樹立・維持することは，必ずしも現実的な方法とはいえない。

われわれは近年，ヒト肝細胞キメラマウスを作製した後に LNP-siRNA を投与することで，後天的かつ種特異的に遺伝子発現を制御する新たな方法を報告した［4］。この研究の背景には，LNP を用いた siRNA をはじめとする核酸医薬デリバリー技術の急速な発展，特に LNP を静脈内投与することで肝細胞へ siRNA を高効率に送達できることがある。例えば，2018 年に FDA に承認された patisiran（Onpattro）は，世界初の siRNA 医薬品であり，LNP を用いて siRNA を肝細胞へ送達し，主として肝臓で発現して血中へ分泌される transthyretin（TTR）を標的とすることで，遺伝性トランスサイレチン型アミロイドーシスを治療する製剤である。

そこで本研究ではまず，proof of concept として，マウスおよびヒトの *TTR* 遺伝子にそれぞれ特異的な LNP-siRNA［siTTR（Mm）/LNP および siTTR（Hs）/LNP］を作製し，種特異的な遺伝子ノックダウンが可能か検証した。SCID マウスへの尾静脈投与試験では，siTTR（Mm）/LNP 投与により血中マウス TTR 濃度が用量依存的に低下し，その効果は Day 1 から認められ，Day 7 まで持続した。尚，siTTR（Hs）/LNP 投与では血中マウス TTR 濃度の低下は認められなかった。Day 7 における肝臓中 *Ttr* mRNA 発現量も血中 TTR 濃度とよく対応しており，siTTR（Mm）/LNP 投与群でのみ低下が認められた［4］。

続いて，cDNA-uPA/SCID マウスをホストとするヒト肝細胞キメラマウスを用いて検討した。siTTR（Mm）/LNP を尾静脈投与したところ，SCID マウスと比較するとノックダウン効果は減弱したものの，血中マウス TTR 濃度は用量依存的に低下し，1.0 mg/kg ではほぼ完全なノックダウンが Day 7 まで持続した。この間, 血中ヒト TTR 濃度には影響を認めなかった。一方，siTTR（Hs）/LNP 投与では血中ヒト TTR 濃度が低下したが，マウス TTR 濃度への影響は認められなかった。SCID マウスと同様に，これらの血中 TTR 濃度の変化は肝組織中の各動物種由来 *TTR* および *Ttr* mRNA 発現量の変化と一致していた。さらに，ヒトおよびマウス TTR にそれぞれ特異的な抗体を用いた免疫組織化学染色により，標的とした動物種の肝細胞で TTR タンパク質発現が選択的に低下することが確認された［4］。これらの結果から，ヒト肝細胞とマウス肝細胞が存在するヒト肝細胞キメラマウスにおいても，siRNA 配列を適切に設計することで種特異的な遺伝子ノックダウンが可能であることが示された。

次に，この種特異的遺伝子制御の薬物代謝研究における有用性を検証するため，残存マウス肝細胞の *Por* を選択的にノックダウンし，薬物代謝試験を行った。培養細胞（Hepa1-6 および Hep3B）ならびに BALB/c マウスを用いた予備検討により，マウス *Por* を標的とする 16 種類の siRNA 候補から，ノックダウン効果および種特異性に最も優れた siRNA を選定し，LNP を製剤化した［siPOR（Mm）/LNP］。SCID マウスおよびヒト肝細胞キメラマウスに Day 0，3 および 7 の計 3 回静脈内投与し，Day 10 に肝臓を採取して解析したところ，ヒト肝細胞キメラマウスではヒト *POR* mRNA 発現量には有意な変化を認めず，SCID マウスおよびヒト肝細胞キメラマウスでマウス *Por* mRNA のみが有意に低下した。免疫組織化学染色において，SCID マウスでは，POR タンパク質は中心静脈付近のわずかな発現を残し著しく減少し，ヒト肝細胞キメラマウスではマウス肝細胞特異的マーカー陽性領域に一致して POR タンパク質発現の低下が確認された（図 1）［4］。

このマウス POR ノックダウン（*Por*-KD）ヒト肝細胞キメラマウス，および同マウスから調製した肝ミクロソームを用いた薬物代謝試験では，試験化合物として S- ワルファリンを用いた。S- ワルファリンの主要代謝物は，ヒトでは 7-hydroxywarfarin，マウスでは 4′-hydroxywarfarin であり，ヒト肝細胞キメラ

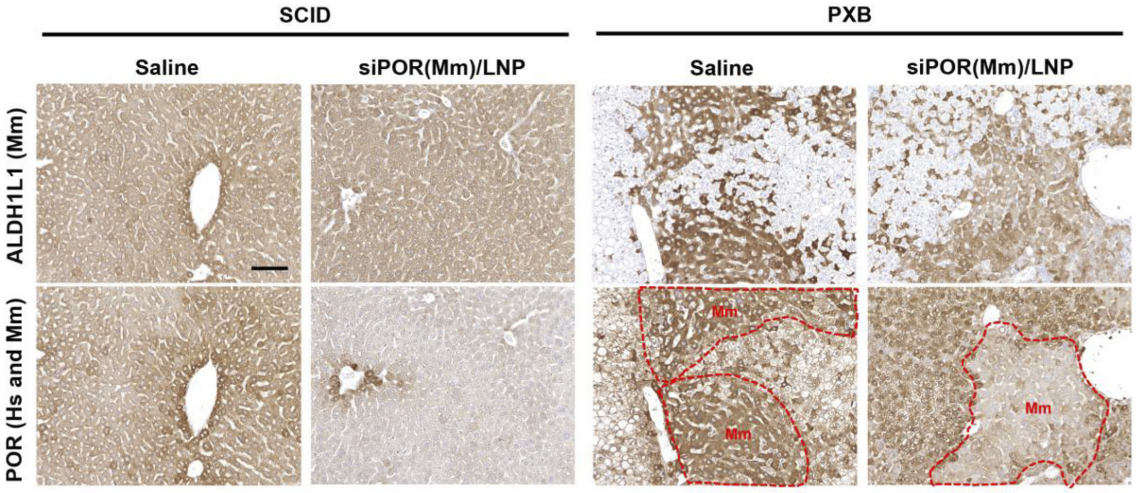


図 1　LNP-siRNA 投与後の SCID マウスおよびヒト肝細胞キメラマウス肝における POR 発現
SCID マウスおよびヒト肝細胞キメラマウス（PXB）に生理食塩水または POR 遺伝子に特異的な siPOR（Mm）/LNP を投与し，肝組織を採取した。マウス特異的マーカー ALDH1L1，ならびにヒトおよびマウス POR に特異的な抗体を用いて免疫染色を行った。マウス肝細胞領域（Mm）を破線で囲んで示す。Scale bar: 100 µm.（文献［4］Figure 5D より転載）

マウスにおいても，残存マウス肝細胞に由来する 4′-hydroxywarfarin 産生が報告されている［3］。キメラマウス肝ミクロソームでは 7-hydroxywarfarin が主要代謝物となり，全体としてヒト型の代謝プロファイルを示したものの，4′-hydroxywarfarin の生成割合は正常ヒト肝ミクロソーム（human liver microsomes: HLM）と比較して依然として高く，残存マウス肝細胞の影響が認められた。一方，*Por*-KD ヒト肝細胞キメラマウス由来肝ミクロソームでは 4′-hydroxywarfarin 生成が抑制され，S- ワルファリンの代謝プロファイルはより HLM に近づいた。この肝ミクロソームにおける S- ワルファリン代謝プロファイルの変化は，*in vivo* 薬物動態試験の結果ともよく一致していた。*Por*-KD ヒト肝細胞キメラマウスでは，対照群と比較して 4′-hydroxywarfarin の生成が抑制されるとともに，7-hydroxywarfarin のわずかな増加が認められた［4］。これらの結果は，適切な siRNA と LNP を用いることで，残存マウス肝細胞における特定遺伝子の発現を種特異的に抑制し，その代謝活性による干渉を最小限にすることで，よりヒトに近い薬物代謝・薬物動態モデルを構築できることを示している。

従来の遺伝子改変による新規ホストマウス系統の樹立と比較した場合，本手法の主な利点は，多くの時間と労力を要するマウス系統の樹立・維持を必要とせず，ヒト肝細胞キメラマウスの作製過程そのものに影響を与えない点にある。また，ノックダウンする遺伝子の種類，組み合わせ，およびタイミングを比較的自由に設定できることから，高い汎用性を有する。遺伝子改変マウスは，一度系統を樹立すれば継続的な薬剤投与を必要としないという利点を有する一方，siRNA-LNP についても，種特異的かつ十分なノックダウン効果を示す siRNA の選定が必要であるが，一度有効な siRNA が同定されれば，比較的容易かつ再現性高く適用することができる。siRNA-LNP によるノックダウンは必ずしも完全ではなく，その効果が一過性である点は本手法の制約となるが，この一過性という特徴は，同一の動物に対して目的に応じて異なる遺伝子を制御できる可能性にもつながり，用途によっては利点と捉えることもできる。また，静脈内投与した LNP-siRNA によるノックダウンが主として肝臓に限定される点も考慮する必要がある。しかし，ヒト肝細胞キメラマウスにおいてヒト化されるのは肝細胞であり，本モデルで標的となる遺伝子も肝細胞で重要な機能を担うものが中心になると考えられることから，多くの薬物代謝研究においては大きな制約とはならない可能性がある。

以上より，siRNA-LNP を用いた種特異的遺伝子制御は，従来の遺伝子改変ホストマウスとは異なるアプローチによって残存マウス肝細胞の影響を選択的に低減し，ヒト肝細胞キメラマウスをさらにヒトに近い薬物代謝・薬物動態モデルへと改変するための柔軟な技術基盤となり得る（図 2）。

4. ヒト OTC 欠損症キメラマウス

通常，ヒト肝細胞キメラマウスの作製には正常ヒト肝細胞が用いられるが，ヒト疾患モデルとして，遺伝性疾患患者由来の肝細胞を移植して利用する試みも行われている。OTC 欠損症を含む尿素サイクル異常症（urea cycle disorders: UCDs）［5, 6］や家族性

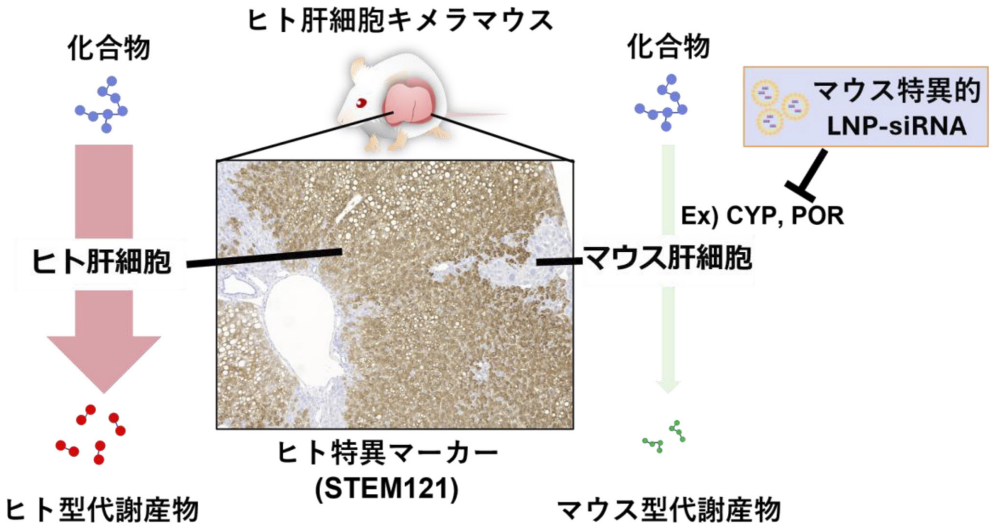


図２　ヒト肝細胞キメラマウスにおける残存マウス肝細胞の機能抑制

高コレステロール血症［7］などの遺伝性代謝疾患患者から分離された肝細胞をホストマウスに移植することで，患者由来肝細胞がホストマウス肝に生着・増殖し，一部のモデルでは疾患表現型を示すことが報告されている。われわれのグループにおいても，OTC 欠損症患者由来ヒト肝細胞を移植したキメラマウスを作製し，*in vivo* および *in vitro* における疾患表現型の解析を行っている［8］。

OTC 欠損症は，UCDs の中で最も頻度の高い疾患である。OTC 遺伝子は X 染色体上に位置するため，男性患者では一般に重症化しやすく，重症例では出生直後から高度の高アンモニア血症を呈する。一方，女性患者は通常ヘテロ接合体であり，X 染色体不活化の偏りなどにより，新生児期に重度の高アンモニア血症を呈する症例から，成人期まで無症候で経過する症例まで，幅広い臨床像を示す。本研究では，OTC 欠損症患者である 5 歳女児および 6 か月男児由来の肝細胞をホストマウスに移植し，その病態を解析した。

いずれの患者由来肝細胞もホストマウスへの移植後に生着・増殖が確認されたものの，ヒト肝細胞置換率は十分には上昇しなかった（女児：68.3 ± 13.3%，男児：6.5 ± 1.9%）。そこで移植された動物にコラゲナーゼ肝灌流を実施しヒト肝細胞を分離して，これらを別のホストマウスに移植する継代移植を実施した。われわれは，初回移植時の生着・増殖能が低いヒト肝細胞であっても，継代移植によって高置換率のキメラマウスを作製できる場合があることを経験している。継代移植を重ねた結果，3 継代目で OTC 欠損症患者由来肝細胞によって高度に置換されたヒト肝細胞キメラマウスの作製に成功した（女児：91.9 ± 7.7%，男児：83.0 ± 3.3%）。3 継代目男児 OTC 欠損肝細胞キメラマウスではほとんどの個体で 8 週齢（移植後 5 週）までに急激なヒトアルブミン値の上昇と高アンモニア血症を伴い，瀕死状態に陥るかまたは死亡した。そこで 4 継代目では移植細胞数を 3 継代目の半数（0.5 × 10^6 個）にすることで，高い置換率（82.4 ± 4.6%）を維持し，移植後 15 週以上生存するキメラマウスが作製された［8］。

血中アンモニア濃度は対照のヒト肝細胞キメラマウス（39.2 ± 3.5 μM）と比較して，3 継代目（女児：79.7 ± 4.8 μM，男児：168.8 ± 46.0 μM）および 4 継代目（男児：68.3 ± 3.0 μM）の OTC 欠損肝細胞キメラマウスにおいて有意に上昇していた。また OTC 欠損症では，カルバモイルリン酸がピリミジン合成経路へ流入することでオロト酸産生が亢進し，尿中オロト酸排泄が増加することが，一つの臨床的特徴となる。このオロト酸尿は，アロプリノールの代謝物によるオロチジン一リン酸脱炭酸酵素の阻害によってさらに増強されることが知られている。アロプリノール負荷試験を実施したところ，女児 OTC 欠損肝細胞キメラマウスでは，アロプリノール処置後の尿中オロト酸濃度が対照マウスの 6.3 倍まで上昇した。一方，男児 OTC 欠損肝細胞キメラマウスでは，無処置時から重度のオロト酸尿が認められ（16.3 倍），アロプリノール負荷によってさらに増強された（49.9 倍）［8］。

組織学的解析では，OTC に対する免疫染色により，女児および男児由来 OTC 欠損肝細胞の特徴を反映した異なる発現パターンが認められた。女児由来肝細胞では，X 染色体不活化によるモザイクを反映して，ヒト肝細胞領域内に OTC 陽性細胞と陰性細胞が混在するモザイク状の発現パターンを示した。これに対し，男児 OTC 欠損肝細胞キメラマウスの肝組織では，ヒト肝細胞領域における OTC 発現は完全に消失していた（図 3A）。さらに，女児由来肝細胞を移植した

キメラマウス肝におけるヒトOTC陽性細胞率を算出したところ，継代移植を重ねてもその後の世代におけるOTC陽性細胞率に大きな変化は認められなかった（図3B）[8]。この結果から，OTC陽性肝細胞とOTC陰性肝細胞は，ホストマウス肝内で同程度の増殖能を有することが示唆された。

これらのOTC欠損ヒト肝細胞キメラマウスから分離した患者由来ヒト肝細胞は，正常ヒト肝細胞と比較して低いOTC酵素活性を維持していた（女児：58.2 ± 22.4%，男児：8.7 ± 5.8%）。また，コラーゲンコートプレート上で培養した患者由来肝細胞は，多角形の細胞形態，明瞭な細胞境界，および毛細胆管様構造の形成など，正常ヒト肝細胞と同様の形態学的特徴を示した。培養液中のアンモニアおよび尿素濃度を測定したところ，男児OTC欠損肝細胞キメラマウスから分離したヒト肝細胞では，アンモニア代謝能および尿素合成能がほぼ完全に欠如していることが明らかとなった。一方，女児由来OTC欠損肝細胞では尿素合成能が残存しており，アンモニアの蓄積も男児由来肝細胞と比較して軽度であったことから，残存OTC活性の存在が示唆された。さらに，代表的なアンモニアスカベンジャーであるフェニル酪酸ナトリウムおよび安息香酸ナトリウムで細胞を処理したところ，OTC欠損肝細胞の培養液中アンモニア濃度は有意に低下した［8］。

本研究により，移植されたOTC欠損症患者由来ヒト肝細胞がホストマウス肝内で生着・増殖可能であることが明らかとなった。一方，高アンモニア血症やオロト酸尿などのOTC欠損症に特徴的な疾患表現型は，患者由来肝細胞によって高度に置換されたキメラマウスにおいてのみ明瞭に認められた。これは，ヒト肝細胞置換率が低い状態では，残存する宿主マウス肝細胞が患者由来肝細胞における機能欠損を補完するためと考えられ，特定の遺伝性代謝疾患の表現型をキメラマウスで再現するためには，高いヒト肝細胞置換率が重要であることを示している。移植に用いる凍結ヒト肝細胞のホストマウス肝臓への生着・増殖能には，正常ヒト肝細胞であってもドナーロット間でばらつきが認められる。入手可能な細胞数が限られる患者由来ヒト肝細胞を用いる場合，継代移植によって患者由来肝細胞を *in vivo* で増殖させ，高置換率のキメラマウスを作製する方法は極めて有効な手段であると考えられる。さらに，これらのキメラマウスから再分離した患者由来肝細胞は，*in vitro* 培養条件下においてもOTC欠損症に特徴的な表現型を維持していた。したがって，本OTC欠損症ヒト肝細胞キメラマウスモデルは，*in vivo* におけるOTC欠損症の病態解析や治療法評価に利用できるだけでなく，希少な患者由来肝細胞を継続的に供給するための有用なプラットフォームとなり，同一OTC欠損症ドナー由来細胞を用いた大規模かつ再現性の高い *in vitro* 研究を可能にすると期待される。

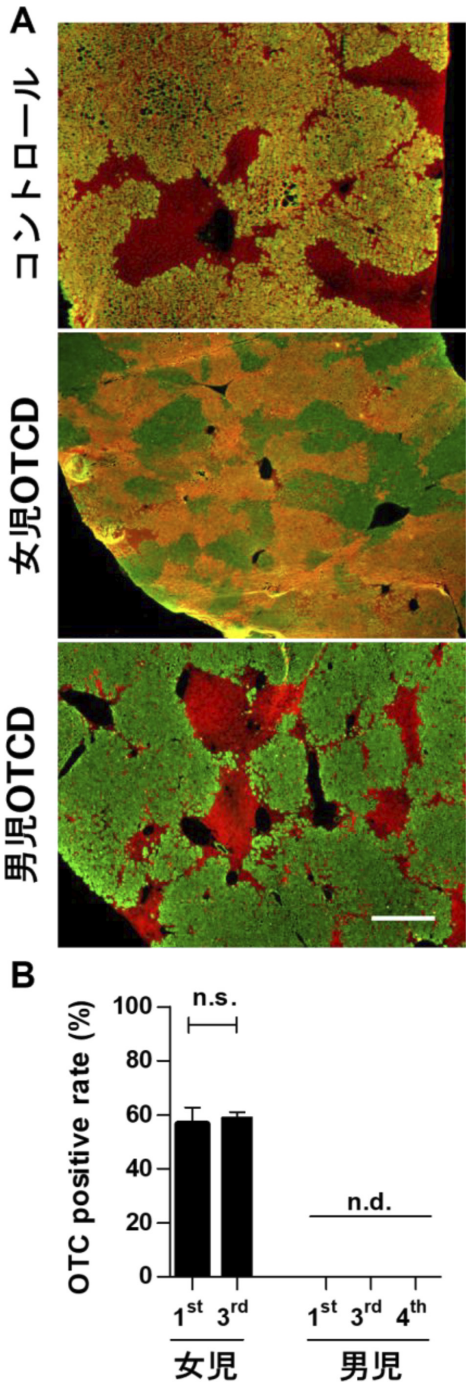


図3　OTC欠損症患者由来肝細胞キメラマウス肝の組織学的解析

（A）ヒト特異的マーカーhCK8/18（Green）およびOTC（Red）に対する蛍光免疫染色。hCK8/18およびOTCの共陽性細胞（Yellow）は，OTCを発現するヒト肝細胞を示す．Scale bar: 400 μm.

（B）hCK8/18陽性ヒト肝細胞領域に占めるOTC陽性領域の割合を，各継代数におけるキメラマウス肝臓のOTC陽性ヒト肝細胞率として解析した．統計解析にはStudent's t-testを用いた．n.s., not significant; n.d., not detectable.（文献［8］を基に著者改変）

5. おわりに

創薬初期には数万種類の化合物が評価されるが，最終的に承認薬となるのは1化合物程度であり，成功確率はおよそ0.003～0.01％と推定されている[9]。近年の *in vitro* ヒト細胞モデル，オルガノイド，Microphysiological System（MPS），*in silico* 解析に代表されるNAMsの発展はめざましく，動物実験への依存を低減する取り組みが世界的に推奨されている。しかしながら，全身レベルでの薬物動態，組織間相互作用，免疫応答などを完全に再現することは容易ではない。本稿で紹介したヒト化モデル動物は，NAMsによって得られた知見を個体レベルで検証するための橋渡しとして機能しうると考えている。将来的には，NAMsとヒト化モデル動物を相補的に活用することで，ヒト予測性の高い非臨床評価系が構築され，医薬品開発の成功確率の向上と実験動物使用数の削減の両立が実現されることを期待している。また，その実現に向けて，われわれは今後もよりヒトに近いモデル動物の開発を目指したい。

謝辞：本稿で紹介した「マウスCYP活性抑制キメラマウス」に関してはエーザイ株式会社との共同研究，「ヒトOTC欠損症キメラマウス」に関しては国立成育医療研究センターとの共同研究で実施された。共同研究者各位に厚く御礼申し上げる。

参考文献

1. Tateno C, Kawase Y, Tobita Y, Hamamura S, Ohshita H, Yokomichi H, et al. Generation of Novel Chimeric Mice with Humanized Livers by Using Hemizygous cDNA-uPA/SCID Mice. PLoS One. 2015;10(11): e0142145. doi: 10.1371/journal.pone.0142145.
2. Kato K, Ohbuchi M, Hamamura S, Ohshita H, Kazuki Y, Oshimura M, et al. Development of Murine Cyp3a Knockout Chimeric Mice with Humanized Liver. Drug Metab Dispos. 2015; 43(8): 1208–17; doi: 10.1124/dmd.115.063479.
3. Uehara S, Iida Y, Ida-Tanaka M, Goto M, Kawai K, Yamamoto M, et al. Humanized liver TK-NOG mice with functional deletion of hepatic murine cytochrome P450s as a model for studying human drug metabolism. Sci Rep. 2022; 12(1): 14907; doi: 10.1038/s41598-022-19242-0.
4. Yamazaki K, Kubara K, Sugahara G, Muto H, Yamamoto M, Mano Y, et al. Species-specific gene expression manipulation in humanized livers of chimeric mice via siRNA-encapsulated lipid nanoparticle treatment. Mol Ther Methods Clin Dev. 2025; 33(2): 101466; doi: 10.1016/j.omtm.2025.101466.
5. Gramignoli R, Tahan V, Dorko K, Skvorak KJ, Hansel MC, Zhao W, et al. New potential cell source for hepatocyte transplantation: discarded livers from metabolic disease liver transplants. Stem Cell Res. 2013; 11(1): 563–73; doi: 10.1016/j.scr.2013.03.002.
6. Srinivasan RC, Zabulica M, Hammarstedt C, Wu T, Gramignoli R, Kannisto K, et al. A liver-humanized mouse model of carbamoyl phosphate synthetase 1-deficiency. J Inherit Metab Dis. 2019; 42(6): 1054–63; doi: 10.1002/jimd.12067.
7. Bissig-Choisat B, Wang L, Legras X, Saha PK, Chen L, Bell P, et al. Development and rescue of human familial hypercholesterolaemia in a xenograft mouse model. Nat Commun. 2015; 6: 7339; doi: 10.1038/ncomms8339.
8. Sugahara G, Yamasaki C, Yanagi A, Furukawa S, Ogawa Y, Fukuda A, et al. Humanized liver mouse model with transplanted human hepatocytes from patients with ornithine transcarbamylase deficiency. J Inherit Metab Dis. 2021; 44(3): 618–28; doi: 10.1002/jimd.12347.
9. Paul SM, Mytelka DS, Dunwiddie CT, Persinger CC, Munos BH, Lindborg SR, et al. How to improve R&D productivity: the pharmaceutical industry's grand challenge. Nat Rev Drug Discov. 2010; 9(3):203–214. doi: 10.1038/nrd3078.

特　集：動物実験代替法の現状と課題 —肝臓を例に—

創薬・安全性評価のための *in vitro* 肝臓モデルの構築と応用

西川昌輝
酒井康行
東京大学大学院　工学系研究科化学システム工学専攻

1. 創薬開発のパラダイムシフトと動物実験・NAMsの相補性

医薬品開発は，1つの新薬を世に送り出すまでに10年から15年以上の歳月と10億ドルを超えるともいわれる多額の資金を投じる高リスク・高リターンなプロセスである［1, 2］。しかしながら，非臨床試験を突破して第I相臨床試験へと進んだ開発候補化合物のうち，最終的に製品化に至る割合はわずか10％程度にとどまり，90％以上が脱落（attrition）しているという深刻な現実に直面している［1, 3］。この高い臨床失敗率の主な要因は，ヒトにおける臨床有効性の欠如（約40～50％）および予期せぬ毒性の発現（約30％）である［1, 4］。

このような開発終盤での不承認や中断は，「translational failure（翻訳の失敗）」として生命科学・製薬界全体の構造的課題となっている［3, 5］。従来の非臨床評価は，主に組織培養ポリスチレン（TCPS）上での2次元（2D）細胞培養アッセイと，マウスやラット，イヌ，サル等の実験動物を用いた *in vivo* 試験によって支えられてきた［6, 7］。特に動物実験は，薬物の全身動態や複数臓器にまたがる薬効・毒性を個体レベルで評価する手段として，医薬品の有効性・安全性の確保に重要な役割を果たしてきた。一方で，従来の細胞培養アッセイ系の生理学的再現性には限界があり，また実験動物とヒトとの間にも，標的受容体の発現パターンや親和性，薬物代謝酵素のアイソフォーム，シグナル伝達系，さらには免疫応答などに無視できない種差が存在する［3, 5］。歴史的にも，カニクイザルを用いた前臨床試験では予測されなかった重篤なサイトカインストームをヒトで引き起こした抗CD28スーパーアゴニスト抗体TGN1412の事例［8, 9］や，サリドマイドの催奇形性，アスピリンの毒性などにみられる顕著な種差は，動物実験から得られる知見をヒトへ外挿する際の課題を示している［2, 10］。さらに近年の創薬においては，低分子医薬のみならず，抗体医薬，二重特異性抗体，核酸医薬，遺伝子・細胞治療製品といった新規モダリティ（New therapeutic modalities）が台頭している［6, 11］。これらの分子は極めて高いヒト標的特異性を有する反面，実験動物の相同タンパク質とは交差反応を示さない，あるいは標的そのものが動物に存在しない場合もあり，適切な動物種を選択することが困難となるケースが生じている。そのため，従来の動物実験のみではヒトにおける薬効や安全性を十分に評価することが困難な場合も増えており，ヒトへの外挿性を補完する新たな評価手法の必要性が高まっている［5, 6］。

こうした背景のもと，米国食品医薬品局（FDA）や欧州医薬品庁（EMA）をはじめとする各国の規制当局は，安全性・有効性評価の科学的妥当性を向上させつつ，動物実験の改善・削減・置換（3Rs）を推進するため，New Approach Methodologies（NAMs：次世代評価法）の導入を進めている［6, 11］。米国では，FDAが2017年に公表した「Predictive Toxicology Roadmap」において，マイクロ生理学的システム（MPS: Microphysiological Systems / Organ-on-a-chip）等の先進的技術の活用を打ち出し，2022年に成立したFDA Modernization Act 2.0では，MPS，*in silico* モデル，細胞ベースアッセイ等を非臨床評価に活用するための法的枠組みが明確化された［6］。さらに2025年には，抗体医薬等の評価における動物実験要件を段階的に削減・代替するロードマップがFDAから示されるなど，NAMsの実装に向けた動きが加速している［12］。欧州においても，3Rs原則に基づいてNAMsを規制的意思決定へ統合する取り組みが進められている。さらに，OECDにおける試験ガイドラインの整備やISO等による標準化など，NAMsを非臨床評価体系へ組み込むための国際的な環境整備が進展している［6, 11］。

しかしこのような動向は，直ちに動物実験をNAMsに置き換えることを意味するものではない。動物個体を用いた試験は，複数臓器間の相互作用や免疫・神経・内分泌系を含む全身性の応答，さらには薬物の吸収・分布・代謝・排泄を統合的に評価できるという重要な特徴を有しており，現時点でこれらを単一の *in vitro* あるいは *in silico* モデルによって完全に再現することは困難である。一方，ヒト細胞を用いたNAMsは，種差の影響を低減し，ヒト特異的な薬効・毒性を評価できることに加え，特定の細胞・組織や物理化学的環境を精密に制御することで，そ

の作用機序を詳細に解析できるという異なる強みを有する。したがって今後は，評価すべき現象や開発段階，Context of Use（CoU）に応じて，*in silico*，*in vitro*，*in vivo* の各評価系から得られる情報を相互補完的に活用することが重要となる。次節からは NAMs の一つである *in vitro* 臓器モデル，特に薬物代謝および毒性評価において中心的な役割を担う肝臓を対象として，我々が進めてきた培養モデルについて紹介する。

2. *in vitro* 肝臓モデルにおける酸素供給の重要性

医薬品開発や安全性・薬効評価において，肝臓は薬物代謝および毒性評価の中心であり，精緻な *in vitro* 評価系の構築は最重要課題の一つである。ヒトや実験動物から単離された肝細胞（Primary Hepatocytes）は，薬物代謝酵素（CYP450 等）やトランスポーター群を保持するモデルとして多用されている［14］。しかし，肝細胞は生体外へ取り出された直後から，肝特異的な形態および機能を急速に喪失する「脱分化」という深刻な問題に直面する。

この機能低下を引き起こす主因として，細胞間相互作用や液性因子の欠如に加え，酸素供給不足が挙げられる。肝臓は生体内で極めて高い代謝活性を担う臓器であり，肝細胞は非常に高い酸素消費速度（OCR）を示す［14］。しかし，従来の TCPS 製プレート等を用いた静置培養系では，細胞への顕著な酸素供給不足が生じており，これが肝細胞の生理的機能を歪める大きな原因となっていた。

従来の静置培養系において，酸素は空気界面から数ミリメートルの厚さを持つ培養液層を拡散によって通過し，底面に接着した細胞へと供給される。この液層を通じた物質移動フラックスは，次の Fick の法則によって計算できる。

$$J_A = -D\frac{dC_A}{dx}$$

J_A：物質 A のフラックス［mol m^{-2} s^{-1}］
D ：拡散係数［m^2 s^{-1}］
C_A：物質 A の濃度［mol m^{-3}］
x ：拡散方向の距離［m］

一般的な TCPS プレート（液深 2.5 mm）において，大気圧酸素分圧（約 20%）下，細胞直上の酸素分圧が仮に 0%（完全な枯渇状態）になったと仮定した際の理論上の最大酸素供給フラックスは，Henry の法則に基づく酸素溶解度を考慮し，およそ 14 pmol cm^{-2} s^{-1} と計算される。これに対し，1.0 × 10^5 cells cm^{-2} のおよそコンフルエントに相当する密度で播種された肝細胞が必要とする OCR は，接着時には約 90 pmol cm^{-2} s^{-1}，接着後でも約 40 pmol cm^{-2} s^{-1} に達する。すなわち，培養液層中の拡散のみに依存する従来の静置培養系では，酸素供給量は物理的限界として肝細胞の酸素要求量を大きく下回り，細胞は低酸素状態に陥る。この供給律速による低酸素環境は，単に細胞の生存率を低下させるだけでなく，細胞のエネルギー代謝を劇的に改変する。酸素供給が制限された肝細胞は，ミトコンドリアでの電子伝達系による効率的な ATP 産生を行えなくなり，解糖系への依存度が高い代謝状態へとシフトする［14］。

この物理的限界を克服する簡便な解法が，培養底面からの直接酸素供給である。培養基材として高酸素透過性材料を底面に配置し，細胞へ酸素を直接拡散させる。酸素透過性材料の拡散係数，酸素溶解度，膜厚などを考慮した底部からの最大酸素供給フラックスは，典型的な場合で 410 pmol cm^{-2} s^{-1} 程度に達し，肝細胞の酸素要求量を十全に満たすことができる。その結果，細胞直上の酸素分圧を生理的な範囲に保ちつつ，肝細胞本来の好気呼吸を維持することが可能となる（図 1）［7, 13–15］。

3. 酸素透過性材料を用いた高機能肝細胞培養系

我々はまず，代表的な高酸素透過性材料であるポリジメチルシロキサン（PDMS）に着目し，その表面改質技術と直接酸素供給を組み合わせることで，高機能肝細胞培養系を開発した。PDMS は優れた酸素透過性と微細加工性を有する一方で，表面が強い疎水性を示すため，吸着させた細胞接着タンパク質（コラーゲン等）が剥離しやすく，肝細胞が長期間接着できないという欠点があった。これに対し，我々は PDMS 表面を酸素プラズマ処理後，アミノシランおよび光反応性架橋剤を用いて，Type I コラーゲンを共有結合的に化学固定化する表面改質技術を確立した。このコラーゲン結合 PDMS プレート上でラット肝細胞を培養すると，細胞は脱落することなく自発的に集合・再組織化し，安定に底面へ接着した半球状のスフェロイド（ヘミスフェロイド：Hemispheroid）を形成した。底面からの直接酸素供給

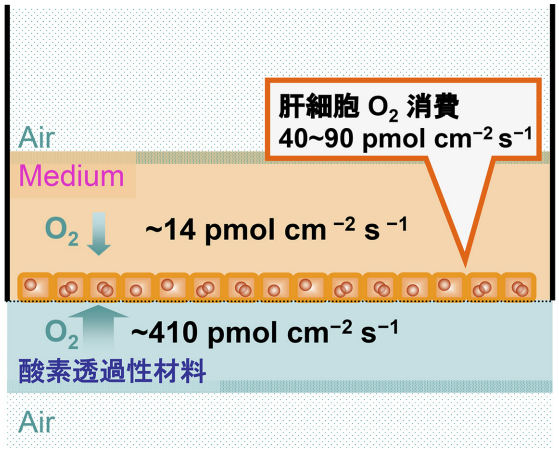


図 1　典型的な肝細胞培養条件下での酸素の供給・消費フラックスの比較

が確保されたヘミスフェロイド内では，中心部の細胞死が著しく抑制され，14 日以上にわたり高生存率と非常に高いアルブミン分泌能が維持された［7］。

次に，肝臓のミクロな構造に着目した。生体内の肝組織では，肝細胞（実質細胞）が非実質細胞（内皮細胞や星細胞等）と三次元的に密接に接触して存在している。*in vitro* においてこのミクロ構造を模倣するため，コラーゲン結合 PDMS プレート上でラット肝細胞とマウス線維芽細胞（NIH/3T3）の二層共培養系を構築した。従来の TCPS 上での共培養では，細胞密度の増加に伴い酸素不足がより顕著となり，数日で細胞層の剥離が生じた。これに対し，PDMS 膜を通じた十分な酸素供給下では，肝細胞と線維芽細胞がそれぞれの層構造を 13 日以上にわたって安定に保持した。この直接的な細胞接触による相互作用と，両細胞の活発な代謝を支える酸素供給の効果により，アルブミン分泌量は TCPS 上の共培養と比較して約 20 倍に増加した。また，アンモニア代謝能や尿素合成能も高レベルで維持された。さらに，共培養下でラット肝細胞の増殖によるとみられる高密度化も観察された［13］。

4. 酸素分圧と供給フラックスの制御による肝代謝ゾーネーションの再現

肝小葉内には，門脈から中心静脈に向かって，各種代謝酵素の発現パターンが変化する肝代謝ゾーネーション（Metabolic Zonation）が存在する。肝小葉内に形成される酸素環境の勾配は，肝代謝ゾーネーションを規定する重要な因子の一つと考えられているが，従来の静置培養ではこれらを生理学的な範囲内で制御することは困難であった。我々は，酸素透過性 PDMS プレートを用い，インキュベーター内の酸素分圧を変化させて，肝細胞の OCR を制御し，肝機能を測定した。その結果，十分な供給フラックス（High flux）を確保した上でインキュベーター内の酸素分圧を門脈周辺の酸素環境を模した 10％に設定すると，糖新生に関連する酵素（PCK1，G6PC 等）が強く誘導され，糖の補給・産生能を持つ門脈様表現型が誘導された。一方，酸素分圧を中心静脈周辺の低酸素環境を模した 5％～ 2.5％へ低下させると，β-カテニンシグナルの核内移行と，グルタミン合成酵素（GLUL）や CYP2E1 の上昇など中心静脈様の代謝型への推移がみられた。対照的に，底面からの酸素供給フラックスを制限した培養系では，分圧に関わらず虚血性の代謝応答を示すことがわかった。以上のように，*in vitro* で生体模倣的に肝代謝ゾーネーションを再現するには，適切な酸素分圧と十分な酸素フラックスの双方が不可欠であることを示した［15］。

5. 化合物吸着の克服：次世代酸素透過性プレート（InnoCell®）の開発

PDMS は優れた酸素透過性と微細加工性を誇り，MPS 開発のデファクトスタンダードとして用いられてきたが，創薬アッセイにおいては極めて深刻な課題を抱えている。それは，疎水性低分子化合物の収着である。創薬候補化合物の多くは高い疎水性を有しており，これらが PDMS の内部へ拡散・吸収されてしまうと，培地中の有効薬物濃度が減少し，CYP 代謝活性や薬物毒性の評価結果に大きな影響を与える。

この課題を解決すべく，我々は三井化学株式会社との共同研究により，高酸素透過性樹脂材料である 4- ポリメチル -1- ペンテン（PMP）を細胞培養基材として新たに導入・評価した。PMP は，その高い酸素透過性により肝細胞の酸素要求量を十分に満たした一方，Rhodamine 誘導体や各種 CYP 標準基質を用いた化合物暴露試験において，PMP への化合物収着量は従来の TCPS と同等であり，PDMS で見られた培地中濃度の急激な消失（Coumarin，Midazolam，Bufuralol 等で 80％以上が PDMS 内へ収着）がほぼ完全に抑えられることがわかった。さらに，ラット肝細胞をコラーゲンコート PMP プレート上で培養した結果，高レベルのアルブミン分泌および薬物代謝酵素群（*Cyp1a1*，*Cyp1a2*，*Ugt1a1*，*Bsep* 等）の高い遺伝子発現が 1 週間にわたり維持された。CYP450 基質カクテルを用いた代謝活性測定において，PMP プレートは基質の非特異吸着を起こすことなく，肝細胞本来の高い代謝能をある程度定量的に評価できることを示した。この PMP 製培養プレートは，現在「InnoCell®」の名称で製品化されており，創薬・安全性評価への応用が進められている［14］。

6. MPS への展開：臓器連関と胆汁排泄の連続モニタリング

酸素透過性材料や低収着基材を用いた培養系の開発・評価を基盤に，微細構造や灌流システムを有し，複数の臓器モデルの共培養も可能な MPS の開発も進めてきた。我々は，東海大学木村研究室，三井化学株式会社，住友ベークライト株式会社と共同で，PMP 製底面と，マイクロチャネル内に磁気駆動の微小撹拌子を備えたオンチップポンプ型多臓器 MPS デバイス（BioStellar® Plate）を開発している。生体では，経口投与された薬物は，小腸で吸収された後，門脈を経由して肝臓へと達し，代謝・排泄を受ける。さらに肝臓から分泌された代謝物を含む胆汁は腸管へと排泄され，その主要成分である胆汁酸の多くは腸管から再吸収される。そこで本システムに，ヒト iPS 細胞由来腸管上皮細胞およびキメラマウス由来ヒト成熟肝細胞（PXB 細胞）を搭載して実験を行った（図 2）。培養液灌流下で共培養したところ，底面からの直接酸素供給，灌流，および共培養の効果により，

PXB 細胞は単独培養を大幅に上回る高いアルブミン分泌能を示し，各種 CYP 活性（CYP1A2, CYP2B6, CYP3A4 等）やグルクロン酸抱合活性が向上し，ジクロフェナクの代謝プロファイルなどがより生体に近づくことがわかった。さらに，RNA-seq 解析や候補因子の添加・阻害実験の結果から，肝細胞からの胆汁酸や腸管上皮からのアラキドン酸などを介して腸肝相互作用が起こり，肝細胞の CYP 酵素群の転写・代謝活性が向上するという一連のフィードバックループの一端が明らかとなった。これは，生体の複雑な現象の一部を適切にモデル化することでその解析が可能になることを示す一例であると考える［16, 17］。

肝臓の主要な解毒・排泄経路である胆汁排泄は，薬物誘発性肝障害（DILI）や胆汁うっ滞（Cholestasis）の評価に不可欠である。しかし，従来のコラーゲンサンドイッチ培養法では，形成された毛細胆管が閉鎖管腔として細胞間に孤立しているため，胆汁が内部に溜まり込み，評価には EDTA 等のキレート剤を用いたタイトジャンクションの非生理的な開放をともなう破壊検査が必要であった。我々は，工学的な微細加工と生物学的な細胞極性制御を融合し，胆汁の連続排泄・非破壊回収を可能にするマイクロチャネル集積デバイスを開発した（図 3）。本デバイスは，酸素透過性底面上に放射状のマイクロチャネル構造をパターニングし，中央に胆汁回収ポートを備えている。さらに，名古屋市立大学荒川研究室と共同で，基材表面にタイトジャンクション構成タンパク質である CLDN1 をコートすることで，培養底面に開口型毛細胆管を自発的に誘導させた。これにより，肝細胞の頂端膜（Apical 側）トランスポーター（MRP2 や BSEP 等）から直接マイクロチャネル内へと胆汁

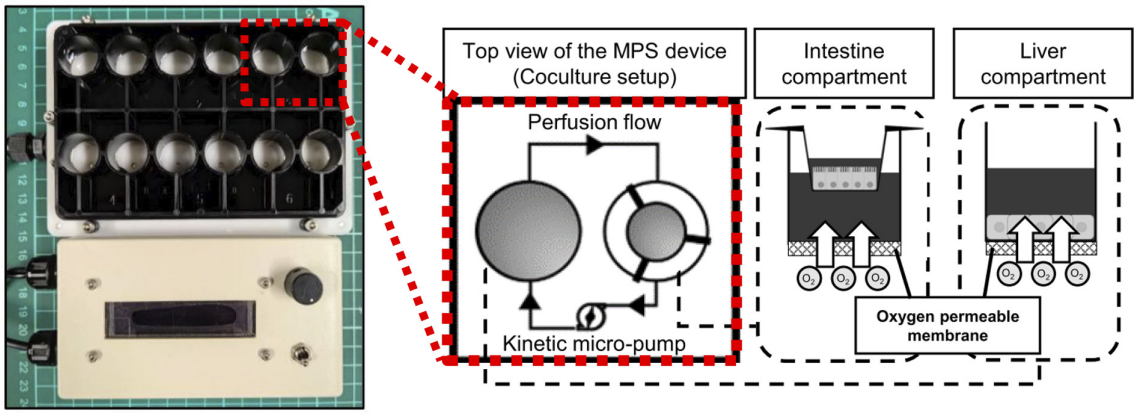


図 2　BioStellar® Plate を用いた灌流共培養実験概要

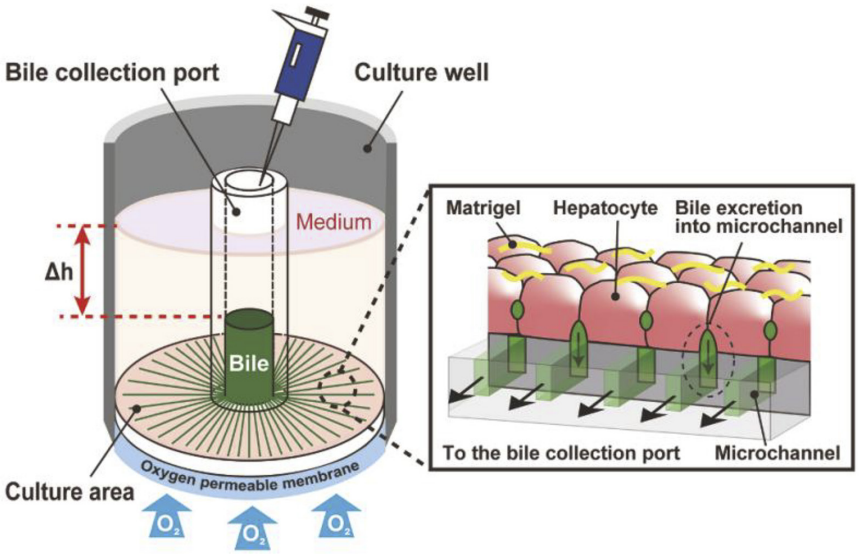


図 3　胆汁の連続排泄・非破壊回収を可能にするマイクロチャネル集積デバイス

酸および薬物代謝物が連続的に分泌され，中央ポートへ非常に高い濃度で集積させることに成功した。これにより，低クリアランス薬物の長期動態評価や，胆汁うっ滞性毒性メカニズムの経時的連続解析などが可能になると考える［18］。

7. まとめと展望

本稿では，創薬・安全性評価のための *in vitro* 肝臓モデルの高度化に向けて，我々がこれまで進めてきた酸素供給を基盤とする細胞培養技術および MPS への展開について紹介した。従来の静置培養系では，培養液中の拡散律速によって肝細胞への酸素供給が著しく制限され，細胞本来のエネルギー代謝や肝特異的機能が十分に発揮されない。我々は，PDMS や PMP などの酸素透過性材料を培養底面に用いて細胞へ直接酸素を供給することで，この物理的制約を解消し，肝細胞の高い機能を長期間維持できることを示してきた。さらに，酸素分圧と供給フラックスを独立して制御することによる肝代謝ゾーネーションの再現，低収着性と高酸素透過性を両立した InnoCell® の開発，多臓器 MPS（BioStellar® Plate）を用いた腸肝相互作用の解析，さらには胆汁の連続排泄・回収を可能とするデバイスへと研究を展開してきた。これらの成果は，生体内の複雑な環境をそのまま再現するのではなく，細胞機能を規定する重要な因子を抽出し，定量的に制御して培養系へ実装することが，生理学的に妥当な *in vitro* モデルを構築する上で重要であることを示している［7, 13–18］。

一方で，生体内の細胞を取り巻く微小環境を考えると，酸素はその一要素にすぎない。細胞のエネルギー代謝は，酸素供給のみならず，糖質，脂質，アミノ酸などの栄養素の種類と濃度によって大きく規定される。しかし，一般的な細胞培養では，生体内とは大きく異なる組成の培地が用いられ，特にグルコースを主要なエネルギー源とする代謝状態に偏っている。そこで現在我々は，酸素透過性プレートによって酸素供給律速を解消すると同時に，糖質，脂質，アミノ酸をより生体に近い組成で供給することで，酸素と栄養環境の双方から生体内のエネルギー代謝を再構築する新たな培養系の開発を進めている。キメラマウス由来ヒト成熟肝細胞を用いた検討では，生体肝と同様に脂肪酸をエネルギー源として利用することや，乳酸やアミノ酸から糖新生を行うことが示唆されている。また，HepG2 細胞においても，従来培養と比較して細胞増殖，グルコース消費および乳酸産生が抑制される一方，脂肪滴の蓄積や細胞あたりのタンパク質量の増加など，大きな代謝・細胞表現型の変化が観察されている。今後，これらの変化を詳細に解析することで，従来の培養環境そのものが細胞の代謝特性をどの程度規定してきたのかを明らかにするとともに，より生理的な代謝環境を再現した創薬・疾患研究プラットフォームへと発展させたい。

今後，こうした *in vitro* モデルを創薬・安全性評価に実装していく上では，個々のモデルの特性と適用限界を明確にし，CoU に応じて適切に活用することが重要となる。すべての生体現象を単一の *in vitro* モデルで再現することを目指すのではなく，特定の薬物応答や毒性メカニズムについて高いヒト予測性を有するモデルを構築し，*in silico* 解析や動物実験から得られる情報と統合して評価することが現実的である。このような相互補完的な評価体系は，非臨床試験の科学的予測性を高めるとともに，不要な動物実験の削減や実験条件の最適化を通じて 3Rs の推進にも寄与すると期待される［6, 11, 12］。

最終的には，実験動物研究が長年蓄積してきた比較生理学，病理学，薬理学の知見を，生体再現性を評価するための重要なベンチマークとして活用しながら，細胞生物学や生物工学に基づく NAMs を発展させていくことが重要である。生体内で細胞が置かれている環境を構成する要素を一つずつ理解し，それらを必要な精度で *in vitro* に再構築することで，従来の細胞培養では捉えることのできなかったヒトの生理・病態・薬物応答を解析できるようになると考えられる。動物実験と NAMs のそれぞれの強みを活かした相互補完的な評価体系の構築が，より予測性の高い創薬・安全性評価，さらには新たな治療法の開発につながることを期待したい。

参考文献

1) Sun D, Gao W, Hu H, Zhou S. Why 90% of clinical drug development fails and how to improve it? Acta Pharm Sin B. 2022;12(7):3049–3062. doi:10.1016/j.apsb.2022.02.002.
2) Hartung T. The (misleading) role of animal models in drug development. Front Drug Discov. 2024;4:1355044. doi:10.3389/fddsv.2024.1355044.
3) Leenaars CHC, Kouwenaar C, Stafleu FR, et al. Animal to human translation: a systematic scoping review of reported concordance rates. J Transl Med. 2019;17:223. doi:10.1186/s12967-019-1976-2.
4) Ewart L, Apostolou A, Briggs SA, et al. Performance assessment and economic analysis of a human Liver-Chip for predictive toxicology. Commun Med. 2022;2:154. doi:10.1038/s43856-022-00209-1.
5) Marshall LJ, Bailey J, Cassotta M, Herrmann K, Pistollato F. Poor Translatability of Biomedical Research Using Animals—A Narrative Review. Altern Lab Anim. 2023;51(2):102–135. doi:10.1177/02611929231157756.
6) Yamazaki D. Current status of MPS studies in domestic and overseas—introduction of cardiac MPS—.

Folia Pharmacol Jpn. 2025;160(2):87–91. doi:10.1254/fpj.24070.

7) Nishikawa M, Yamamoto T, Kojima N, Komori K, Fujii T, Sakai Y. Stable immobilization of rat hepatocytes as hemispheroids onto collagen-conjugated poly-dimethylsiloxane (PDMS) surfaces: importance of direct oxygenation through PDMS for both formation and function. Biotechnol Bioeng. 2008;99(6):1472–1481. doi:10.1002/bit.21690.
8) Schneider CK, Kalinke U, Löwer J. TGN1412—a regulator's perspective. Nat Biotechnol. 2006;24(5):493–496. doi:10.1038/nbt0506-493.
9) Vessillier S, Eastwood D, Fox B, et al. Cytokine release assays for the prediction of therapeutic mAb safety in first-in man trials—whole blood cytokine release assays are poorly predictive for TGN1412 cytokine storm. J Immunol Methods. 2015;424:43–52. doi:10.1016/j.jim.2015.04.020.
10) Bell J. Aspirin killed the cat: animal research models do not always apply to humans. Expert Opin Drug Metab Toxicol. 2019;15(9):683–685. doi:10.1080/17425255.2019.1652596.
11) U.S. Food and Drug Administration. FDA's Predictive Toxicology Roadmap. December 2017.
12) U.S. Food and Drug Administration. Roadmap to Reducing Animal Testing in Preclinical Safety Studies. April 2025.
13) Nishikawa M, Kojima N, Komori K, Yamamoto T, Fujii T, Sakai Y. Enhanced maintenance and functions of rat hepatocytes induced by combination of on-site oxygenation and coculture with fibroblasts. J Biotechnol. 2008;133(2):253–260. doi:10.1016/j.jbiotec.2007.08.041.
14) Nishikawa M, Ito H, Tokito F, et al. Accurate Evaluation of Hepatocyte Metabolisms on a Noble Oxygen-Permeable Material With Low Sorption Characteristics. Front Toxicol. 2022;4:810478. doi:10.3389/ftox.2022.810478.
15) Scheidecker B, Shinohara M, Sugimoto M, Danoy M, Nishikawa M, Sakai Y. Induction of *in vitro* Metabolic Zonation in Primary Hepatocytes Requires Both Near-Physiological Oxygen Concentration and Flux. Front Bioeng Biotechnol. 2020;8:524. doi:10.3389/fbioe.2020.00524.
16) Shinha K, Nihei W, Nakamura H, et al. A Kinetic-Pump Integrated Microfluidic Plate (KIM-Plate) with high usability for cell culture-based multi-organ microphysiological systems. Micromachines. 2021;12(9):1007. doi:10.3390/mi12091007.
17) Kurniawan DA, Leo S, Inamatsu M, et al. Gut-liver microphysiological systems revealed potential crosstalk mechanism modulating drug metabolism. PNAS Nexus. 2024;3(2):pgae070. doi:10.1093/pnasnexus/pgae070.
18) Tokito F, Arakawa H, Nakazono Y, et al. Continuous bile excretion from polarized hepatocytes on a microchannel-patterned device. Cell Rep Phys Sci. 2026;7(4):103229. doi:10.1016/j.xcrp.2026.103229.

特　集：動物実験代替法の現状と課題 —肝臓を例に—

農薬毒性試験データベースの構築と機序情報を活用したリードアクロスによる発がん性予測

吉成浩一
静岡県立大学　薬学部　衛生分子毒性学分野

1. はじめに

化学物質の安全性評価では，ラットなどを用いた反復投与毒性（repeated-dose toxicity：RDT）試験や2年間の発がん性試験が重要な役割を果たしている。一方，動物愛護の観点に加え，試験に必要な時間や費用，さらにヒトへの外挿性の観点からも，従来の動物試験だけに依存しない評価体系の構築が世界的に求められている。例えば，欧州（EU）では，化粧品に関する動物試験が段階的に禁止され，2013年には動物実験データに基づく化粧品製品の販売が完全に禁止された。米国環境保護庁（EPA）でも，2035年までに哺乳類を用いた試験を廃止する目標が掲げられている。さらに医薬品分野では，2023年1月のFDA Modernization Act 2.0の施行により，動物試験に限定されない非臨床評価を利用できる法的枠組みが整備された。これらの背景から，生体模倣システム（Microphysiological System: MPS）などを含む *in vitro* 試験系や人工知能（AI）を活用した *in silico* モデルなどによる予測・評価技術の開発が精力的に進められている。これらの技術は，既存の動物実験を利用した評価系とは異なるものとして，New Approach Methodologies（NAMs）と呼ばれている。

私たちの研究室では，特にRDTや発がん性のような機序や表現型が複雑な毒性の動物実験代替法の開発を最終目標とし，これら毒性の機序に関する研究に加えて，予測・評価に資する *in vitro* および *in silico* 手法に関する研究に取り組んでいる。最近は特に，既存の動物試験データを基盤として，化学構造情報や毒性発現機序関連情報を統合した評価系の1つである「リードアクロス」と呼ばれる手法に関する研究を積極的に進めている。本稿では，それらに関する最近の研究成果を紹介する。

2. 反復投与毒性・発がん性試験結果のデータベース構築

化学物質の毒性予測・評価を行うには，学習セットとなる信頼できる毒性試験データベースが不可欠である。そこで私たちは，食品安全委員会が公開している農薬評価書から，ラットの90日間RDT試験および2年間RDT・発がん性試験について，毒性所見と投与量に関する情報を体系的に抽出し，データベースを構築してきた［1］。最終的には，90日間試験では雄で355農薬・456試験，雌で353農薬・453試験，2年間試験では雄で369農薬・437試験，雌368農薬・434試験のデータを収集し，最近その特徴を解析して報告した［2］。

データベース化にあたっての最大の課題は，毒性所見の整理であった。同じような変化であっても，評価書によって表現が異なる場合が多く認められたためである。そこで，毒性病理の専門家の協力を得て，同義あるいは類似した所見を統合する日本語シソーラスを構築し，最終的に3階層のカテゴリー体系を構築して1,092エンドポイントに整理した。具体的には，第1レベルは臓器・組織などの大分類，第2レベルは所見や検査項目の中分類，第3レベルは細胞部位や病変の細かな特性を表す小分類で，それぞれ3桁，2桁，1桁のコードを付し，各エンドポイントに予備の1桁のコードを加えた7桁のコードを付与した。

構築したデータベースを用いて農薬のRDT試験の特徴を解析した結果，90日間および2年間試験のいずれにおいても，肝臓，腎臓，甲状腺，脾臓が主要な非腫瘍性標的臓器であり，2年間発がん性試験の腫瘍病変については，肝臓，甲状腺，精巣，子宮が主要な標的臓器であった。

また，農薬の作用機構分類（RACコード）を活用したグループごとの毒性プロファイルを比較したところ，教科書的によく知られている，有機リン系殺虫剤によるコリンエステラーゼ活性低下が特徴的に認められたほか，一部の殺菌剤クラスでは肝臓関連所見の頻度が高いことが明らかになった。これらの結果から，毒性データベースの構築とその特徴解析は，新たな毒性メカニズムの探索の基盤にもなり得ると考えている。

これらの解析を通じて特に興味深かったのは，毒性の性差である。例えば，甲状腺腫瘍では，雄で腫瘍を誘発した農薬は37種類あり，そのうち23種類は雄でのみ陽性であった。一方，雌で陽性となった18種

類のうち 14 種類は雄でも陽性であった。また，肝腫瘍については，雄および雌ではともに 22 種類の農薬が陽性であったが，雌雄ともに腫瘍を誘発した農薬は 9 種類にとどまり，13 種の農薬が雄特異的に，また異なる 13 種の農薬が雌特異的に腫瘍を誘発した。これらの性差の原因は明らかではないが，ラット肝臓における薬物代謝酵素の発現の性差や，それに伴う代謝物生成の違いが一つの要因である可能性がある。

そこで最近では，代謝に伴う毒性の変化を検討するため，農薬の代謝物・分解物の RDT 試験結果を収集し，上記のデータベースを拡張している。これまでに得られた親化合物－代謝物のペアの 90 日間試験における毒性所見の違いを解析したところ，多くの場合では代謝物の毒性は軽減または消失しているものの，代謝物のほうが低い無毒性量（NOAEL）を示す場合，代謝物では親化合物では認められなかった毒性所見（異なる臓器毒性など）が認められる場合があることが分かった。現在，化学構造と毒性変化の関係性について解析を進めている。

これらの解析結果は，毒性試験担当者・評価者の経験知を体系化・定量化したものであり，有益なリソースになると思われる。さらに，解析で明らかになった性差や代謝に伴う毒性変化は，毒性予測を行う上で重要な課題を示唆していると考えている。例えば，上述のように毒性試験データベースは予測・評価モデルを構築する際の学習セット・正解データとなるが，ある化学物質の特定の毒性所見に性差がある場合，どちらのデータを採用すべきか検討する必要がある。現時点で私たちは雌雄いずれかで陽性であった場合，その化合物には当該毒性所見を引き起こすポテンシャルがあると考えて，雌雄のデータを統合して利用している。別の観点として，機械学習モデルでは説明変数として化学構造情報を使う場合が多いこと，*in vitro* 試験には代謝を考慮しない試験系が多く用いられていることがある。*in vitro* 試験系では古くから指摘されている課題であるが，対象とする毒性が代謝物による場合，親化合物の構造情報による予測や *in vitro* 評価が難しい可能性を示している。近年，機械学習をはじめとする AI 技術の発展は目覚ましいにもかかわらず，未だ代謝物の構造を予測することは困難であるが，代謝を含む体内動態の考慮が，毒性の *in silico* 予測および *in vitro* 評価の精度向上につながると思われる。

3. リードアクロスの概要とその課題

上述のとおり，RDT や発がん性のような複雑な毒性を動物実験に依存せずに予測する手法として，リードアクロスに世界的な期待が寄せられている。リードアクロスとは，安全性試験が実施されていない物質（ターゲット物質）の毒性を，化学構造や物理化学的性質，または体内動態やタンパク質反応性，遺伝子発現変動プロファイルなどの生物学的性質が類似した単独または複数の物質（参照物質またはソース物質）の毒性試験結果から「類推」する手法である。リードアクロスは，これまでに行われた多くの動物実験の結果を活用するものであり，概念は比較的単純であることから，多くのケーススタディ研究が実施されている。また，欧州化学品庁（ECHA）や欧州食品安全機関（EFSA），OECD はガイドラインを整備し，レギュラトリーサイエンスでの実用化が進められている。しかし，本手法にはいくつかの本質的な課題がある。一つは，客観性と再現性の問題である。具体的には，「類似」の判断基準が不明確であり，専門家の主観的な経験や直感（エキスパートジャッジ）に依存するため，評価者ごとに結果が異なる危険性がある。もう一つは，化学構造と毒性の関連性の問題である。既存のリードアクロス手法では，フィンガープリント等を利用した化学構造類似性に重きがおかれているが，分子内のわずかな構造の違い（メチル基の有無，ハロゲンの置換位置の違いなど）により，標的タンパク質との相互作用が大きく変化し，薬理作用や毒性が大きく異なることはしばしば認められる現象である。そのため，構造情報のみに基づく類似性評価では，リードアクロスによる毒性予測は難しく，特に RDT や発がん性の予測には，構造類似性に加えて，毒性発現機序情報などに基づいた *in vitro* 試験結果で生物学的類似性を客観的に証明する，*in silico*・*in vitro* 統合型のアプローチが求められている。

これらの背景から私たちの研究室では，化学構造（*in silico*）情報によってソース物質の候補物質を広く選択し，その後，毒性発現に関連する *in vitro* 試験の結果を用いて生物学的に妥当な物質だけを絞り込む「2 段階リードアクロス」（図 1）に関して，上述のラット発がん性試験データベースを活用した研究を進めている。

4. 2 段階リードアクロスによる発がん性予測

4-1. 細胞傷害関連腫瘍

最初のケーススタディとして，私たちはラットにおける鼻腔，胃，膀胱・尿路の腫瘍に着目した。OECD が公開している adverse outcome pathway（AOP）のデータベースである AOP-Wiki によれば，これらの腫瘍では，化学物質による持続的な上皮細胞傷害と，それに続く再生性細胞増殖が重要な役割を果たすと考えられており［3–5］，比較的単純な細胞傷害性試験の結果を利用できるのではないかと考えたためである。

具体的には，まず上記のラット発がん性試験データベースから，主要な発がん性標的臓器である肝臓，甲状腺，精巣，卵巣，子宮，乳腺，鼻腔，胃，膀胱・尿路のいずれかに良性腫瘍または悪性腫瘍を誘発した 80 物質と腫瘍を誘発しなかった 46 物質を，試薬の購入可能性も考慮して被験物質群として設定した。

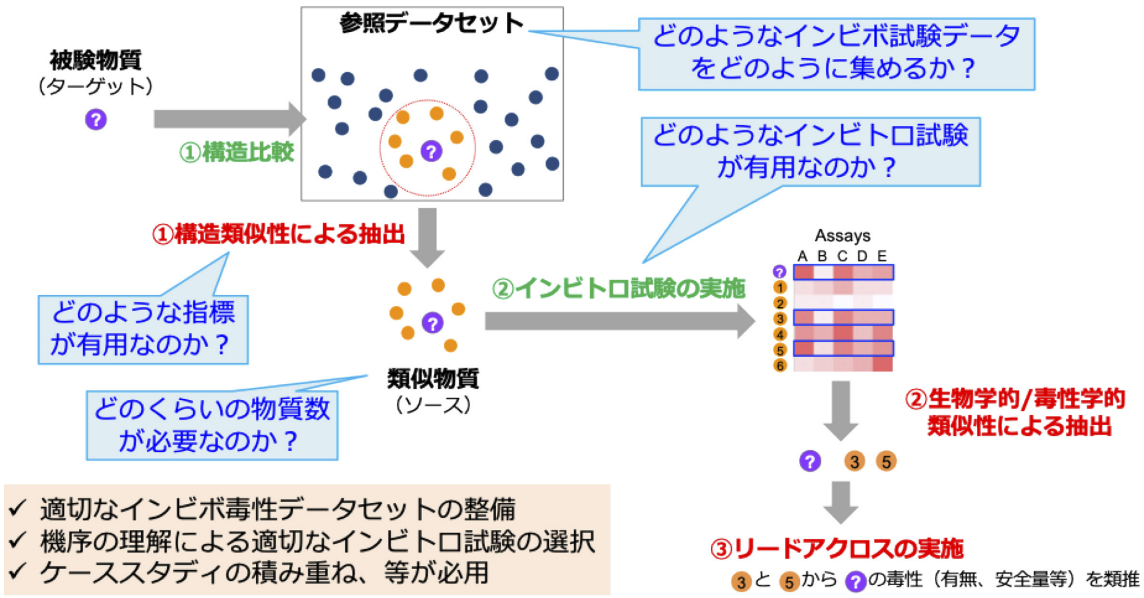


図 1　*In silico* 情報および *in vitro* 試験結果を統合した 2 段階リードアクロスの概要

次に，これら農薬の化学構造情報（SMILES）を収集し，alvaDesc ソフトウェアによる分子記述子の算出と，分子記述子に基づく物質間距離（Euclid 距離を採用）による類似性評価を実施した。他方，126 物質について，ヒト肝癌由来の HepG2 細胞を利用して CellTiter アッセイ（細胞内 ATP レベル測定），LDH アッセイ（培地中逸脱酵素レベル測定）および GSH アッセイ（細胞内の還元型グルタチオンレベル測定）を実施した。試験結果は，実験誤差等を考慮した閾値に基づき陽性・陰性の 2 値とした。

実際に行った解析方法は次の通りである。まず，ターゲット物質と化学構造が類似する物質（一次ソース物質）を抽出した。この際，生物学的類似性の評価を行うことから，構造類似性の基準を比較的緩め，全物質ペアの距離の分布の第一四分位を類似性の閾値とした。次いで，一次ソース物質の中から，ターゲット物質と試験結果が一致している物質のみを最終ソース物質として絞り込み，最終ソース物質の標的腫瘍の陽性率がデータベース全体の陽性率を上回った場合にターゲット物質についても陽性と判定することとした。対象として，一次ソース物質のみでの予測も行い，ソース物質選択およびリードアクロス予測における *in vitro* 試験結果の使用の有用性を評価した。また，本研究では，126 物質のうち 1 物質をターゲット物質，残り 125 物質をソース物質候補とする解析を，126 物質それぞれをターゲットとして繰り返し，得られた全結果から最終的な予測精度を算出した。なお，解析においては，鼻腔，胃，膀胱・尿路をまとめた「細胞傷害性腫瘍」も定義して解析対象とし，腫瘍の陽性率は，それぞれ 4.0%，4.8%，5.6% および 12.7%であった。

解析の結果，化学構造情報で選択した一次ソース物質を用いて予測した場合，感度と特異度の平均値である balanced accuracy（BA）は 0.294 ～ 0.582 であったが，細胞傷害性に関する *in vitro* 試験データを用いてソース物質を絞り込んだところ，BA は 0.752 ～ 0.821 まで向上し，特に特異度の上昇幅が大きかった。また，単独の試験結果よりも複数の試験結果を統合してソース物質を絞り込むことでより高い精度が得られた。以上の結果から，非遺伝毒性発がん性のリードアクロス予測において，機序に基づく試験結果を利用したソース物質の選択が有用であること，また細胞傷害性という一つのエンドポイントにおいても複数の評価指標を組み合わせることが有用であることを示すことができた［6］。

4-2. 甲状腺腫瘍

次に，甲状腺腫瘍の予測に取り組んだ。ラットの甲状腺腫瘍はさまざまな機序により起こるが，主要経路の 1 つとして，核内受容体の活性化を介した肝臓での甲状腺ホルモンの代謝酵素誘導・クリアランス亢進と，それに続く血中 T_4 低下，甲状腺刺激ホルモン（TSH）上昇，甲状腺ろ胞細胞の増殖を経て，濾胞細胞腺腫・腺がんに至る経路が AOP 162 として整理されている［7］。私たちの研究室は，核内受容体を介した薬物代謝酵素誘導の研究に長く従事しており，それらの実験系が利用可能であることも，甲状腺腫瘍に着目した理由の一つである。

薬物代謝酵素誘導には，芳香族炭化水素受容体である AHR や異物応答性の核内受容体である PXR，CAR，PPARα が重要な役割を果たしている。そこで，被験物質について，培養細胞を用いたレポーターアッ

セイによる転写因子活性化作用ならびにラット肝細胞における *Cyp1a1*（AHR 標的遺伝子），*Cyp2b1*，*Cyp3a1*（ともに CAR/PXR 標的遺伝子）および *Cyp4a1*（PPARα 標的遺伝子）の mRNA レベルの誘導作用を評価し，細胞傷害性試験の場合と同様に閾値を設定して 2 値化した。なお，化学構造情報に基づく類似性評価，一次ソース物質の選択は細胞傷害関連腫瘍の場合と同様に行った。本データセットにおける甲状腺腫瘍陽性率は 28%である。

解析の結果，化学構造情報のみを用いたリードアクロスにおける BA は 0.566 であったが，*in vitro* 試験データを組み合わせることで BA は 0.722 まで向上した。特に，*Cyp2b1* および *Cyp3a1* 発現誘導と PXR 活性化作用を組み合わせた条件では，特異度の大きな改善が認められた。以上の結果から，甲状腺腫瘍の予測においても機序に基づく *in vitro* 実験結果の利用が有用であることが示された［8］。一方で，予測精度の向上幅は限定的であった。これは，上述の通り，ラットでは様々な機序により甲状腺腫瘍が生じるが，本解析では AOP 162 でまとめられている甲状腺ホルモンの代謝・クリアランス亢進の機序のみを利用していることに起因すると考えている。今後，ヨウ素取り込みトランスポーター阻害（AOP 110）や甲状腺ペルオキシダーゼ阻害（AOP 119）などの他の腫瘍形成機序に関連する *in vitro* 試験の追加が，精度向上につながるか否かを検討する必要がある。さらには，上述のとおり甲状腺腫瘍の形成には大きな性差が認められることから，代謝や体内動態を考慮した評価も必要かもしれない。

現在は，甲状腺腫瘍と同様に核内受容体がその発現に関与し，発がん性試験でも高頻度で認められる肝腫瘍を対象とした解析を進めている。農薬による肝腫瘍の形成には核内受容体 CAR の関与が大きいことが知られており［9, 10］，実際これをサポートする結果が得られつつある。

5. おわりに

リードアクロスは，基本的に類似物質からターゲット物質の毒性を推測する手法である。しかし，化学構造の類似性だけでは，複雑な毒性の発現機序に関連するような生物学的特徴を十分に反映できない場合が多い。今回の研究では，まず化学構造情報によってソース物質の候補を広く抽出し，続いて対象とする毒性の発現機序に関連した *in vitro* 試験結果を利用して候補を絞り込むことで，予測精度を向上させることができた。これは，AOP として整理されている毒性発現機序の情報が，リードアクロスを利用した毒性予測に有用であること，すなわち適切な *in vitro* 試験を選択することで，生物学的類似性を評価可能であることを示すものである。もちろん，今回紹介した研究成果はラット発がん性を対象とした概念実証を目的としたケーススタディであり，リードアクロスにより 2 年間のラット発がん性試験を代替するには，非常に多くの基礎研究とケーススタディが必要である。以下にリードアクロスを利用した毒性予測の課題を述べる。

第一の課題は，代謝の考慮である。今回構築した農薬毒性データベースは，親化合物と代謝物・分解物の毒性情報を含む形へと拡張を進めているが，代謝物そのものを対象とした解析はまだ十分ではない。すでに行っている解析からも，代謝によって毒性が軽減あるいは消失するだけでなく，親化合物では認められない毒性所見が代謝物で新たに現れたり，代謝物の方が低い NOAEL を示したりする例がある。このことは，親化合物の化学構造だけを用いた *in silico* 予測や，代謝能を十分にもたない *in vitro* 試験だけでは，実際の毒性を捉えきれない可能性を示している。今後は，代謝物生成を考慮した *in silico* 予測に加え，代謝能を備えた *in vitro* モデルなどを組み合わせた毒性評価系を構築・利用する必要がある。

第二の課題は，機械学習モデルなどと同様に，リードアクロスの適用領域（applicability domain: AD）を明確にすることである。リードアクロスは，ターゲット物質の周辺に適切なソース物質が存在することを前提としている。今回の研究においても，豊富なソース物質が存在するターゲット物質と限られた物質しか存在しない，あるいは化学構造的に類似した物質が存在しないターゲット物質が存在した。この課題の解決には発がん性試験結果の拡張がもっとも有効と考えられるが，動物実験の削減が求められている社会状況を考えるとデータベースの大幅な拡充は現実的ではない。したがって，化学構造だけでなく，生物学的特徴の類似性評価における AD の定量的な定義方法を検討し，リードアクロスにより「予測できる物質」だけでなく「予測対象とすべきでない物質」を適切に判定できる仕組みを構築する必要がある。

第三の課題は，*in vitro* と *in vivo* での生物活性の定量的関連付けである。細胞傷害性試験やレポーターアッセイで影響が認められる濃度と，ラット毒性試験での曝露濃度は必ずしも一致しない可能性がある。今回の *in vitro* 試験では比較的高濃度で被験物質を曝露し，細胞影響等を評価したが，RDT・発がん性試験での組織内濃度が *in vitro* 試験で影響が認められた濃度まで上昇するか否かは明確ではなく，*in vitro* で認められた作用が，ラット個体で認められるとは限らない。今後は，*in vitro* で得られた濃度–反応関係を，生体内での曝露量・用量と関連付ける QIVIVE（quantitative *in vitro* to *in vivo* extrapolation）などを統合した（半）定量的な類似性評価が重要になると考えている。

第四の課題は，複数の異なる機序情報の統合である。甲状腺腫瘍や肝腫瘍など，多くの腫瘍は複数の発現機序によって生じる。したがって，一つの AOP や一群の *in vitro* 試験だけですべての発がん性を説明

できるとは考えにくく，複数の機序関連試験結果を組み合わせて類似性評価を行う必要がある。機序 A の類似性評価による予測，次いで機序 B の類似性評価による予測などを連続させる決定木などを組み合わせた解析が有効かもしれない。甲状腺腫瘍や肝腫瘍をモデルとして解析を進めたいと考えている。

最後の課題は，複数エンドポイントへの対応である。RDT 試験や発がん性試験は全身毒性評価であり，これらの試験の代替法を開発するには，単一の毒性エンドポイントの評価では不十分であり，複数の毒性エンドポイント，すなわち毒性プロファイルの評価が必要である。現在は，各臓器腫瘍を個別に予測し，それらの結果を横並びにすることで評価物質の毒性プロファイルを明らかにする方針で研究を進めているが，毒性プロファイルを予測エンドポイントとする検討も開始している。両アプローチの有用性と限界点を明らかにしたいと考えている。

RDT 試験や発がん性試験のような複雑な表現型を有する試験を，単純に単一の試験で置き換えることは現実的に不可能であると思われる。これまでの動物実験で得られた知見を，化学構造，生物学的応答，毒性発現機序，代謝･体内動態といった要素に分解し，それぞれの要素を評価する既存手法について，不足している部分は新たな NAMs として開発し，高度化が必要な部分は改良していく必要がある。最終的には，それらの結果を AI などを活用して再統合することで，より科学的・客観的で説明可能な毒性評価体系が構築できると考えている。これまで培ってきた毒性学，薬物代謝学，計算化学研究の知見を基盤としてこれらの接点をさらに追究し，動物実験から得られた知識を次世代の安全性評価へつなぐ研究を進めていきたいと考えている。

参考文献

1. 増田　茜，増田雅美，川野拓歩，橘内陽子，中山晴香，中島宏之，小島弘幸，北村繁幸，浦丸直人，保坂卓臣，佐々木崇光，吉成浩一．肝細胞肥大の毒性学的特徴の解明に向けた農薬のラット反復投与毒性試験結果データベースの構築．薬学雑誌．137(5): 611–622, 2017.
2. Harakawa Y, Shibata M, Suzuki H, Takahashi N, Shiga A, Mizuno K, Hosaka T, Shizu R, Takeshita J, Yoshinari K. Characterization of the toxicological findings from 90-day and 2-year repeated-dose toxicity studies of pesticides in rats. *J Toxicol Sci*. 50(10): 523–546, 2025.
3. AOP: 136: Intracellular Acidification Induced Olfactory Epithelial Injury Leading to Site of Contact Nasal Tumors. AOP-Wiki. https://aopwiki.org/aops/136（2026 年 9 月 2 日最終閲覧）
4. AOP 115: Epithelial cytotoxicity leading to forestomach tumors (in mouse and rat). AOP-Wiki. https://aopwiki.org/aops/115（2026 年 9 月 2 日最終閲覧）
5. AOP 121: Urinary bladder calculi leading to urothelial papillomas and carcinomas (in mouse and rat). AOP-Wiki. https://aopwiki.org/aops/121（2026 年 9 月 2 日最終閲覧）
6. Mizuno K, Takeshita J, Harakawa Y, Hosaka T, Shizu R, Yoshinari K. Utility of in vitro assay data in read-across prediction of nongenotoxic carcinogenicity of pesticides for cytotoxicity-related rat tumors. *Food Chem Toxicol*. 202: 115566, 2025.
7. AOP 162: Enhanced hepatic clearance of thyroid hormones leading to thyroid follicular cell adenomas and carcinomas in the rat and mouse. AOP-Wiki. https://aopwiki.org/aops/162（2026 年 9 月 2 日最終閲覧）
8. Mizuno K, Uchida N, Takeshita J, Ooka A, Shizu R, Yoshinari K. Read-across prediction of nongenotoxic thyroid carcinogenicity of pesticides in rats using mechanism-based in vitro assay data. *Food Chem Toxicol*. 211: 116006, 2026.
9. Yoshinari K, Shizu R. Distinct Roles of the Sister Nuclear Receptors PXR and CAR in Liver Cancer Development. *Drug Metab Dispos,* 50(7):1019–1026, 2022.
10. Yamada T, Cohen SM, Lake BG. The modes of action for rodent liver tumor formation by activators of the constitutive androstane receptor (CAR) and the peroxisome proliferator-activated receptor alpha (PPARα) are not relevant to human cancer risk: an updated critical evaluation. *Crit Rev Toxicol*, 55(5): 549–586, 2025.

特　集：先端遺伝子操作技術の生命科学研究への応用

序文：特集「先端遺伝子操作技術の生命科学研究への応用」によせて

小沢　学[1]
清成　寛[2]
[1] 東京大学　医科学研究所　准教授
[2] 理化学研究所　生命機能科学研究センター　チームディレクター

生命科学研究において，遺伝子操作技術は生命現象を理解するための基盤的な研究手法の一つである。特にCRISPR/Cas9の登場以来，ゲノム編集技術は急速に普及し，標的遺伝子のノックアウトやノックインは，多くの研究者にとって身近な技術となった。一方，近年の技術革新はさらに目覚ましく，塩基配列をより精密かつ多様に改変する技術や，多数の遺伝子を網羅的に解析するスクリーニング技術など，新たな手法が次々と開発されている。また，ゲノム編集技術の適用対象も，従来広く用いられてきた培養細胞やマウスから多様な動物種へと拡大しつつある。さらに，ゲノムそのものを改変するだけでなく，生体内において目的とする遺伝子の発現を時間的・空間的に制御する技術も発展しており，生命科学研究における「遺伝子を操作する」ための選択肢は大きく広がっている。

このような背景のもと，第73回日本実験動物学会総会において，LASセミナー2「先端遺伝子操作技術の生命科学研究への応用」を企画した。本セミナーでは，個々の技術を紹介するだけではなく，最新の遺伝子操作技術が生命科学研究にどのような新しい可能性をもたらすのかを俯瞰することを目的とした。そのため，ゲノムをより精密に「改変する」技術，遺伝子機能を網羅的に「探索する」技術，ゲノム編集を多様な動物種へ「展開する」技術，そして生体内で遺伝子発現を時空間的に「制御する」技術という，それぞれ異なる視点から研究を進めている4名の先生方にご講演いただいた。

本特集では，その講演内容をもとに，それぞれのテーマについて最新の知見を交えてご執筆いただいた。遺伝子操作技術そのものの進化と多様化から，細胞を用いた網羅的な機能探索，多様な動物種へのゲノム編集技術の展開，さらには動物個体における時空間的な遺伝子発現制御まで，本特集を通して，現在の遺伝子操作技術の広がりとその可能性を感じていただけるものと考えている。

技術の進歩が著しい今日，重要なのは新しい技術を知ることだけではなく，それぞれの技術の特徴や限界を理解し，研究目的に応じて適切な手法を選択することである。また，新たな技術の登場は，これまで技術的な制約から取り組むことができなかった研究課題への道を拓き，新しい研究の発想そのものにつながるとともに，個々の技術を相補的に組み合わせることにより，一つの手法だけでは捉えきれない未知の生命現象に迫ることも期待される。本特集が，これから遺伝子操作技術を導入しようとする研究者・技術者にとっての一助となるとともに，すでにこれらの技術を活用している方々にとっても，今後の研究戦略を考える上で新たな視点や着想を得る機会となれば幸いである。

最後に，ご多忙の中，本セミナーでご講演いただき，さらに本特集のために総説をご執筆いただいた4名の先生方に，改めて心より御礼申し上げたい。

特　集：先端遺伝子操作技術の生命科学研究への応用

多様化するゲノム編集技術の進化と深化

佐久間哲史
京都大学大学院農学研究科　ゲノム編集育種講座

要　約

2026 年 5 月に沖縄で開催された，第 73 回日本実験動物学会総会の LAS セミナー 2「先端遺伝子操作技術の生命科学研究への応用」は，日本ゲノム編集学会・教育実習委員会の協賛での開催とさせていただいた。筆者は同学会の理事ならびに同委員会の委員長を務めており，ゲノム編集に関する教育実習活動を継続的に実施している。冒頭に述べたセミナーでは，本稿のタイトルでもある「多様化するゲノム編集技術の進化と深化」をテーマに，ゲノム編集の基礎的な解説に加えて，プライム編集法（本文にて詳述）をはじめとする最新技術について，時間の許す範囲で紹介した。本稿では，同セミナーでの講演内容をベースとしつつ，講演内では触れることのできなかった技術の紹介も織り交ぜながら，ゲノム編集の最新技術群を体系的に整理して記述する。セミナーに参加された方にもそうでない方にも，また初学者にも熟練者にも，新たな学びや気づきを与えられるよう記述を工夫しつつ，ゲノム編集技術の包括的理解につながる総論的な解説を提供したい。

1. はじめに

日本ゲノム編集学会は，2016 年に一般社団法人として設立されたが，その前身に当たるゲノム編集コンソーシアム（2012 年設立）の時代から，筆者は毎年の研究会及び大会のほぼ全てにおいて，第一演者もしくは第二演者として教育講演を提供してきた。コンソーシアムにせよ学会にせよ，当該コミュニティは国内のゲノム編集研究者が一堂に会する専門家集団であるが，それでもなお年に一度は最新情報をとりまとめた教育講演を実施しなければ，技術のトレンドを把握することが困難になってしまう。それほどまでに国際的競争が激しく，技術の進展が早いのが，ゲノム編集分野の特徴である。

本稿では，初学者から熟練者まで，多様な知識レベルの読者諸氏がそれぞれに有益な情報を得られるよう，セミナーでの講演と同様に，基礎的な内容には【Basic】のタグをつけ，「初学者はまずここを押さえればOK」というポイントを明示しつつ解説する。より発展的な内容を記述するパート（【Advanced】タグ）については，ある程度の基礎知識を要する部分もあるため，初学者は読み飛ばしてもらって構わないが，技術のトレンドを感じ取る手助けにはなるはずである。他方で，既にゲノム編集技術を活用して研究を実施している場合など，熟練者の読者諸氏においては，【Advanced】パートの中にこそ，フォローしきれていなかった重要な情報や，新たな技術利用・応用展開等の糸口が見つかるはずである。読者毎のニーズに応じて，本稿を活用していただければ幸いである。

2. ゲノム編集の基本概念とさまざまなバリエーション

2-1. 【Basic】ゲノム編集の基本概念

典型的なゲノム編集の原理は，ゲノム DNA 上の狙った領域に部位特異的な DNA 二本鎖切断（DNA double-strand break; DSB）を誘導し，DSB が修復される過程で生じる塩基の欠失や挿入により遺伝子の機能を破壊したり（遺伝子ノックアウト），ドナーとなる DNA 分子を共導入しておくことでこれを取り込ませ，外来の遺伝子を挿入したり任意の変異（塩基の置換など）を導入したりする（遺伝子ノックイン）というものである（図 1・左側）。ドナー DNA を伴わない前者の編集においては，非相同末端結合（Non-homologous end joining; NHEJ）やマイクロホモロジー媒介末端結合（Microhomology-mediated end joining; MMEJ）とよばれる修復機構が主な役割を担い，ドナー DNA を伴う後者の編集においては，相同組換え（Homologous recombination; HR）などの相同性依存的修復が利用されるのが一般的である（ただし例外的手法も存在する）。

ここで強調しておきたいのは，総称してゲノム編集ツールとよばれる分子ツールが行っているのは，あくまでも標的 DNA 配列をゲノム上で検索して認識し，結合し，切断するところまでであり，その後配列が書き換わるという結果に至るには，細胞がもともと有する内在の DNA 修復機構に依存せざるを得ないという点である。この事実は，ゲノム編集ツールがそれ自体では配列の書き換えまでを単独で完了させられないというある種の不完全さを印象付けるかもしれない。事実，このことが原因で，遺伝子ノッ

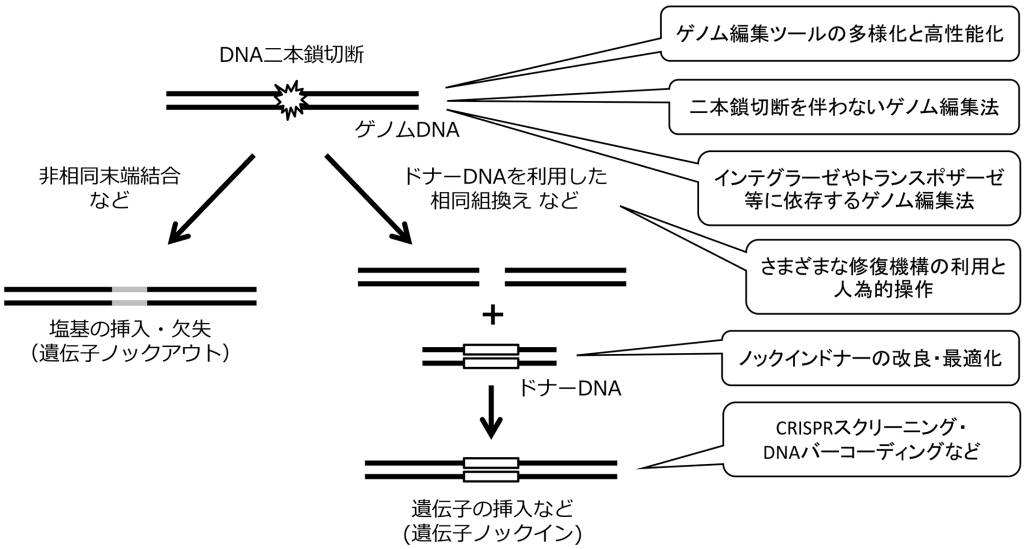


図 1　ゲノム編集の基本概念とさまざまなバリエーション
ゲノム編集の基本概念を左側に，その進化と深化に関わるさまざまな開発要素を右側に，それぞれ示した。

クインを目的としたゲノム編集を実行しようとしても，目的外の編集（望まざる変異の導入による遺伝子ノックアウトなど）が優先的に生じてしまうなどの問題に悩まされることもある。しかし他方で，もしゲノム編集ツールが，DNA 配列の書き換えに特化したツールであったならば，（精度や作用の永続性の有無などの違いはあれど）たとえばモルフォリノアンチセンスオリゴや短鎖干渉 RNA（Small interfering RNA; siRNA）のように，特定の用途でしか使用できない技術にとどまっていただろう。ゲノム編集ツールが真に革命的だったのは，配列改変に特化したシステムではなく，如何様にも味付けできる「核酸標的化プラットフォーム」として利用可能である点だと筆者は考えている。

2-2.【Basic】ゲノム編集のさまざまなバリエーション

ここから，本稿のタイトルである「多様化するゲノム編集技術の進化と深化」の具体に迫る（図 1・右側）。ゲノム編集技術の進化や深化の文脈で最もイメージしやすいのは，ゲノム編集ツールそのものの多様化や高性能化であろう。実際に，次項以降で紹介するように，ゲノム編集の根幹を為すツール自体の探索・改良は，常に本技術の開発の最上流に位置し，中心的役割を担い続けている。しかしながら，その下流にも，技術開発の要素は無数に存在する。まず，ゲノム編集ツールが DNA を認識するのか RNA を認識するのかという最初の分岐点がある（RNA を認識するツールは，多くの場合，「ゲノム編集」の枠組みから外れるアプリケーションに利用されることとなるが，本稿では広義のゲノム編集関連技術の一つとして捉える）。そして，DNA を認識するとしても，単に結合するだけか，DSB を導入するか，はたまた片方の鎖だけを切断するニックを誘導するかの 3 パターンに分けられる。また，ゲノム編集ツールを単独で用いるのか，あるいは編集を媒介する何らかのエフェクターを共作用させるのかという分岐も存在する。ここまでの内容だけでも十分に複雑で多様な技術的要素が含まれるが，実際には更にこの下流に，内在の修復機構の巧みな利用や操作，ノックインドナーの改良や最適化，あるいはゲノム編集システムの発展的な利用法（CRISPR スクリーニングや DNA バーコーディングなど），といった多くの開発要素が存在する（第 4 項にて詳述する）。

3.　さまざまなゲノム編集ツール

3-1.【Basic】ゲノム編集の万能性を支える革命的ツール「CRISPR-Cas9」

歴史を紐解けば，ゲノム編集の概念につながる発見は，メガヌクレアーゼとよばれる自然界に存在する DNA 切断酵素を用いて為された［1］。その後，カスタマイズ可能な DNA 結合ドメインと DNA 切断ドメイン（ヌクレアーゼドメイン）を人工的に組み合わせたキメラ酵素（人工制限酵素型システム；ZFN［2］や TALEN［3］）が開発され，任意のゲノム配列に対応するゲノム編集ツールを人為的に作出することが可能となった（図 2・左側）。これらのツールも十分に画期的であったが，更に革命的だったのが，細菌や古細菌が有する獲得免疫機構に由来する Clustered regularly interspaced short palindromic repeats（CRISPR）-Cas と名付けられたシステムである。CRISPR-Cas のバリエーションについては後述するとして，ここでは種々の CRISPR-Cas システムのうち，最も広く用

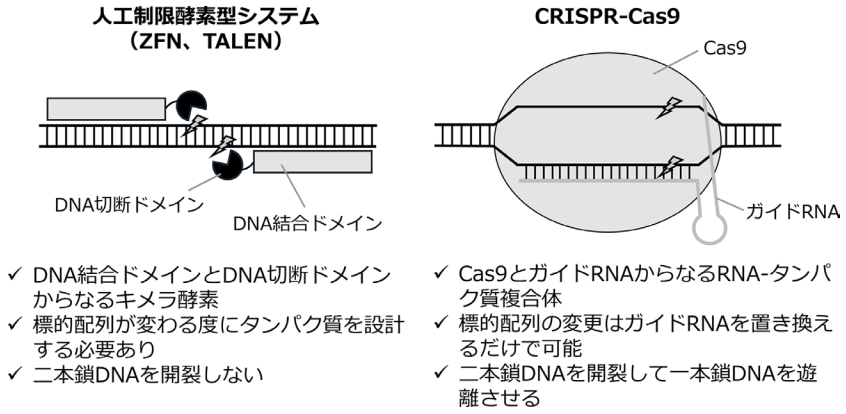


図2　人工制限酵素型システムと CRISPR-Cas9

人工制限酵素型システム（ZFN，TALEN）と CRISPR-Cas9 の概要をまとめた。CRISPR-Cas9 の手軽さと効率の高さ，および汎用性の高さは圧倒的である。

いられる CRISPR-Cas9［4］（図 2・右側）にひとまず焦点を絞る。

従来の人工制限酵素型システムは，標的とする DNA 配列が変わる度に DNA 結合ドメインを人工的に組み上げる必要があり，この点において技術的な困難性やスループットの低さを伴っていた。また，タンパク質が単純に DNA を認識してそのまま結合する性質上，CRISPR-Cas9 において実行可能な一部のアプリケーションに適さないという面もあった。他方で，CRISPR-Cas9 は，認識する DNA 配列の制約がわずかにしか存在しない Cas9 タンパク質と，目的とする標的配列に相補的な配列を内包するガイド RNA の組み合わせによって構成される。ガイド RNA の配列を任意の配列に変更することは，プラスミドベクターへの合成 DNA の挿入やガイド RNA そのものの化学合成などによって容易に実行可能であり，タンパク質ベースのシステムと比べて格段にスケーラブルである。また，Cas9 タンパク質とガイド RNA の複合体が標的 DNA を認識する際には，二本鎖 DNA をほどいて R-loop とよばれる構造体を作り，ガイド RNA と塩基対を形成しない DNA 鎖は一本鎖 DNA として露出することとなる。この特性が有利にはたらくアプリケーションが一部存在するため，ここでハイライトしておく。更に便利なことに，Cas9 は特定のアミノ酸に変異を加えることで，片方の鎖だけを切断するニッカーゼ型 Cas9（nCas9）や切断活性を完全に消失した dCas9 に機能変換することもできる。このことも，CRISPR-Cas9 の汎用性の高さを支える極めて重要な特性である。

3-2. 【Advanced】その他のゲノム編集ツール

後段で述べる発展的技術は，その多くが CRISPR-Cas9 に依存したものであるため，標準的な CRISPR-Cas9 以外のゲノム編集ツールの開発動向について，ここで触れておく。まず，CRISPR-Cas9 が登場する前から使用されている ZFN や TALEN については，筆者も開発に関わった新規ヌクレアーゼドメインを伴う ZFN のアプリケーション［5］や，植物において核ゲノム・ミトコンドリアゲノム・葉緑体ゲノムの全てを標的化できる TALEN ベースのシステムの構築［6］など，一部の改良研究が継続的に進行している。CRISPR-Cas9 以外の CRISPR-Cas システムでは，Cas12 ファミリー，Cas13 ファミリー，および Type I CRISPR-Cascade が主なものとして挙げられるだろう。Cas12 ファミリーでは，当初 Cpf1 と名付けられた Cas12a が，Cas9 に次ぐ位置づけで広く使用されているところであるが，ツールのコンパクトさの観点では Cas12f も利用価値が高い。また，Cas12 ファミリーの文脈で最近報告された画期的な手法が，Cas12a2 を用いたがん細胞特異的な細胞死の誘導である［7, 8］。Cas12a2 は，標的の RNA を配列特異的に認識すると活性化し，二本鎖 DNA を無差別に切断する活性（コラテラル活性）を有する。この活性を利用して，がん特異的な変異を伴う RNA を認識させ，がん細胞だけを選択的に死滅させるわけである。Cas13 ファミリーは，より一般的な RNA 標的ツールとして従来から知られているところであるが，Cas13 ファミリーの中にも例外的な活性を有するものが知られており，たとえば LbuCas13a と名付けられたツールは，一本鎖あるいは二本鎖の DNA を認識して切断すると共に，コラテラル活性として RNA を分解する活性を併せもつ（いわば Cas12a2 と裏返しの活性を有する）［9］。更に，Type I CRISPR-Cascade ベースのシステム群（たとえば CRISPR-Cas3 や TiD）は，高い認識特異性を有しつつ標的ゲノム領域を長鎖に削り込むことのできるツールとして実用化が進んでいる。このように，自然界に存在する多様な CRISPR-Cas ツールの探索と特徴づけ，そしてユニークな応用が現在でも活発に進められている状況にある。

4. DSB 導入ツール／ニック導入ツール／結合のみのツールの使い分け

4-1.【Basic】DSB 導入ツール（Cas9）を用いたさまざまな技術

野生型 Cas9 をそのまま用いる場合のように，DSB を伴う処理を実行する場合は，いわゆる狭義のゲノム編集，すなわちゲノム配列の改変を意図したものとなるのが一般的である（図 3・上段）。その上で，たとえばより高効率な処理を実現するために，内在の DNA 修復機構をアシストする工夫（修復因子の融合や過剰発現・リクルート，ドナー核酸の構造の最適化や化学修飾，低分子化合物による修復機構の操作など）を凝らすこともある［10］。また大量かつ並列な処理を伴えば，ゲノム上で直接的に飽和変異導入を実行することもでき［11］，レンチウイルスベクターと組み合わせれば，CRISPR スクリーニングとよばれる順遺伝学的な機能性スクリーニングも実行可能である（詳細は遊佐氏の稿を参照されたい）。DNA バーコーディングを伴えば，個体レベルで細胞系譜を追跡することもできる。更に，遺伝子発現等の細胞内イベントを記録する DNA レコーディングのような利用例も存在する。誌面の都合上，一つ一つの事例について解説を加えることは難しいが，やはり DSB に依存したゲノム編集が最も広く利用されている方向性であるだけに，DSB を誘導するという操作自体は同じでも，使い方次第でさまざまな利用価値を生み出せるのがこのカテゴリーの特徴である。

4-2.【Basic】ニック導入ツール（nCas9）を用いたさまざまな技術

このカテゴリーも近年発展のめざましい技術領域である（図 3・中段）。まず，ニックを導入する操作自体に依存する編集の例としては，単に DSB を入れるよりも高い特異性を担保できるダブルニッキング［12］や，ニック依存的なゲノム編集法である SNGD 法［13］, NICER 法［14］などがある。これらに加え，デアミナーゼによる脱アミノ化反応を介した塩基編集法を補助する目的で nCas9 を利用する例（Base Editor）や，ニックにより一本鎖 DNA を遊離させ，そこを起点に逆転写反応を介した相補 DNA の合成による自由自在な配列操作を可能にしたプライム編集法（Prime Editor）［15］などの例もあり，従来の DSB 依存的手法とは一線を画す次世代型のゲノム編集技術も開発されている。これらの技術は特に重要性が高いので，第 5 項においてより詳細に取り上げる。

4-3.【Advanced】結合のみを行うツール（dCas9）を用いたさまざまな技術

このカテゴリーは，「その場所で何をさせるか」というアイデア次第で全く異なる出力を生むという点において，筆者のような技術開発者にとっては最も面白い開発対象であるが，個々の技術毎に使い方も目的もバラバラであるために，つかみどころのない技術カテゴリーでもある（図 3・下段）。まず，単純に結合する作用を利用して，転写の開始や伸長を物理的にブロックしたり，転写因子の結合を阻害したりすることができる。また，dCas9 に付与したタグを利用して，標的 DNA 領域に結合する分子を免疫沈降により単離することができる。類似した利用法として，細胞内で近接依存性標識を実行することも可能である。そして転写調節因子やエピゲノム修飾因子を融合・リクルートすれば，転写の ON/OFF を調節したり，DNA のメチル化・脱メチル化やヒストンの化学修飾を書き換える，俗にいうエピゲノム編集を適用することもできる。蛍光タンパク質を局所に集積させれば特定の染色体領域を可視化することもでき，薬剤により会合する性質をもつドメインを dCas9 に付与することにより，染色体上の離れた 2 箇所を引き寄せて染色体高次構造を変化させることもできる。正に“何でもあり”な派生技術が次々と生み出されているのがこのカテゴリーである。

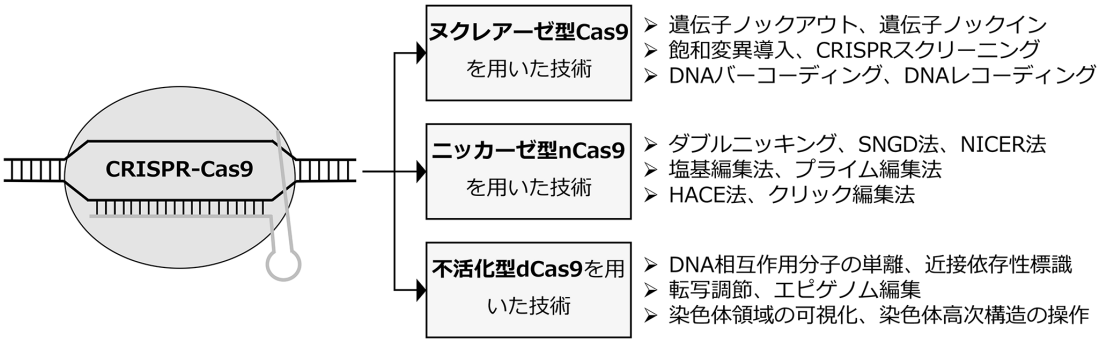


図 3　CRISPR-Cas9 を基盤とするさまざまなアプリケーション
ヌクレアーゼ型 Cas9，ニッカーゼ型 nCas9，不活化型 dCas9 の 3 つのカテゴリーに分け，各ツールを用いた技術をリストアップした。

5. Cas9 と Base Editor，Prime Editor，およびその発展技術

5-1.【Basic】Cas9 と Base Editor，Prime Editor の基礎と特徴

4-2 項でも触れたように，Base Editor と Prime Editor とよばれる nCas9 ベースの技術は，通常の Cas9 ベースのゲノム編集とは異なる作用機序に基づくが故に，編集可能なパターンや目的外編集の起こりやすさ等に大きな違いがあり，これらの技術を適材適所で使い分けることが，目的とする編集を効率的かつ精度よく実行するために求められるスキルとなっている。本稿の主たる読者は技術開発者ではなく技術利用者であろうことを鑑み，各技術のマニアックな説明は省略しつつ，どういう編集をしたいときにどの技術を用いるべきかの判断基準となり得る情報に絞って記述する。

各技術の概要と利点・欠点について，図 4 に簡潔にまとめた。通常の Cas9 では，実行する操作が DNA の切断のみであるために，その後の修復機構は運任せとなる要素が大きく，目的外の編集が起こりやすいことが最大の難点である。一方で，一本鎖 DNA ドナーとの組み合わせによる短鎖の置換・挿入・欠失から，プラスミド DNA ドナー等を用いた長鎖の遺伝子ノックイン，更には複数箇所を同時に切断することによる染色体の長鎖欠失，逆位，転座等の誘導に至るまで，実行可能なゲノム編集操作の幅が最も広いのが Cas9 の有利な点である。Base Editor は，デアミナーゼによる脱アミノ化に依存するという原理上，原則としてピンポイントな塩基置換を主眼とした技術となる。この点が Base Editor の強い制約でもあり，大きな利点でもある。すなわち，目的の塩基置換以外の副産物が生じにくく，編集産物の高い純度が担保されるわけである。Prime Editor は，Base Editor と同じく nCas9 ベースの技術であることから，同様に目的外編集を低減できる特性を有し，かつ逆転写酵素の鋳型配列を比較的自由に設定できることから，多様な編集パターンに対応できるのが有利な点である。一方で，細胞種や標的配列の依存性が強く，ゲノム上のどの領域で設計しても同じレベルでの改変が実行できる状況にはないのが現状である。以上の利点・欠点を把握した上で，各技術を適切に使い分け，最適な手法でのゲノム編集動物や細胞株等の作出に役立てていただきたい。

5-2.【Advanced】Prime Editor の最新動向

上記の技術群の中でも，多様な編集パターンに対応可能な次世代技術である Prime Editor は特に注目度が高く，2019 年に最初の報告が為されて以降，多数の技術改良が報告されてきた［16］。2025 年頃までの主な技術改良については，Gao らによる総説によくまとまっているため，そちらを参照されたい［17］。なお，同総説では Base Editor の改良についてもカバーされている。最近の主要な Prime Editor 関連のトピックとしては，Prime Editor の本家本元である David Liu 氏らが本年 5 月に，Nature Biotechnology 誌に相次いで報告した，PE-PRISM［18］と PE8 シリーズ［19］をまず挙げるべきであろう。PE-PRISM は，Prime Editor に用いられるガイド RNA の末端に付与するモチーフを最適化した研究である。これによりヌクレアーゼによる分解を防ぐことができ，編集効率が上昇することが示されている。PE8 シリーズは，Prime Editor に用いられる逆転写酵素を，AI を用いて再設計することにより，構造安定性を高め，結果的に編集効率も上昇するというものである。

他にも，従来の Prime Editor では困難であった長鎖の挿入を可能にする技術も，近年競って開発されている。そのための一つの方法は，Prime Editor と共にドナー DNA を導入し，Prime Editor によって生じる Flap end とドナー DNA の末端をうまく繋げることで，外来の長鎖 DNA をノックインするというものである。類似したアイデアの報告が複数のグループから（ほぼ）同時多発的に上がっており［20-22］，これら一連のシステムは Prime Assembly という名称で認知されているところである（よく似た手法で QuadPE と名付けられたものも存在する［23］）。また別のアプローチとして，Prime Editor によって attP や

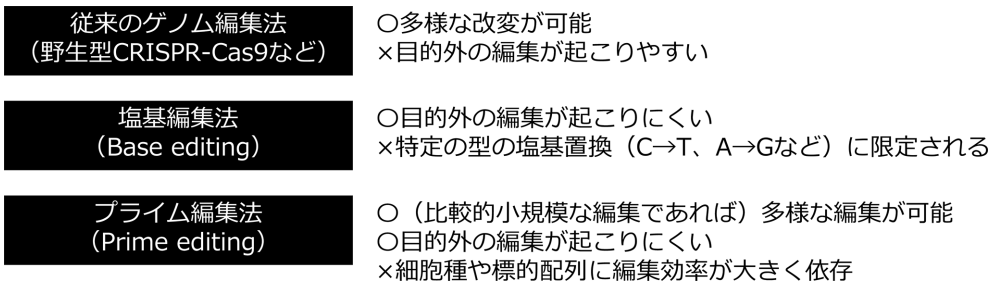


図 4　従来のゲノム編集法と塩基編集法，プライム編集法の比較
従来のゲノム編集法と塩基編集法，プライム編集法の利点と欠点をまとめた。目的に応じて各手法を使い分けることが肝要である。

attB のような landing site を挿入し，インテグラーゼの作用によって長鎖のノックインを実行する手法も考案されており，PASTE や PASSIGE と名付けられている［24, 25］。Prime Editor の文脈からは外れるが，このようにゲノム編集ツールとインテグラーゼやリコンビナーゼ等を併用する手法は，長鎖の挿入におけるホットな方法論となっており，ONE-STEP tagging，STITCHR，INSTALL など続々と新手法が報告されているところである。加えて，自然界のシステム自体がもともと標的配列依存的なトランスポザーゼやリコンビナーゼとして機能する CAST やブリッジリコンビナーゼといったシステムも，ゲノム編集における新たなオプションとして脚光を浴びているところである。

6. おわりに

本稿では，ゲノム編集の基礎をおさらいすると共に，様々な発展システムにつながる技術的背景を解説しつつ，最新動向について誌面の許す範囲において記述した。現時点で特に注目すべきトピックはある程度カバーしたつもりであるが，それにしても CRISPR-Cas の祖先型システムである IscB や TnpB，ブリッジリコンビナーゼに類似する機構を有しつつヌクレアーゼとして機能する TIGR-Tas，オリゴマーを形成しつつ RNA 誘導型の DNA 認識を行う極めてユニークな特性を有する VIPR などを紹介しきれなかった他，これからの技術開発においてますます重要性が高まっていくであろう AI ×ゲノム編集の文脈についても，PE8 シリーズのようなごく一部の例に触れた程度にとどまった。いずれにせよ，本稿のみでゲノム編集技術の最新動向の全貌をつまびらかにすることは，土台無理な話である。

冒頭でも述べたように，日本ゲノム編集学会では，毎年の大会において（少なくとも筆者がその役割を求められる限りは）最新動向の解説を今後も行うつもりである。また，筆者が委員長を拝命している同学会の教育実習委員会では，大会とは別に技術講習会を毎年開催しており，そちらでもより詳細な最新動向の解説を行っている。今後，日本実験動物学会と日本ゲノム編集学会がより密接に連携し，人的交流の活性化やセミナー等の共催，教育実習活動の相互実施等を通じて，両分野の融合的研究がますます発展していくことを願いつつ，筆を置きたい。

謝　辞

本稿の一部において，BIO Clinica 2025 年 8 月臨時増刊号（北隆館）に掲載された筆者らの拙著［26］を修正・再構成の上，出版社の許可の元，再掲載させていただきました。また，本稿で紹介した最新情報の収集において，京都大学大学院農学研究科・博士後期課程の杉山健氏を筆頭に，佐久間グループの学生諸氏の協力をいただきました。ここに感謝の意を表します。

文　献

1) Rudin N, Haber JE. Efficient repair of HO-induced chromosomal breaks in Saccharomyces cerevisiae by recombination between flanking homologous sequences. Mol Cell Biol 1988;8:3918–3928.
2) Kim YG, Cha J, Chandrasegaran S. Hybrid restriction enzymes: zinc finger fusions to Fok I cleavage domain. Proc Natl Acad Sci U S A 1996;93:1156–1160.
3) Christian M, Cermak T, Doyle EL, et al. Targeting DNA double-strand breaks with TAL effector nucleases. Genetics 2010;186:757–761.
4) Jinek M, Chylinski K, Fonfara I, et al. A programmable dual-RNA-guided DNA endonuclease in adaptive bacterial immunity. Science 2012;337:816–821.
5) Onishi A, Sakuma T, Mandai M, et al. Mutation-agnostic gene insertion therapy for RHO-associated autosomal dominant retinitis pigmentosa using zinc finger nucleases. bioRxiv 2026;2026.07.13.738123.
6) Zhou C, Arimura SI. TALENs and Related Technologies for Editing Nuclear and Organellar Genomes in a Model Plant, Arabidopsis thaliana. Bio Protoc 2026;16:e5668.
7) Scholz P, Thompson J, Crosby KT, et al. RNA-triggered cell killing with CRISPR-Cas12a2. Nature 2026;655:230–239.
8) Zeng J, Cheng Z, Chen H, et al. Targeting cancer-specific mutations with RNA-triggered chromatin shredding. Nature 2026;656:199–206.
9) Wu X, Luo S, Guo C, et al. LbuCas13a directly targets DNA and elicits strong trans-cleavage activity. Nat Biomed Eng 2025;9:2141–2154.
10) Danner E, Bashir S, Yumlu S, et al. Control of gene editing by manipulation of DNA repair mechanisms. Mamm Genome 2017;28:262–274.
11) Findlay GM, Boyle EA, Hause RJ, et al. Saturation editing of genomic regions by multiplex homology-directed repair. Nature 2014;513:120–123.
12) Ran FA, Hsu PD, Lin CY, et al. Double nicking by RNA-guided CRISPR Cas9 for enhanced genome editing specificity. Cell 2013;154:1380–1389.
13) Nakajima K, Zhou Y, Tomita A, et al. Precise and efficient nucleotide substitution near genomic nick via noncanonical homology-directed repair. Genome Res 2018;28:223–230.
14) Tomita A, Sasanuma H, Owa T, et al. Inducing multiple nicks promotes interhomolog homologous recombination to correct heterozygous mutations in somatic cells. Nat Commun 2023;14:5607.
15) Anzalone AV, Randolph PB, Davis JR, et al. Search-and-replace genome editing without double-strand breaks or donor DNA. Nature 2019;576:149–157.

16) Sakuma T. From nuclease-based gene knock-in to prime editing—promising technologies of precision gene engineering. Gene Genome Ed 2022;3–4:100017.
17) Gao H, Gao S, Kan G, et al. Research progress of base editing and prime editing tools based on the CRISPR/Cas system. Mol Ther Nucleic Acids 2025;36:102771.
18) Sakai HA, Pierce SE, Jiang AY, et al. Directed evolution of small RNA-stabilizing motifs that improve prime-editing efficiency. Nat Biotechnol 2026;Online ahead of print.
19) Tao YA, Sakai HA, Jiang AY, et al. AI-guided redesign of laboratory-evolved reverse transcriptases enhances prime editing. Nat Biotechnol 2026;Online ahead of print.
20) Liu B, Petti A, Zhou X, et al. Prime assembly with linear DNA donors enables large genomic insertions. Nature 2026;654:806–812.
21) Levesque S, Kawashima N, Hwang GH, et al. In cellulo DNA assembly for targeted genomic integration and rearrangement in human cells. bioRxiv 2025;2025.06.16.659926.
22) Jung H, Jeong B, Kim YW, et al. Site-specific replacement of large-scale DNA fragments in human cells. bioRxiv 2025;2025.09.14.676134.
23) Shi YJ, Ding ZY, Wu Y, et al. Quadruple pegRNA enables programmable and efficient large genomic insertion. Nature 2026;654:272–281.
24) Yarnall MTN, Ioannidi EI, Schmitt-Ulms C, et al. Drag-and-drop genome insertion of large sequences without double-strand DNA cleavage using CRISPR-directed integrases. Nat Biotechnol 2023;41:500–512.
25) Pandey S, Gao XD, Krasnow NA, et al. Efficient site-specific integration of large genes in mammalian cells via continuously evolved recombinases and prime editing. Nat Biomed Eng 2025;9:22–39.
26) 佐久間哲史，杉山　健．ゲノム編集総解説－原理と概念的整理．BIO Clinica 2025 年 8 月臨時増刊号（北隆館）．

特　集：先端遺伝子操作技術の生命科学研究への応用

CRISPR-KO スクリーニングの開発と応用

遊佐宏介
京都大学医生物学研究所幹細胞遺伝学分野

要　約

2012 年に CRISPR-Cas9 システムの生化学的反応の実態が明らかとなった。それは，ガイド RNA-Cas9 複合体がガイド RNA の 5’ 末端の 20 塩基の配列と相同な DNA に二本鎖切断を導入することであり，当時，開発が進んでいたゲノム編集技術に革新的な手法を提供することとなった。CRISPR 以前のゲノム編集では Zinc finger nuclease や TALE nuclease が主流であり，どちらもタンパク質工学が必要で配列特異性と高い切断活性を持つ nuclease の作製に困難な部分があった。一方，CRISPR-Cas9 システムでは，DNA 切断活性を担うタンパク質部分の Cas9 は不変で，配列特異性を担うガイド RNA 上の 20 塩基を置換するだけであった。これにより，さまざまな遺伝子あるいは標的配列に対するガイド RNA 発現ベクターの並列的作製が可能となり，網羅的な遺伝子ノックアウトライブラリーの作製を通した順遺伝学的アプローチの道が開かれることとなった。ここでは，我々が開発改良してきた CRISPR スクリーニングを概説し，その応用例にも触れる。

1. 順遺伝学的アプローチ

遺伝子の機能を遺伝学的に解析するとき，それは，表現型と遺伝型の因果関係を明らかにすることとなる。発現情報等から解析対象とする遺伝子を絞り込める場合，その候補遺伝子のノックアウト細胞（生物）を作製し，表現型を解析することが一般的なアプローチである。この遺伝子 → 表現型へと解析を進める手法は逆遺伝学と呼ばれる。ノックアウトマウスの作製はまさに逆遺伝学の代表的手法である。一方，ゲノム配列が解読される以前や網羅的遺伝子発現解析ができなかった時代には，候補遺伝子を絞り込まず，多量の変異体ライブラリーから着目する表現型を示す変異体を分離し，責任遺伝子を同定する表現型 → 遺伝子へと解析を進める手法が用いられた。これを順遺伝学的手法といい，変異体ライブラリーの作製が容易な酵母や線虫，ハエ，アラビドプシスに適用されて，様々な遺伝子の発見に大きく寄与した。ノーベル賞を見ても，酵母の細胞周期，ハエの体節形成，線虫の RNAi といった生命現象に関わる遺伝子の同定は順遺伝学的手法により達成された。また，様々な情報解析が可能な現代であっても必ずしも候補遺伝子の絞り込みに成功するとは限らず，どの遺伝子が関わるかの仮説なしで網羅的に変異体をスクリーニングし，着目表現型に関与する遺伝子の探索が有効な手段であることは変わらない。

順遺伝学的手法による遺伝子探索で最も重要なのは，‘良質な’変異体ライブラリーの作製である。理想はライブラリーには全ての標的（往々にしてタンパク質をコードする全ての遺伝子）の破壊細胞が存在していることである。二倍体生物を扱う場合には，両染色体の遺伝子コピーが破壊されている（ホモ欠損型である）必要がある。以前は変異導入には，主に点変異を導入する化学変異原や挿入変異を導入するトランスポゾンが用いられた。この場合，ゲノムのどの部分に変異を導入するかは決められないので，ランダムに変異が導入される前提で saturation mutagenesis を目指して，必要な変異体数を計算し，ライブラリーの作製が行われた。たとえば，出芽酵母の Ethyl methanesulfonate（EMS，アルキル化剤）変異では，ある遺伝子を見た場合 1,000 変異体あたり 1 つの変異体が得られるので（変異処理条件による），20,000 ～ 50,000 EMS 変異体を扱えば全遺伝子を網羅できると期待できる。それでも小さな遺伝子は変異導入しにくいのでいつ saturation するか判断するのは現実的には難しい。また，化学変異原は点変異を導入するので，その原因遺伝子を見つけ出すのにも一工夫が必要であった（現在では NGS 解析が使える）。

筆者は博士課程研究として，このような順遺伝学的手法をマウス ES 細胞で実現するための手法の開発に取り組んだ。この時代はまだゲノム編集ツールはなかったので，変異原は N-ethyl-N-nitrosourea（ENU，アルキル化剤）を使い，ヘテロ型で導入された網羅的変異をホモ型に変換する遺伝学的ツールを開発し，動物細胞において劣性形質に着目した順遺伝学的手法を確立した［1］。このマウス ES 細胞における順遺

伝学手法により，10 年以上かけてクローニングされてきた GPI アンカー生合成関連遺伝子のほとんどを一度のスクリーニングで同定することができ，本手法の有効性を示すことができた。しかし，この時開発した遺伝学的ツールはマウス ES 細胞での使用に限られ，また強い positive selection が行える表現型解析しか適用できないという弱点があった。

多種多様な細胞株に適用でき，positive selection だけでなく negative selection にも使える手法を開発したい。これを実現する遺伝学的ツールを探索している最中に登場したのが CRISPR-Cas9 システムであった［2］。

2. CRISPR スクリーニングの開発

CRISPR-Cas9 システムの概要はここでは省くとして，その強みは ① DNA 二本鎖切断の標的部位をガイド RNA 上の 20 塩基で規定できること，そして ② Cas9（特に最初に報告された *Streptococcus pyogenes* の SpCas9）の DNA 切断活性が非常に強く，“標的の切りぞこない”がほとんどないことの 2 点につきる。順遺伝学的手法への応用の観点からこれらの強みを考えてみる。強み①は，20 塩基で規定されるということは，ランダムな 20 塩基の配列がヒトゲノムに偶然存在する確率はわずか 0.27％であり，20 塩基あれば標的をほぼ一意に指定できる（実際には認識の緩みやゲノム配列の偏りを考慮する必要がある）。加えて SpCas9 では NGG PAM も必要であるから，さらに高い特異性が期待できる。また，ガイド RNA の発現ベクターの構築を考えても，20 塩基対の DNA 断片のクローニングは非常に効率がいいので，並列的あるいはプール式で多量の発現ベクターの構築が可能である。以上のことは，2 万のタンパク質コード遺伝子に対し，特異的な標的配列をデザインし，それぞれのガイド RNA 発現ベクター（最低 2 万ベクター）を構築することが現実的であることを意味する。実際には一遺伝子あたり 4 〜 6 個のガイド RNA をデザインし，合計約 10 万の標的配列をレンチウイルスベクターに組み込み，ガイド RNA ライブラリーとして使用するのが一般的である。強み②では，一旦ガイド RNA-Cas9 を細胞に導入すれば，標的となる部位が複数箇所あったとしても，各箇所において，DNA 二本鎖切断後の修復過程でエラー（変異）が入り，標的部位の配列が変化するまで DNA 切断を続けることを意味し，これは一回の操作で複数の遺伝子コピーの破壊を可能にする。正常な二倍体細胞だけでなく，がんのような異数体の細胞であっても，遺伝子の完全破壊が可能である。全ての遺伝子を標的としたガイド RNA をデザインでき，遺伝子破壊の効率もいいので，saturation mutagenesis が容易に行える。このように，CRISPR-Cas9 システムを用いたゲノム編集は，網羅的変異細胞ライブラリー作製に理想的なツールであった。

もう一つの重要な点は，レンチウイルスを使うことでガイド RNA をゲノムに組み込み，20 塩基の標的配列自体を分子バーコードとして各細胞を標識できる点である。次世代シーケンサー（NGS）を使い，20 塩基の配列を解読することで，変異細胞集団中の各ガイド RNA を持つ細胞の存在率を計算することが可能となる。コントロール群と実験群を比較しガイド RNA の存在率の変化を調べることで，その細胞が集団中で増えたのか，減ったのかがわかる。ガイド RNA 発現細胞は標的遺伝子の破壊細胞であるので，2 万遺伝子の各変異細胞の挙動を NGS 解析により読み解くことができる。このように，表現型の読み出しは，変異細胞集団中で，存在率が変化する変異細胞（ガイド RNA）の検出であり，旧来の方法のように，変異細胞の分離はしない。迅速かつ簡便に着目表現型に関与する遺伝子候補を絞り込むことができるようになった。

これらの CRISPR-Cas9 システムの特徴を活かして，網羅的遺伝子破壊ツールとするため，CRISPR スクリーニングのワークフローは以下のようになっている（図 1）。

① Cas9 の安定発現細胞株の作製
② ガイド RNA レンチウイルスライブラリの感染
③ 表現型スクリーニング
④ NGS 解析
⑤ 統計解析によるヒット遺伝子抽出

表現型スクリーニングは大別すると① fitness スクリーニング，②選択圧によるスクリーニング，③セルソーターを使った細胞選別によるスクリーニングとなる（図 2）。

Fitness スクリーニングとは，がん細胞のように常に増殖する細胞において，その生存や増殖に影響を与える遺伝子の探索である［3］。リボソームや RNA ポリメラーゼ，スプライシングやプロテアソームに関わる因子は細胞の生存に必須であり，DNA ポリメラーゼや細胞周期制御因子は増殖に必須である。このような因子は essential gene であり，遺伝子の欠損により変異細胞集団中から消えていく。あるがんで特異的に増殖に関与している場合，例えばオンコジーンも増殖必須遺伝子として見出すことができる。

選択圧を用いるスクリーニングも，がん研究において非常に有用な情報を提供してくれる。ある薬剤を投与することで細胞増殖を抑えることができる場合，そのような薬剤存在下でも増殖する変異細胞は薬剤耐性を，また脱落していく変異細胞は薬剤感受性の亢進を示していると考えられる［4, 5］。患者層別化のためのバイオマーカーや，併用することでより高い抗腫瘍効果を得られるような薬剤の標的として応用することが可能である。選択圧としてはウイルスや毒素も使用することができる。これらのレセプターはもちろん，ウイルスの複製に関与する因子の探索が考えられる［6］。

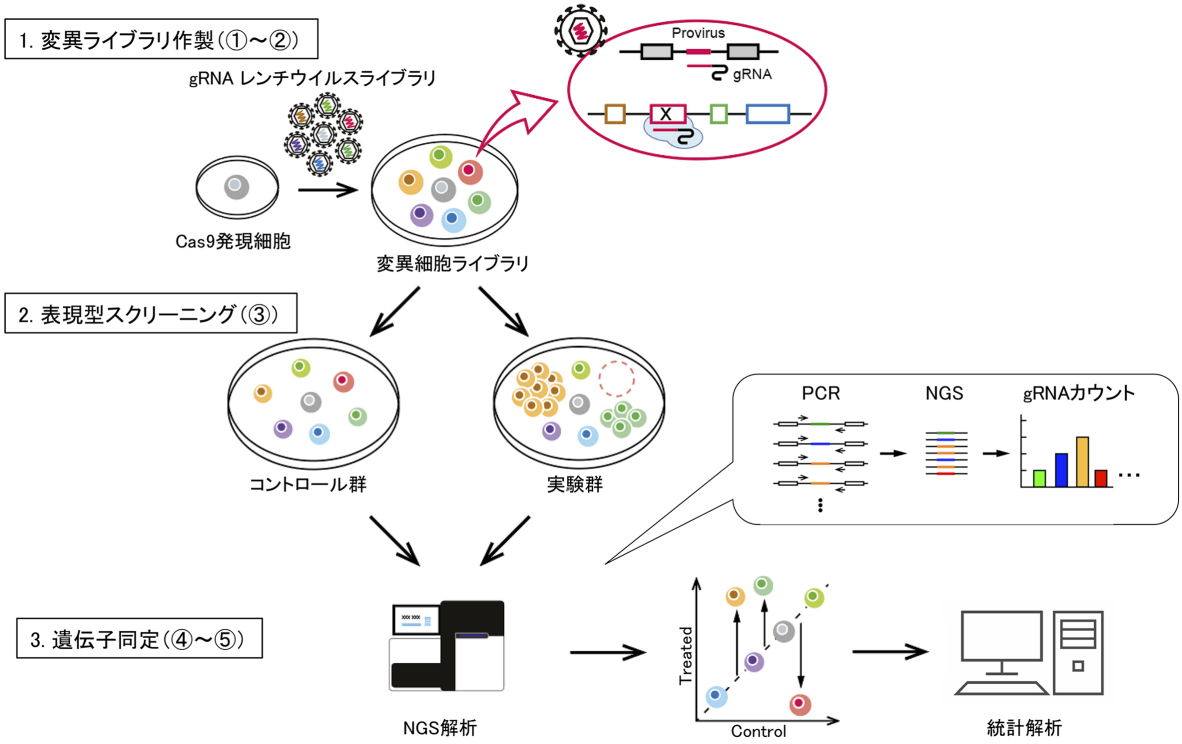


図 1　CRISPR スクリーニングワークフロー
大まかに 3 つのステップからなり，変異ライブラリの作製，表現型スクリーニング，遺伝子同定にわけられる。図中の表現型スクリーニングは，スクリーニングタイプ②の選択圧によるスクリーニングを例示している。

セルソーターを使ったスクリーニングでは，解析できる表現型の種類をさらに広げることができる［7, 8］。ソーターを使う以上，表現型の変化は蛍光シグナルの強度変化で読み出すことになる。細胞の分化状態と相関のあるマーカー遺伝子に GFP をノックインしたレポーター細胞を使ったり，マーカーや標的タンパク質の抗体染色を用いたりすることができる。これらのシグナルに基づいて，セルソーターでシグナルの上位と下位を分取し比較する。あるいは，ソート前のサンプルをコントロールとして使用することもできる。

2014 年に最初のガイド RNA ライブラリーを発表［9］して以降，そのデータに基づき改良を加えて，2016 年に改良版のガイド RNA ライブラリーを発表［10］した。主な着目点は 2 つで，一つ目はガイド RNA の scaffold と呼ばれる標的配列以外の部分の配列の最適化，二つ目は 20 塩基の標的配列中の特定位置の特定塩基の影響の考慮である。これにより CRISPR-Cas9 システムによる遺伝子破壊効率が飛躍的に向上し，ガイド RNA 間の遺伝子破壊効率のばらつきをかなり抑えることが可能となった。これは negative selection による遺伝子探索を目指している場合には非常に重要であり，改良版ガイド RNA ライブラリーによって，より検出力の高いがん細胞の増殖必須遺伝子探索が行えるようになった［10］。

3. CRISPR スクリーニングの実際

ここでは，CRISPR スクリーニングにおいて実際にはどのような細胞培養を行うのかについて触れたい。先にも述べたようにガイド RNA ライブラリーには，約 10 万（1 x 10^5）種類のガイド RNA が混合されている。細胞への導入はレンチウイルスによるが，この時，ガイド RNA ライブラリー中の約 10 万種類のガイド RNA 存在比が変わることなく，ガイド RNA を細胞集団に持ち込む必要がある。これを「コンプレキシティーの維持」という。どうするのかというと，1 ガイド RNA あたりの導入細胞数（カバレッジ）を大きくする。具体的には，100 〜 1,000 cells/gRNA となるよう，感染細胞を作製する。例えば，100x で作製する場合には，10 万 x 100 = 1,000 万（1 x 10^7）cells の感染細胞を作る。

もう一つの考慮点は，各感染細胞を見ると発現するガイド RNA は 1 つが理想ということである。これにより，各変異細胞では 1 つの遺伝子が破壊されていることになる。ウイルス濃度を十分に薄くすることで，細胞がウイルスに感染する際に 2 ウイルス粒子以上で感染する割合が少なくなり，一細胞一遺伝子破壊が実現できる。実際には，細胞集団のウイルス感染率が 30％以下であれば，感染細胞を見ると一ウイルス粒子での感染が大多数となっている。上記の必要感染細胞数を考えると，3.3 x 10^7 cells の Cas9

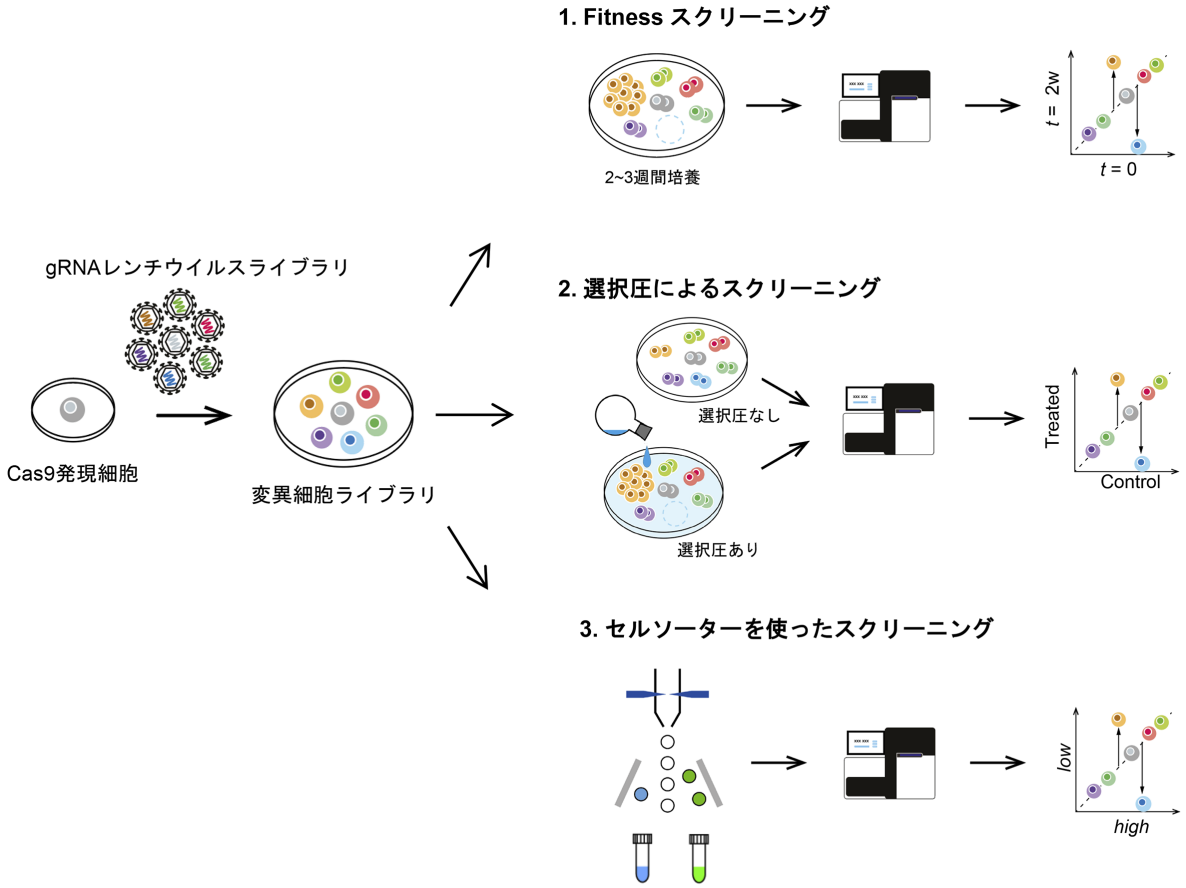


図２　CRISPR スクリーニングで行われる表現型アッセイ

主に 3 つの表現型アッセイにタイプわけできる。統計解析ではコントロール群と実験群を比較して，実験群で有意に存在率が変化した gRNA，そして遺伝子を検出しようとする。何をコントロール群にするのか，しっかり考えておく。例えば，2. 選択圧によるスクリーニングでは，選択圧なし（コントロール群）vs あり（実験群）の他に，変異細胞ライブラリをコントロール群として，変異細胞ライブラリ vs 選択圧なし，変異細胞ライブラリ vs 選択圧ありと 2 つの統計解析を行い，その統計解析結果を比較して，選択圧で表現型を示した遺伝子を絞り込むことも可能である。同様に，3. セルソーターを使ったスクリーニングでは，プレソートサンプルをコントロール群にすることができる。

発現細胞を用意し，30％がウイルスに感染するように使用するウイルス量を調整すれば，1 x 10^7 の感染細胞を得ることができ，変異細胞ライブラリーが完成する。

次に，変異感染細胞ライブラリーを継代する場合を考える。この時も集団中のガイド RNA 存在比が変わらないように継代しなくてはいけない。具体的には，1~2 x 10^8 cells 程度まで増殖させ，トリプシンで細胞を回収後，5 x 10^7 cells（500x）を新しいディッシュに播種する。500 x にしているのは，がん細胞株であれば 5 x 10^7 cells の培養は実現可能であるからで，ヒト iPS 細胞ではコスト面がネックになる可能性が高く，これより少し低いカバレッジでの培養を検討しても良い。

いずれにせよ，スクリーニングでは，ライブラリー中のガイド RNA の総数に対し，十分に大きな数（100 ～ 1,000 倍）の細胞数を扱う必要があり，普段の細胞培養スケールとは異なる大規模なものとなる。低密度でしか培養できない細胞の場合，膨大な培養面積が必要となる可能性が高い。スクリーニング全体を通して必要なディッシュの数や培養液量をあらかじめ計算し準備する必要がある。

4. 終わりに

CRISPR-KO スクリーニングが発表されてから 10 年以上が経とうとしている。この間，本手法を使った様々な表現型解析がなされ，新しい遺伝子機能が報告されてきた。また創薬の標的となる分子も見出されている。派生法として，CRISPR-activation や CRISPR-inactivation によるスクリーニング［11, 12］，またガイド RNA をタイリングすることであるゲノム領域を集中的に解析する方法［13］や，base editor［14］や prime editor［15］を使ったスクリーニング法も報告された。また，培養ディッシュ上だけでなく，マ

ウス体内でのCRISPRスクリーニング［16］も実施されている。CRISPRスクリーニングの手法そのものは十分に完成したものであるので，自身が着目する表現型が変異細胞数の増減で表現できるのであれば，CRISPRスクリーニングが適用できる可能性は十分に高い。ぜひ，検討していただきたい。

Reference

1. Yusa K, Horie K, Kondoh G, Kouno M, Maeda Y, Kinoshita T, et al. Genome-wide phenotype analysis in ES cells by regulated disruption of Bloom's syndrome gene. Nature. 2004;429: 896–899.
2. Jinek M, Chylinski K, Fonfara I, Hauer M, Doudna JA, Charpentier E. A programmable dual-RNA-guided DNA endonuclease in adaptive bacterial immunity. Science. 2012;337: 816–821.
3. Behan FM, Iorio F, Picco G, Gonçalves E, Beaver CM, Migliardi G, et al. Prioritization of cancer therapeutic targets using CRISPR-Cas9 screens. Nature. 2019;568: 511–516.
4. Dunn S, Eberlein C, Yu J, Gris-Oliver A, Ong SH, Yelland U, et al. AKT-mTORC1 reactivation is the dominant resistance driver for PI3Kβ/AKT inhibitors in PTEN-null breast cancer and can be overcome by combining with Mcl-1 inhibitors. Oncogene. 2022;41: 5046–5060.
5. Islam S, Tarumoto Y, Takano M, Sugino S, Nishibuchi G, Mizutani A, et al. CDK10 loss primes tumor cells for transcriptional vulnerability and sensitizes to CDK12/13 inhibition. Cell Death Dis. 2026;17. doi:10.1038/s41419-026-08973-x
6. Sakai M, Masuda Y, Tarumoto Y, Aihara N, Tsunoda Y, Iwata M, et al. Genome-scale CRISPR-Cas9 screen identifies host factors as potential therapeutic targets for SARS-CoV-2 infection. iScience. 2024;27: 110475.
7. Oji A, Yusa K, Noda I, Ichinose T, Kondo Y, Hiratani I. Nuclear compartmentalization at the G1/S transition plays a key role in DNA replication control. Nat Commun. 2026;17. doi:10.1038/s41467-026-75264-6
8. Fukuda K, Okuda A, Yusa K, Shinkai Y. A CRISPR knockout screen identifies SETDB1-target retroelement silencing factors in embryonic stem cells. Genome Res. 2018;28: 846–858.
9. Koike-Yusa H, Li Y, Tan E-P, Velasco-Herrera MDC, Yusa K. Genome-wide recessive genetic screening in mammalian cells with a lentiviral CRISPR-guide RNA library. Nat Biotechnol. 2014;32: 267–273.
10. Tzelepis K, Koike-Yusa H, De Braekeleer E, Li Y, Metzakopian E, Dovey OM, et al. A CRISPR Dropout Screen Identifies Genetic Vulnerabilities and Therapeutic Targets in Acute Myeloid Leukemia. Cell Rep. 2016;17: 1193–1205.
11. Gilbert LA, Horlbeck MA, Adamson B, Villalta JE, Chen Y, Whitehead EH, et al. Genome-scale CRISPR-mediated control of gene repression and activation. Cell. 2014;159: 647–661.
12. Konermann S, Brigham MD, Trevino AE, Joung J, Abudayyeh OO, Barcena C, et al. Genome-scale transcriptional activation by an engineered CRISPR-Cas9 complex. Nature. 2015;517: 583–588.
13. Canver MC, Smith EC, Sher F, Pinello L, Sanjana NE, Shalem O, et al. BCL11A enhancer dissection by Cas9-mediated in situ saturating mutagenesis. Nature. 2015;527: 192–197.
14. Hanna RE, Hegde M, Fagre CR, DeWeirdt PC, Sangree AK, Szegletes Z, et al. Massively parallel assessment of human variants with base editor screens. Cell. 2021;184: 1064–1080.e20.
15. Ren X, Yang H, Nierenberg JL, Sun Y, Chen J, Beaman C, et al. High-throughput PRIME-editing screens identify functional DNA variants in the human genome. Mol Cell. 2023;83: 4633–4645.e9.
16. Keng VW, Chiu AP, To JC, Li X-X, Linden MA, Amin K, et al. Transposon delivery for CRISPR-based loss-of-function screen in mice identifies NF2 as a cooperating gene involved with the canonical WNT signaling molecular class of hepatocellular carcinoma. Heliyon. 2023;9: e18774.

特　集：先端遺伝子操作技術の生命科学研究への応用

多様化する動物モデルにおけるゲノム編集技術の展開

阿部高也
理化学研究所　生命機能科学研究センター 生体モデル開発チーム

要　約

近年，次世代シークエンサーによるゲノム解読技術の発展とゲノム編集技術の登場により，遺伝学的解析の対象となる動物種は急速に拡大している。従来は限られたモデル動物が研究の中心であったが，現在では研究目的に応じて多様な動物種を用いて，それぞれの特徴を活かした研究が可能となっている。マウスでは受精卵マイクロインジェクションやES細胞を用いたジーンターゲティング技術が長年にわたり発展してきた。これらの基盤技術はCRISPR/Cas9によるゲノム編集へと受け継がれ，現在では他の動物種における遺伝子改変技術開発の重要な基盤となっている。一方で，動物種ごとに生殖特性が異なり各々に適した生殖工学技術が必要となるため，マウスで確立された手法をそのまま適用できるとは限らない。そのため，それぞれの動物種に応じた技術開発や最適化が求められている。本稿では，まずマウスにおける遺伝子改変技術の発展について概説する。続いて，我々が報告したラットおよびゴールデンハムスターにおけるノックイン動物作製技術の開発，さらに有袋類のハイイロジネズミオポッサムと爬虫類のソメワケササクレヤモリのゲノム編集について紹介する。これらの事例を通して，多様化する動物モデルにおけるゲノム編集技術の現状と課題について概説する。

多様化する動物モデル

従来から広く研究に利用されてきた代表的なモデル動物として，線虫，ショウジョウバエ（昆虫），ゼブラフィッシュ（魚類），アフリカツメガエル（両生類），ニワトリ（鳥類），マウス（哺乳類）などがある。これらに共通する特徴として，飼育や繁殖が容易であること，世代時間が短いこと，遺伝学的手法や解析技術が整備されていること，さらにゲノム情報や変異体などの研究資源が豊富に蓄積されていることが挙げられる。これら以外で研究に用いられる動物は，準モデル動物と非モデル動物に大別される。非モデル動物とは，飼育法や繁殖技術，ゲノム情報，遺伝学的手法などの研究基盤が十分に整備されていない実験動物を指す。一方，準モデル動物という用語に厳密な定義はないものの，モデル動物と非モデル動物の中間に位置し，一定の研究基盤が整備された実験動物を指すことが多い。2000年代後半から次世代シークエンサーの発展により，非モデル動物のゲノム解読が急速に進展した。これにより，多くの非モデル動物で研究基盤の整備が進み，準モデル動物化が促進された。近年ではEarth BioGenome Projectをはじめとする国際的な取り組みにより，多様な生物種で高品質な参照ゲノムの整備が進められている（Blaxter et al., 2025）。また，従来のモデル動物や準モデル動物においても，ゲノム情報の高精度化やアノテーションの充実が進められている。さらに2010年代にゲノム編集技術が登場したことで，従来のモデル動物や準モデル動物に加え，新たにゲノム情報が整備された非モデル動物においても，標的遺伝子の改変と機能解析が可能となった。実際に，昆虫（ハマダラカ・ミツバチ・フタホシコオロギ）（Gantz et al., 2015; Hu et al., 2019; Matsuoka et al., 2025），魚類（メダカ・キンギョ）（Ansai et al., 2014; Lee et al., 2024），両生類（ネッタイツメガエル・イベリアトゲイモリ）（Blitz et al., 2013; Elewa et al., 2017），爬虫類（ブラウンアノール・ソメワケササクレヤモリ）（Abe et al., 2023b; Rasys et al., 2019），哺乳類（ブタ・カニクイサル・マーモセット）（Hai et al., 2014; Kumita et al., 2019; Niu et al., 2014）など，極めて多様な動物種でゲノム編集が報告されている。多様な動物モデルが必要とされる理由の一つは，組織の再生能力や，非ヒト霊長類に特有の高次脳機能などの従来のモデル動物では解析が困難な生命現象を研究するためである。研究目的に応じて適切な動物種を選択する時代になってきたといえる。

マウスの遺伝子改変技術

マウスは哺乳類の代表的なモデル動物であり，ゲノム編集技術が登場する以前から，遺伝子改変技術を利用した逆遺伝学的研究手法が確立されていた。

これらの基盤技術は，他の動物種における遺伝子改変技術の開発にも広く応用されている。そこで，まずマウスの遺伝子改変技術について紹介する。

マウスの遺伝子改変技術は，1980 年に Jon Gordon らがマイクロインジェクション法を用いて受精卵の前核に DNA 断片を注入し，トランスジェニックマウスの作製に成功したことに始まる（Gordon et al., 1980）。マイクロインジェクション法では，顕微鏡下でマニピュレーターを用いて先端が極めて細いガラスキャピラリーを操作し，DNA 溶液を受精卵の前核へ注入する。注入された DNA 断片はゲノム中のランダムな位置に組み込まれる。また，同一部位に 1 コピーから数十コピー以上の DNA が連結して挿入されることも多く，トランスジーン（導入遺伝子）の発現量は系統ごとに大きく異なる。この方法によるトランスジェニックマウスの作製効率は必ずしも高くなく，目的に適した系統が得られる割合はマイクロインジェクションした受精卵数に対して数％程度である。この方法は挿入部位によっては内在性遺伝子の機能や発現に影響を与えることがある。実際に，広く使われている 40 系統のトランスジェニックマウスを解析したところ，約半数で内在性遺伝子の破壊が認められ，多くの系統で大規模欠損や重複などの構造変異を伴っていることが報告されている（Goodwin et al., 2019）。一方，ランダムな DNA 挿入による内在性遺伝子の破壊と，それに伴う予期しない表現型の解析が，新たな遺伝子機能の発見につながった例もある（Kuro-o et al., 1997）。

マウス胚性幹細胞（ES 細胞）を用いたジーンターゲティング技術は，1981 年の ES 細胞の樹立（Evans et al., 1981; Martin, 1981），ES 細胞を胚盤胞へ注入してキメラマウスを作製し，その遺伝情報を次世代へ伝達する技術の確立（Bradley et al., 1984），さらに相同組換えを利用したジーンターゲティング法の開発によって確立された（Doetschman et al., 1987; Thomas et al., 1987）。これにより，標的遺伝子の機能を欠損させたノックアウト（KO）マウスや，標的遺伝子に特定の遺伝子配列や変異を導入したノックイン（KI）マウスの作製が可能となり，生命科学研究に大きな変革をもたらした。これらの技術開発への貢献により，Martin Evans，Oliver Smithies，Mario Capecchi は，2007 年にノーベル生理学・医学賞を受賞した。

ES 細胞を用いたジーンターゲティングでは，未分化状態を維持した高品質な ES 細胞を培養する技術と，標的遺伝子座に対応する数 kb の相同配列（ホモロジーアーム）を有するターゲティングベクターの構築技術が必要である。ターゲティングベクターを ES 細胞に導入した後，薬剤選別によって得られた薬剤耐性コロニーから，PCR 解析やサザンブロット解析により相同組換え ES 細胞を同定する。同定した相同組換え ES 細胞を胚盤胞期胚へ注入してキメラマウスを作製し，改変した遺伝子が生殖系列を介して次世代へ伝達されることで，遺伝子改変マウス系統が樹立される。このように, ES 細胞を用いたジーンターゲティングには多くの高度な技術が必要である。そのため，ゲノム編集技術が登場する以前は，KO マウスや KI マウスを独自に作製できる研究施設は限られていた。

ゲノム編集技術は，2000 年代前半に Zinc Finger Nuclease（ZFN）の実用化が始まり（Urnov et al., 2005），2010 年前後には Transcription Activator-Like Effector Nuclease（TALEN）が登場した（Bogdanove et al., 2011; Christian et al., 2010）。ZFN および TALEN は，標的配列ごとに DNA 結合タンパク質を設計する必要があり，ベクター構築が煩雑であった。その後，guide RNA を変更するだけで標的配列を自在に変更できる CRISPR/Cas9 システムが登場したことで，急速に CRISPR/Cas9 へ移行した。CRISPR/Cas9 によるゲノム編集の基本原理は，2012 年に Emmanuelle Charpentier と Jennifer Doudna らによって報告され（Jinek et al., 2012），このゲノム編集技術の開発への貢献により，2020 年にノーベル化学賞が授与された。2013 年には，Feng Zhang ら（Cong et al., 2013）および George Church ら（Mali et al., 2013）によって哺乳類細胞への応用が報告され，さらに同年には，Rudolf Jaenisch らや Feng Zhang らによって，受精卵マイクロインジェクションにより，KO マウスおよび KI マウスを一世代で作製できることが相次いで報告された（Wang et al., 2013; Yang et al., 2013）。この方法は，ES 細胞を用いたジーンターゲティングと比較して著しく簡便で，遺伝子改変マウスの作製期間も大幅に短縮された。さらに，マウスでは受精卵へのマイクロインジェクション技術がすでに確立されていたことから，この技術を有する研究施設へ急速に普及した。マイクロインジェクションは，熟練した技術やマニピュレーターなどの高価な装置を必要とするが（図 1A），近年ではこれらを必要としない受精卵エレクトロポレーション法が開発され，とりわけ KO マウスの作製は大幅に簡便化された（Hashimoto et al., 2016）。

マウスの受精卵ゲノム編集が広く普及するなか，KO に比べて KI の作製効率が著しく低いことが大きな課題となった。そのため，KI 効率の向上を目的とした様々な技術開発が進められてきた（Aida et al., 2015; Chu et al., 2016; Gu et al., 2018; Miura et al., 2015; Yao et al., 2018; Yoshimi et al., 2016）。我々もこの課題に取り組み，高効率な KI マウス作製法を開発した（Abe et al., 2020; Abe et al., 2023a）。我々は，これまで十分に検討されてこなかった CRISPR/Cas9 およびドナーベクター導入時の受精卵の細胞周期に着目し，KI 効率との関係を解析した。実験には，体外受精（IVF）によって作製した受精卵（IVF 胚）を用いた。また，IVF 胚は前核期に凍結保存し，実験ごとに融解して使用した。自然交配由来の受精卵は受精時刻

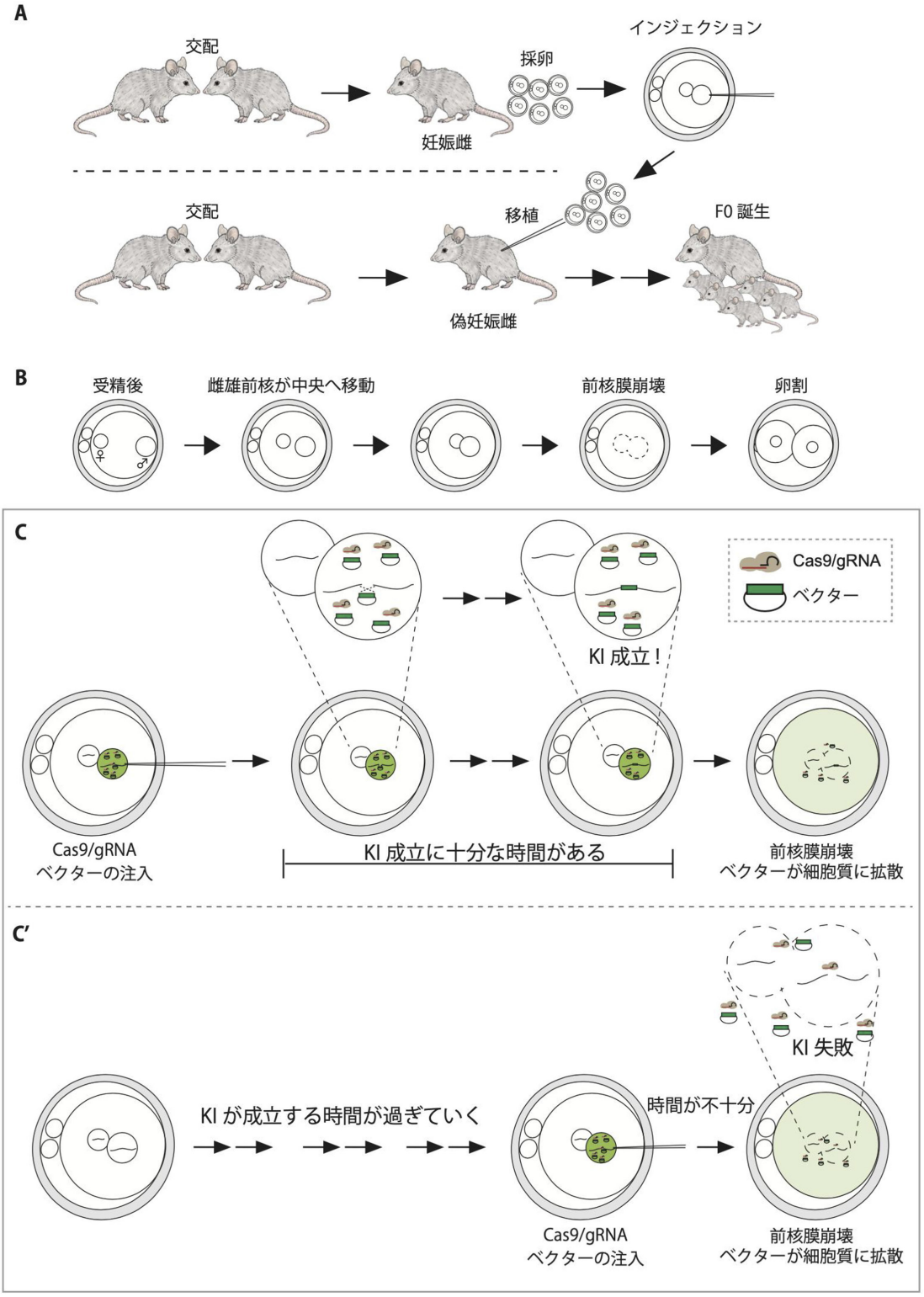


図 1　受精卵マイクロインジェクションを用いたゲノム編集と高効率ノックイン

（A）哺乳類での受精卵マイクロインジェクション法の一般的な流れの模式図：交配して受精卵を回収して，受精卵の前核に Cas9/gRNA などを注入する。精管結紮した雄と交配して作出した偽妊娠雌に，注入した受精卵を移植して F0 個体を得る。F0 個体の遺伝型を解析して遺伝子改変動物を同定する。（B）受精から第一卵割までの雌雄前核の様子を表した模式図（C）CRISPR/Cas9 およびドナーベクターの注入から前核膜崩壊まで十分な時間がある場合の KI 成立過程の模式図（C’）注入から前核膜崩壊まで KI 成立に十分な時間がない場合の模式図

にばらつきが生じるため，IVF によって受精のタイミングを揃え，受精卵の細胞周期を均一化することを目的とした。実際に，凍結保存した IVF 胚の第一卵割のタイミングをタイムラプス観察で解析したところ，そのばらつきは 30 分以内であり，ほぼ同期していた。そこで，凍結 IVF 胚を融解した後の培養時間を 1 時間，4 時間および 7 時間とした胚の前核に CRISPR/Cas9 およびドナーベクターを注入し，KI 効率を比較した。その結果，融解後 1 時間および 4 時間で注入した受精卵では高効率に KI 胚が得られたが，7 時間後に注入した受精卵では KI 胚はほとんど得られなかった。

受精直後のマウス受精卵では雌雄の前核が形成され，発生の進行に伴って両前核は接近し，前核膜崩壊を経て第一卵割が起こる（図 1B）。それぞれの注入時間における前核膜崩壊までの時間は約 8 時間，4 時間，1 時間であったことから，注入から前核膜崩壊までの時間が KI 効率を左右する重要な要因であると考えられた。CRISPR/Cas9 およびドナーベクターが注入された前核内では，Cas9 が標的ゲノム領域に DNA 二本鎖切断を誘導し，ドナーベクターを鋳型とした修復反応によって外来遺伝子がゲノムへ挿入されることで KI が成立する（図 1C）。一方，前核膜崩壊が起こると，前核内に存在していた Cas9 およびドナーベクターは細胞質へ拡散すると考えられる（図 1C’）。これらの結果から，効率的な KI には前核内にドナーベクターが高濃度に存在することが重要であると考えられた。また，KI 反応には一定の時間を要し，前核内で Cas9 およびドナーベクターが作用できる時間が少なくとも約 4 時間は必要であることが示唆された。

さらに，片方の前核のみへの注入と比較して，雌雄両前核に注入することで，雌雄両アレルへの KI 効率を向上させることができた。このことからも，KI は前核膜崩壊後ではなく，主として注入した前核内で起きていることが示唆された。また，Cas9 mRNA や発現プラスミドではなく，Cas9 タンパク質を直接導入することも重要であった。Cas9 mRNA や発現プラスミドを用いた場合には，mRNA の翻訳が起こるまでに時間を要するため，前核内で作用できる時間が短くなり，結果として KI 効率が低下すると考えられる。以上の結果から，高効率な KI を達成するためには，CRISPR/Cas9 およびドナーベクターの注入から前核膜崩壊まで KI 成立に十分な時間が残されている受精卵を用いることが重要であることが明らかとなった。我々は，この方法を用いてこれまでに約 100 の異なる遺伝子座において KI マウスの樹立に成功しており，その高い汎用性が実証されている。

齧歯類ラットとハムスターのゲノム編集

齧歯類のゲノム編集では，マウスで開発された技術を応用できる場合が多い（図 1A）。しかし，動物種ごとに生殖特性や胚操作技術が異なるため，それぞれの種に応じた最適化が必要となる。我々はラットおよびゴールデンハムスターにおいて，特に KI 動物の作製法を確立したので，その取り組みについて紹介する。

ラットは，マウスと並んで古くから広く利用されてきた代表的な実験動物であり，特に，神経科学・行動学・薬理学などの分野で重要な役割を果たしてきた。一方，遺伝子改変技術についてはマウスに比べて開発が遅れていた。ラット ES 細胞は 2008 年に樹立されているものの（Buehr et al., 2008; Li et al., 2008），マウス ES 細胞ほど遺伝子改変動物の作製に広く利用されるには至っていない。また，IVF や胚操作技術についてもマウスほど標準化されていない（Honda et al., 2019）。ゲノム編集により KO ラットの作製は比較的普及している一方で，KI ラットの作製は依然として容易ではなかった。そこで我々は，マウスで確立した高効率 KI 法をラットへ応用することを試みた（Abe et al., 2025）。

ラットでは IVF 技術は確立されているものの，我々の実験では，IVF 胚を用いてゲノム編集を行った場合，産仔が得られる割合が非常に低いという問題があった。そのため，過排卵誘導処理を施した雌を自然交配させ，受精卵を回収して使用した。得られた受精卵について，タイムラプス観察により第一卵割の開始時期を解析したところ，胚間でマウス IVF 胚ほど同期していないものの，そのばらつきはおおむね 5 時間以内に収まることが確認された。第一卵割および前核膜崩壊の時期を解析し，前核膜崩壊まで KI 成立に十分な時間が残されている時間帯にマイクロインジェクションを行うことで，再現性よく KI 個体を得ることができた。これらの結果より，マウスと同様に前核膜崩壊までの時間を考慮してマイクロインジェクションを行うことで，ラットにおいても効率的に KI が可能であることが明らかとなった。本方法により，複数の KI ラットの樹立に成功している（Abe et al., 2025; Matsumoto et al., 2024）。

ゴールデンハムスター（Syrian hamster）は，マウスやラットとは異なる生理学的特徴を有することから，さまざまな研究分野で利用されてきた。特に，低温環境へ暴露により冬眠を誘導できることから，冬眠研究の代表的モデルとして利用されている（Chayama et al., 2016）。また，インフルエンザウイルスや新型コロナウイルス（SARS-CoV-2）などのヒト呼吸器ウイルスに対して高い感受性を示し，感染後の病態がヒトと類似することから，感染症研究においても重要なモデル動物として利用されている（Wang et al., 2022）。このように，ゴールデンハムスターはマウスでは再現することが難しい生命現象や病態を解析するための有用な実験動物である。一方，生殖工学技術やゲノム編集技術はほとんど確立されておらず，CRISPR/Cas9 を用いた KO ハムスターの作製は報

告されているものの（Miao et al., 2023; Taylor et al., 2022），KI ハムスターの作製は報告されていなかった。

ハムスターにおける胚操作を困難にする要因の一つとして，初期胚の高い光感受性が挙げられる。ハムスター胚は，マウス胚ではほとんど影響が認められない程度の光照射によって発生停止を起こすことが知られている。その詳細な機構は十分には解明されていないものの，蛍光灯などの人工光に含まれる短波長光が原因と考えられており，600 nm 以上の長波長光に対しては比較的耐性を示すことが報告されている（Takenaka et al., 2007）。そのため，採卵やマイクロインジェクション，胚移植などの胚操作は，暗室内で赤色フィルターを介した照明下で実施した。また，我々の実験条件では，IVF や過排卵処理によって得られた受精卵をマイクロインジェクションに安定して利用することが困難であった。一方，ゴールデンハムスターは明確な 4 日周期の性周期を示すことから，この特性を利用して，自然交配により受精卵を回収した（Whittaker, 1999）。KI には前核膜崩壊までの時間を考慮することが重要であるが，自然交配由来の受精卵では受精のタイミングを正確に把握することができない。そこで，雌雄前核の形態や位置関係を指標として，前核膜崩壊まで KI 成立に十分な時間が残されていると予測される時間帯を考慮してマイクロインジェクションを実施した。その結果，世界で初めて KI ハムスター系統の作製に成功した（Shigeta et al., 2025）。また，この方法により複数の KI ハムスター系統の樹立に成功している。一方，ハムスターではマウスと比較して胚移植後の仮親の妊娠率や仔の離乳までの生存率が低く，KI 効率も改善の余地がある。今後，これらの問題を改善することで，ゴールデンハムスターにおける遺伝子改変技術の実用性を高める必要がある。

有袋類オポッサムのゲノム編集

有袋類は有胎盤類（真獣類）との共通祖先から約 1.6 ～ 1.9 億年前に分岐したと考えられており，哺乳類の進化や発生機構を理解するための重要な研究対象として注目されている（図 2A）（Samollow, 2008）。実験動物としては，アメリカ大陸に分布するハイイロジネズミオポッサム（以下，オポッサム）や，オーストラリアに分布するダナートやワラビーなどが知られている（Cook et al., 2021; Hickford et al., 2009）。特にオポッサムは，小型でマウスと同様の環境下で飼育・繁殖できるため有袋類の代表的な実験動物として広く利用されてきた。

オポッサムは育児嚢を持たない有袋類であるが，他の有袋類と同様に新生仔は非常に未熟な状態で出生する（図 2B）。出生直後の新生仔は自力で母親の乳首まで移動し，乳首に吸着したまま発生を続ける（図 2C）。そのため，乳首まで移動するための前肢と吸着に必要な顎が発達しているが後躯の発達は未熟である（Zhu et al., 2023）。このように，真獣類では胎内で進行する発生過程を出生後に観察できることは，有袋類を研究する大きな利点である。さらに，有袋類では授乳期間中に乳成分が変化し，母乳に含まれる成長因子や免疫関連因子が新生仔の器官形成や免疫機能の成熟に関与することが示されており，母子間相互作用を研究するモデルとしても利用されている（Fehrenkamp et al., 2019; Sharp et al., 2017; Wang et al., 2012）。また，新生仔は高い組織再生能力を示すことから，再生生物学の研究モデルとして注目されている（Saito et al., 2025; Wheaton et al., 2021）。有袋類は真獣類との比較を通じて，哺乳類におけるエピジェネティック制御機構の起源と進化を研究する上でも興味深い。真獣類の体細胞では一般に父性または母性 X 染色体のいずれかがランダムに不活化されるのに対し，有袋類では父性 X 染色体が選択的に不活化される（Mahadevaiah et al., 2020; Renfree et al., 2013）。このように，オポッサムは真獣類との比較から哺乳類の発生・進化を理解するための有用な動物モデルであるが，遺伝学的解析手法はほとんど確立されていなかった。そこで我々は，一連の生殖工学技術を含む受精卵マイクロインジェクション法

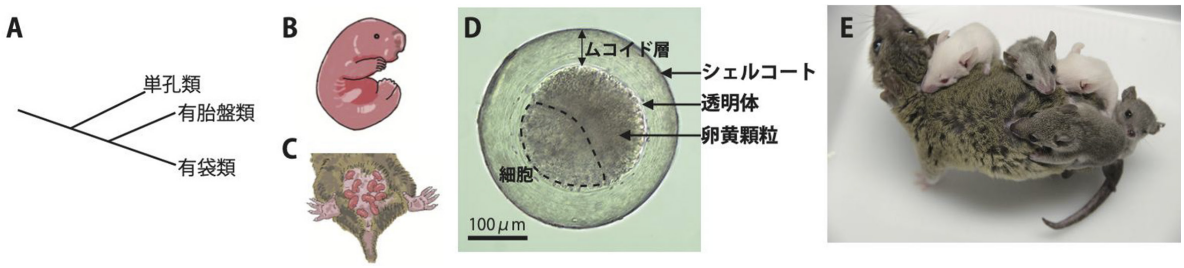


図 2　ハイイロジネズミオポッサムと KO オポッサム

（A）単孔類・有胎盤類・有袋類の進化系統樹の概略図（B）オポッサム新生仔（出産当日）の模式図（C）オポッサム新生仔が母親の乳首に吸い付いている模式図（D）オポッサム受精卵の写真（E）チロシナーゼ遺伝子を標的とした gRNA と Cas9 をマイクロインジェクションして得られた F0 個体および母親の写真：白色の個体はアルビノ，白色と灰色が混在する個体はモザイク，灰色の個体は野生型を示す。

を開発して，CRISPR/Cas9 により世界で初めて KO オポッサムの作製に成功した（Kiyonari et al., 2021）。ここでは，その技術開発においてオポッサム特有の課題となった交尾の確認方法と受精卵マイクロインジェクションについて紹介する。

マウス・ラット・ハムスターなどの齧歯類では，交尾の成立は膣栓，膣スメアや膣インピーダンス（膣電気抵抗）などによって容易に確認することができる。一方，オポッサムでは，これらの方法で交尾日を特定することは困難である。マイクロインジェクションに最適なステージの受精卵を回収するためには，交尾の成立時刻を正確に把握する必要があったため，飼育ケージ上方から連続的にビデオ撮影を行い，録画映像から交尾時刻を特定した。交尾時刻を基に受精卵を回収し，マイクロインジェクションによる CRISPR/Cas9 の導入を試みた。しかし，オポッサムの受精卵は透明帯に加えて厚いムコイド層および硬いシェルコートに覆われており，マウス受精卵とは大きく異なる構造を有している（図 2D）。特にこの時期は発生が進むにつれてシェルコートが硬くなり，通常のマイクロインジェクションではキャピラリーを受精卵内へ貫通させることが困難であった（Kiyonari et al., 2021, Video S1）。そこで，明暗周期を後退させることで，シェルコートが十分に硬化する前のより早い発生時期に受精卵を回収した。さらに，キャピラリーに微細な振動を与えるピエゾ装置（膜を振動で機械的に破る）を用いてマイクロインジェクションを行うことで，オポッサム受精卵への CRISPR/Cas9 の導入が可能となった。これらの技術的改良により，毛色形成に関与するチロシナーゼ遺伝子の KO を行い，F0 世代においてアルビノ表現型を示す個体を得ることに成功した（図 2E）。アルビノは両アレルに変異が導入されたことを示している。さらに変異アレルが次世代へ伝達されることも確認された。オポッサムでは，偽妊娠雌の作出や受精卵移植をはじめとする生殖工学技術が十分に整備されておらず，遺伝子改変技術の開発には多くの課題が存在した。しかし，そのような状況においても，マウスで蓄積された生殖工学およびゲノム編集技術は，オポッサムにおける技術開発の重要な基盤となった。我々が確立したゲノム編集技術は，今後オポッサムを用いた遺伝子機能解析や発生研究の発展に貢献するとともに，ダナートをはじめとする他の有袋類への応用を通じて，有袋類研究の発展を支える基盤技術となることが期待される。

爬虫類ヤモリのゲノム編集

爬虫類（トカゲやヤモリ）は，脳・心臓・四肢・再生能力などの進化過程を理解するための進化発生生物学（Evo-Devo）モデルとして注目されている（図 3A）（Koshiba-Takeuchi et al., 2009; Leal et al., 2016; Lozito et al., 2017; Noji et al., 2026; Nomura et al.,

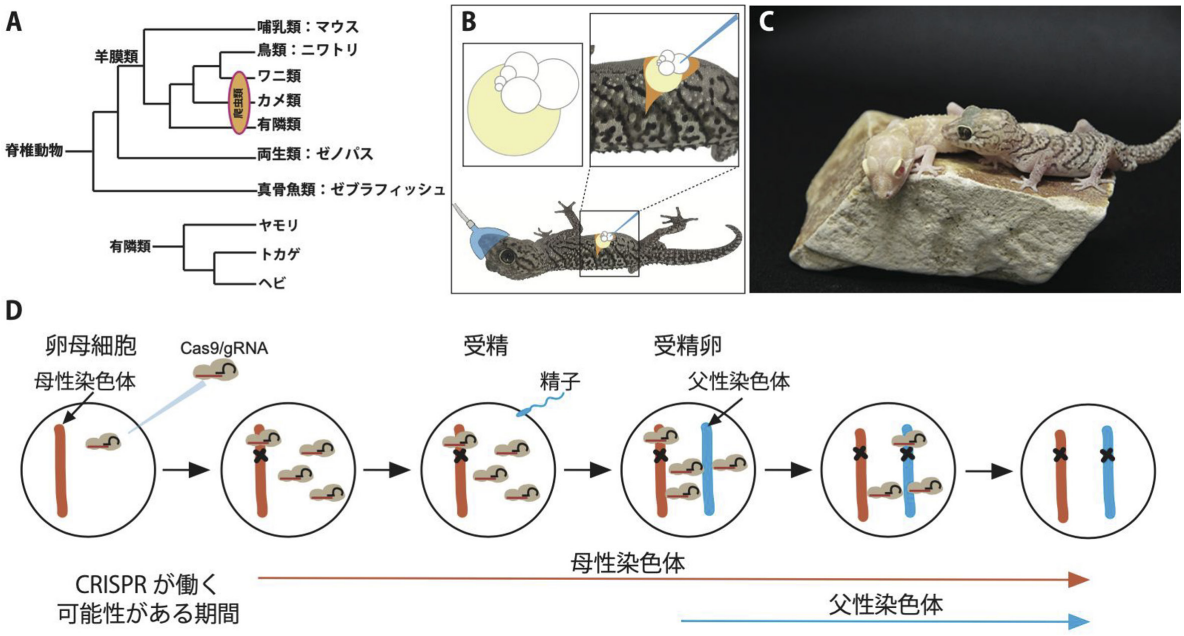


図 3　ソメワケササクレヤモリとゲノム編集

（A）進化発生生物学モデルとしての爬虫類の位置付けを示した脊椎動物の進化系統樹の概略図（B）ヤモリ卵母細胞インジェクション法と卵巣（挿入図）の模式図（C）ゲノム編集でチロシナーゼ遺伝子が KO されたアルビノと野生型のヤモリの写真（D）卵母細胞に注入された CRISPR/Cas9 により母性染色体および受精後の父性染色体に変異が導入されると考えられる過程の模式図

2013)。我々が研究に用いているソメワケササクレヤモリは，体長約 15 cm で，性成熟までに 6 ヶ月ほど要する。繁殖に季節性はなく，一年を通して約 10 日ごとに 1, 2 個の卵を産み, 約 60 日で孵化する。また，爬虫類では性決定が孵卵温度に依存する種も多いが，本種の性決定は温度に依存しない。さらに，高精度なゲノム情報もすでに整備されていることから，実験動物として優れた特徴を有している（Hara et al., 2015; Noro et al., 2009)。

爬虫類におけるゲノム編集には，受精卵へのアクセスが困難であるという特有の課題がある。卵は硬い卵殻に覆われており，産卵時にはすでに胚発生が体節期まで進行している。さらに，多くの種では交尾後の精子がメスの生殖管内に長期間貯蔵されるため, 受精時期を正確に把握することが難しい（Kircher et al., 2024)。これらの理由から，哺乳類で一般的に行われている受精卵マイクロインジェクションを爬虫類へ適用することは容易ではない。この問題を解決するために，従来とは全く異なるアプローチでアノールトカゲのゲノム編集法が報告された（Rasys et al., 2019)。この手法は卵母細胞インジェクション法と呼ばれ，麻酔下で雌個体を開腹し，卵巣を露出した後，未成熟な卵母細胞へ CRISPR/Cas9 を注入するものである。我々はこのトカゲの手法を基盤として，麻酔法や切開後の処置などを改良し，ソメワケササクレヤモリへの応用を試みた（図 3B）（Abe et al., 2023b)。

ソメワケササクレヤモリ（ヤモリ）には左右一対の卵巣が存在し，それぞれの卵巣には発育段階の異なる卵母細胞が含まれている。卵巣内には白色に近い小さな未成熟卵母細胞から，黄色味を帯びた排卵間近の大型卵母細胞まで観察される（図 3B 挿図)。我々はこのうち，直径 1 〜 2.5 mm 程度の約 4 個の未成熟卵母細胞に対して Cas9 タンパク質と gRNA を注入した。注入にはゼブラフィッシュなどの受精卵インジェクションに用いられるインジェクターを利用した。我々はトカゲの報告と同様にチロシナーゼ遺伝子の KO を試みた。その結果，処置した 6 匹の母親ヤモリから 7 個の発生胚が得られ，そのうち 3 個体が KO を示すアルビノ個体であった(図 3C)。また，2 個体はモザイクあるいはヘテロ接合体であり，残る 2 個体は野生型であった（Abe et al., 2023b)。興味深いことに，先行研究のトカゲと同様に，ヤモリにおいても F0 世代で両アレルに変異が導入されたアルビノ個体が得られた。この結果は，未受精卵である卵母細胞に注入された Cas9 と gRNA が，受精後にも活性を保持していた可能性を示唆している（図 3D)。母親由来染色体は卵母細胞への注入直後から Cas9 と gRNA に曝露されるのに対し，父親由来染色体は受精後に初めて受精卵の細胞質中に存在する Cas9 によって切断される。驚いたことは，インジェクション後 28 〜 43 日目に産卵された卵からもアルビノ個体が得られたことである。ソメワケササクレヤモリでは約 10 日間隔で産卵し，受精は産卵のおよそ 10 日前に起こると推定されることから，父親由来染色体の切断はインジェクション後 18 〜 33 日目以降に生じたことになる。これは，Cas9 が約 1 ヶ月近く活性を維持したまま卵母細胞に存在していたことを示唆している。この卵母細胞インジェクション法は，ヘビにおいてもその有効性が報告されており（Tzika et al., 2023)，爬虫類全般へ応用可能なゲノム編集技術として期待される。

ところで，爬虫類と類似した生殖様式をもつ鳥類のニワトリでは，PGC（始原生殖細胞 : primordial germ cell）を利用した遺伝子改変技術（トランスジェニック）がゲノム編集が登場する前から確立されており，ゲノム編集も PGC を介して行うことができる（Dimitrov et al., 2016; van de Lavoir et al., 2006)。培養下の PGC でゲノム編集を行い，その後，卵内の胚へ移植する。移植された PGC は生殖系列へ分化し，ゲノム編集された生殖細胞を有する個体が得られる。その個体を繁殖させることで，次世代において遺伝子改変個体を作製することができる。また，ニワトリにおいても卵母細胞インジェクションを行っている報告がある(Jiang et al., 2025)。これはトランスジェニック個体の作製法であるが，卵母細胞インジェクション法が爬虫類だけでなく，鳥類においても利用できる可能性を示唆している。

多様な動物種における KI 技術の課題と展望

これまで述べてきたように，ゲノム編集技術の発展によってさまざまな動物種で遺伝子改変が可能となった。一方，外来 DNA を特定のゲノム領域へ導入する KI は，単純な遺伝子 KO と比較して技術的難易度が高い。我々は，マウス・ラット・ハムスターにおける KI 技術の開発を通じて，受精卵の発生過程において CRISPR/Cas9 およびドナーベクターの導入時期が KI 効率を左右する重要な要因であることを明らかにしてきた。しかし，受精卵の大きさや構造，発生速度，生殖様式などは動物種によって大きく異なるため，マウスで確立された方法をそのまま他の動物種へ適用できるとは限らない。

CRISPR/Cas9 を用いた KI は，Cas9 によってゲノム DNA に二本鎖切断（double-strand break: DSB）を誘導し，その修復過程を利用して外来 DNA を標的部位へ導入する技術である。KI に利用される代表的な DNA 修復経路として，相同組換え修復（homology-directed repair: HDR)，非相同末端結合(non-homologous end joining: NHEJ)，およびマイクロホモロジー媒介末端結合（microhomology-mediated end joining: MMEJ）が挙げられる。HDR を利用した KI では，標的領域の両側に相同配列を有するドナー DNA を鋳型として，相同組換えによって目的の外来 DNA を正確に導入する（図 4A)。一方，NHEJ を利用した KI では，

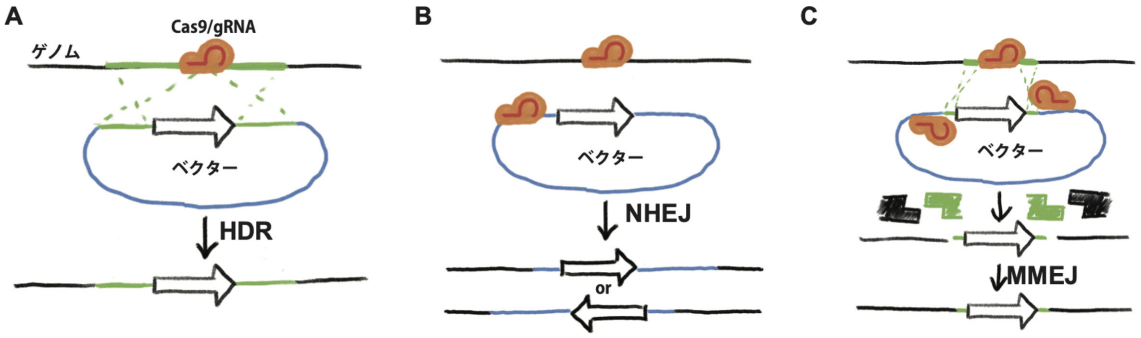


図 4　HDR・NHEJ・MMEJ を介した KI の概要
（A）HDR（B）NHEJ（C）MMEJ を介した KI 方法の模式図：緑色の実線は HDR におけるホモロジーアームおよび MMEJ におけるマイクロホモロジーアーム，白抜き矢印は挿入する外来 DNA，青色の実線は不要なベクター部分，オレンジ色および赤色の実線は Cas9 タンパク質および gRNA を示す。

ゲノム DNA とドナー DNA の両方に DSB を誘導し，切断されたゲノム DNA 末端とドナー DNA 末端が直接連結されることで外来 DNA が導入される（図 4B）。この方法では，ドナー DNA とともにプラスミド骨格などの不要なベクター配列が挿入される場合があり，挿入方向や接合部配列の制御も困難である。これに対して，MMEJ を利用した KI では，ゲノム DNA とドナー DNA の切断端に設計した短い相同配列（マイクロホモロジーアーム）（5 ～ 40 bp）を介して修復を誘導することで，外来 DNA が挿入される（図 4C）。NHEJ を利用した KI と比較して挿入方向や接合部配列を制御しやすく，比較的精密な配列導入が可能である（Sakuma et al., 2016）。これらの DNA 修復経路は細胞周期との関連が知られており，NHEJ が細胞周期を通じて機能するのに対し，HDR や MMEJ は主に S 期から G2 期に利用される。このような修復経路の細胞周期依存性は，受精卵を用いた KI の効率にも影響を与える重要な要因の一つと考えられる。マウスでは HDR 利用した KI が広く用いられているが，同じ方法がすべての動物種に適しているとは限らない。例えば，アフリカツメガエルやゼブラフィッシュでは，NHEJ や MMEJ を利用した KI が主に用いられている（Hisano et al., 2015; Mochii et al., 2024）。これらの動物では，初期胚の細胞周期が非常に短く，また，前核を標的としたマイクロインジェクションが困難であることから，CRISPR やドナー DNA は受精卵の細胞質に注入される。このように，利用可能な DNA 修復経路だけでなく，受精卵の構造や発生速度を考慮して KI 方法を選択することが重要である。また，マウスにおいても細胞質への注入で KI を成功させた報告がある（Yang et al., 2013）。このことは，前核への直接注入が困難な動物種においても，条件を最適化することで，細胞質への導入によって KI が成立する可能性を示している。

さらに，マイクロインジェクション以外の KI 手法が開発されている。その一つが，adeno-associated virus（AAV）ベクターを利用した方法である。透明帯を通過して初期胚へ感染が可能な AAV を利用することで，ドナー DNA を受精卵へ導入することができる。マウスやラットでは，回収した受精卵を培養下で AAV に感染させることによる KI が報告されている（Mizuno et al., 2018）。また，アフリカシマネズミ（Rhabdomys pumilio）では，卵管内に AAV を投与して卵管内の初期胚へドナー DNA を導入することにより，KI に成功している（Li et al., 2023）。これらの方法は，マイクロインジェクションや胚移植などの胚操作技術が十分に確立されていない動物種において，特に有用なアプローチとなる可能性がある。近年では，従来の DNA 修復機構を利用した KI に加えて，CRISPR とトランスポゾンあるいはインテグラーゼを組み合わせることにより，外来 DNA をゲノムへ導入する新たな技術も開発されており（Lampe et al., 2024; Yarnall et al., 2023），今後これらの技術がさまざまな動物種へ応用されることで，準モデル動物における遺伝子改変技術が発展することが期待される。

ここで紹介したように，マウスで確立されたゲノム編集技術は，他の動物種へ応用するための重要な基盤となる。しかし，効率的な遺伝子改変を実現するためには，単にマウスの方法を移植するのではなく，それぞれの動物種がもつ生殖様式，受精卵の構造，発生速度，細胞周期などの特徴を理解し，それに応じて技術を最適化することが重要である。各動物種の特性に応じたゲノム編集技術の開発が進み利用可能な動物モデルがさらに広がることで，従来のモデル動物だけでは明らかにできなかった生命現象を遺伝学的に解析することが可能になると期待される。

引用論文

Abe, T., Inoue, K. I., Furuta, Y. and Kiyonari, H. (2020). Pronuclear Microinjection during S-Phase Increases the Efficiency of CRISPR-Cas9-Assisted Knockin of Large DNA Donors in Mouse Zygotes. Cell Rep 31, 107653.

Abe, T., Inoue, K. I. and Kiyonari, H. (2023a). Efficient CRISPR/Cas9-Assisted Knockin of Large DNA Donors by Pronuclear Microinjection During S-Phase in Mouse Zygotes. Methods Mol Biol 2637, 181–194.

---- (2025). Efficient CRISPR/Cas9-mediated knockin of reporter genes in rats at ROSA26 by pronuclear microinjection. Dev Growth Differ 67, 215–225.

Abe, T., Kaneko, M. and Kiyonari, H. (2023b). A reverse genetic approach in geckos with the CRISPR/Cas9 system by oocyte microinjection. Dev Biol 497, 26–32.

Aida, T., Chiyo, K., Usami, T., Ishikubo, H., Imahashi, R., Wada, Y., Tanaka, K. F., Sakuma, T., Yamamoto, T. and Tanaka, K. (2015). Cloning-free CRISPR/Cas system facilitates functional cassette knock-in in mice. Genome Biol 16, 87.

Ansai, S. and Kinoshita, M. (2014). Targeted mutagenesis using CRISPR/Cas system in medaka. Biol Open 3, 362–371.

Blaxter, M., Lewin, H. A., DiPalma, F., Challis, R., da Silva, M., Durbin, R., Formenti, G., Franz, N., Guigo, R., Harrison, P. W., et al. (2025). The Earth BioGenome Project Phase II: illuminating the eukaryotic tree of life. Front Sci 3.

Blitz, I. L., Biesinger, J., Xie, X. and Cho, K. W. (2013). Biallelic genome modification in F(0) Xenopus tropicalis embryos using the CRISPR/Cas system. Genesis 51, 827–834.

Bogdanove, A. J. and Voytas, D. F. (2011). TAL effectors: customizable proteins for DNA targeting. Science 333, 1843–1846.

Bradley, A., Evans, M., Kaufman, M. H. and Robertson, E. (1984). Formation of germ-line chimaeras from embryo-derived teratocarcinoma cell lines. Nature 309, 255–256.

Buehr, M., Meek, S., Blair, K., Yang, J., Ure, J., Silva, J., McLay, R., Hall, J., Ying, Q. L. and Smith, A. (2008). Capture of authentic embryonic stem cells from rat blastocysts. Cell 135, 1287–1298.

Chayama, Y., Ando, L., Tamura, Y., Miura, M. and Yamaguchi, Y. (2016). Decreases in body temperature and body mass constitute pre-hibernation remodelling in the Syrian golden hamster, a facultative mammalian hibernator. R Soc Open Sci 3, 160002.

Christian, M., Cermak, T., Doyle, E. L., Schmidt, C., Zhang, F., Hummel, A., Bogdanove, A. J. and Voytas, D. F. (2010). Targeting DNA double-strand breaks with TAL effector nucleases. Genetics 186, 757–761.

Chu, V. T., Weber, T., Graf, R., Sommermann, T., Petsch, K., Sack, U., Volchkov, P., Rajewsky, K. and Kuhn, R. (2016). Efficient generation of Rosa26 knock-in mice using CRISPR/Cas9 in C57BL/6 zygotes. BMC Biotechnol 16, 4.

Cong, L., Ran, F. A., Cox, D., Lin, S., Barretto, R., Habib, N., Hsu, P. D., Wu, X., Jiang, W., Marraffini, L. A., et al. (2013). Multiplex genome engineering using CRISPR/Cas systems. Science 339, 819–823.

Cook, L. E., Newton, A. H., Hipsley, C. A. and Pask, A. J. (2021). Postnatal development in a marsupial model, the fat-tailed dunnart (Sminthopsis crassicaudata; Dasyuromorphia: Dasyuridae). Commun Biol 4, 1028.

Dimitrov, L., Pedersen, D., Ching, K. H., Yi, H., Collarini, E. J., Izquierdo, S., van de Lavoir, M. C. and Leighton, P. A. (2016). Germline Gene Editing in Chickens by Efficient CRISPR-Mediated Homologous Recombination in Primordial Germ Cells. PLoS One 11, e0154303.

Doetschman, T., Gregg, R. G., Maeda, N., Hooper, M. L., Melton, D. W., Thompson, S. and Smithies, O. (1987). Targetted correction of a mutant HPRT gene in mouse embryonic stem cells. Nature 330, 576–578.

Elewa, A., Wang, H., Talavera-Lopez, C., Joven, A., Brito, G., Kumar, A., Hameed, L. S., Penrad-Mobayed, M., Yao, Z., Zamani, N., et al. (2017). Reading and editing the Pleurodeles waltl genome reveals novel features of tetrapod regeneration. Nat Commun 8, 2286.

Evans, M. J. and Kaufman, M. H. (1981). Establishment in culture of pluripotential cells from mouse embryos. Nature 292, 154–156.

Fehrenkamp, B. D., Morrissey, K. A. and Miller, R. D. (2019). Opossum milk IgG is from maternal circulation and timing of transfer correlates with neonatal immune development. Reprod Fertil Dev 31, 1246–1251.

Gantz, V. M., Jasinskiene, N., Tatarenkova, O., Fazekas, A., Macias, V. M., Bier, E. and James, A. A. (2015). Highly efficient Cas9-mediated gene drive for population modification of the malaria vector mosquito Anopheles stephensi. Proc Natl Acad Sci U S A 112, E6736–6743.

Goodwin, L. O., Splinter, E., Davis, T. L., Urban, R., He, H., Braun, R. E., Chesler, E. J., Kumar, V., van Min, M., Ndukum, J., et al. (2019). Large-scale discovery of mouse transgenic integration sites reveals frequent structural variation and insertional mutagenesis. Genome Res 29, 494–505.

Gordon, J. W., Scangos, G. A., Plotkin, D. J., Barbosa, J. A. and Ruddle, F. H. (1980). Genetic transformation of mouse embryos by microinjection of purified DNA. Proc Natl Acad Sci U S A 77, 7380–7384.

Gu, B., Posfai, E. and Rossant, J. (2018). Efficient generation of targeted large insertions by microinjection into two-cell-stage mouse embryos. Nat Biotechnol 36,

632–637.

Hai, T., Teng, F., Guo, R., Li, W. and Zhou, Q. (2014). One-step generation of knockout pigs by zygote injection of CRISPR/Cas system. Cell Res 24, 372–375.

Hara, Y., Tatsumi, K., Yoshida, M., Kajikawa, E., Kiyonari, H. and Kuraku, S. (2015). Optimizing and benchmarking de novo transcriptome sequencing: from library preparation to assembly evaluation. BMC Genomics 16, 977.

Hashimoto, M., Yamashita, Y. and Takemoto, T. (2016). Electroporation of Cas9 protein/sgRNA into early pronuclear zygotes generates non-mosaic mutants in the mouse. Dev Biol 418, 1–9.

Hickford, D., Frankenberg, S. and Renfree, M. B. (2009). The tammar wallaby, Macropus eugenii: a model kangaroo for the study of developmental and reproductive biology. Cold Spring Harb Protoc 2009, pdb emo137.

Hisano, Y., Sakuma, T., Nakade, S., Ohga, R., Ota, S., Okamoto, H., Yamamoto, T. and Kawahara, A. (2015). Precise in-frame integration of exogenous DNA mediated by CRISPR/Cas9 system in zebrafish. Sci Rep 5, 8841.

Honda, A., Tachibana, R., Hamada, K., Morita, K., Mizuno, N., Morita, K. and Asano, M. (2019). Efficient derivation of knock-out and knock-in rats using embryos obtained by in vitro fertilization. Sci Rep 9, 11571.

Hu, X. F., Zhang, B., Liao, C. H. and Zeng, Z. J. (2019). High-Efficiency CRISPR/Cas9-Mediated Gene Editing in Honeybee (Apis mellifera) Embryos. G3 (Bethesda) 9, 1759–1766.

Jiang, J., Wang, C., Du, X., Gao, F. and Wu, S. (2025). Generation of transgenic chicken through ovarian injection. Animal Model Exp Med 8, 187–193.

Jinek, M., Chylinski, K., Fonfara, I., Hauer, M., Doudna, J. A. and Charpentier, E. (2012). A programmable dual-RNA-guided DNA endonuclease in adaptive bacterial immunity. Science 337, 816–821.

Kircher, B. K., Stanley, E. L. and Behringer, R. R. (2024). Anatomy of the female reproductive tract organs of the brown anole (Anolis sagrei). Anat Rec (Hoboken) 307, 395–413.

Kiyonari, H., Kaneko, M., Abe, T., Shiraishi, A., Yoshimi, R., Inoue, K. I. and Furuta, Y. (2021). Targeted gene disruption in a marsupial, Monodelphis domestica, by CRISPR/Cas9 genome editing. Curr Biol 31, 3956–3963 e3954.

Koshiba-Takeuchi, K., Mori, A. D., Kaynak, B. L., Cebra-Thomas, J., Sukonnik, T., Georges, R. O., Latham, S., Beck, L., Henkelman, R. M., Black, B. L., et al. (2009). Reptilian heart development and the molecular basis of cardiac chamber evolution. Nature 461, 95–98.

Kumita, W., Sato, K., Suzuki, Y., Kurotaki, Y., Harada, T., Zhou, Y., Kishi, N., Sato, K., Aiba, A., Sakakibara, Y., et al. (2019). Efficient generation of Knock-in/Knock-out marmoset embryo via CRISPR/Cas9 gene editing. Sci Rep 9, 12719.

Kuro-o, M., Matsumura, Y., Aizawa, H., Kawaguchi, H., Suga, T., Utsugi, T., Ohyama, Y., Kurabayashi, M., Kaname, T., Kume, E., et al. (1997). Mutation of the mouse klotho gene leads to a syndrome resembling ageing. Nature 390, 45–51.

Lampe, G. D., King, R. T., Halpin-Healy, T. S., Klompe, S. E., Hogan, M. I., Vo, P. L. H., Tang, S., Chavez, A. and Sternberg, S. H. (2024). Targeted DNA integration in human cells without double-strand breaks using CRISPR-associated transposases. Nat Biotechnol 42, 87–98.

Leal, F. and Cohn, M. J. (2016). Loss and Re-emergence of Legs in Snakes by Modular Evolution of Sonic hedgehog and HOXD Enhancers. Curr Biol 26, 2966–2973.

Lee, S. H., Wang, C. Y., Li, I. J., Abe, G. and Ota, K. G. (2024). Exploring the origin of a unique mutant allele in twin-tail goldfish using CRISPR/Cas9 mutants. Sci Rep 14, 8716.

Li, P., Tong, C., Mehrian-Shai, R., Jia, L., Wu, N., Yan, Y., Maxson, R. E., Schulze, E. N., Song, H., Hsieh, C. L., et al. (2008). Germline competent embryonic stem cells derived from rat blastocysts. Cell 135, 1299–1310.

Li, S., Mereby, S. A., Rothstein, M., Johnson, M. R., Brack, B. J. and Mallarino, R. (2023). TIGER: Single-step in vivo genome editing in a non-traditional rodent. Cell Rep 42, 112980.

Lozito, T. P. and Tuan, R. S. (2017). Lizard tail regeneration as an instructive model of enhanced healing capabilities in an adult amniote. Connect Tissue Res 58, 145–154.

Mahadevaiah, S. K., Sangrithi, M. N., Hirota, T. and Turner, J. M. A. (2020). A single-cell transcriptome atlas of marsupial embryogenesis and X inactivation. Nature 586, 612–617.

Mali, P., Yang, L., Esvelt, K. M., Aach, J., Guell, M., DiCarlo, J. E., Norville, J. E. and Church, G. M. (2013). RNA-guided human genome engineering via Cas9. Science 339, 823–826.

Martin, G. R. (1981). Isolation of a pluripotent cell line from early mouse embryos cultured in medium conditioned by teratocarcinoma stem cells. Proc Natl Acad Sci U S A 78, 7634–7638.

Matsumoto, N., Miyano, M., Abe, T., Kashima, T., Kato-Ishikura, E., Inoue, K. I., Liu, J., Kiyonari, H., Takeuchi, H. and Ikegaya, Y. (2024). Generation of Dopamine Transporter (DAT)-mCherry Knock-in Rats by CRISPR-Cas9 Genome Editing. Biol Pharm Bull 47, 394–398.

Matsuoka, Y., Nakamura, T., Watanabe, T., Barnett, A. A., Tomonari, S., Ylla, G., Whittle, C. A., Noji, S., Mito, T. and Extavour, C. G. (2025). Establishment of CRISPR/Cas9-based knock-in in a hemimetabolous insect: targeted gene tagging in the cricket Gryllus bimaculatus. Development 152.

Miao, J., Lan, T., Guo, H., Wang, J., Zhang, G., Wang, Z., Yang, P., Li, H., Zhang, C., Wang, Y., et al. (2023). Characterization of SHARPIN knockout Syrian hamsters developed using CRISPR/Cas9 system. Animal Model Exp Med 6, 489–498.

Miura, H., Gurumurthy, C. B., Sato, T., Sato, M. and Ohtsuka, M. (2015). CRISPR/Cas9-based generation of knockdown mice by intronic insertion of artificial microRNA using longer single-stranded DNA. Sci Rep 5, 12799.

Mizuno, N., Mizutani, E., Sato, H., Kasai, M., Ogawa, A., Suchy, F., Yamaguchi, T. and Nakauchi, H. (2018). Intra-embryo Gene Cassette Knockin by CRISPR/Cas9-Mediated Genome Editing with Adeno-Associated Viral Vector. iScience 9, 286–297.

Mochii, M., Akizuki, K., Ossaka, H., Kagawa, N., Umesono, Y. and Suzuki, K. T. (2024). A CRISPR-Cas9-mediated versatile method for targeted integration of a fluorescent protein gene to visualize endogenous gene expression in Xenopus laevis. Dev Biol 506, 42–51.

Niu, Y., Shen, B., Cui, Y., Chen, Y., Wang, J., Wang, L., Kang, Y., Zhao, X., Si, W., Li, W., et al. (2014). Generation of gene-modified cynomolgus monkey via Cas9/RNA-mediated gene targeting in one-cell embryos. Cell 156, 836–843.

Noji, R., Kaneko, M., Abe, T., Kiyonari, H., Nishikawa, Y., Kumamoto, T., Gotoh, H., Ohtaka-Maruyama, C., Ono, K., Yoshizawa, T., et al. (2026). Conserved Interhemispheric Morphogenesis in Amniotes Preceded the Evolution of the Corpus Callosum. Dev Growth Differ 68, e70041.

Nomura, T., Gotoh, H. and Ono, K. (2013). Changes in the regulation of cortical neurogenesis contribute to encephalization during amniote brain evolution. Nat Commun 4, 2206.

Noro, M., Uejima, A., Abe, G., Manabe, M. and Tamura, K. (2009). Normal developmental stages of the Madagascar ground gecko Paroedura pictus with special reference to limb morphogenesis. Dev Dyn 238, 100–109.

Rasys, A. M., Park, S., Ball, R. E., Alcala, A. J., Lauderdale, J. D. and Menke, D. B. (2019). CRISPR-Cas9 Gene Editing in Lizards through Microinjection of Unfertilized Oocytes. Cell Rep 28, 2288–2292 e2283.

Renfree, M. B., Suzuki, S. and Kaneko-Ishino, T. (2013). The origin and evolution of genomic imprinting and viviparity in mammals. Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci 368, 20120151.

Saito, Y., Sugiura, Y., Sakaguchi, A., Sada, T., Nishiyama, C., Maeda, R., Kaneko, M., Kiyonari, H. and Kimura, W. (2025). Redox-dependent purine degradation triggers postnatal loss of cardiac regeneration potential. Redox Biol 79, 103442.

Sakuma, T., Nakade, S., Sakane, Y., Suzuki, K. T. and Yamamoto, T. (2016). MMEJ-assisted gene knock-in using TALENs and CRISPR-Cas9 with the PITCh systems. Nat Protoc 11, 118–133.

Samollow, P. B. (2008). The opossum genome: insights and opportunities from an alternative mammal. Genome Res 18, 1199–1215.

Sharp, J. A., Wanyonyi, S., Modepalli, V., Watt, A., Kuruppath, S., Hinds, L. A., Kumar, A., Abud, H. E., Lefevre, C. and Nicholas, K. R. (2017). The tammar wallaby: A marsupial model to examine the timed delivery and role of bioactives in milk. Gen Comp Endocrinol 244, 164–177.

Shigeta, M., Inoue, K. I., Shimada, N., Tobe, A., Abe, T. and Kiyonari, H. (2025). Generation of Knock-In Syrian Hamsters via Zygote Microinjection Using CRISPR/Cas9 Genome Editing. Genesis 63, e70027.

Takenaka, M., Horiuchi, T. and Yanagimachi, R. (2007). Effects of light on development of mammalian zygotes. Proc Natl Acad Sci U S A 104, 14289–14293.

Taylor, J. H., Walton, J. C., McCann, K. E., Norvelle, A., Liu, Q., Vander Velden, J. W., Borland, J. M., Hart, M., Jin, C., Huhman, K. L., et al. (2022). CRISPR-Cas9 editing of the arginine-vasopressin V1a receptor produces paradoxical changes in social behavior in Syrian hamsters. Proc Natl Acad Sci U S A 119, e2121037119.

Thomas, K. R. and Capecchi, M. R. (1987). Site-directed mutagenesis by gene targeting in mouse embryo-derived stem cells. Cell 51, 503–512.

Tzika, A. C., Ullate-Agote, A., Zakany, S., Kummrow, M. and Milinkovitch, M. C. (2023). Somitic positional information guides self-organized patterning of snake scales. Sci Adv 9, eadf8834.

Urnov, F. D., Miller, J. C., Lee, Y. L., Beausejour, C. M., Rock, J. M., Augustus, S., Jamieson, A. C., Porteus, M. H., Gregory, P. D. and Holmes, M. C. (2005). Highly efficient endogenous human gene correction using designed zinc-finger nucleases. Nature 435, 646–651.

van de Lavoir, M. C., Diamond, J. H., Leighton, P. A., Mather-Love, C., Heyer, B. S., Bradshaw, R., Kerchner, A., Hooi, L. T., Gessaro, T. M., Swanberg, S. E., et al. (2006). Germline transmission of genetically modified primordial germ cells. Nature 441, 766–769.

Wang, H., Yang, H., Shivalila, C. S., Dawlaty, M. M., Cheng, A. W., Zhang, F. and Jaenisch, R. (2013). One-step generation of mice carrying mutations in multiple

genes by CRISPR/Cas-mediated genome engineering. Cell 153, 910–918.

Wang, X., Sharp, A. R. and Miller, R. D. (2012). Early postnatal B cell ontogeny and antibody repertoire maturation in the opossum, Monodelphis domestica. PLoS One 7, e45931.

Wang, Z. and Cormier, R. T. (2022). Golden Syrian Hamster Models for Cancer Research. Cells 11.

Wheaton, B. J., Sena, J., Sundararajan, A., Umale, P., Schilkey, F. and Miller, R. D. (2021). Identification of regenerative processes in neonatal spinal cord injury in the opossum (Monodelphis domestica): A transcriptomic study. J Comp Neurol 529, 969–986.

Whittaker, D. (1999). Hamster. In: Poole T, ed. The UFAW Handbook on the Care and Management of Laboratory Animals, Seventh Edition. Blackwell Science, Oxford, UK.

Yang, H., Wang, H., Shivalila, C. S., Cheng, A. W., Shi, L. and Jaenisch, R. (2013). One-step generation of mice carrying reporter and conditional alleles by CRISPR/Cas-mediated genome engineering. Cell 154, 1370–1379.

Yao, X., Zhang, M., Wang, X., Ying, W., Hu, X., Dai, P., Meng, F., Shi, L., Sun, Y., Yao, N., et al. (2018). Tild-CRISPR Allows for Efficient and Precise Gene Knock-in in Mouse and Human Cells. Dev Cell 45, 526–536 e525.

Yarnall, M. T. N., Ioannidi, E. I., Schmitt-Ulms, C., Krajeski, R. N., Lim, J., Villiger, L., Zhou, W., Jiang, K., Garushyants, S. K., Roberts, N., et al. (2023). Drag-and-drop genome insertion of large sequences without double-strand DNA cleavage using CRISPR-directed integrases. Nat Biotechnol 41, 500–512.

Yoshimi, K., Kunihiro, Y., Kaneko, T., Nagahora, H., Voigt, B. and Mashimo, T. (2016). ssODN-mediated knock-in with CRISPR-Cas for large genomic regions in zygotes. Nat Commun 7, 10431.

Zhu, M. and Tabin, C. J. (2023). The role of timing in the development and evolution of the limb. Front Cell Dev Biol 11, 1135519.

特　集：先端遺伝子操作技術の生命科学研究への応用

マウス個体における Tet-ON/OFF システムを用いた時空間遺伝子発現制御の最適化

田口純平
京都大学大学院医学研究科附属動物実験施設

要　約

Tet-ON/OFF システムは薬剤依存的に外来遺伝子の可逆的な発現制御を可能にする有用なツールであり，培養細胞から個体モデルまで幅広く利用されている。しかしながら，生体（*in vivo*）における多様な実験系に対応した標準的プロトコール（ゴールドスタンダード）は確立されておらず，実験デザインの詳細は研究者の経験や裁量に委ねられているのが現状である。本稿では，Tet-ON および Tet-OFF システムを介して蛍光レポータータンパクを発現誘導できる遺伝子改変マウスをそれぞれ作製し，同一条件下での直接比較を通じてはじめて見えてきた両システムの動作性の違いを紹介する。特に，生体内実験の成否を分ける「細胞種特異性」「発現レベル」「可逆性」という 3 つの観点から，Tet システムを最大限に使いこなすための実践的な最適解について考察する。

はじめに

医学・生命科学研究において，特定遺伝子の発現を時空間的に制御する技術は，複雑な生命現象や病態メカニズムの解明において強力な武器となる。なかでも，1992 年に Hermann Bujard と Manfred Gossen によって開発された「Tet システム（テトラサイクリン誘導性遺伝子発現システム）」は，哺乳類細胞における人工的な遺伝子発現制御法のデファクトスタンダードとして，今日まで広く利用されてきた[1]。本システムは，主に転写活性化因子（トランスアクチベーター）と，その結合配列である Tet オペレーター（TetO）を含む応答性プロモーターの 2 つのコンポーネントから構成されている[2]。その作動原理には大きく分けて 2 つのバリエーションが存在する。一つは，テトラサイクリン系薬剤（主にその誘導体であるドキシサイクリン：Dox）の非存在下においてトランスアクチベーター（tTA）が TetO へ結合し外来遺伝子を発現させ，反対に Dox 存在下において発現が停止する「Tet-OFF システム」である。もう一つは，変異導入により見出されたリバース型トランスアクチベーター（rtTA）を用い，逆に Dox が存在するときにのみ TetO へ結合して発現を誘導する「Tet-ON システム」である。これら両システムは，Dox の投与やその停止によって外来遺伝子の発現を可逆的にコントロールできる点が最大の強みである。特に Tet-ON システムにおいては，Dox 濃度を調整することで発現レベルを段階的にチューニングできることも知られている。さらに近年では，単なる転写制御に留まらず，CRISPR-Cas システムと組み合わせた時空間的ゲノム・エピゲノム編集や，恒常活性型・ドミナントネガティブ型分子を用いた細胞内シグナル伝達への介入など，多岐にわたる応用が進んでいる。このような発展を遂げてきた Tet システムであるが，培養細胞レベルにおいて高効率に機能する遺伝子回路も，マウス生体内という複雑な環境下においては，必ずしも理想通りに機能するとは限らない。そこで本稿では，Tet-ON あるいは Tet-OFF システムをマウス生体内で使用した際の実用的な違いに焦点を当てる。具体的には，個体レベルにおける「細胞種特異性」「外来遺伝子の発現レベル」「発現の可逆性」という，実験の成否を握る主要な 3 つの観点から両システムを直接比較し，生体内実験を成功に導くための最適なアプローチについて紹介する[3]。

生体内 Tet-ON/OFF システムの臓器特異性

まず，生体内における Tet システムの外来遺伝子発現動態を調べるために，Dox 依存的に全身で蛍光タンパク Venus を発現誘導可能な「Tet-ON マウス」を作製した（図 1a）。同マウス（4 週齢）に，2 mg/mL の Dox を 1 週間自由飲水投与し，全身の主要臓器を観察した。その結果，Dox 非投与下では自家蛍光のみが認められた一方で，Dox 投与群では主に腎臓，肝臓，膵臓，皮膚，および消化管において Venus の明瞭な蛍光シグナルが観察された（図 1b）。しかしながら，脳，心臓，骨格筋，肺などの一部の臓器では，Dox 投与下であっても検出可能な Venus の蛍光は認められなかった。

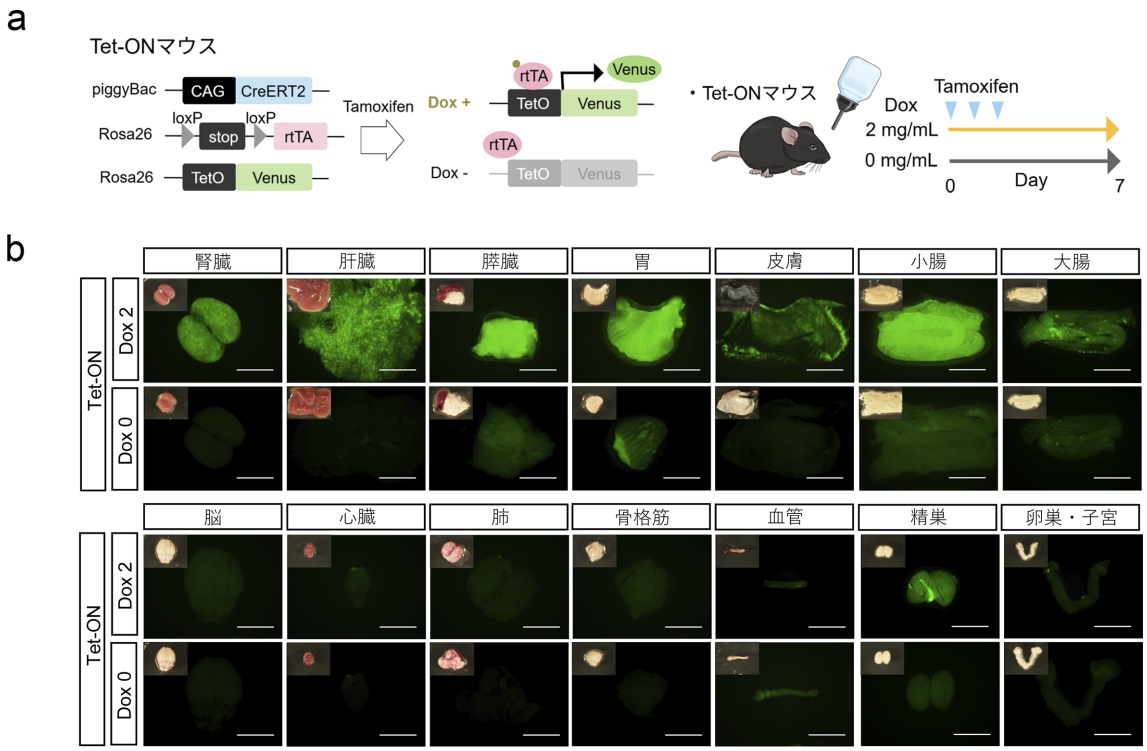


図 1　Tet-ON マウス諸臓器における外来遺伝子発現
a：Tet-ON マウスのアレル構成および外来遺伝子発現誘導の実験概略
本マウスは腹腔内への Tamoxifen 投与により全身で rtTA が発現し，Dox 投与下において Venus の発現が誘導される。Dox は 2 mg/mL，1 週間の自由飲水によって投与された。
b：Tet-ON マウス諸臓器における Venus の蛍光

次に，Tet-ON マウスの rtTA アレルを tTA アレルに置き換えた「Tet-OFF マウス」を作製し，同様の条件で実験を実施した（図 2a）。その結果，特筆すべきことに，Dox 非投与下において，Tet-ON システムでは明確な発現誘導が見られなかった脳，心臓，肺を含む，検証したすべての臓器で Venus の蛍光シグナルが観察された（図 2b）。また，Dox 投与下ではこの Venus シグナルは消失し，Dox が外来遺伝子発現を厳密に抑制していることが示唆された。

上皮細胞に限定される Tet-ON システム

続いて，Tet-ON マウスにおいて Venus を発現している細胞種を特定するため，免疫組織化学的解析を行った。まず，肉眼的に Venus 蛍光が認められた臓器を解析したところ，各臓器において以下の細胞種で Venus 陽性像が確認できた（図 3a）。

・腎臓：近位尿細管，糸球体
・肝臓：肝細胞，胆管細胞
・膵臓：腺胞細胞，導管細胞，膵島細胞
・胃：前胃層状扁平上皮，腺胃腺上皮（筋層では陰性）
・小腸および大腸：絨毛および隠窩上皮細胞（筋層では陰性）
・皮膚：表皮，毛包（真皮間葉系細胞では陰性）
・精巣：ライディッヒ細胞，精原細胞（成熟した生殖細胞では陰性）

一方，肉眼的に蛍光シグナルが観察できなかった脳，心臓，骨格筋，肺においては，脳の脈絡叢上皮および肺の気管支上皮細胞を除き，いずれの細胞種からも Venus の発現は認められなかった（図 3b）。これらの結果は，成体マウスにおける Tet-ON システム駆動性の外来遺伝子発現は，その大部分が上皮系細胞に限定されており，主要な非上皮系細胞種では十分に機能しないことを示唆している。

広範な臓器・細胞種に適用可能な Tet-OFF システム

次に，Tet-OFF マウスにおける Venus の発現を組織学的に解析した。上述の Tet-ON マウスにおいて発現が確認できた臓器・細胞種のすべてで，Tet-OFF マウスにおいても Dox 非投与下で Venus の発現が誘導されていた（図 3a）。さらに，Tet-OFF マウスのみで新たに Venus 陽性像が確認された臓器・細胞種を以下に示す（図 3b）。

・大脳：神経細胞，グリア細胞
・小脳：分子層，顆粒層，白質，プルキンエ細胞
・心臓：心筋細胞，冠血管平滑筋細胞
・肺：一部の間葉系細胞，肺胞上皮細胞，気管支上皮細胞

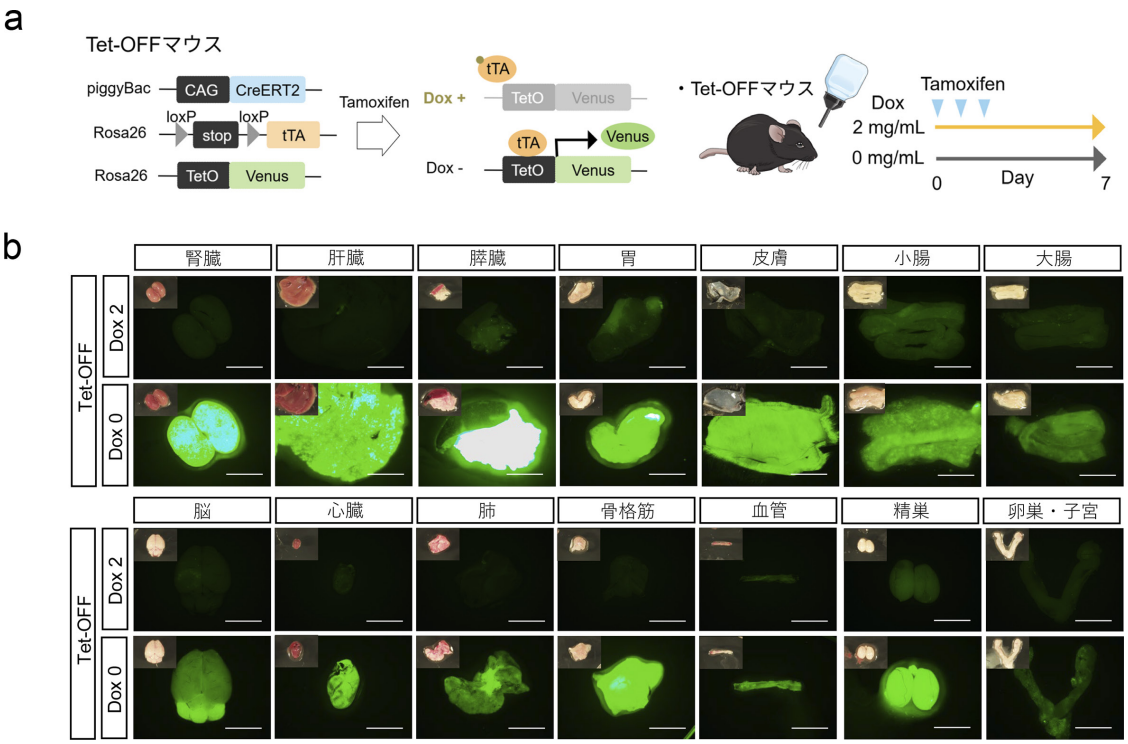


図 2　Tet-OFF マウス諸臓器における外来遺伝子発現
a：Tet-OFF マウスのアレル構成および外来遺伝子発現誘導の実験概略
本マウスは腹腔内への Tamoxifen 投与により全身で tTA が発現し，Dox 非投与下において Venus の発現が誘導される。Dox は 2 mg/mL，1 週間の自由飲水によって投与された。
b：Tet-OFF マウス諸臓器における Venus の蛍光

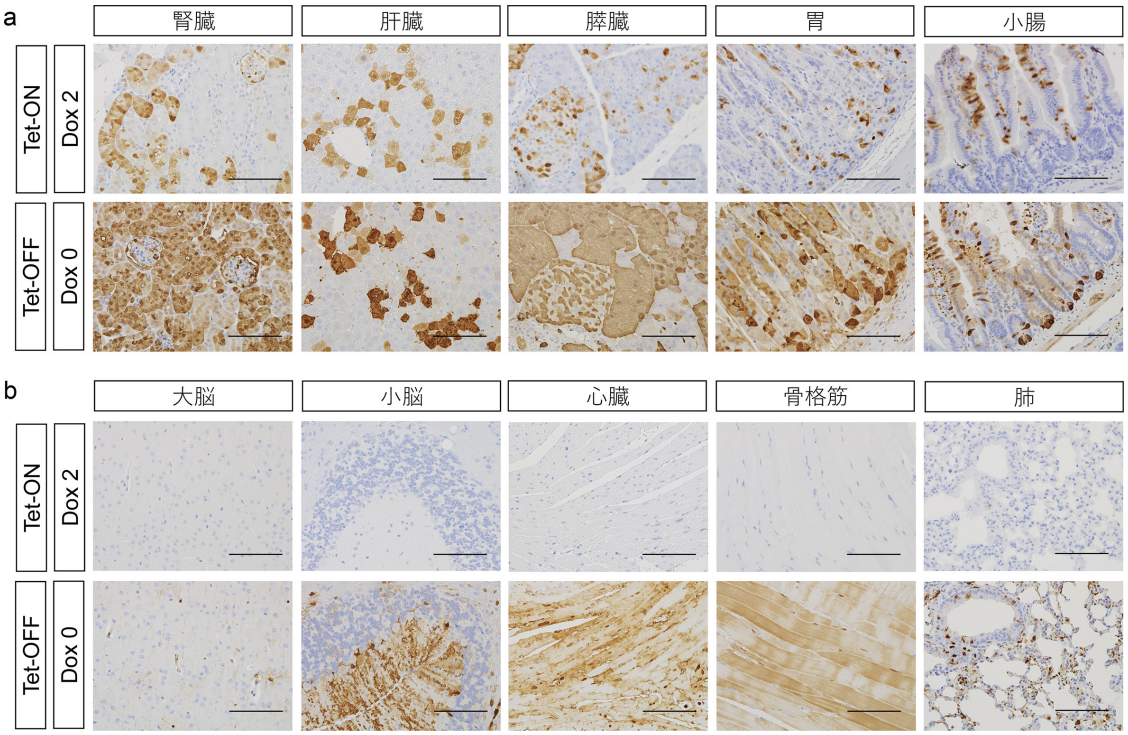


図 3　Tet-ON/OFF マウス諸臓器における Venus 免疫染色
Tet-ON システムでの外来遺伝子発現には臓器特異性が見られ，主に上皮系細胞に限局する傾向を示した。一方で，Tet-OFF システムではより広範な臓器・細胞種における Venus 発現が観察された。

・骨格筋：骨格筋細胞
・白色脂肪組織：脂肪細胞
・卵巣：顆粒層細胞，間質細胞（成熟した生殖細胞では陰性）
・消化管：筋層内平滑筋細胞，末梢神経細胞，固有層間葉系細胞
・皮膚：真皮間葉系細胞

これらの結果は，Tet-OFF マウスの大脳，心臓，骨格筋における Venus の mRNA 発現レベルでも確認されている。対照的に，Tet-ON マウスでは mRNA のわずかな発現上昇がみられたものの，有意な差ではなかった。以上の結果から，Tet-OFF システムは成体組織の大部分の細胞種において外来遺伝子の発現を強力に誘導可能であることが明らかになった。

Tet-ON システムにおける Dox 濃度依存的な段階的制御

Dox 投与量に応じた外来遺伝子発現レベルの段階的制御は，*in vitro* における Tet システムの大きなメリットの一つである。そこで，*in vivo* での外来遺伝子発現の調律範囲を調べるため，Tet-ON および Tet-OFF マウスに異なる濃度の Dox（Tet-ON マウス：0, 0.2, 0.4, 1.0, 2.0, 4.0 mg/mL，Tet-OFF マウス：0, 0.2, 4.0 mg/mL）を自由飲水投与し，投与 7 日目における肝臓での外来遺伝子発現を解析した。

その結果，Tet-ON マウスでは，Dox 濃度の増加に伴って Venus の蛍光強度や mRNA 発現レベルが段階的に上昇していく様子が観察された（図 4a）。一方，この Tet-ON システムで見られた段階的な制御とは対照的に，Tet-OFF システムでは，低用量（0.2 mg/mL）および高用量（4.0 mg/mL）のいずれの Dox 投与濃度であっても，Venus の蛍光シグナルや mRNA 発現はほぼ完全に消失し，外来遺伝子発現は強力に抑制されることが明らかとなった（図 4b）。以上の結果は，生体内における Dox 濃度依存的な外来遺伝子の発現調節は Tet-ON システムにおいて有効であり，Tet-OFF システムでは困難であることを示唆している。

Tet-OFF システムにおける可逆的発現制御の限界

次に，Tet システムにおける外来遺伝子発現の可逆性について検証を行った。Tet-ON および Tet-OFF マウスに Dox を 7 日間投与（Day7）し，その後 7 日間 Dox 投与を停止（Day7+7）した際の肝臓における Venus 発現のダイナミクスを観察した（図 5a）。

まず，Tet-ON マウスでは，Day7 までに Venus の蛍光強度が経時的に上昇した（図 5b）。その後 Dox 投与を停止したところ，Venus シグナルは減少し，Day7+7 時点でほぼ消失した。この結果から，Tet-ON システムは生体内において Dox の有無に対して迅速に応答し，外来遺伝子発現の優れた可逆的制御を可能にすることが示された。

一方，同様の実験を Tet-OFF マウスでも実施したところ，Dox 投与に伴って Venus シグナルは減少し，Day7 ではほぼ消失した（図 5b）。しかしながら，その後 Dox 投与を停止したにもかかわらず，Day7+7 時点では Venus シグナルの再活性化は観察できなかった。この結果と一致して，Venus mRNA は Dox 投与後 Day 3 時点でほぼ検出限界以下となり，その後 Day7+7 まで検出されないままであった。さらに，

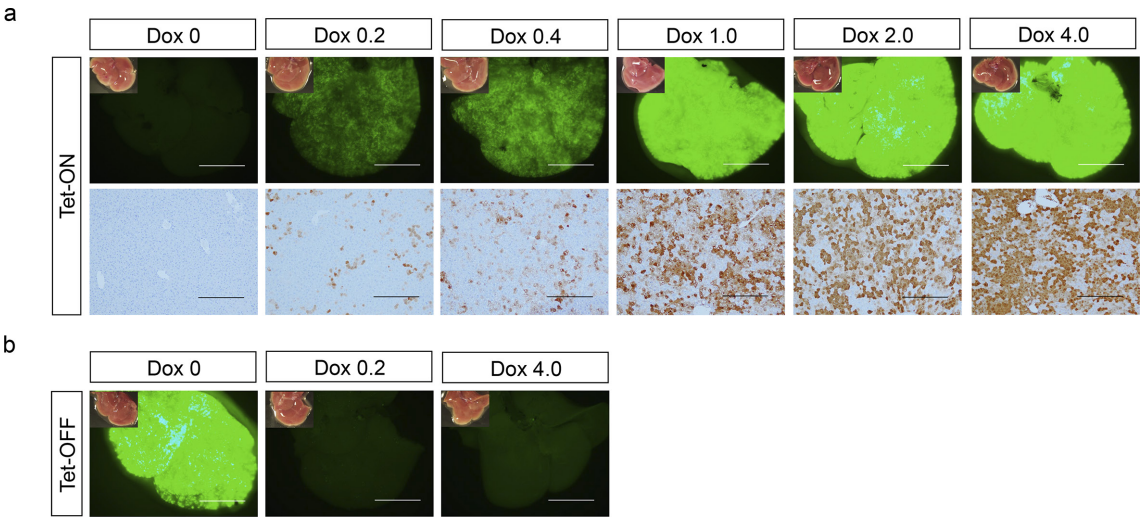


図 4　Tet システムにおける外来遺伝子発現レベルの Dox 濃度依存的制御
a：Tet-ON システムによる段階的な Venus 発現誘導
Dox 濃度（0, 0.2, 0.4, 1.0, 2.0, 4.0 mg/mL）依存的に Venus 陽性細胞数および細胞当たりの Venus 発現レベルの増加が認められた。
b：Tet-OFF システムによる発現制御の限界
Dox 濃度（低用量：0.2 mg/mL，高用量：4.0 mg/mL）にかかわらず，Venus 発現が強力に抑制された。

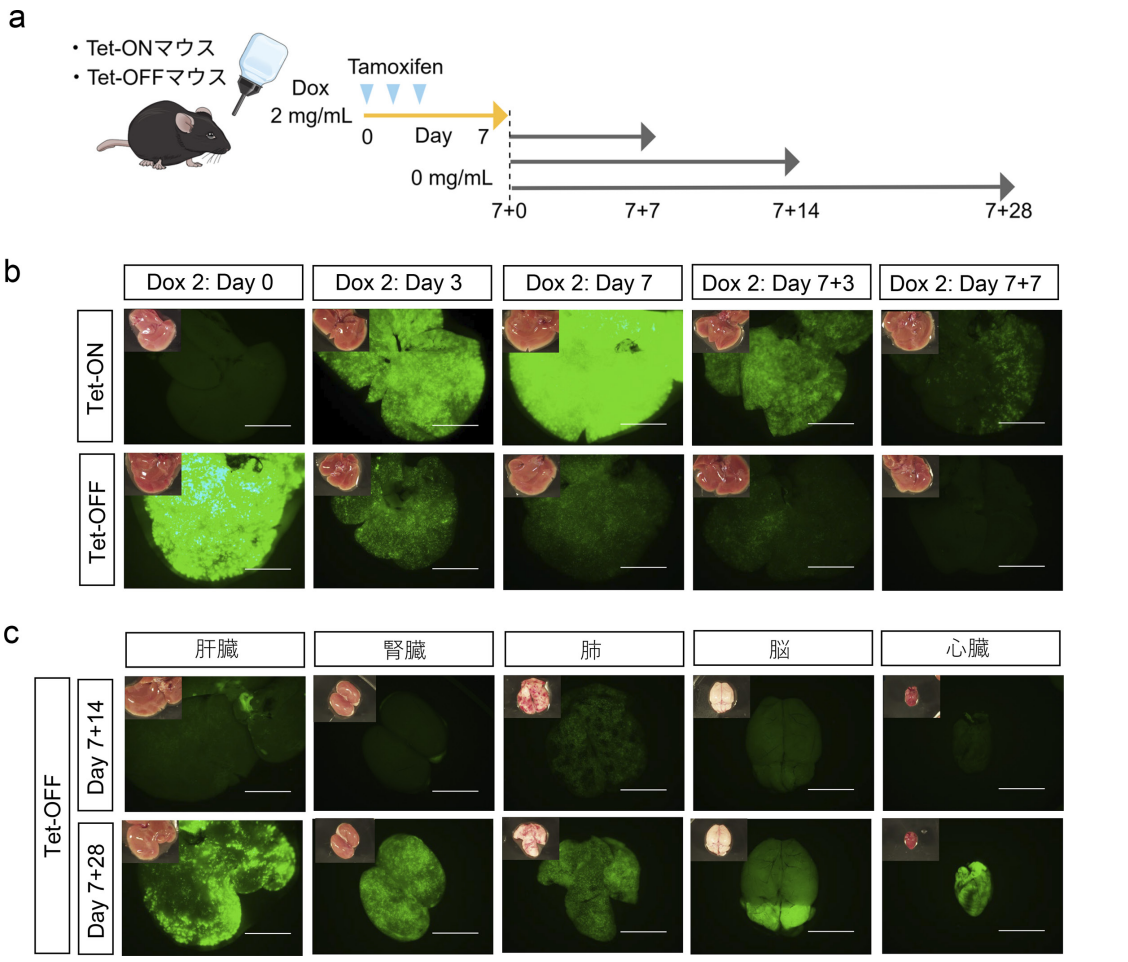


図 5　Tet システムにおける外来遺伝子発現の可逆性
a：Tet-ON/OFF マウスにおける可逆的発現誘導の実験概略
b：Tet-ON/OFF マウス間における Venus 発現の可逆性比較
Tet-ON マウスは Dox 投与下で Venus 発現強度が亢進し，投与停止に伴う発現の減弱が観察された。一方，Tet-OFF マウスでは Dox 投与下で Venus 発現が消失したものの，投与停止 7 日後でも Venus 発現の再活性化は認められなかった。
c：Tet-OFF マウスにおける投与停止期間延長による Venus 発現の部分的な再活性化
Tet-OFF マウスへの Dox 投与停止期間を延長したところ，投与停止 28 日目にようやく Venus 発現の再活性化が観察された。しかしながらその発現レベルは部分的であった。

Dox 投与停止期間を延長したところ，停止後 2 週間（Day7+14）でいくつかの臓器において Venus 蛍光が確認され始め，停止後 4 週間（Day7+28）でようやくほぼすべての臓器で Venus 発現の再活性化が観察された（図 5c）。しかしながら，Venus の蛍光シグナルおよび mRNA レベルは，Day7+28 時点であっても完全な回復には至らなかった。これらの結果は，Tet-OFF マウスでは外来遺伝子の再活性化に一定の期間を要し，短期間での外来遺伝子の可逆的操作は困難であることを示唆している。

テトラサイクリン（Tc）を用いた段階的・可逆的制御の実現

これまでの実験結果から，Tet-OFF システムは Tet-ON システムに比べ，適用可能な臓器・細胞種の範囲が広い一方で，発現レベルの段階的制御や迅速な可逆的制御が困難であることが明らかとなった。そこで著者らは，Tet-OFF システムで認められたこれらの欠点を克服すべく，Dox に代わる誘導薬剤としてテトラサイクリン（Tc）に着目した。既報において，Tc は Dox よりもトランスアクチベーターへの結合親和性が低いことが報告されている [4]。このことから，低濃度の Tc を投与することで Tet-OFF システムにおける外来遺伝子発現を段階的に制御できるのではないかと仮説を立て，その可能性を検討した。

Tet-OFF マウスに 0.2 mg/mL の Tc を自由飲水投与したところ，同濃度の Dox 投与下で見られた強力な抑制とは対照的に，Tc 投与マウスでは中程度の Venus シグナルが観察された。さらに，2.0 mg/mL の Tc 投与は Dox と同様に外来遺伝子の発現を十分に抑

制すること，また投与停止 1 週間後（Day7+7）では外来遺伝子の発現レベルが未処理マウスと同等まで回復することが明らかとなった（図 6a, b）。加えて，Tc は Dox と比較して，外来遺伝子発現に依存しない副作用的な遺伝子発現変動[5]の程度が少ないこともRNA sequence 解析の結果から明らかとなっている。

これらの結果から，Tet-OFF システムを生体内で使用する際には，Dox に代えて Tc を選択することによって，広範な細胞種を対象とした段階的および可逆的な外来遺伝子発現制御が実現可能であることが示唆された。

おわりに

近年のゲノム編集技術の進展により，遺伝子改変マウスの作製は飛躍的に容易になった。しかしながら，動物モデルを用いた実験は，準備の段階から多大な時間的・経済的コストを要することから，生体内での遺伝子発現制御系を初めて導入する際には，最適なシステム設計の選択に頭を悩ませる場合も多いのではないだろうか。本稿では，Tet-ON/OFF システムの生体内における「細胞種特異性」「発現レベル」「可逆性」の違いについて解説した。具体的には，チューニング特性に優れるものの上皮系細胞に偏る Tet-ON システムと，広範な組織に適用できるが Dox 投与後の制御に課題を残す Tet-OFF システムという両者のトレードオフを示し，後者の弱点を克服するアプローチとして Tc の有用性を紹介した。

このような生体内での詳細な挙動特性は，実験の成否を直接左右するにもかかわらず，一般的な学術論文などでは十分に記載されてない場合が多い。著者もマウス個体レベルでの研究を主体としており，遺伝子改変マウスを作製したものの期待通りにワークせず，試行錯誤を繰り返した苦い経験が少なくない。本稿で紹介した実践的なノウハウが，今後 Tet システムを用いた個体レベルでの研究を開始される読者のみなさまの円滑な実験計画立案において，少しでも参考になれば幸いです。

謝　辞

本稿の研究内容は，著者が過去に所属していた東京大学医科学研究所先進モデル動物作製コアにて実施され，山田泰広教授（現・東京大学大学院医学系研究科）との共同研究として発表された成果を基に構成したものです[3]。本研究の遂行にお力添えをいた

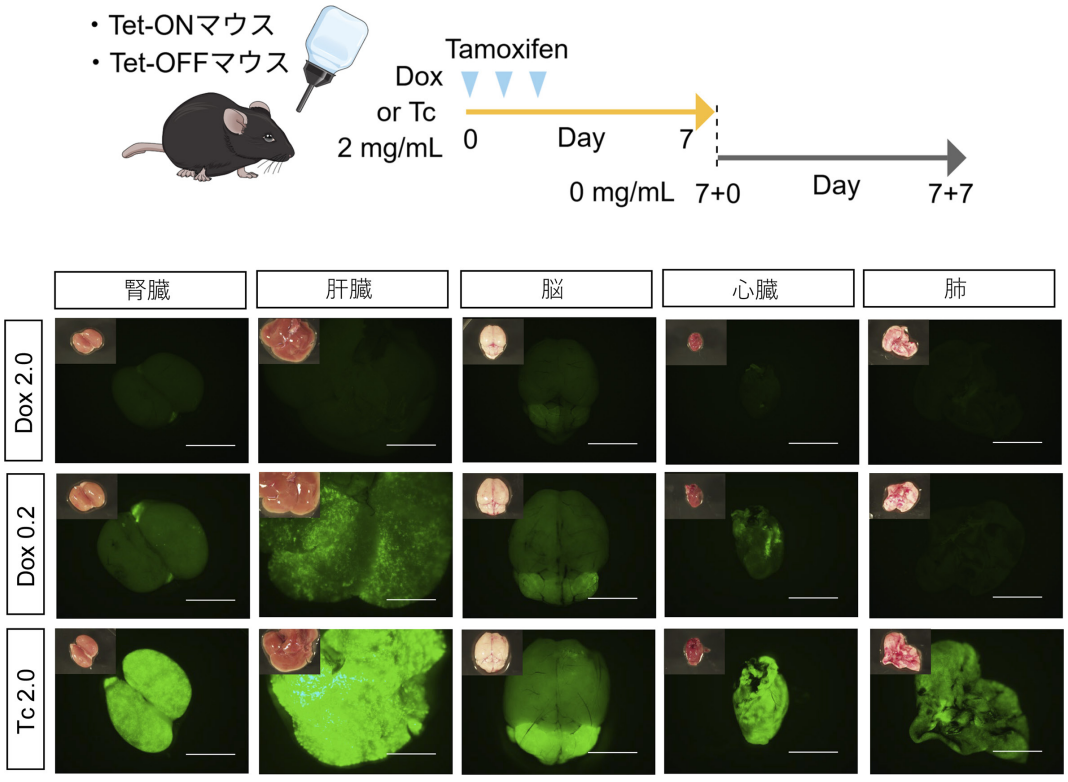


図 6　テトラサイクリン（Tc）を用いた Tet-OFF システムにおける可逆性限界の克服
a：Tet-OFF マウスにおける Dox あるいは Tc を用いた可逆的発現誘導の実験概略
b：Dox あるいは Tc を投与した Tet-OFF マウスにおける Venus 再発現の違い
Dox を投与した場合は投与停止 7 日後でも Venus 発現の再活性化が観察されなかったのに対し，Tc を投与した場合は投与停止 7 日時点で十分なレベルでの再活性化が確認された。

だいた共著者の先生方にこの場を借りて厚く御礼申し上げます。また，第 73 回日本実験動物学会総会 LAS セミナー 2 にて，本内容を発表する機会を与えてくださった小沢学先生，清成寛先生，佐々木えりか先生に改めて深く感謝申し上げます。ならびに実験動物ニュース「特集」というかたちで本内容を広く会員の皆様に共有できる場をご提供くださった同誌編集委員長の山田久陽先生にも心より御礼申し上げます。

引　用

1. Gossen M and Bujard H. Tight control of gene expression in mammalian cells by tetracycline-responsive promoters. Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 89(12), 5547–5551 (1992)
2. Gossen M, Freundlieb S, Bender G, Müller G, Hillen W, Bujard H. Transcriptional activation by tetracyclines in mammalian cells. Science, 268(5218), 1766–1769 (1995)
3. Taguchi J, Yamada Y, Ohta S, Nakasuka F, Yamamoto T, Ozawa M, Yamada Y. A versatile in vivo platform for reversible control of transgene expression in adult tissues. Stem Cell Reports, 20(1), 102373–102373 (2025)
4. Degenkolb J, Takahashi M, Ellestad GA, Hillen W. Structural requirements of tetracycline-Tet repressor interaction: determination of equilibrium binding constants for tetracycline analogs with the Tet repressor. Antimicrob. Agents Chemother, 35(8), 1591–1595 (1991)
5. Moullan N, Mouchiroud L, Wang X, Ryu D, Williams EG, Mottis A, Jovaisaite V, Frochaux MV, Quiros PM, Deplancke B, Houtkooper RH, Auwerx J. Tetracyclines Disturb Mitochondrial Function across Eukaryotic Models: A Call for Caution in Biomedical Research. Cell Rep, 10(10), 1681–1691 (2015)

動物実験福祉に関する海外動向調査報告・オーストラリア（メルボルン）

瀬戸山健太郎[1, 4]
森松正美[2, 4]
越本知大[3, 4]
[1] 鹿児島大学先端科学研究推進センター
[2] 北海道大学大学院獣医学研究院
[3] 宮崎大学フロンティア科学総合研究センター
[4] 日本実験動物学会人材育成委員会

1. 調査の概要と目的

本海外動向調査は，日本で比較的よく知られている欧米地域以外の動物実験の規制体制，研究施設の管理・運営，動物実験を取り巻く社会とのコミュニケーションの実態について調査することを目的とした。そのため，動物実験が国家管理ではなく州単位で管理されているオーストラリア・ビクトリア州（メルボルン）をその一例として理解するために，令和 7 年度研究開発施設共用等促進費補助金（ライフサイエンス研究の振興（ナショナルバイオリソースプロジェクト））情報センター整備プログラム「外部検証推進のための人材の育成と活用」の活動の一環として 2026 年 2 月 25 日から 2 月 27 日に標記の 3 名で実施した（図 1, 2）。

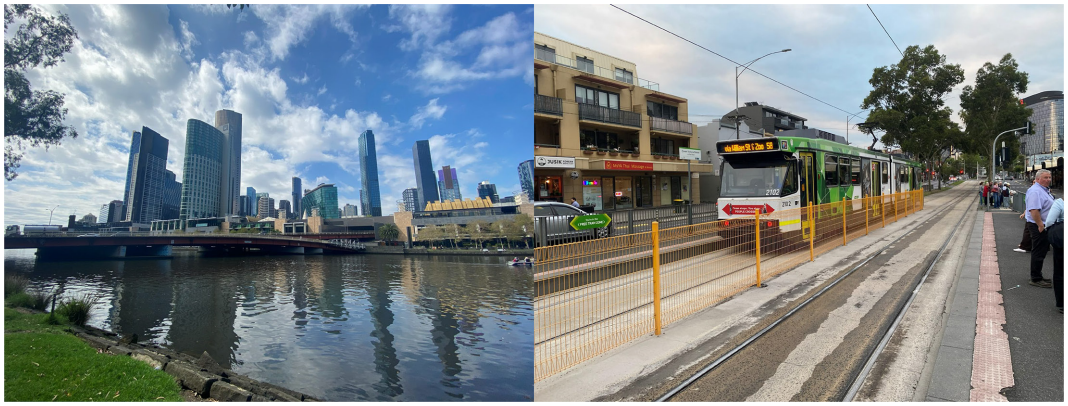


図 1　メルボルンの街並み



図 2　Queen Victoria Market にて
右：森松先生，中央：越本先生，左：瀬戸山

今回の調査では，Understanding Animal Research（UAR）Oceania との意見交換を通じてオーストラリア全般およびビクトリア州における動物実験の規制や社会とのコミュニケーションの現状を把握するとともに，Walter and Eliza Hall Institute of Medical Research（WEHI），Australian Synchrotron および Peter MacCallum Cancer Centre の研究施設を訪問し，動物実験施設の管理・運営，動物の飼育管理，実験実施体制，教育訓練および研究支援体制等についても視察した。また，英国で長年に亘って UAR の活動に従事した専門家との間で，動物実験に関する情報公開や透明性確保の取り組みについても意見交換することで，研究機関と社会との信頼関係の構築に向けた具体的な取り組みについて，新しい情報を収集した。

今回の調査を通じて，オーストラリアにおける動物実験の規制・管理体制や研究施設の運営実態と州ごとの差異，ならびに透明性の確保と社会とのコミュニケーションに関する取り組みについて多くの知見を得るとともに，今後の我が国における動物実験の適正な管理，外部検証および社会との対話の在り方を検討する上で有益な情報が獲得できた。

2. 活動内容

● 2 月 25 日：UAR Oceania との意見交換および WEHI 視察

初日は，UAR Oceania の Chief Executive（最高責任者）である Bella Lear 氏（図 3）とランチミーティングを通じてオーストラリアにおける動物実験の規制や動向についてヒアリングを行った。同国は連邦制を採用しており，国家レベルの規範（コード）は存在するものの，実質的な法的拘束力は各州の法律に委ねられている。訪問したビクトリア州では全ての脊椎動物に加えてタコを含む頭足類も保護対象として定義されており，ニューサウスウェールズ州ではコンパニオンアニマルを用いた研究が事実上禁止されるなど，州ごとに対象とする動物種を含めて異なる規制が行われていること，そのため国家として動物実験に関連する統計を持たないことを確認した。

オーストラリアにおいては研究における動物実験の正当性を担保する中心的役割は，各機関に設置された動物倫理委員会（Animal Ethics Committee; AEC）が担っている。この委員会は，獣医師，研究者，動物福祉代表，および一般市民代表の 4 つのカテゴリーの委員から構成されている。審査においては Harm-Benefit 分析が重視され，承認後に州政府の監査を受けてからプロトコールごとにライセンスが発行される仕組みとなっている。また，教育現場（高校）での実験も州により異なる規制下にあるようで，ビクトリア州では全校を統括する単一の倫理委員会が審査を担当するといった情報など，ビクトリア州およびその他の州における動物実験に関する情報が Bella 氏より共有された。



図 3　初日のランチミーティング
左奥：UAR Chief Executive の Bella 氏

午後は WEHI を訪問し，施設管理の実際を視察した（図 4）。WEHI はオーストラリアで最も歴史がある医学生命科学研究所で，メルボルン大学医学部や主要病院が集積する Parkville Biomedical Precinct の中核機関の一つとして，がん，免疫，感染症学分野における世界トップクラスの研究施設である。同研究所でのマウスの飼育は，IVC システムによる飼育環境の標準化とともに，独自のオンラインシステムによる動物および実験プロトコールの一元的な管理が徹底されていた。技術者



図 4　WEHI

はプロジェクト単位で配置され，ケージカードのバーコードを読み込むことでオンラインシステム上から該当するケージの動物情報や実験計画書の内容を確認することができる。これにより，計画書に沿った適切な処置を実施するとともに，実施内容を記録，管理する体制が構築されていた。また，獣医師は予期せぬ症状が発生した場合に介入し，その結果を報告書として蓄積することで，研究改善や再発防止に活用しているとのことであった。さらに，過去の感染事例を教訓とした厳格なバイオセーフティ対策が取られていた。

● 2 月 26 日：Australian Synchrotron 視察

2 日目は，メルボルン南東部の Clayton にある国家的研究インフラである Australian Synchrotron を訪問した（図 5）。同施設は放射光を活用し，結晶解析からバイオメディカルリサーチ，プレクリニカル実験に至るまで広範な研究を支えている。

動物実験施設としての側面では，Imaging and Medical Beamline（IMBL）を用いるがんや骨研究などが実施されており，マウスやラットに加え，ヒツジを対象とした大規模な実験も行われている。ヒツジについては Monash 大学の動物プラットフォームより導入されており，施設内には飼育エリア，実験（照射）エリア，および処置室が完備されていた。また，動物の福祉と適切なケアを確保するため，施設には獣医師，動物施設管理者，および動物福祉担当者が配置されていた。遺伝子組換え動物の導入実績は極めて限定的とのことであった。

施設内では，Microbeam radiation therapy（MRT）や Phase contrast imaging など，放射光を活用した先進的な研究が実施されていた。MRT を用いた脳腫瘍モデルを用いた研究では，血液脳関門への影響も確認されており，将来的な腫瘍治療への応用が期待されている。Phase contrast imaging では，乳腺組織の画像化や大型動物を対象としたイメージング研究が進められており，ヒツジを対象とした画像検査にも取り組んでいた。さらに，イヌに自然発生した骨肉腫や軟部肉腫を対象とした臨床研究プログラムも実施されている。この研究では，CT や MRI によって腫瘍の位置を確認した後に放射線治療を行うなど，自然発生腫瘍を対象とした臨床応用を見据えた研究が進められている。加えて，海外の複数の研究機関が共用施設を利用し，

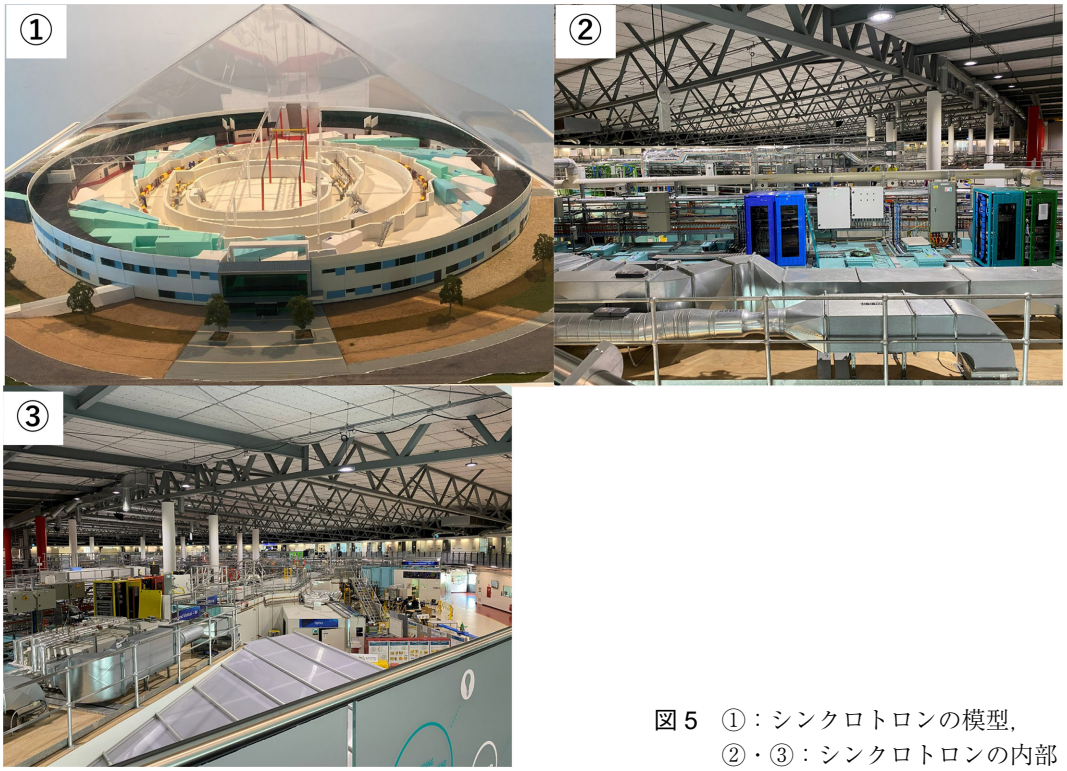


図 5　①：シンクロトロンの模型，
②・③：シンクロトロンの内部

ヒトを対象とした脳腫瘍の放射線治療における位置決め精度の検証や，MRT によるがん細胞への影響評価など，国際的な共同研究も，同じライン（施設，設備）で実施されていた。

これまでのボランティアを対象としたイメージング研究の実績を基に，近い将来，実際の患者を対象としたイメージングの実施も予定されているとのことであり，放射光を活用した先進的な技術を基礎研究から大型動物研究，さらに臨床応用へと展開する取り組みが進められている点も印象的であった（図 6）。

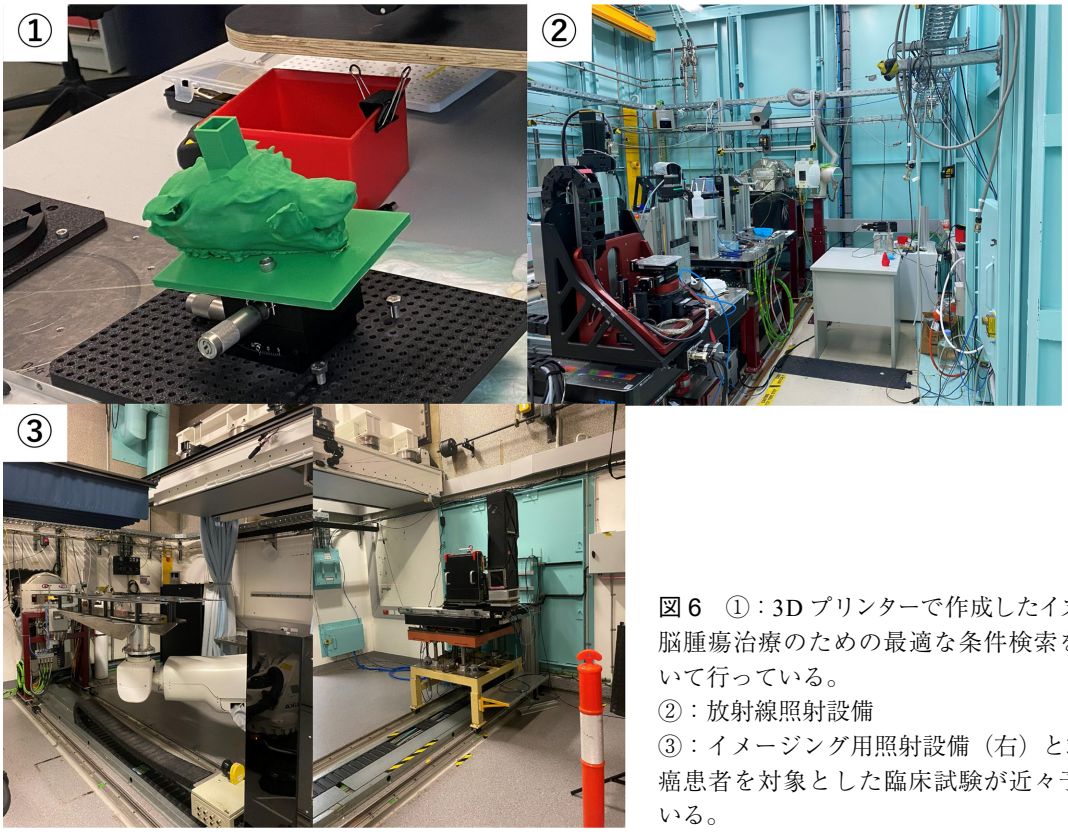


図 6　①：3D プリンターで作成したイヌ頭部模型
脳腫瘍治療のための最適な条件検索を模型を用いて行っている。
②：放射線照射設備
③：イメージング用照射設備（右）と寝台（左）
癌患者を対象とした臨床試験が近々予定されている。

● 2 月 27 日：Peter MacCallum Cancer Centre 視察，UAR Oceania との意見交換

最終日は，Peter MacCallum Cancer Centre の動物研究施設を視察した。同センターはがん研究に特化した医療研究機関であり，当該施設は約 20,000 ケージを有する大規模マウス飼育施設である。IVC システムを採用しており，施設内はスタッフの作業性と動物の快適性を考慮し 21℃に設定されていた。施設内には X 線照射装置が設置され，州政府の許認可制度の下，訓練を受けた限定的な担当者のみが操作する体制がとられている。教育訓練はオンライン研修，導入教育，実技評価を含む包括的なトレーニングを修了した後に，実施許可を付与する仕組みとなっている。特に，すべての従事者が緊急時に遅滞なく動物を人道的に安楽死させることができるよう，頸椎脱臼による安楽死技術については技能確認が行われていた。また，技術者と研究者の間の直接的なコミュニケーションが奨励されており，飼育管理は飼育室ごとに配置された技術者が担い，研究者と緊密に連携しながら運営されていた。

その後，UAR Oceania の Bella 氏と，動物実験に関する科学コミュニケーションの在り方についてディスカッションを行った。インターネット上に溢れる動物実験の不正確なイメージ（フィクションや古い素材）が公衆の認識を歪めている現状が指摘され，これに対し，UAR では動物実験の透明性に関する合意を通じて，研究機関が自らの研究内容をありのままに情報提供することを推奨している。具体的な取り組みとして，研究施設内の 360 度パノラマカメラによるバーチャルツアーの公開や，Charles River 社の協賛による写真

コンテストの開催，さらには研究機関による「透明性に関する協定（Openness Agreement）」への署名推進などが紹介された。

オーストラリアでは，こうした情報公開が社会の信頼構築に寄与している一方，政治的なロビー活動によって州の規制が容易に変更され得るリスクも共有された。UAR Oceania はアジア圏への活動拡大も視野に入れており，2026 年 4 月からは「UAR Oceania Asia Network」を構築し，Webinar 等を通じた情報発信を開始している。わが国においても，単なる情報開示に留まらない「社会との対話」を支える専門的な広報体制の構築が，研究の継続性を確保する上で不可欠な要素になると再認識した。

展示動物の飼養保管状況について知見を得るため，空き時間を利用してメルボルン動物園を視察した。哺乳類，鳥類，大型爬虫類の展示では，日本と同様に檻展示は基本的になくなっており，一頭当たりの割当面積がかなり広く取られていたが，単独飼育の種が多く，群管理の概念についてはやや疑問が残った。海洋生物展示区域には環境保全啓発や傷病動物保護活動関連のボードやポスターが見られ，かつて使われていたと思われる海獣のショースペースが残っていたのが印象的であった（図 7）。



図 7　メルボルン動物園
海洋生物展示区域には環境保全啓発や傷病動物保護活動関連のボードやポスターが設置されていた（写真右）。

3. まとめ

今回の調査を通じ，オーストラリアの動物実験規制が州法主導のもと，各研究機関における AEC や専門スタッフによる組織的な管理プログラムによって運用されている実態を確認した。また，WEHI の動物・実験プロトコール管理システムや Peter MacCallum Cancer Centre における教育訓練体制，UAR Oceania による動物実験の透明性確保や社会とのコミュニケーションに関する取り組みなど，今後の日本国内の研究環境を考える上で有用な事例について知見を得ることができた。

調査で得られた知見を踏まえ，わが国においても，研究データや動物実験情報の体系的な管理の在り方，研究者と社会との対話を通じて理解と信頼を得るためのコミュニケーションの在り方について，継続的な検討が必要である。特に，動物実験に関する情報を適切に公開し，研究の必要性や動物福祉への配慮を社会に分かりやすく伝えるための専門的な体制の構築は，今後さらに重要になると考えられる。

なお，オーストラリアは畜産業が盛んな国であることから，家畜を用いた動物実験の実情についても調査を予定していたが，関係者との調整が整わず，今回の出張期間中には十分な調査を実施することができなかった。今後，関係機関との連携や情報交換を通じて，家畜を用いた動物実験の実施状況や管理体制についても継続して調査していきたい。

この調査はナショナルバイオリソースプロジェクト「外部検証推進のための人件の育成と活用」（JPNBRP202235）の支援を受けて実施した。

研究室・施設便り

熊本大学生命資源研究・支援センター 動物資源開発研究施設　資源開発分野の紹介

竹尾　透

はじめに

このたび「研究室・施設便り」にて，熊本大学生命資源研究・支援センター動物資源開発研究施設（Center for Animal Resources and Development: CARD）資源開発分野について紹介させて頂く機会を賜り，心より感謝申し上げます。当センターでは，遺伝子改変マウスを用いた生命科学・生物医学研究を推進し，マウスバンクを通じた研究支援体制の構築，国内外の研究機関との連携，マウスリソースに関する国際標準化に取り組んでいます。私たちの研究室（資源開発分野）では，生殖工学を基盤としてCARDマウスバンクとラットバンクを運営し，研究，教育，研究支援，社会貢献，国際連携を一体的に展開しています（図1）。本稿では，当センターの概要と資源開発分野の活動をご紹介いたします。

熊本大学および生命資源研究・支援センターの概要と資源開発分野の歩み

熊本大学は，1756年に肥後細川藩によって開かれた医学教育の場である再春館と薬用植物園の蕃滋園（ばんじえん），さらに第五高等学校など，長い歴史をもつ教育・研究機関の伝統を受け継ぐ総合大学です。現在は，人文社会科学から自然科学，生命科学・医療に至る幅広い領域で教育・研究を展開しています。本荘・九品寺地区および大江地区には，医学，薬学，発生医学，遺伝学，ウイルス学，血液学など生命科学・医学系の研究拠点が集積しています。生命資源研究・支援センター（Institute of Resource Development and Analysis：IRDA）は，本荘中地区（図2）にある動物資源開発研究施設（CARD）本館・新館，遺伝子実験施設，アイソトープ実験施設から構成され，研究資源および関連情報に関する研究・教育を推進しています。

CARDの歴史は，1979年に発足した医学部附属動物実験施設と，医学部附属遺伝発生医学研究施設（現在の発生医学研究所）で遺伝子改変マウスの作製を担っていたトランスジェニック実験室にさかのぼります。1998年に両者を母体として動物資源開発研究センター（CARD）が設置され，資源開発分野も発足しました。初代教授として中潟直己教授が着任し，哺乳類の生殖工学技術の研究開発と，遺伝子改変マウスを保存・供給するマウスバンクの整備が進められました。私自身は，熊本大学薬学部，大学院薬学教育部で学び，2008年に博士（薬学）を取得後，資源開発分野の研究員として研究者としての歩みを始めました。2010年に助教，2015年に講師，2020年に教授となり，現在までマウス・ラットの生殖工学研究とバ



図1　生殖工学を中核とした資源開発分野の活動



図2　熊本大学生命資源研究・支援センターをはじめとする生命科学系の研究施設が集積している本荘中地区

イオリソースの利活用の推進を活動の基盤として，研究支援，教育・人材育成，社会実装，国際連携に取り組んでいます。

資源開発分野では，発足当初から「研究」と「研究支援」を分けることなく活動しています。マウスバンクには，繁殖や体外受精が困難な系統，凍結後に精子の受精能が低下する系統，生殖機能障害を呈する疾患モデルなど，多様な課題が持ち込まれます。研究支援の現場で生じた問題を生殖生物学の研究課題に落とし込み，新しい技術を開発して再び現場へ還元する。その積み重ねが，現在の生殖工学技術「CARD Protocol」と「CARDマウスバンクシステム」の基礎になっています。

生殖工学を核に，研究・教育・支援を循環させ，世界の研究基盤へ

資源開発分野の特徴を一言で表すなら，「生殖工学を極め，未来の創薬・医療・健康を支える研究室」です。生殖工学の基礎研究から得られた知見を，過剰排卵誘起，体外受精，生殖細胞の保存，胚移植などの技術へ展開し，CARDマウスバンクや研究支援の現場で活用します。そこで見いだされた課題を再び研究へ還元し，より再現性が高く，利用しやすい技術へ発展させる。この循環を通じて，遺伝子改変マウス・ラットリソースと生殖工学技術を国内外の研究者・技術者が利用できる研究基盤として提供し，生命科学研究の進展とイノベーションの加速，その先の創薬・医療・健康への貢献を目指しています。

この循環で大切にしていることは，技術の性能だけではありません。「誰が行っても再現できるか」「世界の研究現場で継続して利用できるか」「動物実験における3Rsに貢献できるか」という視点から，技術開発を進めています。体外受精における高い受精率や効率的な凍結保存法は，研究の効率性や再現性を高めると同時に，必要な動物数の削減や生体輸送の回避につながっています。また，動物実験については，その科学的必要性と妥当性を常に検討し，代替法の進展も踏まえながら，関係する法令・指針および学内規程に基づき，3Rsを基本として適正に実施することが重要だと考えています。

また，研究成果を論文で終わらせず，研究支援，教育，人材育成，技術移転，社会実装へ展開し，そこで得た経験を次の研究へつなげることも重要な役割です。マウスバンクシステムの構築，標準化された生殖工学技術の普及，管理された情報の共有を組み合わせ，必要なモデル動物を迅速かつ確実に利用できる環境を整えることで，新たな発見や共同研究を生み出す世界的な研究基盤へ発展させたいと考えています。

CARD マウスバンク

CARDマウスバンクは，遺伝子改変マウスを将来にわたって利用できる研究資源として保存・管理し，必要とする研究者へ提供する研究基盤として改善を進めています。寄託された系統について，胚や精子を凍結保存するとともに，系統情報，遺伝子情報，遺伝型判定法，寄託者情報，供給条件などを管理します。公開可能な系統はCARD R-BASE（図3）で検索でき，国際的なマウスリソース情報基盤とも連携しています。また研究者からの多様なニーズにも対応しており，マウス系統のバックアップ保存や個々の研究計画に応じた繁殖に関する技術支援も提供しています。

マウスバンクの品質管理で大切なことは，試料が「凍結されている」だけでなく，将来「確実に目的の個体が復元できる」ことです。寄託されたマウス系統の凍結胚は，一部の胚を融解後に胚移植を行い，産子への発生能と遺伝型を確認します。凍結精子についても，体外受精による受精能・発生能を確認します。保存試料は，温度管理と液体窒素の自動供給システムを備えた大型タンクで安全に保管しています（図4）。

マウスバンクは，研究の再現性と継続性に加え，3Rsにも貢献しています。研究プロジェクトを完了したマウス系統を胚や精子として凍結保存すれば，生体での維持繁殖に必要な動物数を削減することがで



図3　CARDマウスバンクに保管されている系統を検索できる「CARD R-BASE」



図4　遺伝子改変マウスの凍結胚や精子を保管している大型液体窒素タンクシステム

きます。既存系統を共有することで重複作製を避け，凍結・冷蔵した胚や精子を輸送することで，生体輸送に伴う感染，死亡，逸走，長距離輸送のストレスなどのリスクも低減できます。2016年の熊本地震では，生殖細胞によるバックアップが研究資源を守る上で極めて重要であることを実感しました。

CARDマウスバンクの活動は，私たちだけで成り立つものではありません。遺伝子改変マウス系統の寄託，リソースの受入れ，施設間での試料授受にご協力いただいている国内外の大学・研究機関の動物実験施設の皆様に，日頃から大きな支えをいただいています。研究資源を未来へつなぐ目的を共有し，現場で支えてくださる施設関係者，技術職員，飼育管理スタッフの皆様に，この場を借りて心より御礼申し上げます。

生殖工学の研究

当研究室の生殖工学研究の礎には，長年にわたる実験動物学と生殖工学の知識・技術の蓄積があります。精子凍結保存では，ラフィノース五水和物とスキムミルクを主成分とするR18S3（中潟法）を基盤に技術開発を進めてきました。2002年，私は薬学部生として，課題であったC57BL/6マウス凍結精子の受精能低下に関する研究に参画しました。その後，精子凍結保存液の改良に加え，メチル-β-シクロデキストリン（MBCD）を用いた精子前培養液，還元型グルタチオン（GSH）を用いた体外受精培地などを組み合わせ，凍結精子から安定して受精卵を得る技術を開発し，マウスバンクでの精子凍結保存を実用的な技術へ発展させました。

また，インヒビン抗血清とウマ絨毛性性腺刺激ホルモン（eCG）を組み合わせた超過剰排卵誘起法を開発しました。従来法に比べて一個体から得られる卵子数を大幅に増やすことで，体外受精，ゲノム編集，胚凍結などに必要な雌動物数の削減につながります。排卵障害を示す疾患モデルマウスの繁殖にも応用でき，生殖機能の理解と研究支援の双方に貢献しています。

未受精卵、前核期受精卵および二細胞期胚の凍結保存では、簡易ガラス化法を用いています。これらの技術を精子凍結保存，凍結精子を用いた体外受精，超過剰排卵誘起法と組み合わせることで，遺伝子改変マウスの作製、繁殖、保存および輸送における多くの課題が解決されました。特に前核期受精卵を保存して必要な時に融解することで，採卵・受精とマイクロインジェクションやエレクトロポレーションによる遺伝子導入を時間的に分離し，ゲノム編集を安定して運用できるようになりました。

輸送技術も重要な研究課題です。精子や二細胞期胚の冷蔵保存法を開発し，低温下での機能低下を抑える保存液の研究を進めてきました。二細胞期胚ではN-アセチルシステイン，精子ではジメチルスル

フォキサイドやケルセチンの有効性を見いだしています。胚や精子の低温輸送は，生体輸送を代替し，微生物統御上のリスクや動物福祉上の負担，国際輸送の課題を軽減します。

近年は，受精促進・阻害化合物，精巣上体の代謝環境，マイクロ流体デバイスを用いた精子選別など，精子の受精能制御や分子機構の解明，新たな技術との融合研究にも取り組んでいます。

マウスからラットへ

マウスで培った生殖工学とバイオリソースの取り組みは，現在ラットへ広がっています。ラットは，生理学，薬理学，神経科学，行動科学などで長く利用され，創薬研究や生理機能解析，外科的操作にも重要な実験動物です。ゲノム編集により遺伝子改変ラットの利用が広がる一方，生殖工学技術には多くの課題が残されていました。

現在，私たちは，ラット生殖工学に関する研究開発を進めています。これまでの成果として，ラット精子の凍結保存法，凍結精子を用いた体外受精法，ラット精子の冷蔵保存法を開発してきました。近年は，ドライアイスを用いた凍結精子の輸送や受精卵の凍結・加温条件を改良し，ラットリソースを安全に保存・輸送するための基盤技術を開発しています。これらの技術を活用し，2019年からCARDラットバンク（図5）を運営しています。

本研究から得られた経験として，マウスの知見をそのまま応用するのではなく，動物種ごとの生殖特性を理解して技術に反映することが重要でした。実験動物学の発展に貢献するために，マウスからラットへ，さらに多様な動物種へと生殖工学を展開し，持続可能なバイオリソース基盤の構築を目指していきます。

教育と人材育成

生殖工学には，論文やマニュアルだけでは伝えきれない知識や技術があります。顕微鏡下で0.1mm程度の卵子や胚を操作する感覚，精子の状態を見極める視点，培地環境を維持する工夫，受精率が低下した際の原因分析など，技術の成否を左右する知恵は，実際の操作と熟練の経験者との対話を通じて受け継がれます。そのため，教育と人材育成を研究・研究支援と同様に重要な活動として位置付けています。

学内では，薬学部生に生殖・発生の基礎，生殖工学実習，遺伝子改変動物とバイオリソースについて講義・実習を行っています。医学系・薬学系の大学院生には，問いの設定から仮説，実験計画，技術習得，データ解析，考察，学会発表，論文作成まで一連の研究活動を指導しています。異なる専門背景をもつ学生が，薬学，医学，実験動物学，生殖生物学，遺伝学を横断して学び，自らの研究成果が生命科学・生物医学の課題解決にどうつながるかを考えられることも大きな教育的価値です。

専門人材の育成では，2000年から熊本大学CARD生殖工学技術研修会（図6）を国内外で開催しています。本研修会では，講義，実演，実習を通じて，体外受精，精子・胚の凍結・冷蔵保存，胚移植などの知識と技術に加え，マウスバンクで蓄積した経験やノウハウを共有しています。2026年までに研修会の参加者は800名を超え，海外でも研修会や技術交流を実施（中国，フランス，シンガポール，韓国，スペイン，スリランカ，台湾，アメリカ）してきました。こうした活動を通じて，マウスからラットを含む齧歯類へと研修内容を広げています。

社会貢献

私たちにとって生殖工学の社会実装とは，研究成果を論文で終わらせず，研究現場で実際に使える技

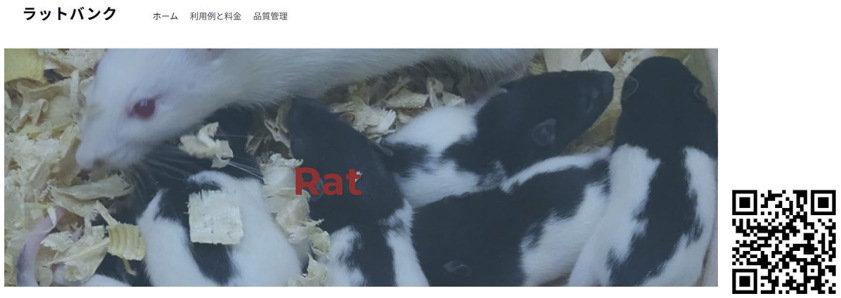


図5　CARDラットバンクのウェブサイト

術へ還元することです。開発した技術は，マウスバンクやラットバンクの標準プロトコルとして活用し，オンラインマニュアルの公開（図7）や生殖工学研修会を通じて普及しています。また，特許取得や製品化にも取り組み，大学で生まれた技術を広く利用できる形へ展開しています。

2016年と2026年に経験した熊本地震についても，当時の経験や有効だった対策および課題を共有することも重要な役割だと考えています。研究施設のスタッフと飼育動物の安全を確保し，災害時に貴重な遺伝子改変マウスを守るには，平時から胚や精子としてバックアップする体制を整える必要があります。研究資源の保存を防災・危機管理の一部として位置付けることは，人と動物の安全，大学や研究機関の研究継続性を高め，長い時間と多くの動物を用いて作製された貴重な遺伝子改変マウス系統を守ることにつながります。

学協会活動も，研究成果を社会へ還元し，分野全体を発展させる重要な場だと考えています。日本実験動物学会をはじめとする関連学会を通じて，バイオリソースの利活用の促進，生殖工学技術の普及，実験動物の管理と動物福祉の向上，研究の再現性・継続性の向上，人材育成に取り組んでいます。

教育・人材育成という面では，私自身，日本実験動物学会には深い思いがあります。初めて参加した2004年の第51回大会（長崎）は，アジア実験動物学会連合（AFLAS）第1回大会との合同開催であり，世界の実験動物学を意識する大きな契機となりました。その後，本学会でマウス生殖工学に関する研究成果を発表する機会を重ね，2012年の第59回大会（別府）では，日本実験動物技術者協会第46回大会との合同開催の中で奨励賞（図8）をいただきました。その後も，評議員，各種委員会，理事などの学会活動を通じて，多くの研究者・技術者・関係者の皆様から，研究だけでなく，実験動物学，動物福祉，人材育成，学会運営について学ぶ機会をいただいてきました。こうした経験を次の世代にもつなげたいと考え，研究室のメンバーにも積極的に学会へ参加し，研究発表や交流，学会活動を通じて成長することを勧めています。日本実験動物学会は，研究成果を発表する場であると同時に，世代や専門分野を越えて学び，人とつながり，実験動物学の未来をともに考える場でもあり



図6　熊本大学CARD生殖工学研修会のウェブサイト



図7　マウス生殖工学技術オンラインマニュアル

ます。学生・若手研究者や技術者をはじめ，多くの会員の皆様にも，学術集会への参加にとどまらず，国際交流やさまざまな学会活動に参加していただければ幸いです。

国際連携と国際標準化

CARDでは，マウスリソースの共有を支える国際連携と国際標準化にも取り組んでいます。International Mouse Strain Resource（IMSR）との連携（図9），世界各地でマウスバンク機能を担う大学・研究機関との交流を通じて，遺伝子改変マウスの作製，保存・供給に加え，生殖工学，品質管理，人材育成に関する技術交流を進めています。バイオリソースを国際的に共有するには，試料だけでなく，マウスの遺伝的背景，遺伝子改変情報，技術，品質，利用条件まで含めた共通基盤が必要です。

アジア・太平洋地域では，Asian Mouse Mutagenesis Resource Association（AMMRA，図10）が重要な役割を担っています。AMMRAは，マウス遺伝学，遺伝子改変動物の開発，バイオリソースの保存・供給，表現型解析，関連技術の発展を目的に，地域の中核研究機関が連携するネットワークです。日本からは熊本大学CARDと理化学研究所バイオリソース研究センターが創設メンバーとして参画し，研究プロジェクト，リソース，技術に関する情報共有に加え，若手研究者・技術者が国際的なネットワークを築く場にもなっています。

さらに，動物実験の信頼性と再現性を高める国際標準化を進めています。2024年には，世界各国の研究機関，学会，バイオリソース機関・コンソーシアムが連携し，Laboratory Animal Genetic Reporting（LAG-R）ガイドラインをNature Communicationsに発



図8　2012年第59回日本実験動物学会総会（別府）における表彰式



図9　世界中に保管されているマウス系統を検索できるIMSRポータルサイト

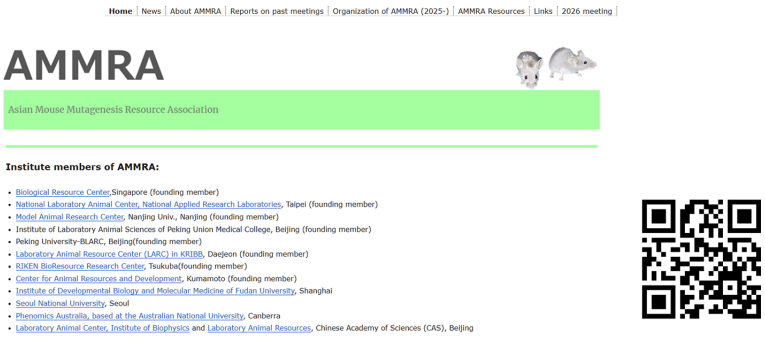


図10　AMMRA：アジアにおけるマウス遺伝学およびマウスリソースに関するコンソーシアム

表しました。LAG-Rは，遺伝子改変動物を用いる研究で，系統名，遺伝的背景，改変アレル，作製法，遺伝型判定法（genotyping），入手元など，再現に必要な遺伝学的情報を明確にする報告指針です。LAG-Rによる情報の標準化，CARD R-BASEや国際リポジトリによるリソース共有，共通の生殖工学技術を組み合わせることで，研究成果を再現可能な形で次の研究者へ引き継ぐことができます。

国際連携では，人のつながりも技術やリソースと同じくらい重要です。AMMRAをはじめとする人的ネットワーク，生殖工学研修による技術の共有，LAG-Rなどによる情報の標準化を組み合わせ，国際的に信頼される実験動物研究基盤を構築していきたいと考えています。国際マウス生殖工学研修会は，技術を共有するとともに，人と人，研究機関と研究機関をつなぐ機会でもあります。

現在の資源開発分野

現在の資源開発分野は，私のほか，中尾聡宏特任助教，中川佳子客員助教，土山修治技術専門職員（技術部門），坂本亘技術専門職員（技術部門）をはじめ，マウスバンク，飼養保管・衛生・設備管理を担う専門スタッフ，学部生・大学院生からなる多職種のチームです。研究，マウスバンク，ラットバンク，動物実験施設の管理，教育，国際交流をそれぞれの専門性を生かして支えています。また，疾患モデル動物に関する共同研究では，生殖障害をもつモデルマウスの解析や繁殖技術の開発に取り組んでいます。これまでに当研究室から，学部生：33名，修士課程：24名，博士課程：9名が卒業し，製薬・バイオ関連企業，大学・研究機関，臨床（病院，薬局），官公庁，コンサルタント等で活躍しています（図11）。

生殖工学の研究から技術開発，マウス・ラットリソースの保存・供給，教育，社会実装，国際連携までを身近に経験できることも，資源開発分野の魅力だと考えています。私たちが大切にしているのは，「私たちの仕事が未来の研究や社会を支える」という考え方です。生殖工学の技術を磨き，試料を正確に管理して高い品質を維持すること，保存した胚や精子から確実に系統を復元することは，一つ一つは地道な作業です。しかし，その積み重ねが将来の科学を支える基礎になります。高度な生殖工学技術と信頼性の高い研究基盤の両方を大切にし，未来を見据えて，研究基盤を支える仕事に責任と誇りを持って取り組める専門人材を育てることが，資源開発分野の文化です。



図11　令和7年度資源開発分野のメンバー

これからの生殖工学とマウス・ラットリソースの研究で実現したいこと

私が生殖工学とマウス・ラットリソースを通して実現したいことは，「未来の創薬・医療・健康を支える研究基盤」をつくることです。生殖工学に関しては，生殖の本質を解明することで，多様な生物への応用や次世代技術の創出を目指します。マウス・ラットリソースに関しては，質の高いモデル動物と情報を次世代へ残し，世界中の研究者が信頼して利用できる形で共有できる仕組みを構築したいと考えています。今後は，AIやデジタル技術も活用しながら，リソースの品質管理，情報の標準化・共有，研究データとの連携を高度化することで，研究の再現性と有効活用をさらに高めたいと考えています。同時に，次世代の生命科学研究における動物実験の必要性と在り方を問い続け，3Rsを基本として動物福祉の向上を図りながら，生命科学研究の発展とイノベーションにつなげていきたいと考えています。

今日の実験動物学は，長年にわたり発展させてこられた先人の先生方，技術者，学協会関係者の皆様のご尽力の上に成り立っています。今後も，先人の先生方から受け継いだものを守るだけではなく，同じ時代を歩む研究者・技術者，動物実験施設やバイオリソース機関の仲間とともに磨き，発展させ，次の世代へ渡していくことが私たちの使命だと考えています。

日本やアジアにおいて実験動物学に関わる方が一堂に集い，分野や立場を越えて未来を語り合う機会として，2027年5月24日から28日まで福岡国際会議場で「アジア実験動物科学会議 in Japan（ACLAS2027）」が開催されます（図12）。第11回AFLAS大会，第74回日本実験動物学会総会，第61回日本実験動物技術者協会全国大会の3団体合同大会で，テーマは「生命

を支える科学と技術 ～未来の実験動物科学技術を共に深化 ・ 実践する～」です。研究者，技術者，施設関係者，獣医師，行政関係者，企業，学生 ・ 若手をはじめ，実験動物科学を支える多様な立場の方々が一堂に会し，研究と技術，動物福祉，人材育成について学び，交流する貴重な場になると期待しています。ぜひ多くの皆様にご参加いただき，日頃の成果や経験を持ち寄り，新しいつながりと次の研究基盤をともにつくっていただければ幸いです。

最後に，生殖工学と遺伝子改変動物リソースを通じて世界の生命科学研究を支え，その成果を未来の創薬 ・ 医療 ・ 健康へつなげることが，私たちの目標です。そのためにも，研究者 ・ 技術者だけでなく，企業，行政，そして社会の多様な立場の皆様との対話と協働を大切にしながら，科学的信頼性と動物福祉の双方を重視した研究基盤を育てていきたいと考えています。



図12　来年の福岡国際会議場で開催されるアジア実験動物科学会議 in JAPAN

維持会員便り

実技教育の新たな拠点として
― KAC技術研修所の移転と新たな取り組み ―

株式会社ケー・エー・シー
技術ソリューション部　坂本 雄二

動物実験に携わる人材の教育・訓練において，知識を学ぶことと，実際に動物を扱う技術を身につけることは必ずしも同じではありません。実験動物の生物学的特性や動物福祉，関連法規などについて学ぶ機会は，eラーニングの普及もあり以前に比べて増えてきました。一方で，保定，投与，採血などの基本的な手技について，実際に動物を用いて指導を受け，自らの手技を確認できる場は，決して多くないように思います。

また，研究や試験の現場では，「新たな手技を導入したいが，どのような方法が適切なのか」「施設内で手技を標準化したい」「若手研究者や新任者に実技を含めた教育を行いたい」といった課題が生じることがあります。そのような時，所属する施設だけですべてを完結することが難しい場合もあります。こうした実技教育や手技に関するさまざまな要望に対応できる場として，株式会社ケー･エー･シー（KAC）では，東京都荒川区に新たな技術研修所を開設しました。

KACでは2001年（平成13年），滋賀県栗東市に技術研修所を開設し，約25年にわたり，当社社員をはじめ社外の方々を対象とした実験動物の管理・飼育および動物実験手技に関する教育・研修を行ってきました。その間，動物福祉への考え方や飼育環境に求められる水準は大きく変化し，研究現場における教育・訓練の在り方も変わってきました。また，研修内容に対する要望も多様化し，従来の研修施設では対応が難しい場面も生じるようになりました。

そこで，栗東市で培ってきた研修機能を引き継ぎながら，これからの実技教育に求められる機能を改めて検討し，主たる研修拠点を東京へ移す形で新しい技術研修所を整備しました。



株式会社ケー・エー・シー 東京支社 （技術研修所1F,2F）

図1　研修所正面およびJR尾久駅からの経路

新研修所は東京都荒川区に位置しており，JR尾久駅から徒歩6分，東京駅からも乗り換えなしでアクセス可能な立地にあります。首都圏の大学，研究機関，製薬企業等から利用しやすいことに加え，遠方から来所する場合にも比較的アクセスしやすい環境となっています。建物は3階建てで，研修機能の移転にあわせ，従来台東区にあった東京支社も同時に移転しました。現在は東京支社としての機能の中に技術研修所を位置付け，2階の一部を講義室とし，1階には動物飼育室と実習室を配置しています。

周辺の尾久・西尾久エリアは，都電荒川線（東京さくらトラム）が走る落ち着いた住宅地を中心とした下町らしい街並みが広がり，荒川遊園や荒川自然公園といった親しみやすい施設や緑地も点在しています。都心に近接しながらも比較的静かな環境にあり，研修に集中しやすい点も特徴の一つです。

講義室には大型モニターを設置しており，当社が提供するeラーニングシステム「e-SEAs」の動画教材や講義用スライドを用いた座学研修を行うことが可能です。実験動物の生物学的特性，飼育管理の基本，動物福祉や関連法規の考え方などについてあらかじめ知識を整理した上で実技に臨むことで，受講者が実技研修の位置付けを理解した上で実践に移行できるような構成としています。

1階にはマウスおよびラット専用の飼育室をそれぞれ設置しました。各飼育室では，温度・湿度，換気回数，照度，騒音など，実験動物分野において求められる基本的な環境要件を満たすよう設計し，飼育設備には個別換気システム（IVC）方式の飼育装置を導入しています。

さらに本研修所では，マウス室とラット室であえて異なるメーカーのIVC飼育装置を採用しています。飼育装置は外観や基本構造が似ていても，実際の運用や管理方法にはメーカーごとの特徴があります。複数のシステムを実際の飼育環境の中で確認できることは，教育目的にとどまらず，新たな飼育設備の導入や運用方法を検討する際にも活用できるのではないかと考えています。

そして，新研修所で特に重視したのが，実際に動物を用いた実技研修を行うことのできる環境です。実習室は最大18名を収容可能な規模としており，マウス，ラットを用いた各種手技について，いわゆるウェットハンドでの実技研修を行うことができます。保定，投与，採血などの基本的な手技をはじめ，研修の目的や受講者の経験に応じて内容を組み立てることも可能です。

実技研修では，単に「手技ができるようになる」ことだけを目的とはしていません。なぜその保定が必要なのか，どのような操作が動物への負担につながるのか，手技がうまくいかなかった場合に何を見直すべきなのか，といった点も含めて考えることを重視しています。

動物実験に日常的に携わっている方の多くは，すでに必要な手技や技術を身につけ，特に不便を感じ



図2　講義室，動物飼育室（IVCラック2種），実習室

ることなく実験を実施されていると思います。しかし，日頃問題なく行えている手技であっても，改めてその方法を見直してみると，保定の仕方や動物への触れ方，器具の扱い方など，さらに改善できる部分が見つかることがあります。長く行っている手技であるからこそ，いつの間にか自己流となっている部分や，もう少し工夫できる部分が残されていることもあります。

私自身，実技教育に携わる中で「技術の差は苦痛の差」ということを伝えてきました。同じ手技であっても，それを行う人の技術によって，動物が受ける苦痛やストレスには違いが生じます。そして，このことは動物福祉の問題だけにとどまらないと考えています。

適切な保定や確実な手技によって動物への不必要な負担を軽減することは，実験条件をより安定させることにもつながります。一方，保定や操作に伴う過度なストレスや手技のばらつきは，得られる実験データにも影響を及ぼす可能性があります。そう考えると，「技術の差は苦痛の差」であると同時に，さらには「実験データの差」にもなり得ます。

「技術の差は苦痛の差，さらには実験データの差」――。

すでに身につけている技術であっても，時には立ち止まって再確認し，ブラッシュアップする。そのことが，より精度の高い実験データを得ることに寄与すると同時に，実験動物福祉の実践にもつながっていくのではないでしょうか。新たな手技を習得するためだけではなく，今行っている手技・技術を再チェックする場としても，本研修所を活用していただきたいと考えています。

そのため本研修所では，あらかじめ動画教材等を用いて手技の流れや要点を確認した上で実技に入り，途中で課題が生じた場合には，無理に生体を用いた操作を繰り返すのではなく，一度手を止めて教材に戻り，動作や手順を確認することができます。技術の習得と動物への負担軽減を両立させることは，実技教育におけるRefinementを考える上でも重要であると考えています。

一方，新研修所の役割は，定型的な研修プログラムを実施することだけではありません。研究機関や大学，企業等において新たな実験手技を導入する際には，その手技が実際の研究環境の中で安定して実施できるか，担当者間でどのように手技を標準化するかなど，事前に検討を要することがあります。そのような場合に，実際に動物を用いながら手技を確認し，方法を検討する場として活用していただくことも，新研修所の役割の一つと考えています。

研究者や技術者の皆様は，日々の研究や業務の中で非常に多忙であり，研修のためにまとまった時間を確保すること自体が難しい場合も少なくないと思います。そのため，研修の実施日や時間帯，研修メニューの組み立てについても，あらかじめ決められた形に当てはめるのではなく，それぞれの事情や目的に応じてさまざまな設定，アレンジができるようにしています。必要な内容を必要な時間で実施することも含め，まずはご相談いただき，その施設や受講者にとって無理のない研修の形を一緒に考えていきたいと思っています。

また，すべての研修を東京の研修所で行う必要があるわけではありません。動物実験施設では，施設ごとに設備，飼育環境，使用している器材，手順等が異なります。そのため，研修内容によっては，研修所に来ていただくよりも，講師が実際の施設を訪問し，その施設の環境に合わせて研修を行う方が効果的な場合もあります。当社では，こうした出張研修についても，内容を相談しながら対応しています。

近年，動物実験を取り巻く環境では，個々の研究者や技術者が一定の技術を持っていることに加え，組織としてどのような教育・訓練を行い，その技術をどのように維持しているのかという点も重要になっています。しかし，それぞれの大学，研究機関，企業が，あらゆる実技教育のための設備や指導者を自施設内に常時用意することは容易ではありません。

さらに，KACがこれまで培ってきた経験やノウハウは，実験動物を用いた研修だけに限られるものではありません。動物実験施設を運営していると，施設の改修や運用方法の変更，飼育器材やエンリッチメントの導入，獣医学的ケアの実践など，日々さまざまな課題に直面します。さらに，動物実験委員会の運営や動物実験計画書の内容の検討，第三者認証・検証に向けた体制整備など，「どのように進めたらよいのか」「他の施設ではどのようにしているのか」「何かヒントが欲しい」と感じる場面もあるのではないでしょうか。KACでは，これらの分野について豊富な経験を持つ人財を擁しており，さまざまな側面から皆様のご要望にお応えすることが可能です。

私どもKACでは，こうした動物実験施設の運営にまつわるさまざまな困り事や悩みに対しても，これまで多くの施設に関わる中で蓄積してきた経験とノウハウを活かし，それぞれの施設の状況に応じたサ

ポートを行っています。必ずしも一つの正解を当てはめるのではなく，現状を一緒に整理し，その施設にとってより良い方法を考えていくことも，私どもの役割の一つであると考えています。

必要な時に実際に動物を用いた研修ができる。新しい手技について検討できる。現在行っている手技をもう一度見直すことができる。そして，必要に応じて講師が施設へ出向くこともできる。このような実技教育を支える場が，大学，研究機関，企業等が多く集まる首都圏にあることには，一定の意味・価値があるのではないかと考えています。新しい技術研修所が，KAC社内の教育施設にとどまらず，動物実験に携わる皆様の技術をもう一段ブラッシュアップする場，また新たな手技を検討する場として活用され，そのことが実験動物福祉の実践と，より信頼性の高い実験結果を得ることにつながっていけば幸いです。

そして，研修に限らず，動物実験施設の運営の中で何か困っていること，悩んでいること，あるいは少しヒントが欲しいと感じることがあれば，そうした時にもKACを思い出していただければと思います。施設運営に関わるさまざまな部分を私どもがお手伝いすることで，研究者や技術者の皆様が，本来取り組むべき研究そのものにより集中できる環境づくりのお役に立つことができれば幸いです。

【KACが提供可能な主なサービス】

- 動物実験に関する基礎的講義全般，技術手技の教育研修（研修所，出張研修）
- 実験動物技術者1級・2級資格の取得支援
- 実験動物・動物実験に関する座学・実験手技のオンデマンドでの動画配信
- 実験動物・動物実験に関する様々なトピックスの講義・講演（ご要望にお応えします）
- 実験動物の獣医学的ケア業務の提供，DJCLAM（日本実験動物医学専門医協会の専門医，Diplomate of Japanese College of Laboratory Animal Medicine）取得に向けた獣医師の教育研修
- 動物実験委員会の運営，第三者認証の取得・維持，施設建設に関する支援およびコンサルテーション
- 動物実験受託・遺伝子組換え動物繁殖・作製受託
- 動物飼育管理・実験室管理受託，実験支援受託
- ヒト組織・細胞含めた試薬の提供
- その他，お客様のご要望にお応えします。



図3　研修所メンバー（イメージ）

会員便り

「獣医保健看護学」と「実験動物」

日本獣医生命科学大学　獣医学部　獣医保健看護学科
基礎部門　生体機能学研究分野
藤澤正彦

日本獣医生命科学大学の藤澤と申します。現在，「愛玩動物看護師」を養成する「獣医保健看護学科」の教員として，研究および教育に携わっております。元々，獣医学科の研究室において研究活動を続けておりましたが，2008年より「獣医保健看護学」の教育と研究に取り組んでおります。多くの皆様にとって，「獣医保健看護学」並びに「実験動物学」との関わり合いについては，まだ馴染みが薄い部分もあるのではないかと思いますので，紙面をお借りして簡単に紹介させて頂きます（図1）。

「愛玩動物看護師」は，動物の状態を観察し，飼い主に適切な情報を伝え，獣医師による診療を支援する専門職として2019年に国家資格化され，2022年に初めての資格取得者が誕生しました［1］。当研究室は，「獣医保健看護学」という学問体系の中で，「獣医保健系」に分類されています。「獣医保健系」とは，生命倫理や動物福祉を基盤として，獣医療に関わる動物の生理・解剖，疾病の原因や病態を理解し，動物の健康増進，疾病予防，疾病の早期発見および早期処置に必要な知識と技術を身につけることを目指す領域です［2］。また，大学院の博士課程前期および後期課程においては，「基礎獣医保健看護学」や「先端獣医保健看護学」の領域で研究を行う専門家の養成も目標としています。動物の健康や疾病を科学的に理解するためには，基礎研究と臨床応用をつなぐ視点が重要です［3］。当研究室では，動物機能学，動物繁殖学，動物薬理学および実験動物学に関する講義・実習を担当しています。これらの教育を通して基盤研究の重要性を学ぶことで，学生が卒業後に臨床現場だけでなく，研究機関，製薬企業，非臨床試験受託機関，大学など，幅広い分野で活躍できる人材の育成を目指しています（図2）。

当研究室は，前教授である袴田陽二先生の時代から，「公私立大学実験動物施設協議会」，いわゆる「公私動協」と関わる機会を頂いて参りました［4］。これまで本学において，公私動協の委員会活動や教育・研修委員会が主催する技術研修会などを開催する機会に恵まれてきました。その過程において，動物看護学教育における実験動物関連科目の在り方について，多くの御指導と御助言を頂きました。実験動物をめぐる社会的な要請や研究環境は変化し続けていますが，動物福祉に配慮しながら適切な実験を実施する

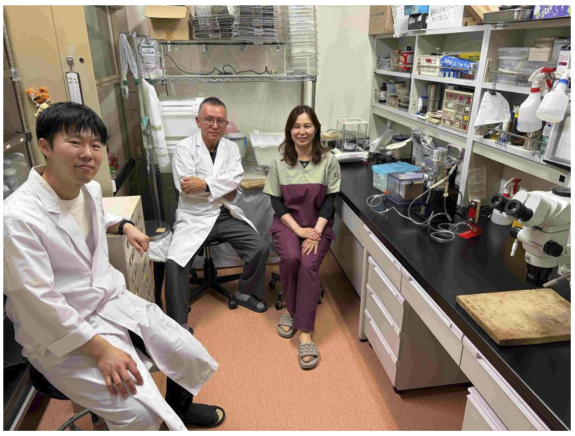


図1　研究室風景①（動物処置室）
左から菅井和久助教，袴田陽二前教授，鎌田由依技術補佐員



図2　令和4年度　公私動協　教育・研修委員会主催研修会（事前会議の様子，日本獣医生命科学大学）

という基本姿勢は，時代が変わっても揺らぐことはありません。また，当研究室の同窓生の中には，公私動協の事務局運営に携わり，教育・研修委員会をはじめとする各種委員会の運営にも貢献している者もおります（日本医科大学医学部，丸山基世講師）。本研究室で学んだ卒業生が，大学，研究機関，企業などさまざまな場所で実験動物学や動物福祉に関わる活動を続けていることは，私たちにとって大きな励みとなっています（図3）。

本学科には民間資格である「実験動物取扱技術者資格」（日本実験動物技術者協会主催）の取得を目指す学生が複数名おり，現在もその流れは続いております。「愛玩動物看護師」カリキュラムの中にも「実験動物学」は「比較動物学」の1項目として必須科目に該当し，「ヒトと動物の関係」を問う1学問体系として重視されています。実験動物を適切に取り扱うために必要な解剖生理，動物福祉，適正飼養，麻酔・鎮痛，感染管理などの知識は獣医の臨床現場のみならず，幅広い分野での応用が期待されます（図4）。

現時点では，日本は欧米に比べて専門性の制度化は発展途上にあります。将来展望としては，愛玩動物看護師制度の成熟とともに，実験動物分野を含む専門資格の導入が検討されることを祈念しております（米国における「Academy of Laboratory Animal Veterinary Technicians and Nurses（ALAVTN）」に類似した資格）[5]。卒業生の活躍を励みとしつつ，今後の展開を期待しております。

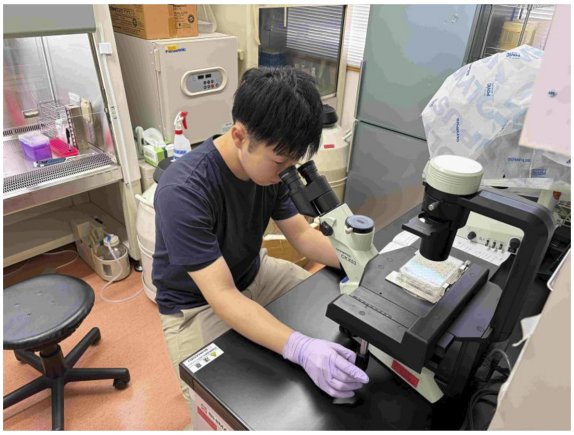


図3　研究室風景③（培養室）



図4　実習風景（シミュレーター動物と筆者）

参考文献

1) （一財）動物看護師統一認定機構ホームページ．https://www.ccrvn.jp/index.html
2) 日本獣医生命科学大学　獣医学部　獣医保健看護学科ホームページ．https://www.nvlu.ac.jp/veterinary-nursing/about/003.html/
3) 日本獣医生命科学大学大学院獣医生命科学研究科　獣医保健看護学専攻ホームページ．https://www.nvlu.ac.jp/graduate/003.html
4) 公私立大学実験動物施設協議会ホームページ．https://jalap.adthree.com/
5) アメリカ獣医技術者協会（NAVTA）．https://navta.net/

会員便り

あのころ憧れた研究者を目指して

東京大学新領域創成科学研究科メディカル情報生命専攻
東京大学医科学研究所先進動物ゲノム研究分野
飯田龍哉

はじめに

皆様，はじめまして。東京大学医科学研究所先進動物ゲノム研究分野に所属しております，博士課程3年の飯田龍哉と申します。このたび，前号（実験動物ニュース2026, Vol. 75, No. 3）の会員便りを寄稿された平野里佳先生よりご紹介いただき，本稿を執筆することとなりました。平野先生は昨年まで私と同じ研究室に所属しており，共通の趣味であるお笑いライブを一緒に見に行くなど，頼れる先輩として公私ともにお世話になりました。また，このような貴重な機会を与えて頂きましたことを，心より感謝申し上げます。

執筆にあたり，過去の会員便りを拝読したところ，経験豊富な先生方による興味深い記事の数々に感銘を受けました。同時に，研究を始めてまだ間もない私に，果たしてこの場でお伝えできるようなことがあるのだろうかと，不安も感じております。しかし，これまでの経験を振り返りながら，実験動物学に携わる学生の生活や，研究者を目指す中での思いの一端をお伝えできればと思います。最後までお付き合いいただけますと幸いです。

初めに少し趣味について紹介をすると，私は少しミーハーな性格で，流行っているものにはつい飛びついてしまいます。最近は「ちいかわ」の熱が高まっています。ちいかわは，癒しや共感，感動などさまざまな要素が詰まった，とても面白い漫画です。私が好きなキャラクターは，猫のようなハチワレというキャラクターです（図1）。ハチワレは，数少ない言葉を話すキャラクターで，理不尽な状況でも優しさを忘れず，いつも前向きです。また，草むしり検定のための勉強や討伐のための修行など，努力を惜しまない向上心の強いキャラクターでもあります。私も心が荒んだときにはハチワレを思い出し，優しく，前向きであろうとしています。ちいかわはX（旧Twitter）で誰でも読むことができますので，ぜひ一度読んでみてください。また，この文が公開される頃も劇場版がおそらく公開中だと思います。こちらも非常に面白い映画ですので，機会があればぜひ映画館に足を運んでみてください。他にも，私はお金の心配をせずに研究を続けられるように，株の売買も趣味として行っています。もし詳しい先生がいらっしゃいましたら，学会などでお会いした際に，ぜひコツをご教示いただければ嬉しく思います。

研究者になりたいと思ったきっかけ

私は福岡県福岡市で生まれ，大学学部を卒業するまでの22年間を福岡で過ごしました。小学生の頃は勉強にあまり興味がなく，夏休みの宿題も最終日にすべて終わらせるようなタイプでした。夏休みの作文では，何も書くことがなかったため，想像で祖父母との感動的なエピソードを作り上げて書いたところ，市の優秀作文集に掲載されてしまいました。せっかく選ばれたにもかかわらず，本来は健康な祖父母が病に倒れているような内容だったため，家族には言えなかったという思い出があります。



図1　研究室にあるちいかわグッズ
中央の青い髪がある猫のようなキャラクターがハチワレ。

研究者を志したのは中学生の頃です。たまたまテレビで聞いたCMソングをきっかけに，イギリスのロックバンドQueenが好きになりました。Queenは1970 ～ 1980年代を中心に活躍したバンドで，「We Will Rock You」や「We Are the Champions」など，数々の有名曲を世に送り出しています。2018年に，ボーカルのフレディ・マーキュリーを中心とした伝記映画『ボヘミアン・ラプソディ』が大ヒットしたことで，若い世代にも知られているかもしれません。彼らの曲を聴き，彼らの生涯について調べていく中で，私はなぜか，バンドマンに憧れるのではなく，研究者に憧れるようになりました。そのきっかけとなったのが，「'39」という曲でした。「'39」は，宇宙へ1年間旅に出ている間に，地球では何年もの時間が過ぎ，愛する人がいなくなってしまうという物語を，アインシュタインの特殊相対性理論をモチーフに描いた壮大な曲です。この曲を作曲したギタリストのブライアン・メイは，天体物理学を研究し，博士号を取得しています［1］。ギタリストとして活躍しながら，天体物理学の博士号を持っているというギャップが，当時の私にはとてもかっこよく感じられました。さらに，この曲をきっかけにアインシュタインや相対性理論について興味を持ったことで，研究者という存在への尊敬や憧れが湧いてきました。周りの友人がアイドルやスポーツ選手，ミュージシャンに憧れるのと同じように，私は純粋に「研究者ってかっこいい」と思い，研究者になることを志しました（図2）。



図2　2024年に武道館で開催されたQueenのライブ
2016年には武道館，2024年には東京ドームで開催されたQueenのライブに行きました。図は2024年のものでブライアン・メイがギターを演奏しています。2024年のライブには2016年よりも多くの観客が集まっており，『ボヘミアン・ラプソディ』の映画化によるQueen人気の広がりを実感しました。

研究の世界へ

高校に入ってからは，研究者になるために勉強に取り組むようになりました。特に物理と化学が好きで，化学を学べば世の中にあるすべてのものを作り出せるという，かなり大雑把な考えから，地元の九州大学工学部物質科学工学科に進学しました。現在は実験動物学の分野で研究していますが，大学学部時代まで，生物学をほとんど学んでいませんでした。

大学では応用化学を専攻し，物理・化学を中心とした授業を学んでいました。一方で，教授の先生方による研究紹介では「バイオ」という言葉がたびたび登場し，生物学を学ぶことの重要性を感じていました。そこで，学部4年次には，生物学に近い分野であるタンパク質工学を専門とする研究室に所属しました。ここで初めて本格的に生物学に触れることになりました。自分で作製したプラスミドを大腸菌に入れると，大腸菌がその情報を基に，目的のタンパク質を大量に作ってくれる。そんな一連の現象を実際に自分の手で経験したことで，生物が持つ機構のすごさや，その緻密さに強く惹かれました。また，研究では試行錯誤を重ねるなかで，一つの工夫によって，それまで全く進まなかった反応が一気に進展する経験をしました。さらに，そこから研究の方向性が広がっていくことにも大きな楽しさを感じました。研究成果は，私が卒業した後に論文化［2］され，現在でもその成果を発展させた研究が複数発表されています。この経験を通して研究の面白さを学び，研究者になるという道を選んだことは間違いではなかったと確信しました。

実験動物から学ぶ現在

話は前後しますが，学部3年次後半の研究室選択にあたり，自分のやりたい研究について考えるようになりました。当時は，CRISPR-Cas9を用いたゲノム編集技術の開発者がノーベル化学賞を受賞したこともあり，一般向けにもゲノム編集に関する記事や情報があふれ，注目を集めていました。「バイオ」に興味を持っていたミーハーな私は，ゲノム編集に関する研究，さらには動物を用いた研究がしたいと思い，

研究室を探し始めました。そしてたどり着いたのが，現在所属する東京大学医科学研究所先進動物ゲノム研究分野でした。研究内容を調べてみると，ゲノム編集で作製する「ヒト化動物」や「キメラ動物」といった言葉が並んでおり，研究について右も左も分からなかった当時の私には，どれもかっこよく，とても魅力的に感じられました。そこで，修士課程からヒト化動物の開発について研究することになりました。

私が研究しているヒト化動物とは，拒絶反応が起こりにくい免疫不全動物にヒトの細胞や組織を移植し，それらが動物の体内に生着・増殖した動物のことです。ヒトとマウス，ラットなどの実験動物では，薬物代謝や血液細胞の反応などに違いがあることが知られています。ヒト化動物を用いることで，ヒトの代謝や生体反応を動物の体内で解析することが可能になります。我々の研究室では，ゲノム編集技術を用いて，重症免疫不全ラットを世界に先駆けて開発しました。ラットはマウスより約10倍大きな実験動物であるため，手術が容易で，多くのサンプルを得られるなどのメリットがあります。我々の重症免疫不全ラットは，ナショナルバイオリソースプロジェクト－ラット（NBRP-Rat）を通じて広く研究者に提供されており，マウスを補完する実験動物として，さまざまな異種移植研究に利用されています。私は現在，この重症免疫不全ラットの改良に取り組んでおり，よりヒト細胞が生着しやすいラットの作製を目指しています［3］。

実験動物を用いた研究は，ケージ交換など大変な仕事も多いですが，うまくいったときには個体レベルで劇的な変化が得られるため，達成感も大きな研究です。また，実験動物から学ぶことも多くあります。動物実験を始めたばかりの頃は，ラットにビビりながら触れており，ラットも私の緊張感を感じてか，なかなか思うように保定させてくれないなど苦労しました。しかし，私自身がラットの扱いに慣れていくにつれ，最近ではラットもほとんど抵抗せず，体を触らせてくれるようになりました。こちらが信頼して心を開いて接しないと，相手も心を開いてくれない。ラットとの関わりを通して，そんな人間関係にも通じる学びを得ることができました。また，注意深く観察していると，彼らはケージの中で巣を作る場所や排泄する場所を決め，整理された生活を送っていることが分かります。生活リズムが乱れたり，部屋の清掃を怠ってしまったりする私にとっては，彼らの規則正しい生活を見習わなければと，いつも励まされながら研究生活を送っています。

おわりに

振り返ってみると，私は特にこれを研究したいという明確なテーマがあったわけではなく，漠然と「研究者ってかっこいい」という思いから研究者を目指していました。研究テーマも，かっこよく魅力的な名前に惹かれて選んできたように思います。そんな私が，今日まで研究者になりたいと思い続けているのは，周りの研究者の先生方が，中学生の頃に私が思い描いていた通りにとてもかっこよく見えているからです。信念を持ち，自分の研究を信じ，楽しそうに研究に向き合っている先生方の姿に，私は今も憧れと尊敬を抱き続けています。これまで私を指導してくださった先生方や，学会などでお会いし，研究についてお話しくださる先生方には，感謝してもしきれません。

一方で，ただ漠然と研究者を志したため，博士課程3年となり卒業が近づくにつれ，ここ数年は，自分が何をしたいのか，何のために生きているのかを自問自答する日々が続いていました。研究ができているだけで，ある意味では夢が叶っているような状況だったからこそ，研究者になって何をしたいのかということを，これまであまり考えてこなかったのかもしれません。そんな中，本稿を書くことになり，これまでの道のりを改めて振り返ってみました。私はただ好奇心の赴くままに，その時々でやりたいと思ったことに飛び込んできたのだと思います。そして，少なくともそのことを後悔してはいないと気づきました。私があのころ憧れていたのは，自分のやりたいことに寝食を忘れてひたすら向き合う研究者の姿でした。私もあのころの純粋な気持ちを忘れず，たとえ困難な道であっても，その時に一番やってみたいと思うことに真摯に取り組み，いつか誰かに「研究者ってかっこいい」と思ってもらえるような研究者になれるよう，これからも邁進していきたいと思います。

ただ，ふと考えてみると，「かっこいい」とは一体何なのでしょうか。とても曖昧な言葉です。ブライアン・メイは，ギタリストだったからかっこよかったのでしょうか。私にとっての「かっこいい」が何なのか，まだ分かりません。まずは，一度断念したエレキギターの練習を再開するところから始めてみます。

このような貴重な執筆の機会を与えてくださった実験動物ニュース編集委員の皆様に，この場をお借りして心より御礼申し上げます。読者の皆様も，最後までお付き合いいただき，ありがとうございました。本学会の総会などでお会いした際には，ぜひ気軽にお声がけください（図3）。

おまけ：来年の総会へ向けておすすめの福岡フード紹介

来年の第74回実験動物学会総会は福岡で開催されます。そこで，私が福岡に帰省した時に必ず行くお店を紹介したいと思います。興味があればぜひ足を運んでみてください。

・牧のうどん

福岡といえばラーメンを思い浮かべる方が多いと思いますが，福岡県民にはラーメンよりもうどんが好きという人も少なくありません。そんな福岡のうどんを代表するお店の一つが「牧のうどん」です。牧のうどんの特徴は，何といっても太くて柔らかい麺です。ゆっくり食べていると，麺がどんどん出汁を吸っていき，食べても食べても麺が減りません。出汁は優しくもしっかりとした味わいで，私はその味を思い出すだけで福岡に帰りたくなります。おすすめは，肉ごぼう天うどん，芋天，かしわご飯です。肉ごぼう天うどんは，甘く煮た肉の味が加わることで，出汁の味わいがさらに引き立ちます。芋天は衣が分厚く，出汁をしみこませて食べると抜群の相性です。「かしわ」は鶏肉のことで，かしわご飯はうどんのお供として定番の一品です（図4）。

福岡にはほかにも，北九州発祥で最近では関西や関東にも進出している「資さんうどん」や，うどんだけでなく焼き肉など幅広いメニューを展開しローカルCMでもおなじみの「ウエスト」，安さが魅力の「小麦治」など，チェーン店だけでも多くのうどん店があります。福岡にお越しの際は，ぜひそれぞれの店を巡ってみてください。

・元祖長浜屋

福岡のラーメンには，博多ラーメン，長浜ラーメン，久留米ラーメンといった種類があります。そんな中で，私は子供のころから祖父に「元祖長浜屋」に連れていかれていました。長浜は福岡の魚市場の近くにあり，早朝から市場で働く人たちに素早くラーメンを提供するため，茹で時間の短い細麺が使われるようになったといわれています。現在ではおなじみとなった「替え玉」も，長浜のラーメン文化の中で生まれたものとされています。メニューはラーメンと替え玉，替え肉，ビールなど非常にシンプルで，注文から提供までがとにかく早いのが特徴です。入店時に麺の硬さを聞かれるため，慣れている人は店に入ると同時に麺の硬さを伝えることもあります。元祖長浜屋のラーメンは，細麺に豚骨スープ，ネギと薄切りの豚肉を合わせたシンプルな一杯です。豚骨の純粋なあっさりとした味わいなので，卓上に置かれたゴマ，胡椒，紅しょうがなどを加え，自分好みに調整して食べます。また，替え玉をしたときには，スープが薄まるのを防ぐために，卓上のやかんに入ったスープを加えます。独特なラーメン文化を体験できるため，ぜひ行ってみることをおすすめします（図5）。



図3　第73回実験動物学会総会での一枚
向かって右が筆者，左が真下知士先生。



図4　牧のうどん
肉ごぼう天うどん，かしわご飯セット。やかんの中には出汁が入っています。

・その他

むっちゃん万十（博多駅バスターミナルにある，ハムエッグがおいしい），揚子江（大宰府にある肉まん屋），天麩羅処ひらお（福岡空港の近くにある天ぷら屋），びっくり亭（南福岡駅近くの鉄板焼肉料理のお店）など。

文　献

［1］May B; A survey of radial velocities in the zodiacal dust cloud. *Springer Science & Business Media*, 2008.

［2］Nishioka R, Iida R, Minamihata K, Sato R, Kimura M and Kamiya N; Transglutaminase-mediated proximity labeling of a specific Lys residue in a native IgG antibody. *Chem. Commun.* 2024; 60 (65): 8545–8548.

［3］Iida R, Ishida S, Wang J, Hattori K, Yoshimi K, Yamazaki S and Mashimo T; A novel *Kit* mutant rat enables hematopoietic stem cell engraftment without irradiation. *Exp. Hematol.* 2024;132:104174.



図5　元祖長浜屋
主なメニューはラーメンのみ。紅ショウガが好きなのでたくさん入れています。

日本実験動物学会からのお知らせ

2026 年度維持会員懇談会の開催について

財務特別委員会委員長　　夏目知佳子

日頃より（公社）日本実験動物学会へのご理解とご支援を頂きありがとうございます。維持会員懇談会は動物実験に関する話題を広く情報共有，周知する目的で開催されています。

近年，生命科学・医学・医療の分野では，研究における「性差」への適切な配慮が改めて重要視されています。実験動物を用いた研究においても，雌雄による生理学的・行動学的な違いが研究成果の再現性やヒトへの外挿に影響することが指摘されており，この問題はジェンダード・イノベーションや性別・年齢・人種等が交差する多様な視点も含め，より広い文脈で論じる必要があります。

そこで，今回の維持会員懇談会では，実験動物・動物実験をはじめ，医療・生命科学・社会科学等，多分野の専門家をお招きし，「なぜ性差を考慮するのか」「それによって研究や医療・製品開発はどう変わるのか」を参加者の皆様とともに多角的に考える機会といたします。

本年度も現地開催＋ライブ配信のハイブリッド形式にて開催いたします。実験動物，動物実験にかかわる多くの方のご参加をお待ちしております。

記

日　　時：2026 年 11 月 11 日（水）13:00 ～ 19:10
会　　場：東京大学フードサイエンス棟　中島董一郎記念ホール
　　〒 113-8657 東京都文京区弥生 1-1-1　https://www.a.u-tokyo.ac.jp/nakashima/
参 加 費：講演会：無　料　　意見交換会：4,000 円
参加申込：原則，JALAS の会員，維持会員及び本企画の後援団体の方を対象といたします。事前に，JALAS 維持会員懇談会のホームページ，または右のフォームより参加申込みをお願いします。
後　　援　日本製薬工業協会，一般社団法人日本安全性試験受託研究機関協議会，
（予 定）　公益社団法人日本実験動物協会，NPO 法人動物実験関係者連絡協議会，
　　日本実験動物協同組合，日本実験動物器材協議会

Ⅰ 講演会（13:00 ～ 17:05）
「研究・開発における『性差』を考える ―実験動物から医療・社会まで―」

開会の辞　　小倉淳郎 理事長（日本実験動物学会）

Session 1　性差をめぐる研究と社会の視点
13:10 ～ 13:45　　平松竜司 先生（東京大学大学院）
13:45 ～ 14:20　　佐々木成江 先生（横浜国立大学）
14:20 ～ 14:55　　髙瀬堅吉 先生（中央大学）

（Coffee break）

Session 2　性差を踏まえた実験動物学研究の基盤と展開
15:15 〜 15:50　　三輪佳宏 先生（理化学研究所）
15:50 〜 16:25　　大沼健太 先生（ジャクソン・ラボラトリー・ジャパン株式会社）

16:25 〜 16:40　新規維持会員紹介

16:40 〜 17:00　アジア実験動物科学会議 in Japan（ACLAS2027）の概要

閉会の辞　夏目 知佳子（日本実験動物学会　財務特別委員会　委員長）

Ⅱ 意見交換会（17:10 〜 19:10）
場　所：カフェアグリ 101（東京大学フードサイエンス棟 2 階　中島ホール横）
参加費：4,000 円

以上

動物実験の外部検証
令和 9 年度の実施に向けた事前説明会・個別相談会

日　　時：令和 9 年 1 月 29 日（金）13:00 〜 17:30
会　　場：東京大学食の安全研究センター　中島董一郎記念ホール
〒 113-8657 東京都文京区弥生 1-1-1
https://www.a.u-tokyo.ac.jp/campus/overview.html
参加方法：対面と同時オンライン配信によるハイブリッド開催
参 加 費：無　料
参加方法やプログラムは学会 HP（https://jalas.jp/index.html）をご覧ください。

アジア実験動物科学会議 in Japan（ACLAS2027）の開催

大 会 長：中潟直己（熊本大学），中野洋子（日本獣医生命科学大学）
テ ー マ：生命を支える科学と技術
日　　時：令和 9 年 5 月 24 日（火）〜 28 日（金）
会　　場：福岡国際会議場
〒 812-0032 福岡市博多区石城町 2-1
※ ACLAS2027 は AFLAS 主催「第 11 回 AFLAS 大会」と JALAS 主催「第 74 回日本実験動物学会総会」並びに JAEAT 主催「第 61 回日本実験動物技術者協会全国大会」の合同大会です。
※開催案内は大会 URL（https://cfmeeting.com/aflas-jalas-jaeat2027/jointevent.html）をご覧ください。

Experimental Animals
―和 文 要 約―
Vol. 75, No. 4 October 2026

原著

Diacerein alleviates endometrial fibrosis in an intrauterine adhesion model via ferroptosis inhibition 383–396

Cong Shi[1)], Jianhua Sun[1)] and Jumin Niu[2)]

[1)]Department of Gynecology, Shenyang Women's and Children's Hospital, 87 Danan Street, Shenyang, 110013, Liaoning, China, [2)]Department of Gynecology, Shenyang No.4 People's Hospital, No. 20 Huanghe South Street, Shenyang, 110031, Liaoning, China

Intrauterine adhesion (IUA) is a significant contributor to uterine infertility, primarily characterized by endometrial fibrosis. Although diacerein exhibits anti-inflammatory and anti-fibrotic properties, its therapeutic potential in IUA remains unclear. This study investigated the protective effects of diacerein in an IUA rat model induced by mechanical injury. Histological analysis revealed that diacerein treatment alleviated endometrial damage, and immunohistochemical staining confirmed the restoration of CK19 and CK18 expression, indicating improved epithelial integrity and regeneration. Diacerein mitigated endometrial fibrosis by inhibiting epithelial-mesenchymal transition (EMT), as evidenced by increased E-cadherin and decreased N-cadherin expression, likely via suppression of TGFβ/SMAD2 signaling. Diacerein exerted anti-inflammatory effects in IUA rats. Notably, diacerein inhibited ferroptosis by reducing lipid peroxidation, limiting Fe^{2+} accumulation, and modulating ferroptosis-related proteins, including ACSL4, SLC7A11, GPX4, and FTH1. The protective effects of diacerein were mirrored by ferroptosis inhibitor Ferrostatin-1 treatment but reversed by ferroptosis inducer Erastin, confirming that diacerein alleviates endometrial fibrosis in IUA rats through ferroptosis suppression. Mechanistically, diacerein modulated the NRF2/HMGB1 signaling pathway, restoring NRF2 and HO1 levels while downregulating HMGB1 expression. Collectively, these findings suggest that diacerein effectively attenuates ferroptosis-mediated fibrosis in IUA, highlighting ferroptosis inhibition as a promising therapeutic strategy for IUA management.

ニカルジピンはメデトミジン-ミダゾラム-ブトルファノール（MMB）麻酔後
低体温を軽減する.....397–404

佐々木建・渡邉正輝・菱田英佑・大森智貴・中川龍弥・井上莉夕・佐々木宣哉
北里大学獣医学部実験動物学研究室

メデトミジン–ミダゾラム–ブトルファノール（MMB）混合麻酔は実験動物に広く用いられているが，周術期および麻酔後低体温を生じやすい。本研究では，血管拡張作用を有するL型カルシウムチャネル遮断薬ニカルジピン（Ni）の併用が，ラットにおけるMMB麻酔関連低体温を軽減し得るかを検討した。雄性SDラットにMMBを腹腔内投与し，Niを0，0.25，0.5 mg/kgで併用した。体温は加温（37°C）条件および非加温条件下で麻酔中から回復期まで測定し，収縮期血圧（SBP）および心拍数（HR）も評価した。加温条件下では，体温推移に群間差は認められなかった。一方，非加温条件下では，Ni併用群で回復期体温が高く維持され，回復期AUCも0Ni群に比べて有意に高値を示した。Niは麻酔導入時間およびアチパメゾール投与後の回復時間に有意な影響を及ぼさなかった。これに対し，SBPは用量依存的に低下し，HRは上昇傾向を示し，とくに0.5 mg/kg群で顕著であった。以上より，ニカルジピンは非加温条件下におけるMMB麻酔後低体温を部分的に軽減し，MMB麻酔時の体温管理を補完する補助的手段となる可能性が示された。ただし，その効果は積極的加温による保護効果を代替するものではなく，体温管理の基本として加温は依然として重要である。とくに0.5 mg/kgでは顕著なSBP低下が認められたことから，今後は適切な用量設定と安全性の検討が必要である。

Keratinocyte-specific STAT3 knockout attenuates imiquimod-induced
psoriasiform phenotype in mice.....405–416

Limin Li[1)], Cai Zhang[2)], Lu Chen[1)], Wenchao Yao[1)], Xiaoli Hou[1)], Zhengxiao Li[3)] and Faming Tian[1,2)]

[1)]School of Public Health, North China University of Science and Technology, No. 21 Bohai Avenue, Caofei dian New Town, Tangshan, 063210, China, [2)]North China University of Science and Technology Affiliated Hospital, Jianshe South Road, Lubei District, Tangshan, 063000, China, [3)]The Second Affiliated Hospital of Xi'an Jiaotong University, No. 157 West 5th Road, Xi'an, Shanxi, Xi'an, 710000, China

Signal transducer and activator of transcription 3 (*STAT3*) is critical in psoriasis, but keratinocyte-derived *STAT3* remains unclear. This study investigated the effect of keratinocyte-specific *STAT3* knockout on imiquimod (IMQ)-induced psoriasis-like dermatitis. Keratinocyte-specific *STAT3* knockout (Conditional knockout, cKO) mice and littermate controls (LC) received daily topical 5% IMQ to induce psoriasis-like lesions. Lesion severity was assessed by PASI score, histopathology by H&E staining, and systemic inflammation by spleen index and serum chemokine C-X-C motif ligand (CXCL1), chemokine C-C motif ligand 20 (CCL20), and IL-22 levels (ELISA). Skin expression of inflammation, chemokine, and *STAT3* pathway related factors was examined by immunohistochemistry (IHC), real-time quantitative polymerase chain reaction (qRT-PCR), and western blot. *In vitro*, IL-17A-stimulated HaCaT cells were used with siRNA-mediated *STAT3* knockdown; changes in *STAT3* signaling and downstream factors were assessed by qRT-PCR and Western blot. *In vivo*, keratinocyte-specific *STAT3* knockout significantly alleviated IMQ-induced skin lesions, reduced PASI score, improved barrier function, decreased spleen index, and lowered serum CXCL1, CCL20, and IL-22. It also suppressed IL-22, CXCL1, and CCL20 expression in skin and inhibited *STAT3* activation. *In vitro*, IL-17A increased *STAT3* phosphorylation, which was blocked by *STAT3* knockdown, along with suppression of IL-22 and CXCL1 upregulation.

レスベラトロールは腹腔内低酸素環境の回復と自己抗体沈着の抑制により
子宮内膜症を改善する.....417–428

ルオ・イー[1)]・小林美央[1)]・ジャン・ディー[2)]・小野洋輔[2)]・吉野　修[2)]・兼平雅彦[1)]

[1)]山梨大学総合分析実験センター資源開発分野，[2)]山梨大学医学部産婦人科

子宮内膜症は，子宮内膜もしくはその類似組織が子宮外で増殖する疾患である。正所性子宮内膜が骨盤腔内に逆流・癒着するという「子宮内膜移植説」が広く受け入れられているが，発症機序については不明な点が多い。本研究では，マウス子宮内膜症モデルを用い，子宮内膜症の新たな発症機序を解明することを目的とした。我々が誘導した子宮内膜症モデルにおいて，腹腔滲出細胞（Peritoneal exudate cells; PECs）におけるHIF-1α陽性率が有意に上昇したことから，子宮内膜症では腹腔内に低酸素環境が誘導されると予想した。次に，HIF-1αにより発現が誘導される遺伝子の発現を解析したところ，自然免疫系に関与するToll-like receptor 4（TLR4）とIL-1βの遺伝子の発現上昇を認めた。このことから，腹腔内への低酸素環境の誘導ならびに自然免疫系の活性化が子宮内膜症発症の一因であると予想した。そこで，低酸素環境の改善効果が報告されているレスベラトロール（RSV）を腹腔内に投与したところ，PECsにおけるHIF-1α発現低下，ならびに子宮内膜症病変の縮小を認めた。しかし，TLR4とIL-1βの遺伝子発現に変化がなかったことから，自然免疫系以外の関与が予想された。興味深いことに，子宮内膜症病変には自己抗体の沈着が認められたが，RSV投与により自己抗体の沈着が抑制されることを確認した。以上の結果より，腹腔内の低酸素環境ならびに自己抗体の沈着が子宮内膜症の発症機序の1つであること，そして，RSVが子宮内膜症の症状を軽減できる可能性が示唆された。

AltEx-BE: 多種実験動物に対応したエクソン注釈に基づく塩基編集による
エクソンスキッピングのためのスプライス部位標的gRNA設計ツール 429–438

松本生成[1)]・久野朗広[2–4)]・水野聖哉[4)]

[1)]筑波大学大学院人間総合科学学術院人間総合科学研究群ヒューマンバイオロジー学位プログラム，[2)]筑波大学高等研究院，[3)]筑波大学医学医療系解剖学発生学研究室，[4)]筑波大学医学医療系トランスボーダー医学研究センター（生命科学動物資源センター）

スプライシングは真核生物に高度に保存された転写後制御機構であり，その破綻は多様な疾患の原因となる。そのため，人為的にエクソンスキッピングを誘導したモデル動物の解析は，生体における遺伝子機能の理解に重要である。エクソンはその利用様式に基づき，すべての転写産物に共通して含まれるものと，転写産物間で選択的に利用されるものに分類される。一般に，前者のスキッピングは遺伝子レベルの機能変化を反映する一方，後者は転写産物間の多様性に影響する。近年，塩基編集技術によるスプライスサイトへの点変変異導入が可能となり，エクソンスキッピング実験を支援するguide RNA（gRNA）設計ツールが複数開発されている。しかし，既存ツールはいずれもエクソンの使用様式やフレーム，コーディング状態などのエクソン特性を考慮しておらず，研究目的に応じた標的エクソンの選択が困難であった。そこで本研究では，これらの特性を考慮し，塩基編集技術を用いたスプライスサイト改変によるエクソンスキッピングのためのgRNA設計ツールAltEx-BEを開発した。AltEx-BEは，標的エクソンにその利用様式やフレーム情報を注釈し，任意のPAM配列および編集ウィンドウの塩基編集ツールに対応したgRNA候補を提示する。本ツールは，多様なモデル動物における，塩基編集を用いたエクソンレベルの遺伝子機能解析を支援し，実験結果の解釈性に寄与する。

Artesunate ameliorates experimental colitis by suppressing intestinal inflammation and modulating the gut microbiota 439–453

Haiyang Sun[1)], Rujiao Jiang[2)], Jingjing Jing[2)], Xinying Wang[3)], Ning Wang[2)], Meihua Guo[2)] and Ce Tang[1,4)]

[1)]Institute of Precision Medicine, The First Affiliated Hospital, Sun Yat-sen University, No. 58, Zhong Shan Er Lu, Guangzhou, Guangdong Province, 510080, China, [2)]Laboratory Animal Center, Dalian Medical University, No. 9 West Section Lvshun South Road, Dalian, Liaoning Province, 116044, China, [3)]College of Basic Medical Science, Dalian Medical University, No. 9 West Section Lvshun South Road, Dalian, Liaoning Province, 116044, China, [4)]Animal Experiment Center, The First Affiliated Hospital, Sun Yat-sen University, No. 74, Zhong Shan Er Lu, Guangzhou, Guangdong Province, 510080, China

Artesunate (ART) is a semi-synthetic derivative of artemisinin with well-established antimalarial activity. In this study, we demonstrate that ART treatment markedly attenuates disease severity in dextran sulfate sodium (DSS)–induced colitis. ART significantly reduces the accumulation of inflammatory neutrophils, monocytes, Th17 cells, and IL-17-producing innate lymphoid cells (ILCs) and γδT cells in the colon, accompanied by suppression of pro-inflammatory gene expression, including *Tnf*, *Il6*, and *Il1b*, and upregulation of anti-inflammatory mediators such as *Tgfb* and *Il10*. In parallel, ART restores the expression of intestinal tight junction proteins zonula occludens-1 (ZO-1) and claudin-1, indicating improved epithelial barrier integrity. ART treatment inhibits the IL-17 production from both Th17 cells and other lymphocytes. ART also reshapes the gut microbiota, which contributes to protection against DSS-induced colitis. Notably, mesalazine co-treatment with ART augmented its protective efficacy against DSS-induced colitis. Collectively, these findings identify ART as a potent modulator of intestinal inflammation and barrier function, highlighting its therapeutic potential for mucosal inflammatory diseases.

テンシン2欠損はカルジオトキシン誘導筋損傷後の再生筋線維の成長を軽度に促進する 454–463

宮木麻里菜[1)]・小宮佑介[1)]・中田后紀[1)]・野口賢世[1)]・横山壱成[2)]・鈴木貴弘[2)]・尾嶋孝一[3)]・有原圭三[1)]・佐々木宣哉[4)]

[1)]北里大学獣医学部食品機能安全学研究室，[2)]九州大学大学院農学研究院畜産化学研究室，[3)]国立研究開発法人農業・食品産業技術総合研究機構畜産研究部門，[4)]北里大学獣医学部実験動物学研究室

テンシン2（TNS2）は細胞接着構造に関連するタンパク質であり，インスリン／インスリン様成長因子1（IGF-1）シグナルを負に制御することが知られているが，骨格筋再生における役割は明らかでない。本研究では，筋細胞ステージとTNS2の関係を明らかにするため，C2C12筋芽細胞の分化過程およびカルジオトキシン（CTX）誘導筋損傷モデルにおいて，抗リン酸化TNS2（Tyr483）抗体で検出されるTNS2関連免疫反応シグナルを解析するとともに，*Tns2*^{nph}変異マウスにおける筋再生を評価した。安静条件下において，*Tns2*^{nph}マウスは野生型（WT）マウスと比較して筋組織像，筋線維径，Aktおよびp70リボソームタンパク質S6キナーゼ（p70S6K）のリン酸化に明らかな差を認めなかった。C2C12細胞では，抗リン酸化TNS2（Tyr483）反応シグナルは分化期に比べて増殖期に強く検出された。さらに*in vivo*においても，同シグナルはCTX誘導筋再生の初期に一過性の増加を示した。筋損傷後，*Tns2*^{nph}マウスでは，4日目に中心核を有する筋線維数の増加，7日目に筋線維径の増大，15日目に前脛骨筋重量／体重比の増加が認められた。さらに，再生筋においてp70S6Kのリン酸化亢進が観察された。以上より，TNS2関連シグナルは骨格筋再生過程において，特に再生初期における同化シグナルの増強を介して，状況依存的に筋線維成長を調節する因子として機能する可能性が示された。

A novel non-transecting ligation technique for clinically mimetic cholestatic cirrhosis in rats 464–473

Xianfeng Wu[1,2], Shujuan Gao[1,2], Yuwei Zou[1,2], Chunyong Yang[1,2], Zhiyong Yang[1,2], Xiaobo Wang[3], Yujie Li[1,2], Ziyang Zeng[4] and Bin Yi[1,2]

[1]Department of Anesthesiology, The First Affiliated Hospital (Southwest Hospital) of Army Medical University, 29 Gaotanyan Main Street, Shapingba District, Chongqing 400038, China, [2]Key Laboratory of Perioperative Multi-organ Protection and Intelligent Anesthesia, Chongqing Municipal Health Commission, 29 Gaotanyan Main Street,, Shapingba District, Chongqing 400038, China, [3]Molecular, Cellular and Developmental Biology Department (MCD), Centre de Biologie Intégrative (CBI), Centre National de la Recherche Scientifique, Université Paul Sabatier, 118 Route de Narbonne, Toulouse 31062, France, [4]Department of Anesthesiology, Chongqing Traditional Chinese Medicine Hospital, 6 Panxiqizhi Road, Liangjiang New Area, Chongqing 400021, China

The conventional common bile duct ligation (CBDL) model suffers from high postoperative mortality (frequently exceeding 50%), which severely limits longitudinal monitoring of disease progression and complications such as hepatopulmonary syndrome (HPS). We developed an improved CBDL (MCBDL) to preserve the continuity of bile duct, and compared MCBDL (n=40) with traditional CBDL (n=40) and sham operation (n=10) within 42 days. MCBDL captures cirrhosis and extrahepatic organ injury while significantly improving survival (72.5% vs. 45%, *P*=0.003) and attenuating systemic inflammation (IL-6: 117 ± 11 vs. 153 ± 26 pg/ml, *P*=0.047). Scanning electron microscopy revealed persistent secretory activity in ligated epithelia of both groups, but only CBDL permitted leakage from isolated stumps, creating a pathogenic cycle driving mortality. By preserving ductal continuity, MCBDL is associated with significantly reduced mortality while maintaining the hallmark features of cholestatic cirrhosis (METAVIR F4) and HPS-related extrahepatic complications, providing a stable platform for mechanistic studies.

テストステロンはアトピー性皮膚炎モデルKFRS4ラットの皮膚炎を改善する ...474–484

林　健太[1]・長坂夏奈[1]・北爪知希[1]・浦崎真央[1]・ホアン・ヒエウ[1]・中村紳一朗[2]・庫本高志[1]

[1]東京農業大学農学部動物科学科，[2]麻布大学獣医学部実験動物学

アトピー性皮膚炎（AD）は，遺伝的素因，環境因子，免疫応答などが複合的に関与する慢性炎症性皮膚疾患であり，その発症率には性差が認められる。KFRS4ラットはAD様皮膚炎を自然発症するモデル動物であり，特に雌で重症化がみられることから，性ホルモンの関与が示唆されている。本研究では，KFRS4ラットにおける性ホルモンの役割を明らかにするため，精巣・卵巣摘出および外用テストステロン処置の影響を検討した。その結果，雌ラットの卵巣摘出は皮膚炎の発症や重症度に影響しなかったのに対し，雄ラットの精巣摘出は皮膚炎を著しく悪化させた。さらに，テストステロン外用は卵巣摘出雌および精巣摘出雄のいずれにおいても皮膚炎スコアを有意に改善し，塗布部位には病変が認められなかった。組織学的には，テストステロン塗布部位では皮脂腺数の増加と表皮肥厚が見られ，アンドロゲン受容体（AR）陽性細胞が顕著に増加していた。一方，ADの発症に関与するTh2関連サイトカイン遺伝子（*Il4*，*Il5*）とTh17関連サイトカイン遺伝子（*Il17a*）の発現量は，テストステロン塗布によって減少した。以上より，テストステロンは皮膚バリア機能の増強と免疫応答の修飾を介して皮膚炎を抑制する可能性が示された。本研究は，テストステロンやアンドロゲン経路がAD治療の新たな標的となり得ることを示唆する。

マウスの間葉系細胞に発現させたウイルス由来FLIPタンパク質E8は，
骨形成異常，脂肪萎縮症，および筋萎縮を誘導する.....485–497

酒巻和弘[1)]・矢島伸之[2)]・岡崎泰昌[3)]・鳥海　拓[4)]・本田雅規[4)]・豊國伸哉[3,5)]・新井嘉則[6)]

[1)]京都大学生命科学研究科体制統御学部門，[2)]京都大学ウイルス学研究所がんウイルス部門，[3)]名古屋大学医学研究科病理病態学講座，[4)]日本大学歯学部解剖学講座，[5)]名古屋大学低温プラズマ科学研究センター，[6)]日本大学歯学部歯科放射線学講座

ウマヘルペスウイルス2型（EHV-2）のE8は，ウイルス由来FLIPタンパク質ファミリーに属する分子であり，培養細胞の系においてデスレセプターが誘導するアポトーシスを阻害することが知られている。本研究では，E8の発現が個体に及ぼす影響を調べるため，I型コラーゲンα2鎖（*Col1α2*）のプロモーター制御下にCreを発現するトランスジェニック（Tg）マウスと交配することでコンディショナルに且つ組織特異的にE8を発現するモデルマウスを作製した。樹立したTgマウスについてE8の発現様式を調べると間葉系の細胞でその発現が認められた。このTgマウスは既に生育段階で骨形成に異常を伴う成長抑制を示した。また成体マウスでは，骨形成だけでなく脂肪萎縮様や筋萎縮様の症状を呈した。骨・脂肪・筋肉の形成に異常が認められることから，間葉系幹細胞（MSC）からそれぞれの細胞系譜への分化が不完全であることが推測された。この可能性を検証するため，マウスMSC細胞株であるC3H10T1/2にE8を発現させてマイクロアレイで解析することで変動する遺伝子を調べたところ，MSCから骨芽細胞・脂肪細胞・筋芽細胞への分化にそれぞれ関与する因子（*Nov/CCN3*，*STEAP4*，*Ankrd1/CARP*など）で変動が認められた。以上の結果は，間葉系幹細胞或いは前駆細胞におけるE8の恒常的な発現が，複数の細胞系譜への分化過程に影響を及ぼすことを強く示唆している。

維持会員（五十音順）（91社）

（令和8年10月7日現在）

会　員　名	〒	住　　所
アーク・リソース（株）	861-5271	熊本県熊本市西区中原町383-2
（株）アイテクノ	391-0004	長野県茅野市城山10-10
アイパークインスティチュート（株）	251-8555	神奈川県藤沢市村岡東2-26-1
旭化成セラピューティクス（株）	410-2321	静岡県伊豆の国市三福632-1
味の素（株）	210-8681	神奈川県川崎市川崎区鈴木町1-1
アステラス製薬（株）	305-8585	茨城県つくば市御幸が丘21
（株）アドスリー	162-0814	東京都新宿区新小川町5-20 サンライズビルII 3F
（株）アニマルケア	160-0022	東京都新宿区新宿5-18-14 新宿北西ビル7F
（株）アニメック	183-0031	東京都府中市西府町3-17-4
EPトレーディング（株）	162-0822	東京都新宿区下宮比町2-23 つるやビル6階
（株）新日本科学イナリサーチセンター	399-4501	長野県伊那市西箕輪2148-188
インビボサイエンス（株）	210-0821	神奈川県川崎市川崎区殿町3-25-12
エーザイ（株）	300-2635	茨城県つくば市東光台5-1-3
メディフォード（株）	869-0425	熊本県宇土市栗崎町1285
（株）大塚製薬工場	772-8601	徳島県鳴門市撫養町立岩字芥原115
小野薬品工業（株）	618-8585	大阪府三島郡島本町桜井3-1-1
小原医科産業（株）	165-0022	東京都中野区江古田4-28-16
オリエンタル酵母工業（株）	174-8505	東京都板橋区小豆沢3-6-10
花王（株）	321-3497	栃木県芳賀郡市貝町赤羽2606
科研製薬（株）	426-8646	静岡県藤枝市源助301
鹿島建設（株）	107-8348	東京都港区赤坂6-5-11
北山ラベス（株）	396-0025	長野県伊那市荒井3052-1
キッセイ薬品工業（株）	399-8304	長野県安曇野市穂高柏原4365-1
九動（株）	841-0075	佐賀県鳥栖市立石町惣楽883-1
共立製薬（株）	300-1252	茨城県つくば市高見原2-9-22
協和キリン（株）富士リサーチパーク	411-8731	静岡県駿東郡長泉町下土狩1188
クズウ・ベクター・サイエンス（有）	287-0224	千葉県成田市新田128-6
クミアイ化学工業（株）	439-0031	静岡県菊川市加茂3360
（株）クレハ	974-8686	福島県いわき市錦町落合16
ジーリンクス（株）	433-8116	静岡県浜松市中央区西丘町943-1
（株）ケー・エー・シー	110-0005	東京都台東区上野1-4-4 藤井ビル3階 （株）ケー・エー・シー東京支社
KMバイオロジクス（株）	869-1298	熊本県菊池市旭志川辺1314-1
興和（株）	189-0022	東京都東村山市野口町2-17-43
三協ラボサービス（株）	132-0023	東京都江戸川区西一之江2-13-16
参天製薬（株）	630-0101	奈良県生駒市高山町8916-16
（株）三和化学研究所	511-0406	三重県いなべ市北勢町塩崎363
（株）ジェー・エー・シー	153-0043	東京都目黒区東山1-2-7 第44興和ビル3階
シオノギテクノアドバンスリサーチ（株）	561-0825	大阪府豊中市二葉町3-1-1
（公財）実中研	210-0821	神奈川県川崎市川崎区殿町3-25-12
ジャクソン・ラボラトリー・ジャパン（株）	222-0033	神奈川県横浜市港北区新横浜3-17-6
昭和セラミックス（株）	486-0934	愛知県春日井市長塚町1-1-9
（有）新東洋製作所	334-0073	埼玉県川口市赤井2-13-22

会　員　名	〒	住　　所
(株) 新日本科学安全性研究所	891-1394	鹿児島県鹿児島市宮之浦町2438番地
(株) シーエーシー	103-0015	東京都中央区日本橋箱崎町24番1号
住友化学 (株)	554-8558	大阪府大阪市此花区春日出中3-1-98
(株) 精研	541-0048	大阪府大阪市中央区瓦町3-6-5 銀泉備後町ビル14階
清和産業 (株)	132-0033	東京都江戸川区東小松川4-57-7
ゼリア新薬工業 (株)	360-0111	埼玉県熊谷市押切字沼上2512-1 中央研究所
千寿製薬 (株)	650-0047	兵庫県神戸市中央区港島南町6-4-3
ゾエティス・ジャパン (株)	151-0053	東京都渋谷区代々木3-22-7 新宿文化クイントビル14階
第一三共 (株)	134-8630	東京都江戸川区北葛西1-16-13
大正製薬 (株)	331-9530	埼玉県さいたま市北区吉野町1-403
ダイダン (株)	210-0821	神奈川県川崎市川崎区殿町3-25-22 ライフイノベーションセンター R407
武田薬品工業 (株)	251-8555	神奈川県藤沢市村岡東2-26-1
中外製薬 (株)	244-8602	神奈川県横浜市戸塚区戸塚町216 中外サイエンスパーク横浜
千代田エクスワンエンジニアリング(株)	221-0022	神奈川県横浜市神奈川区守屋町3-13
(株) ツムラ	300-1192	茨城県稲敷郡阿見町吉原3586
帝人ファーマ (株)	191-8512	東京都日野市旭が丘4-3-2
(一財) 動物繁殖研究所	300-0134	茨城県かすみがうら市深谷1103
東洋熱工業 (株)	104-8324	東京都中央区京橋2-5-12 東熱ビル
トーアエイヨー (株)	960-0280	福島県福島市飯坂町湯野字田中1
トキワ科学器械 (株)	110-0005	東京都台東区上野5-11-1
(株) 夏目製作所	113-8551	東京都文京区湯島2-18-6
(株) 日東エアテック	334-0073	埼玉県川口市赤井1-34-28
日本エスエルシー (株)	431-1103	静岡県浜松市中央区湖東町3371-8
日本化薬 (株)	115-8588	東京都北区志茂3-31-12
日本クレア (株)	153-8533	東京都目黒区東山1-2-7
日本実験動物器材協議会	153-8533	東京都目黒区東山1-2-7 日本クレア (株) 内
(公社) 日本実験動物協会	101-0051	東京都千代田区神田神保町3-2-5 九段ロイヤルビル502号室
日本実験動物協同組合	101-0032	東京都千代田区岩本町2-8-10 神田永谷マンション602
日本新薬 (株)	601-8550	京都府京都市南区吉祥院西ノ庄門口町14
(一財) 日本生物科学研究所	198-0024	東京都青梅市新町9-2221-1
日本たばこ産業 (株) たばこ中央研究所	227-8512	神奈川県横浜市青葉区梅が丘6-2
日本農産工業 (株)	220-8146	神奈川県横浜市西区みなとみらい2-2-1ランドマークタワー46F
日本農薬 (株) 総合研究所	586-0094	大阪府河内長野市小山田町345番地
KHIグループ 日本事務所	370-0074	群馬県高崎市下小鳥町290-1
(株) 野村事務所	105-0003	東京都港区西新橋1-2-9 日比谷セントラルビル7階
(株) 濱畑	594-1141	大阪府和泉市春木町22-2
ハムリー (株)	306-0101	茨城県古河市尾崎2638-2
(一財) 阪大微生物病研究会	565-0871	大阪府吹田市山田丘3-1 大阪大学内
(株) HERO	581-0802	大阪府八尾市北本町2-10-5-307
(株) ボゾリサーチセンター	412-0039	静岡県御殿場市竈1284
三浦工業 (株)	108-0074	東京都港区高輪2-15-35 三浦高輪ビル2F
Meiji Seikaファルマ (株)	104-8002	東京都中央区京橋2-4-16 明治京橋ビル
持田製薬 (株)	412-8524	静岡県御殿場市神場字上ノ原722
(株) ヤクルト本社 中央研究所	186-8650	東京都国立市泉5-11
八洲冷熱 (株)	101-0062	東京都千代田区神田駿河台3-4 龍名館本店ビル4階

会　員　名	〒	住　　所
ライオン（株）	256-0811	神奈川県小田原市田島100
ラビックス（株）	251-0012	神奈川藤沢市村岡東2-26-1
レッテンマイヤージャパン（株）	101-0052	東京都千代田区神田小川町3-26-8 ユニゾ神田小川町三丁目ビル3F
（株）レナテック	259-1114	神奈川県伊勢原市高森4-19-15

（公社）日本実験動物学会　会員の入会・退会・変更の申込みについて

会員の入会・変更の申込みは下記の方法で受け付けております。

https://www.jalas.jp/

（公社）日本実験動物学会ホームページより受け付け
会員情報の変更はホームページの会員ページにログインしてできます。

［入会・退会・変更の申込みについてのお問い合わせ］　Email　office2@jalas.jp

［その他ご不明な点はこちらまで］

公益社団法人　日本実験動物学会　事務局
〒113-0033　東京都文京区本郷6-26-12　東京RSビル3F
TEL　03-3814-8276　FAX　03-3814-3990　Email　office@jalas.jp

● 編集後記 ●

長雨の季節もようやく終わりを迎え，秋晴れの爽やかな日々とともに，朝夕には肌寒さを感じる頃となりました。今秋，千葉県では印旛沼周辺において堤防決壊や浸水被害が発生したとの報道がありました。被害に遭われた皆様に心よりお見舞い申し上げるとともに，一日も早い復旧・復興をお祈り申し上げます。一方で，愛知県を中心に開催されたアジア大会では，日本人選手の目覚ましい活躍が見られ，多くの感動を与えてくれました。

さて，本号では，先の総会シンポジウムをもとに2つの特集を掲載いたしました。

1つ目の特集は，「動物実験代替法の現状と課題 ―肝臓を例に―」です。北村先生（東北大学）による「序文：動物モデルとNAMsのいまを考える」，江口先生（三重大学）による「脂肪組織および肝臓由来細胞外小胞による多臓器ネットワーク」，菅原先生・立野先生（株式会社フェニックスバイオ）による「ヒト肝細胞キメラマウスの進展とヒト肝疾患モデルへの応用」，西川先生・坂井先生（東京大学）による「創薬・安全性評価のための*in vitro*肝臓モデルの構築と応用」，吉成先生（静岡県立大学）による「農薬毒性試験データベースの構築と機序情報を活用したリードアクロスによる発がん性予測」の計5報をご寄稿いただきました。動物モデルとNAMs（New Approach Methodologies）のそれぞれの特徴を理解し，比較しやすくすることを目的として，同じ生体組織である肝臓を共通テーマとした総説が掲載されており，関連分野の現状と課題を俯瞰できる内容となっています。

2つ目の特集は，「先端遺伝子操作技術の生命科学研究への応用」です。小沢先生（東京大学）・清成先生（理化学研究所）による「序文:特集『先端遺伝子操作技術の生命科学研究への応用』によせて」，佐久間先生（京都大学）による「多様化するゲノム編集技術の進化と深化」，田口先生（京都大学）による「マウス個体におけるTet-ON/OFFシステムを用いた時空間遺伝子発現制御の最適化」，阿部先生（理化学研究所）による「多様化する動物モデルにおけるゲノム編集技術の展開」，遊佐先生（京都大学）による「CRISPR-KOスクリーニングの開発と応用」の計5報をご寄稿いただきました。遺伝子操作技術そのものの進化と多様化に加え，細胞を用いた網羅的な機能探索，多様な動物種へのゲノム編集技術の展開，さらには個体レベルでの時空間的な遺伝子発現制御まで，現在の遺伝子操作技術の広がりと将来性を実感できる内容となっております。

特集以外では，日本実験動物学会人材育成委員会の皆様より「動物実験福祉に関する海外動向調査報告・オーストラリア（メルボルン）」（瀬戸山先生［鹿児島大学］，森松先生［北海道大学］，越本先生［宮崎大学］）をご寄稿いただきました。また，研究室・施設便りとして「熊本大学生命資源研究・支援センター 動物資源開発研究施設 資源開発分野の紹介」（竹尾先生［熊本大学］），維持会員便りとして「実技教育の新たな拠点として － KAC技術研修所の移転と新たな取り組み －」（坂本先生［株式会社ケー・エー・シー］），さらに会員便りとして藤澤先生（日本獣医生命科学大学），飯田先生（東京大学）にご寄稿いただきました。

本号は2つの充実した特集をはじめ，多彩な記事を掲載することができました。ご多忙の中，ご執筆いただきました先生方に心より御礼申し上げます。なお，お知らせにも掲載しておりますとおり，11月11日（水）には維持会員懇談会が東京大学にて開催されます。多くの皆様のご参加をお待ちしております。また，当該シンポジウムの演者の皆様にもご寄稿をお願いする予定です。引き続き，『実験動物ニュース』へのご支援，ご協力を賜りますようお願い申し上げます。

【広報・情報公開検討委員会】

広告掲載一覧

日本クレア株式会社	実験動物等企業広告
北山ラベス株式会社	実験動物等企業広告
日本エスエルシー株式会社	飼料 LabDiet
日本エスエルシー株式会社	実験動物
ダイダン株式会社	実験動物飼育ラック　アイラックシステム
わかもと製薬株式会社	感染症診断キット
株式会社　ケー・エー・シー	獣医学的ケア業務の受託サービス
株式会社　夏目製作所	Pure Palace
株式会社　アニメック	Bio-Huts



想像を追い越せ
～世界を変える、小さな生命と共に～

私たち日本クレアは、生命のあらゆる可能性を探求し発展させる基盤として、動物愛護のグローバルな視点に立った世界最高品質の実験動物を提供して参ります。

マウス・ラット・コモンマーモセット

●クローズドコロニー
- マウス：Jcl:ICR
- ラット：Jcl:SD, Jcl:Wistar, BrlHan:WIST@Jcl(GALAS)

●近交系
- マウス：C3H/HeNJcl, C3H/HeJJcl*, C57BL/6NJcl, C57BL/6JJcl*, BALB/cAJcl, BALB/cByJJcl*, FVB/NJcl, DBA/2JJcl*, 129^{+Ter}/SvJcl
- ラット：F344/Jcl

●ハイブリッド系
- マウス：B6C3F1/Jcl, B6D2F1/Jcl, MCH(ICR)/Jcl (Multi Cross Hybrid)

●疾患モデル
免疫不全モデル
- マウス：BALB/cAJcl-*nu*, C.B-17/Icr-*scid* Jcl, NOD/ShiJic-*scid* Jcl, ALY®/NscJcl-*aly*
- ラット：F344/NJcl-*rnu*

1型糖尿病モデル
- マウス：NOD/ShiJcl

2型糖尿病モデル
- マウス：KK/TaJcl, KK-A^{y}/TaJcl, BKS.Cg-*m*+/+*Lepr*^{db}/Jcl*
- ラット：GK/Jcl, SDT/Jcl, SDT fatty/Jcl

アスコルビン酸合成能欠如モデル
- ラット：ODS/ShiJcl-*od*

網膜変性疾患モデル
- ラット：RCS/Jcl-*rdy*

関節リウマチモデル
- マウス：SKG/Jcl

外用保湿剤・外用殺菌消毒薬効果検証モデル
- マウス：NOA/Jcl

ヒトDuchenne型筋ジストロフィーモデル
- マウス：C57BL/10-*mdx*/Jcl

●遺伝子改変動物
短期発がん性試験モデル
- マウス：CByB6F1-Tg(HRAS)2Jic

乳腺がん高感受性モデル
- ラット：Hras128/Jcl

膵がん短期発がんモデル
- ラット：Kras301/Jcl

生体恒常性維持機構解析モデル
- マウス：α-Klotho KO/Jcl
- マウス：*klotho*/Jcl

アレルギーモデル
- マウス：OVA-IgE/Jcl (卵アレルギー), TNP-IgE/Jcl (化学物質アレルギー)

●Germ free
- マウス：MCH(ICR)/Jcl[Gf], C57BL/6NJcl[Gf], BALB/cAJcl[Gf]

●コモンマーモセット
Jcl:C.Marmoset(Jic) (国内生産)

その他の取り扱い動物

●(公財)実中研維持系統

●フェレット(輸入販売)
生産地：中華人民共和国／輸入販売代理店((株)野村事務所)を通じて国内販売

実験動物用飼料
一般動物用飼料／家畜・家禽試験用飼料／放射線滅菌飼料／特殊配合飼料／成分分析

器具・器材
飼育ケージ／自動給水システム・限外濾過式飲水装置／オートスクレーパーユニット・流水洗滌ユニット・洗浄機・高圧蒸気滅菌装置／環境制御飼育装置・クリーンラック／パスボックス、エアーシャワー／排水処理システム・AQUA-CLEAN空調システム／施設計画プランニング

受託業務
微生物学的クリーニング／遺伝子改変マウスの作製／モノクローナル抗体作製／受精卵採取・凍結処理／凍結受精卵の供給／系統維持及び生産／各種処置動物作出／マイクロバイオーム研究のサポート(無菌動物・ノトバイオートマウス作製および受託試験)／各種受託試験　他

関連業務
動物輸出入／微生物モニタリング／遺伝モニタリング／各種データ／情報サービス

業務提携
Physiogenex社(仏)：代謝性疾患領域に特化した薬効薬理試験受託サービス

※ "This substrain is at least (a number>20 by definition) generations removed from the originating JAX® Mice strain and has NOT been re-infused with pedigreed stock from The Jackson Laboratory."

日本クレア株式会社
CLEA
www.CLEA-Japan.com

【動物・飼料のご注文先：AD受注センター　TEL.03-5704-7123】

東京AD部	〒153-8533 東京都目黒区東山1-2-7	TEL.03-5704-7050
大阪AD部	〒564-0053 大阪府吹田市江の木町6-5	TEL.06-4861-7101
東京器材部	〒153-8533 東京都目黒区東山1-2-7	TEL.03-5704-7600
大阪器材部	〒564-0053 大阪府吹田市江の木町6-5	TEL.06-4861-7105
札幌出張所	〒063-0849 北海道札幌市西区八軒九条西10-4-28	TEL.011-631-2725
仙台出張所	〒983-0014 宮城県仙台市宮城野区高砂1-30-24	TEL.022-352-4417
名古屋出張所	〒465-0093 愛知県名古屋市名東区一社3-79	TEL.052-715-7580

私たちは、生命科学発展のサポートを通じて
人々の幸せと社会に貢献してまいります

科学性と動物福祉の両立を目指した
品質管理と実験管理
日本実験動物協会福祉認証取得施設

実験動物生産・供給
- SPFウサギ(SPF項目 8項目)
  - Kbl:JW(日本白色種)
  - Kbl:NZW(ニュージーランドホワイト種)
  - Kbl:Dutch(ダッチ種)
- Healthyウサギ(SPF項目 6項目)
  - Kbs:JW(日本白色種)
  - Kbs:NZW(ニュージーランドホワイト種)

バイオ関連支援サービス
- 広範囲な動物実験関連業務を代行します
  - ○非GLP試験　○実験動物長短期飼育
  - ○変異型ロドプシンTgウサギ(有色・白色)
  - ○各種Tgウサギ作製　○担癌マウス作製
- ポリクローナル抗体作製　● 抗体精製
- モノクローナル抗体作製
- 細胞培養・凍結保存
- GMP対応試験
  - ○発熱性物質試験　○細胞毒性試験
  - ○急性毒性試験　○抗原性試験　○溶血性試験
- 微生物検査代行(動物・検査セット)

北山ラベス株式会社
Laboratory Animals Breeding & Equipment Supply
〒396-0025 長野県伊那市荒井3052番地1
TEL.0265-78-8115 FAX.0265-78-8885

LabDiet
Your work is worth it.

PicoLab® シリーズ

海外の施設で使用される飼料をあなたの動物へ



SUMMARY OF IRRADIATED RODENT DIETS

IRRADIATED

アメリカ合衆国含め世界で販売増加
日本でも人気のLabDiet®製品です!

※本製品はガンマ線照射済飼料です。
※比較的リーズナブルな価格でご購入いただけます。

- ☑ 海外の研究で使用されている飼料と同じ飼料を使いたい
- ☑ 海外の施設との共同研究で、使用する飼料を合わせたい
- ☑ 世界で実績のある飼料を使いたい

日本総代理店

SLC
日本エス エル シー株式会社

〒431-1103 静岡県浜松市中央区湖東町3371-8
TEL(053)486-3178㈹ FAX(053)486-3156 **http://www.jslc.co.jp/**

ご注文はこちら

関東エリア	関西エリア	九州エリア
(053)486-3155㈹	(053)486-3157㈹	(0942)41-1656㈹

SLCの実験動物



マウス

●アウトブレッド
Slc：ddY
Slc：ICR

●インブレッド
DBA/1JmsSlc(コラーゲン薬物誘導関節炎)
BALB/cCrSlc
C57BL/6NCrSlc・C57BL/6JmsSlc(J由来)
C3H/HeSlc
C3H/HeNSlc
C3H/HeYokSlc
DBA/2CrSlc
NZW/NSlc
A/JmsSlc
AKR/NSlc
NC/NgaSlc(薬物・アレルギー誘導アトピー性皮膚炎)
CBA/NSlc
129×1/SvJmsSlc

●B10コンジェニック
C57BL/10SnSlc
B10.BR/SgSnSlc
B10.D2/nSgSnSlc

●ハイブリッド
B6D2F1/Slc(Slc:BDF1)
CB6F1/Slc(Slc:CBF1)
CD2F1/Slc(Slc:CDF1)
B6C3F1/Slc(Slc:B6C3F1)
(NZWX)BXSB))F1/Slc受注生産
※上記以外の系統については御相談ください。

●ヌードマウス(ミュータント系)
BALB/cSlc-*nu*(*Foxn1*^{nu})
KSN/Slc(*Foxn1*^{nu})

●疾患モデル
BXSB/MpJmsSlc-*Yaa*（自己免疫疾患）
MRL/MpJmsSlc-*lpr*（自己免疫疾患・*Fas*^{lpr}）
NZB/NSlc（自己免疫疾患）
NZBWF1/Slc（自己免疫疾患）
WBB6F1/Kit-*Kit*^{W}/*Kit*$^{W-v}$/Slc(肥満細胞欠損貧血・*Kit*^{W}/*Kit*$^{W-v}$)
NC/Nga(皮膚炎)
★SAMR1/TaSlc（非胸腺リンパ腫・SAM系対照動物）
★SAMP1/SkuSlc（老化アミロイド症）
★SAMP6/TaSlc（老年性骨粗鬆症）
★SAMP8/TaSlc（学習・記憶障害）
★SAMP10/TaldrSlc（脳萎縮・うつ様行動）
AKITA/Slc
C57BL/6HamSlc-*ob/ob*(肥満・2型糖尿病・*Lep*^{ob})
HIGA/NscSlc（IgA腎症）
B6.K0R/StmSlc-*Apoe*^{tm1}(アポE欠損高脂血症・*Apoe*^{tm1})
C.K0R/StmSlc-*Apoe*^{tm1}(アポE欠損高脂血症・*Apoe*^{tm1})

ラット

●アウトブレッド
Slc：SD
Slc：Wistar
Slc：Wistar/ST

●インブレッド
F344/NSlc
BN/SsNSlc
LEW/SsNSlc(薬物誘導性関節炎)

●ヌードラット
Slc：Long-Evans-*rnu*/*rnu*

●疾患モデル
★ SHR/Izm(高血圧)
★ SHRSP/Izm(脳卒中)
★ WKY/Izm(SHR/Izmのコントロール)
★ SHRSP5/Dmcr(NASHモデル【HFC飼料給餌】)
DIS/EisSlc(食塩感受性高血圧症)
DIR/EisSlc(食塩抵抗性)
Slc：Zucker-*fa/fa*（肥満・*Lepr*^{fa}）
HWY/Slc（ヘアレスラット）

モルモット

●アウトブレッド
Slc：Hartley

ウサギ

●アウトブレッド
Slc：JW/CSK
Slc：NZW

ハムスター

●アウトブレッド
Slc：Syrian

スナネズミ

●インブレッド
MON/Jms/GbsSlc

無菌動物

●インブレッドラット
F344/NSlc(GF)

●インブレッドマウス(三協ラボサービス株)
Tsl：C57BL/6NCr

遺伝子改変動物

●マウス
C57BL/6-Tg(CAG-EGFP)（グリーンマウス）
C57BL/6JJmsSlc-Tg(*gpt* delta)
BRJ(BALB/c *Rag-2*$^{-/-}$*Jak3*$^{-/-}$高度免疫不全)

●ヌードマウス
C57BL/6-BALB/c-*nu/nu* -EGFP(EGFP全身発現ヌードマウス)

●ラット
SD-Tg(CAG-EGFP)（グリーンラット）
★ Slc:SD-Tg(SOD1H46R-4)

(株)星野試験動物飼育所

●アウトブレッドマウス
Hos：HR-1(ヘアレス)

●ハイブリッドマウス
Hos：HRM2(メラニン保有)

●アウトブレッドラット
Hos：OLETF(2型糖尿病)
Hos：LETO(OLETFの対照動物)
Hos：ZFDM-*Lepr*$^{fa/fa}$(2型糖尿病)

(一財)動物繁殖研究所

●インブレッドマウス
IVCS(4日性周期)
C57BLKS/Jlar-+*Lepr*^{db}/+*Lepr*^{db}(肥満2型糖尿病)
TSOD(肥満2型糖尿病)

●アウトブレッドラット
Iar：Wistar-Imamichi
Iar：Long-Evans

Inotiv(旧ハーランOEM生物動物)

●アウトブレッドラット
★RccHan®：WIST

●インブレッドマウス
★CBA/CaOlaHsd

●免疫不全モデルマウス
★C.B-17/IcrHsd-*Prkdc*^{scid}

その他(conventional動物)

●ミニブタ
☆(一財)日生研・NPO法人医用ミニブタ研究所)

●マイクロミニピッグ
☆国内繁殖生産(富士マイクラ(株))

●医学用ベビーブタ(SPF)SHIZUOKA EXPIG
☆静岡県畜産技術研究所中小家畜研究センター

●ビーグル犬
☆国内繁殖生産((一財)動物繁殖研究所)

●フェレット
自家繁殖生産(中伊豆支所)

●コモンマーモセット
自家繁殖生産(中伊豆支所)

★印は受託生産動物、☆印は仕入販売動物です。

SLC
日本エス エル シー株式会社
〒431-1103 静岡県浜松市中央区湖東町3371-8
TEL(053)486-3178㈹ FAX(053)486-3156
http://www.jslc.co.jp/

営業専用TEL
関東エリア (053)486-3155㈹
関西エリア (053)486-3157㈹
九州エリア (0942)41-1656㈹

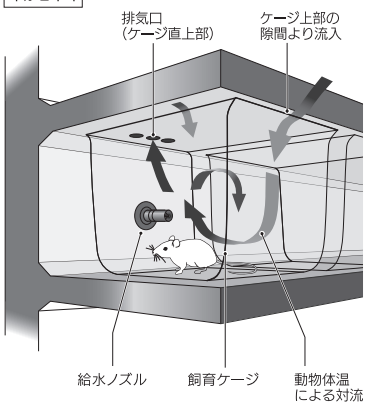
「ダイダン」の一方向気流ラックがさらに進化！　特許 第4961404号、第5749901号

実験動物飼育ラック アイラックシステム

Novel One Way Air Flow Rearing Equipment 〈iRack System〉

「アイラックシステム」とは、オープンラックの「易操作性」と、IVCのような「安全性」を同時に兼ね備えた実験動物飼育ラックです。

概念図



オープンラック

IVC Individual Ventilation Cage

アイラックシステム
操作しやすい！ 安全！ 省エネ！
よごれにくい！ 感染リスクが少ない！

環境面の向上
安定した一方向気流により、アレルゲン・感染リスク・臭気の低減、実験精度の向上、動物福祉の向上が可能。

操作性の向上
ラック前面に扉などがなく、ケージの操作性や清掃性が向上。

ランニングコスト削減
さらに小排気風量（当社比30～60％）で、外気負荷・搬送動力エネルギーを削減。

構造と特長

- ケージ個別換気方式の採用
- 高度な一方向気流の形成
- 遮蔽物がなくケージの出し入れが容易に
- 良好な気流による均一な温度分布
- 床敷交換の削減が可能に
- メンテナンスも容易に

ダイダン株式会社

https://www.daidan.co.jp/

確かな実験データは 確実なチェックから・・・

スピーディ　スムーズ　高感度



ELISAによる実験動物の感染症診断キット

モニライザ®
MONILISA®

- モニライザ®Ⅳa(96ウェル)
  HVJ,MHV/SDAV, *M.pulmonis*, Tyzzer菌抗体検査用
- モニライザ®HVJ(96ウェル)
  HVJ抗体検査用
- モニライザ®MHV(96ウェル)
  MHV/SDAV抗体検査用
- モニライザ®Myco(96ウェル)
  M.pulmonis 抗体検査用
- モニライザ®Tyzzer(96ウェル)
  Tyzzer菌抗体検査用
- モニライザ®HANTA(48ウェル)
  Hantavirus抗体検査用

特徴

●抗体検出感度に優れ、特異性、再現性が高く、どのような場所でも簡便に検査ができ、in-houseモニタリングに最適です。

●酵素標識物として、プロテインAを使用していますので、同一試薬で、マウス・モルモット・ウサギ・ハムスターの抗体検査ができます。

頒布元
公益財団法人 実中研
ICLAS モニタリングセンター
〒210-0821　神奈川県川崎市川崎区殿町3丁目25番12号
TEL.044-201-8525　FAX.044-201-8526

製造販売元
わかもと製薬株式会社
〒103-8330　東京都中央区日本橋本町二丁目2番2号
TEL.03-3279-0381　FAX.03-3279-1271

2024.4

実験動物専門の獣医師がお客様施設を訪問。獣医学的ケア業務をサポート。



日本全国対応

獣医学的ケア業務の受託サービス

獣医学的訪問ケア　管理獣医師　メールや電話での相談対応

1日から長期常駐まで、お客様の必要に応じたご利用ができます

KAC 株式会社ケーエーシー

京都府京都市中京区西ノ京西月光町40番地　https://www.kacnet.co.jp/inquiry/

「獣医学的管理業務」のご相談・お問合せはコチラから ▶

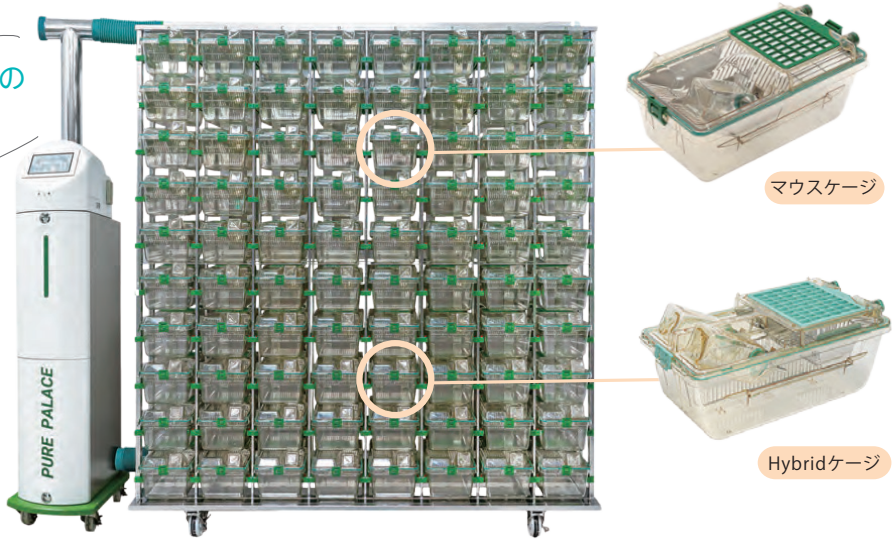
お気軽にご相談ください

IVCの新しい選択肢

Pure Palace

夏目製作所の新提案

詳しくはこちら



マウスケージ

Hybridケージ

NATUME Since 1946 株式会社夏目製作所 https:/ /www.nazme.co.jp

◎本　社
〒113-8551　東京都文京区湯島 2-18-6
TEL:03-3813-3251　FAX:03-3815-2002

◎大阪 SSC
〒561-0811　大阪府豊中市若竹町 1 -9-1
TEL:06-6398-7177　FAX:06-6398-7178



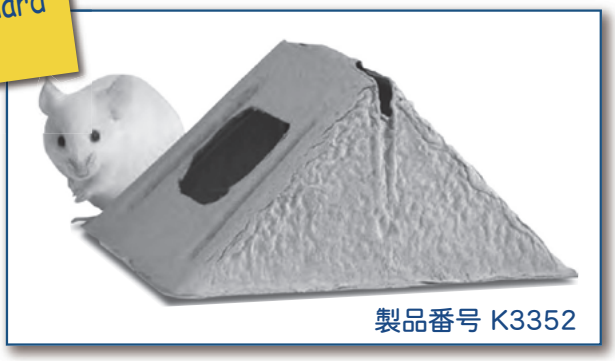
CERTIFIED

Bio-Huts™

初めてのマウス用検定済みペーパーハット



The Industry Standard
Just Got Better!



製品番号 K3352

- オートクレーブにかけられます。
- アクリルアミドを含みません。
- 汚染物質検査済。
- GLP適合原料
- ２方が開いているので観察がしやすい。
- 簡単に割れてHalf Hutが２個になる。

お問い合わせとご用命は

●製造元：

Bio Serv®
Delivering Solutions™...
◆Nutritional ◆Enrichment ◆Medicated ◆Special Needs
www.bio-serv.com

●輸入元：

Animec 株式会社 アニメック
〒183-0031 東京都府中市西府町3-17-4 Tel: 042-333-7531 Fax: 042-333-0602
アニメックの製品 検索
URL: http://animec-tokyo.sakura.ne.jp
E-mail: animec@theia.ocn.ne.jp