

- 27) Takashima S, Ise H, Zhao P, Akaike T, Nikaido T : Human amniotic epithelial cells possess hepatocyte-like characteristics and functions. *Cell Structure Function* 2004, 29 : 73-84.
- 28) Zhao P, Ise H, Hongo M, Ota M, Konishi I, Nikaido T : Human amniotic mesenchymal cells have some characteristics of cardiomyocytes. *Transplantation* 2005, 79 : 528-535.
- 29) Rao MS, Mattson MP : Stem cells and aging : expanding the possibilities. *Mech. Aging Dev* 2001, 122 : 713-734.
- 30) Mueller SM, Glowacki J : Age-related decline in the osteogenic potential of human bone marrow cells cultured in three-dimensional collagen sponges. *J Cellular Biochem* 2001, 82 : 583-590.
- 31) Bieback K, Kern S, Kluter H, Eichler H : Critical parameters for the isolation of mesenchymal stem cells from umbilical cord blood. *Stem Cells* 2004, 22 (4) : 625-634.
- 32) Lee MW, Yang MS, Park JS, Kim HC, Kim YJ, Choi J : Isolation of mesenchymal stem cell from cryopreserved human umbilical cord blood. *Int J Hematol* 2005, 81(2) : 126-130.
- 33) Yang SE, Ha CW, Jung M, Jin HJ, Lee M, Song H, Choi S, Oh W, Yang YS : Mesenchymal stem/progenitor cells developed in culture from UC blood. *Cytotherapy* 2004, 6(5) : 476-486.
- 34) Jang YK, Jung DH, Jung MH, Kim DH, Yoo KE, Sung KW, Koo HH, Oh W, Yang YS, Yang SE : Mesenchymal stem cells feeder layer from human umbilical cord blood for *ex vivo* expanded growth and proliferation of hematopoietic progenitor cells. *Ann Hematol* 2006, 85 : 212-225.
- 35) Gang EJ, Hong SH, Jeong JA, Hwang SH, Kim SW, Yang IH, Ahn C, Han H, Kim H : *In vitro* mesengenic potential of human umbilical cord blood-derived mesenchymal stem cells. *Biochem Biophys Res Commun* 2004, 13 : 321(1) : 102-108.
- 36) Kim JW, Kim SY, Park SY, Kim YM, Kim JM, Lee MH, Ryu HM : Mesenchymal progenitor cells in human umbilical cord. *Ann Hematol* 2004, 83(12) : 733-738.
- 37) Makino S, Fukuda K, Miyoshi S, Konishi F, Kodama H, Pan J, Sano M, Takahashi T, Hori S, Abe H, Hata J, Umezawa A, Ogawa S : Cardiomyocyte can be generated from marrow stromal cells *in vitro*. *J Clin Invest* 1999, 103 : 697-705.
- 38) Tomita S, Li RK, Weisel RD, Mickle DAG, Kim EJ, Sakai T, Jia ZQ : Autologous transplantation of bone marrow cell improves damaged heart function. *Circulation* 1999, 100 : 247-256.
- 39) Menasche P, Hagege AA, Vilquin JT, Desnos M, Adergel E, Pouzet B, Bel A, Sarateanu S, Scorsin M, Schwartz K, Bruneval P, Benbunan M, Marolleau JP, Duboc D : Autologous skeletal myoblast transplantation for severe postinfarction left ventricular dysfunction. *J Am Coll Cardiol* 2003, 41 : 1078-1083.
- 40) Herreros J, Prosper F, Perez A, Gavira JJ, Garcia-Velloso MJ, Barba J, Sanchez PL, Canizo C, Rabago G, Marti-Climent JM, Hernandez M, Lopez-Holgado N, Gozalez-Santos JM, Martin-Luengo C, Alegria E : Autologous skeletal myoblasts transplanted to ischemia-damaged myocardium in human : histological analysis of cell survival and differentiation. *J Am Coll Cardiol* 2003, 41 : 879-888.
- 41) Siminiak T, Kalawski R, Fiszer D, Jerzykowska O, Rzezniczak J, Rozwadowska N, Kurpysz M : Autologous skeletal myoblast transplantation for treatment of postinfarction myocardial injury : phase I clinical study with 12 months of follow-up. *Am Heart J* 2004, 148 : 531-537.
- 42) Shimizu T, Yamato M, Isoi Y, Akutsu T, Setomaru T, Abe K, Kikuchi A, Umezumi M, Okano T : Fabrication of polysatellite tissue grafts using a novel 3-dimensional cell sheet manipulation technique and temperature-responsive cell culture surfaces. *Circ Res* 2002, 90 : 40-48.
- 43) Kang XO, Zang WJ, Bao LJ, Li DL, Song TS, Xu XL, Yu XJ : Fibroblast growth factor-4 and hepatocyte growth factor induce differentiation of human umbilical cord blood-derived mesenchymal stem cells into hepatocytes. *World J Gastroenterol* 2005, 11 : 7461-7465.
- 44) Hong SH, Gang EJ, Jeong JA, Ahn C, Hwang SH, Yang IH, Park HK, Han H, Kim H : *In vitro* differentiation of human umbilical cord blood-derived mesenchymal stem cell into hepatocyte-like cells. *Biochem Biophys Res Commun* 2005, 330 : 1153-1161.
- 45) Lee KD, Kuo TK, Whang-Peng J, Chung YF, Lin CT, Chou SH, Chen JR, Chen YP, Lee OK : *In vitro* hepatic differentiation of human mesenchymal stem cells. *Hepatology* 2004, 40(6) : 1275-1284.
- 46) Tanabe Y, Tajima F, Nakamura Y, Shibasaki E, Wakejima M, Shimomura T, Murai R, Murawaki Y, Hashiguchi K, Kanbe T, Saeki T, Ichiba M, Yoshida Y, Mitsunari M, Yoshida S, Miake J, Yamamoto Y, Nagata N, Harada T, Kurimasa A, Hisatome I, Terakawa N, Murawaki Y, Shiota G : Analyses to clarify rich fractions in hepatic progenitor cells from human umbilical cord blood and cell fusion. *Biochem Biophys Res Commun* 2004, 324 : 711-718.
- 47) Sharma AD, Cantz T, Richter R, Eckert K, Henschler R, Wilkens L, Jochheim-Richter A, Arseniev L, Ott M : Human cord blood stem cells generate human cytochrome 18-negative hepatocyte-like cells in injured mouse liver. *Am J Pathol* 2005, 167(2) : 555-564.
- 48) Nonome K, Li X, Takahara T, Kitazawa Y, Funeshima N, Yata Y, Xue F, Kanayama M, Shinno E, Kuwae C, Saito S, Watanabe A, Sugiyama T : Human umbilical cord blood-derived cells differentiation into hepatocyte-like cells in the Fas-mediated liver injury model. *AJP-Gastrointestinal and liver physiology* 2005, 289 : 1091-1099.
- 49) 柿沼 晴 : ヒト臍帯血細胞の肝細胞への誘導と細胞移植. *日本炎症・再生医学会雑誌* 2006, 26 : 44-48.
- 50) Willenbring H, Bailey AS, Foster M, Akkari Y, Dorrel C, Olson S, Finegold M, Fleming WH, Grompe M : Myelomonocytic cells are sufficient for therapeutic cell fusion in liver. *Nat Med* 2004, 10 :

- 744-748.
- 51) Pessoa A, Eletti B, Croera C, Savalli N, Diodovich C, Gribaldo L : Pancreas developing markers expressed on human mononucleated umbilical cord blood cells. *Biochem Biophys Research Commun* 2004, 323 : 315-322.
 - 52) Yoshida S, Ishikawa F, Kawano N, Shimoda K, Nagafuchi S, Shimoda S, Yasukawa M, Kanemaru T, Ishibashi H, Shultz LD, Harada M : Human cord blood-derived cells generate insulin-producing cells *in vivo*. *Stem Cells* 2005, 29 : 1409-1416.
 - 53) Sanchez-Ramos JR, Song S, Kamath SG, Zigova T, Willing A, Cardozo-Pelaez F, Stedeford T, Chopp M, Sanberg PR : Expression of neural markers in human umbilical cord blood. *Exp Neurol* 2001, 171 (1) : 109-115.
 - 54) Ha Y, Choi JU, Yoon DH, Yeon DS, Lee JJ, Kim HO, Cho YE : Neural phenotype expression of cultured human cord blood cells *in vitro*. *Neuroreport* 2001, 16 : 12(16) : 3523-3527.
 - 55) Goodwin HS, Bicknese AR, Chien SN, Bogucki BD, Quinn CO, Wall DA : Multilineage differentiation activity by cells isolated from umbilical cord blood : expression of bone, fat, and neural markers. *Biol Blood Marrow Transplant* 2001, 7(11) : 581-588.
 - 56) Buzanska L, Machaj EK, Zablocka B, Pojda Z, Domanska-Janik K : Human cord blood-derived cells attain neuronal and glial features *in vitro*. *J Cell Sci* 2002, 115(Pt 10) : 2131-2138.
 - 57) Bicknese AR, Goodwin HS, Quinn CO, Henderson VC, Chien SN, Wall DA : Human umbilical cord blood cells can be induced to express markers for neurons and glia. *Cell Transplant* 2002, 11(3) : 261-264.
 - 58) Hou L, Cao H, Wang D, Wei G, Bai C, Zhang Y, Pei X : Induction of umbilical cord blood mesenchymal stem cells into neuron-like cells *in vitro*. *Int J Hematol* 2003, 78(3) : 256-261.
 - 59) Jang YK, Park JJ, Lee MC, Yoon BH, Yang YS, Yang SE, Kim SU : Retinoic acid-mediated induction of neurons and glial cells from human umbilical cord-derived hematopoietic stem cells. *J Neurosci Res* 2004, 75(4) : 573-584.
 - 60) Jeong JA, Gang EJ, Hong SH, Hwang SH, Kim SW, Yang IH, Ahn C, Han H, Kim H : Rapid neural differentiation of human cord blood-derived mesenchymal stem cells. *Neuroreport* 2004, 15 (11) : 1731-1734.
 - 61) Sun W, Buzanska L, Domanska-Janik K, Salvi RJ, Stachowiak MK : Voltage-sensitive and ligand-gated channels in differentiating neural stem-like cells derived from the nonhematopoietic fraction of human umbilical cord blood. *Stem Cells* 2005, 23 (7) : 931-945.
 - 62) Chen N, Hudson JE, Walczak P, Misiuta I, Garbuzova-Davis S, Jiang L, Sanchez-Ramos J, Sanberg PR, Zigova T, Willing AE : Human umbilical cord blood progenitors : the potential of these hematopoietic cells to become neural. *Stem Cells* 2005, 23(10) : 1560-1570.
 - 63) Buzanska L, Habich A, Jurga M, Sypecka J, Domanska-Janik K : Human cord blood-derived neural stem cell line-Possible implementation in studying neurotoxicity. *Toxicol in vitro*. 2005, 19(7) : 991-999.
 - 64) Dezawa M, Kanno H, Hoshino M, Cho H, Matsumoto N, Itokazu Y, Tajima N, Yamada H, Sawada H, Ishikawa H, Mimura T, Kitada M, Suzuki Y, Ide C : Specific induction of neuronal cells from bone marrow stromal cells and application for autologous transplantation. *J Clin Invest* 2004, 113(12) : 1701-1710.
 - 65) Kondo T, Johnson SA, Yoder MC, Romand R, Hashino E : Sonic hedgehog and retinoic acid synergistically promote sensory fate specification from bone marrow-derived pluripotent stem cells. *Proc Natl Acad Sci USA* 2005, 102(13) : 4789-4794.
 - 66) Dezawa M, Takahashi I, Esaki M, Takano M, Sawada H : Sciatic nerve regeneration in rats induced by transplantation of *in vitro* differentiated bone-marrow stromal cells. *Eur J Neurosci* 2001, 14 (11) : 1771-1776.
 - 67) Jiang Y, Jahagirdar BN, Reinhardt RL, Schwartz RE, Keene CD, Ortiz-Gonzalez XR, Reyes M, Lenvik T, Lund T, Blackstad M, Du J, Aldrich S, Lisberg A, Low WC, Largaespada DA, Verfaillie CM : Pluripotency of mesenchymal stem cells derived from adult marrow. *Nature* 2002, 418(6893) : 41-49.
 - 68) Jiang Y, Vaessen B, Lenvik T, Blackstad M, Reyes M, Verfaillie CM : Multipotent progenitor cells can be isolated from postnatal murine bone marrow, muscle, and brain. *Exp Hematol* 2002, 30(8) : 896-904.
 - 69) Jiang Y, Henderson D, Blackstad M, Chen A, Miller RF, Verfaillie CM : Neuroectodermal differentiation from mouse multipotent adult progenitor cells. *Proc Natl Acad Sci USA* 2003, 1 (Suppl 100) : 11854-11860.
 - 70) Wislet-Gendebien S, LePrince P, Moonen G, Rogister B : Regulation of neural markers nestin and GFAP expression by cultivated bone marrow stromal cells. *J Cell Sci* 2003, 116(Pt 16) : 3295-3302.
 - 71) Tondreau T, Lagneaux L, Dejeneffe M, Massy M, Mortier C, Delforge A, Bron D : Bone marrow-derived mesenchymal stem cells already express specific neural proteins before any differentiation. *Differentiation* 2004, 72(7) : 319-326.
 - 72) Deng J, Petersen BE, Steindler DA, Jorgensen ML, Laywell ED : Mesenchymal stem cells spontaneously express neural proteins in culture, and are neurogenic after transplantation. *Stem Cells* 2005, (Epub ahead of print).
 - 73) Kang KS, Kim SW, Oh YH, Yu JW, Kim KY, Park HK, Song CH, Han H : A 37-year-old spinal cord-injured female patient, transplanted of multipotent stem cells from human UC blood, with improved sensory perception and mobility, both functionally and morphologically : a case study. *Cytotherapy* 2005, 7(4) : 368-373.
 - 74) Broxmeyer HE : Biology of cord blood cells and future prospects for enhanced clinical benefit. *Cytotherapy* 2005, 7 : 209-218.

- 75) Tse WT, Pendleton JD, Beyer WM, Egalka MC, Guinan EC : Suppression of allogeneic T-cell proliferation by human marrow stromal cells: implications in transplantation. *Transplantation* 2003, 75 : 389-397.
- 76) Ryan JM, Barry FP, Murphy JM and Mahon BP : Mesenchymal stem cells avoid allogeneic rejection. *J Inflammation* 2005, 2 : 8.
- 77) 研究用幹細胞リソースバンク : <http://scb.ims.u-tokyo.ac.jp/>, 理研CELL BANK : <http://www.bcr.riken.jp/lab/cell/hcb/>

Mini Review

胎盤絨毛由来間葉系細胞の軟骨細胞への分化誘導

張 曉紅, 伊倉宏一, 高橋賢次, 三鶴亜矢子, 高橋恒夫

東京大学医科学研究所細胞プロセッシング(CERES)研究部門

Chondrogenic differentiation of mesenchymal progenitor cells derived from chorionic villi of human placenta

Treatment of defects of articular cartilage remains a problem in orthopedic surgery because cartilage has little self-healing capability. Recently a new approach for repair of articular cartilage has appeared using tissue engineering to create cartilage-like tissues in a three-dimensional scaffolding with autologous chondrocytes. However, the number of autologous chondrocytes for autograft is limited. To solve this problem, mesenchymal stem cells (MSCs) sourced from bone marrow have been investigated as candidates for producing chondrocytes. One of the possible sources may be the placenta thrown away as a medical waste after the collection of cord blood. In this report, we determined the potential of chondrogenic differentiation of mesenchymal progenitor cells derived from chorionic villi of fetal human placenta (PDMSCs). Our results show that PDMSCs include cells which have chondrogenic differentiation potential and may serve as an alternative source of cells for repair of articular cartilage.

Rec.9/6/2004, Acc.11/4/2004, pp102-106

Xiaohong Zhang, Kouichi Igura, Kenji Takahashi, Ayako Mitsuru and Tsuneo A. Takahashi
Division of Cell Processing, The Institute of Medical Science, The University of Tokyo

Key words

mesenchymal progenitor cell, human placenta, chondrogenic differentiation, articular cartilage repair, tissue engineering

はじめに

近年,組織工学手法により失われた組織や臓器を再生して治療しようとする再生医療研究が急速に進展し,すでに臨床応用がスタートしているものもあり,社会的に大きな注目を集めている。整形外科領域においては,再生医療により自己修復能が乏しい関節軟骨の修復が期待されている。組織工学を用いての組織再生において基本となる要素は,①幹細胞,②細胞増殖足場,および③成長因子といわれる¹⁾。幹細胞を用いての再生医療は最も期待されるものであるが,幹細胞には万能細胞である胚性幹細胞(ES細胞)に加えて,より実現化に近いものとして骨髄間葉系幹細胞などの種々の成体幹細胞がある²⁾。本稿では,再生医療応用を目指して我々が進めているヒト胎盤絨毛由来間葉系細胞を用いた研究,特に軟骨細胞への分化誘導とその臨床応用に向けた研究の概要を紹介する。

軟骨の再生医療

軟骨は無血管系の特殊な結合組織で,構成細胞である軟骨細胞と細胞間基質からなる。細胞間質は無定型なゲル状構造物とその中に埋め込まれた線維成分からなり,線維の種類,量によって軟骨組織は硝子軟骨,弾性軟骨,線維軟骨に分けられる。関節軟骨は硝子軟骨であり,その特徴的な構造から非常に自己治癒能力に乏しい組織である。すなわち関節軟骨は一度損傷を受けると,生体の中では修復されることがあっても正常な硝子軟骨に戻ることはなく,最終的に変形性関節症に進行する。これまで骨髄細胞の移植や骨膜³⁾,軟骨膜⁴⁾,自家軟骨細胞の移植⁵⁾,など様々な治療が試みられてきたが,軟骨修復を可能とする治療法が存在しなかった。最近,自家軟骨細胞をアテロコラーゲンゲル内で培養し,生体外で硝子軟骨細胞様組織を作る方法が開発された。アテロコラーゲンゲルはウシの真皮から精製

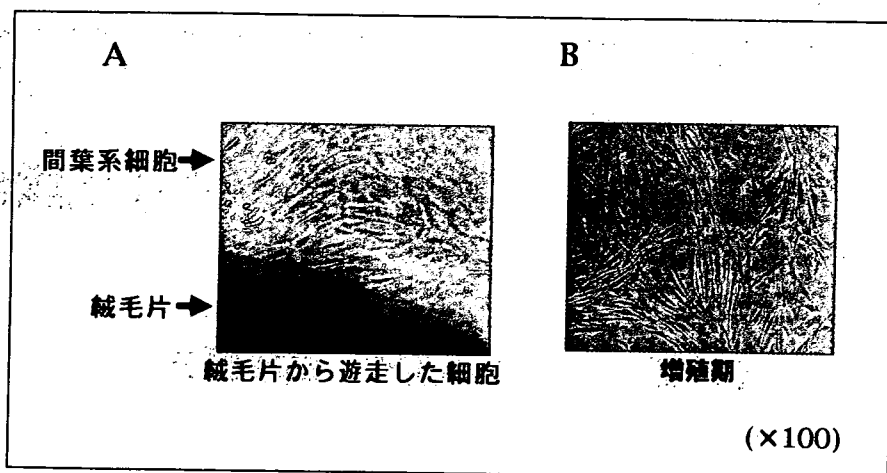


図1
A: Explant培養法により絨毛組織から out-growth した間質細胞。
B: 増殖中ヒト胎盤絨毛由来間質細胞。

されたI型コラーゲンであり、抗原性を有する末端のテロペプチドが取り除かれており、免疫応答が極めて少ないとされる。軟骨欠損修復における術後の短期成績は比較的良好であった⁶⁷⁾。しかし、この治療法においてもいくつかの問題が存在する。すなわち非荷重部の大腿骨顆の中部、あるいは外側から採取可能な軟骨細胞の数には限界があること、軟骨採取と移植の二度の手術が必要となることなどである⁸⁾。この問題を解決するには、移植細胞として自己の軟骨細胞以外で軟骨細胞分化能を有する細胞、すなわち骨髄間葉系細胞などの成体幹細胞が細胞ソースとして期待される。

ヒト胎盤と再生医療

再生医療の細胞ソースとして、ヒト胚性幹細胞の樹立や、最近の幹細胞研究の飛躍的な進展がみられる一方で、倫理における問題、移植時の免疫反応の回避、安定した供給の可能性、など様々な問題がある。医療廃棄物として処理された胎盤は、倫理面や安全面において、その利用に比較的問題が少ない細胞ソースである。胎盤と臍帯に含まれている臍帯血は豊富に造血幹・前駆細胞を含み、白血病等の治療のために移植されており、大きな実績が得られている。その保存施設、すなわち臍帯血バンクにおいては、移植において必要となる臍帯血の主要組織適合抗原(HLA)を含む多くの情報が得られ管理されている。したがって、臍帯血を採取した後の胎盤から間葉系細胞を採取培養して臨床に用いる時には、必要となる感染症、遺伝性疾患の有無等の情報はすでに保存されている臍帯血から得ることが可能である。臍帯血は組織学的に胎児側の細胞であるので、同じ胎盤絨毛由来間葉系細胞母体側の細胞を含まずに単離できれば、移植が必要な患者と軟骨へ誘導する細胞のHLAを合わせることにより、移植時の免疫反応をさらに回避できることが期待される。我々は研究室に構築した臍

帯血バンクシステムを利用して、臍帯血が提供された胎盤から胎盤絨毛由来間葉系細胞を分離、培養、保存するシステムを構築すべく研究を進めている。

胎盤と間葉系細胞

ヒト胎盤は、胎児と母体由来の組織からなり、胎児由来の組織は主に絨毛板と絨毛、母体由来組織は脱落膜から構成される。胎盤は胎生期に胚ないし胎児に酸素や栄養物質を供給し、炭酸ガスや老廃物の排泄を行う機能を果たす器官である。また、各種ホルモンを分泌し内分泌腺として機能している。胎児の出生後、排出された胎盤の重さは約500gであり、毛細血管や結合組織で充たされている。

最近、臍帯血、臍帯の細胞に分化能がある間葉系細胞が存在していることが報告されてきている^{9,10)}。前述のように臍帯血バンクにはHLAを含め胎児側の情報が保管されているので、我々の研究室では出産後に得られる胎盤の中の絨毛組織に着目してきた。これまで我々は絨毛由来の間葉系細胞が、脂肪細胞、骨芽細胞、神経系細胞へ分化することを確認してきた¹¹⁾。胎盤絨毛由来間質細胞から軟骨細胞への分化誘導能と、軟骨細胞の供給源としての可能性について考察する。

ヒト胎盤絨毛由来間質細胞の同定

母親からインフォームドコンセントを得て、正常産後に娩出された胎盤を用いた。胎児側絨毛からの間葉系細胞の単離は、臍帯と羊膜、絨毛板を除去した後、絨毛から切り出した組織片をメスで1~2mm立方の小片にし、その組織を培養皿上に乗せて、培地(DMEM(low glucose)+10%FBS)を添加、植え付けた組織の周辺部から細胞を out-growth させる Explant 培養法で行った。単離した細胞は線維芽細胞様の形態を示し(図1)、この細胞を増幅させFACSで細胞表面抗原を解析した。ヒアルロン酸レセプター CD44, T

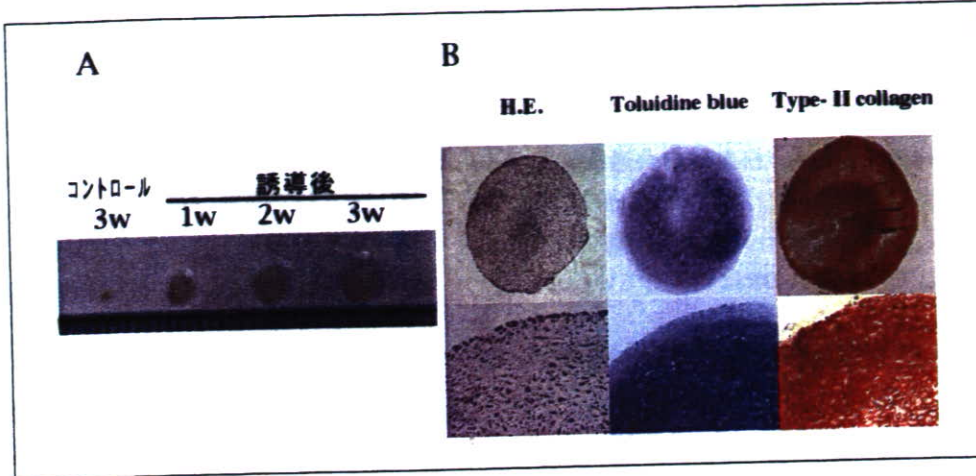


図2
 A: 誘導後のペレットの外観。誘導後ペレットのサイズは大きくなり、透明感が増加した。コントロール：誘導因子を除く培地で培養。
 B: 誘導3週目のペレットのパラフィン包埋切片をHematoxylin Eosin(H.E.), トルイジンブルー染色, Type-II コラーゲン免疫染色を行った。

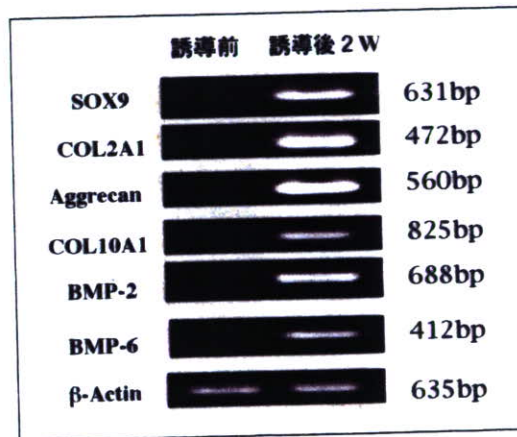


図3 RT-PCRによる誘導前後(2週目)のペレットの軟骨細胞分化に関連する遺伝子の発現

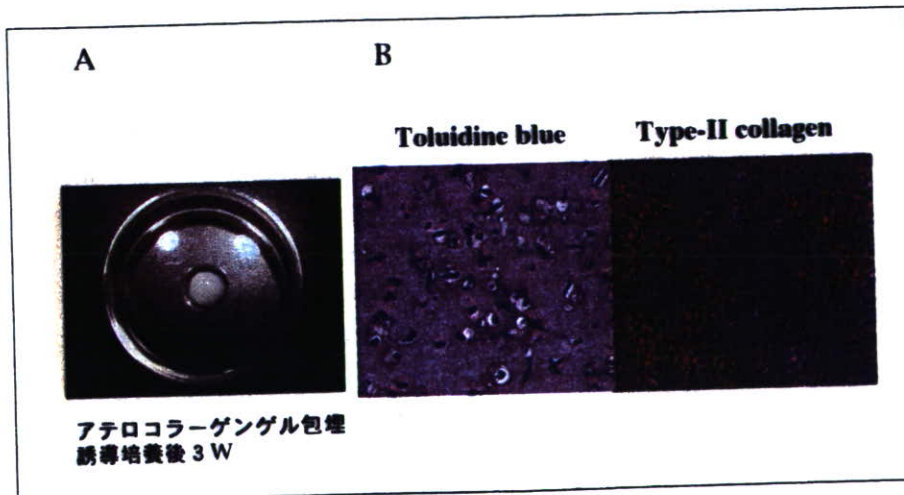


図4 アテロコラーゲンゲル包埋培養
 A: アテロコラーゲンゲル中で分化誘導3週目。ゲルは白色化し、一定の硬度を示した。
 B: パラフィン包埋切片をトルイジンブルー染色, Type-II コラーゲンに対して免疫染色を行い、陽性を示した。

リンパ球や神経細胞に発現するCD90, 骨髄由来間葉系幹細胞のマーカーであるCD73およびCD105 (エンドグリン), ほとんどの細胞に発現しているHLA-class Iを発現していた。一方, 接着分子CD31(PECAM-1), 造血幹細胞マーカーであるCD34やCD133, 白血球の共通抗原であるCD45, アンジオポエチンのレセプターで血管内皮細胞に発現しているTIE-II, マクロファージや樹状細胞などの抗原提示細胞に発現しているHLA-DRは発現していなかった。

ヒト胎盤絨毛由来間質細胞の軟骨細胞への分化誘導

我々はこれまで報告されている骨髄由来間葉系細胞を軟骨細胞へ分化誘導する pellet 法を改変して¹²⁾, 胎盤絨毛由来間葉系細胞から軟骨細胞への分化誘導を試みた。胎盤から胎児側の絨毛を切り取り, Explant 法で細胞を単離して増幅し, 2×10^5 /ペレットの細胞濃度で, 誘導因子として骨形成誘導因子 bone morphogenetic protein-(BMP-2), transforming growth factor- β 3(TGF- β 3), 軟骨細胞外のマトリックスの合成を促進させる dexamethasone, ascorbate-2-phosphate, proline, pyruvate, 血清の代替として ITS+Premix (insulin, transferrin, selenious acid, BSA, 1 linoleic acid) を添加した DMEM(high-glucose) を用いて 3 週間培養した。誘導後 1 週間でペレットは大きさを増し, 透明感が増加した (図 2)。誘導 3 週目のペレットのパラフィン包埋切片を作り, 酸性粘液多糖類を検出するトルイジンブルー染色, および軟骨特異的マーカーである II 型コラーゲンで免疫染色した。図 2 に示されるように, トルイジンブルーで赤紫色に染色され, また II 型コラーゲン免疫染色は陽性であった。次に誘導前の細胞と誘導後 2 週目の細胞から mRNA を抽出し, RT-PCR で誘導前後の遺伝子発現を検討した (図 3)。II 型コラーゲンの転写因子 SOX9, II 型コラーゲン, 軟骨の主要なプロテオグリカンであるアグリカン, 肥大化軟骨細胞から分泌される X 型コラーゲン, 骨形成因子 BMP2, 6 の遺伝子の発現がみられた。これらの結果は骨髄間葉系細胞を軟骨細胞へ分化誘導する時にみられる結果と一致している¹³⁾。以上のことから, 胎盤胎児側絨毛由来間葉系細胞には軟骨細胞に分化誘導しうる細胞が存在していると考えられる。

アテロコラーゲンをを用いた軟骨様組織の作成

単層培養で得られた細胞を用いての軟骨細胞移植の欠点は, 移植された細胞が軟骨欠損部位に留まることが難しい点にある。この欠点を補う方法として, 自家軟骨細胞を採取後, アテロコラーゲンゲルに包埋培養し, この生体外で

作成した軟骨様組織を軟骨欠損部位に移植する方法である⁹⁾。アテロコラーゲンは前述のように免疫反応が極めて低いとされ, またすでに形成外科領域では臨床に用いられている安全性の高いコラーゲンである。我々は胎盤胎児側絨毛由来間質細胞がアテロコラーゲンゲル内で培養が可能か, また生体外で軟骨様組織の作製が可能か検討した。絨毛由来間質細胞を上述のように単離, 増殖させ, アテロコラーゲンに包埋し, ペレット誘導培養法と同じ条件で培養した。培養 3 週後, パラフィン包埋切片を観察したところ, 形態学的に胎盤由来間葉系細胞は軟骨細胞様の円形の三次元構造をとり, また周囲に II 型コラーゲンやコンドロイチン硫酸などの細胞外基質を産生しており, 軟骨様組織であることが確認された (図 4)。このように胎盤由来間葉系細胞はアテロコラーゲン包埋誘導培養により軟骨様組織に分化誘導しうるということが明らかとなった。

今後の展望

上述のように胎盤胎児側絨毛由来間葉系細胞には軟骨細胞へ分化誘導し得る細胞が存在すること, その細胞はアテロコラーゲンに包埋して誘導培養することにより軟骨様組織を作製できることが確認された。ヒト胎盤は倫理面な問題も少ない上に, 大量の間葉系細胞を得ることが可能であり, また遺伝子導入もしやすい特徴を持ち¹⁴⁾, 間葉系細胞の研究に使いやすい細胞といえる。しかし, 軟骨細胞へ誘導したヒト胎盤由来間葉系細胞を実際に治療に用いるには, 移植されたヒト胎盤由来間葉系細胞の *in vivo* における挙動の詳細を明らかにし, またヒト胎盤由来間葉系細胞はヘテロな細胞集団と考えられることから, 軟骨細胞への分化能を持つ細胞の純化を進めている。

おわりに

21 世紀に入って高齢化は深刻な社会問題になってきており, 加齢に伴い, 変形性関節症と関節リウマチに伴う軟骨損傷の患者はますます増加していくと予想され, 軟骨再生医療は整形外科領域において重要な課題である。我々は臍帯血バンクのシステムを利用し, 胎盤絨毛由来間質細胞を用いて, 治療に有効な細胞を安全に, また安定して臨床に供することができるようなシステムを構築することを目的として研究を進めている。

文 献

- 1) Langer R, Vancanti JP: Tissue engineering. Science, 260: 920-926, 1993.
- 2) Blau HM, Brazelton TR, Weiman JW: The evolving concept of a stem cell. Cell, 105: 829-841, 2001.

獣医学的管理

麻酔，安楽死処分は科学者の自主管理か，法的な規制か

黒澤 努

大阪大学大学院医学系研究科 実験動物医学教室

我が国の動物愛護の基本的な法律であり，実験動物の取り扱いについての法的根拠の最上位に位置づけられるのが“動物の愛護及び管理に関する法律（動物愛護法）”である。1973年の制定以来，何度か改正されているが，最新の改正は2005年に行われ，2006年6月に施行された。この最終改正では実験動物に関する事項についても多くの愛護団体からの改正要求があり，より厳格な規定も検討されたようである。しかし，一部の研究者から，あまりに厳格な規制があると動物実験の施行に障害があり，科学の発展に逆行する懸念があるのではないかとされた。そこで日本学術会議，実験動物研究連絡委員会（玉置憲和委員長）ではこの点の検討を行い，提言を発表した。提言の中で強調されたのは，動物実験の施行に関しては研究者の自主規制が望ましいこと，またその実施に関しては第三者機関などの専門家による点検を行い，動物実験の透明性を図ることなどである。この内容を付度した国会では2005年の改正では実験動物に係る規制を極めて限定的なものであっても，適切な動物実験の施行は可能であるとされたのである。

さらに動物愛護法改正の議論の中で動物実験と実験動物の飼育はそれぞれ別の概念であるとする考え方が説明された。すなわち動物実験は科学活動の一部であり，研究の自由の建前から，法的規制などに馴染まないという考え方である。その一方，実験動物の飼育等は適切性を保つためには動物愛護の観点からの規制が必要なものとする考え方である。

これらを踏まえ，動物実験は各省庁が傘下の研究機関に通達を出し，動物実験の適正な施行に当たっての指針を示して，各研究機関に個別の動物実験規定などを制定して自主管理を行うこととなった。ただし，動物実験施行の責任は研究機関の長が負うとして，それまで不明確であった動物実験が行われた際の責任の所在については機関の長であることが明確に示めされたのである。

表1 我が国の実験動物を含む動物愛護法制

動物の愛護及び管理に関する法律

（動物愛護法）

- 基本指針
- 各種基準に係る告示等
 - ・ 特定飼養施設の構造及び規模に関する基準の細目
 - ・ 特定動物の飼養又は保管の方法の細目
 - ・ 動物の飼養及び保管に関する基準
 - 家庭動物等の飼養及び保管に関する基準
 - 展示動物の飼養及び保管に関する基準
 - 実験動物の飼養及び保管並びに苦痛の軽減に関する基準
 - 産業動物の飼養及び保管に関する基準

- ・ 動物の処分方法に関する指針
- 一 各省庁等の告示
 - ・ 文科省の動物実験指針
 - ・ 厚労省の動物実験指針
 - ・ 農水省の動物実験指針
 - ・ 日本学術会議の動物実験指針

2005年の動物愛護法の改正後は表1に示すような体制で実験動物を含む、動物の愛護は法制化されている。すなわち動物愛護法を親法として、それを根拠に基本指針が策定され、それ以外に動物愛護法の中で謳われている、各種の基準を定めることができるとの規定をもとに各種基準に係る告示等が動物愛護法の所管官庁である環境省からだされている。

表2 動物愛護及び管理に関する法律目次

- 第1章 総則（第1条—第4条）
- 第2章 基本指針等（第5条・第6条）
- 第3章 動物の適正な取扱い
 - 第1節 総則（第7条—第9条）
 - 第2節 動物取扱業の規制（第10条—第24条）
 - 第3節 周辺の生活環境の保全に係る措置（第25条）
 - 第4節 動物による人の生命等に対する侵害を防止するための措置（第26条—第33条）
 - 第5節 動物愛護担当職員（第34条）
- 第4章 都道府県等の措置等（第35条—第39条）
- 第5章 雑則（第40条—第43条）
- 第6章 罰則（第44条—第50条）
- 附則

これらの各個基準は動物種別に分けられているものではなく、その動物のヒト社会でのあり方をもとに分類されているようである。とくに動物愛護法は家畜またはヒトが占有している動物等についての規定であり、野生動物については規定していない。またそのわけ方はヒトとの関わりがどのように行われているかを考え、終生飼育すべき家庭動物、展示動物と、非終生飼育する実験動物、産業動物とに大きく分けられている。また第3章、第2節には動物取扱業の規制が規定されているがその第10条に定められている動物では“(哺乳類、鳥類又は爬虫類に属するものに限り、畜産農業に係るもの及び試験研究用又は生物学的製剤の製造の用その他政令で定める用途に供するために飼養し、又は保管しているものを除く。以下この節及び次節において同じ。)”として、畜産に使われる動物及び実験動物の取り扱い業の規制は除外されている。しかし、ここでの除外規定は第2節と第3節に関してだけであることも謳われている。すなわち第3節“周辺の生活環境の保全に係る措置”に関しても畜産動物と実験動物は除外されているが、逆に言えば第4節以降は適用される規定となっている。ちなみに畜産動物、実験動物が除外されない第5節は“動物愛護担当職員”の規定である。またこの規定では第4章以降の規定には畜産動物、実験動物ともに適用されることとなる。この第4章では都道府県等の措置等が規定されていて、犬及びねこの引取り、負傷動物等の発見者の通報措置、犬及びねこの繁殖制限、動物愛護推進員、

協議会などの規定があり、動物愛護団体の関与が規定されているが、この部分では実験動物は除外されていないので、こうした愛護団体の関わりは実験動物にも適用されることと解される。

ちなみに実験動物に係る規定は第5章“雑則”に規定されていて、動物を殺す場合の方法、経過措置、審議会の意見の聴取などとともに“動物を科学上の利用に供する場合の方法、事後措置等”として記載されている。

こうして動物愛護法の体系が理解できたところで、麻酔、安楽死に関係する条項について検討してみよう。まず（基本原則）が第2条にあるがそこでは

“第2条 動物が命あるものであることにかんがみ、何人も、動物をみだりに殺し、傷つけ、又は苦しめることのないようにするのみでなく、人と動物の共生に配慮しつつ、その習性を考慮して適正に取り扱うようにしなければならない。”

としている。すなわち動物をみだりに殺し、傷つけ、又は苦しめてはいけないという規定がある。これはみだりでない殺す行為、傷つける行為、あるいは苦しめる行為は容認される規定となっている。これこそ動物実験そのものにあてはまる行為を規定しているものと解される。一般の動物実験においてこの3つの行為のないものはほとんどなく、逆に動物実験のほとんどがこの3つの行為を含むのであるから、この規定を厳格にとらえるのであれば、動物実験がいつでも、どこでも、誰でも行える行為ではないことは明らかである。また主題の麻酔及び安楽死との関連で考えれば、動物実験を行う際には麻酔及び安楽死をともに考慮して、適正に取り扱うことの一部として麻酔および安楽死を行う事と規定されているものと解される。

動物愛護法の規定に基本指針の策定がある。実験動物関係者は動物愛護法の第41条の規定（動物を科学上の利用に供する場合の方法、事後措置等）を特に注目するあまり、この基本指針にあまり関心がないようであるが、実はここには実験動物の扱ただけでなく動物実験そのものの考えが示されている。

すなわち“動物の愛護及び管理に関する施策を総合的に推進するための基本的な指針”（2006年10月31日 環境省告示第140号）である。この基本指針の根拠は動物愛護法第5条であり、第5条“環境大臣は、動物の愛護及び管理に関する施策を総合的に推進するための基本的な指針（以下「基本指針」という。）を定めなければならない。”と規定されたので策定されたものである。

基本指針の内容であるが、そこにはまず

国民が動物に対して抱く意識及び感情は、千差万別である。例えば、家庭動物等の不妊去勢措置、ねこの屋内飼養、動物実験、畜産等における動物の資源利用、様々な動物を食材として利用する食習慣、狩猟等の動物の捕獲行為、動物を利用した祭礼儀式、外来生物の駆除、動物の個体数の調整、安楽殺処分等については、これらの行為が正当な理由をもって適切に行われるものである限り、動物の愛護及び管理に関する法律（昭和48年法律第105号。以下「動物愛護管理法」という。）やその精神に抵触するものではないが、現実には、これらの行為に対する賛否両論が国内外において見受けられる。

とされていて、動物実験は正当な理由をもって適切に行われる限り法律またはその制定精神に抵触するものではないとしながらも、賛否両論が国内外において見受けられるとされているのである。

さらに基本指針は①現状と課題として、

実験動物の飼養等については、実験動物の飼養及び保管並びに苦痛の軽減に関する基準（平成18年4月環境省告示第88号。以下「実験動物の飼養保管等基準」という。）に基づき、自主管

理を基本としてその適正化を図る仕組みとなっているが、本基準の遵守指導等を円滑に行うための体制整備が十分にされていない施設が一部にある。

として、実験動物の飼養等が制定された基準の遵守指導等を円滑に行うための体制整備が十分にされていない施設があると指摘しているのである。この基本指針の文言は重大であり、自主管理が適切にできない場合には何らかの措置が今後予想されそうである。とくにこの基準では苦痛軽減も規定されており、これがいまだ十分にされていない施設の存在がすでに基本指針において指摘されているのである。またこの基本指針では動物実験に関して以下のように3Rの原則に言及している。

動物を科学上の利用に供することは、生命科学の進展、医療技術等の開発等のために必要不可欠なものであるが、その飼養及び科学上の利用に当たっては、動物が命あるものであることにかんがみ、科学上の利用の目的を達することができる範囲において、国際的にも普及し、定着している実験動物の取扱いの基本的考え方である「3Rの原則」（代替法の活用：Replacement, 使用数の削減：Reduction, 苦痛の軽減：Refinement）を踏まえた適切な措置を講じること等が必要とされている。

ここで注目すべきは3Rの原則は国際的にも普及定着してとしている点であり、本論である麻酔、安楽死に関わるRefinementの考え方も国際的な実験動物の取り扱いの基本的な考え方であるとしており、この基本指針を念頭に置くと実験動物の麻酔、安楽死等は国際的に普及定着した方法で行うことが示唆されているものと解される。当然その位置づけも国際的に普及定着した考え方を持ち込むべきであることが予想される。

以上2005年の動物愛護法改正での議論およびそこで整理された考えをまとめると

動物実験に関しては；

- ・ 動物実験は研究の自由の建前から法的規制は馴染まない
- ・ 動物実験は研究機関の長（総長）の責任で施行する

また実験動物の取り扱いに関しては；

- ・ 実験動物の飼養保管ならびに苦痛軽減は動物愛護法で他の動物と同様、法的規制がある
- ・ 具体的な方法等は“実験動物の飼養保管並びに苦痛軽減の基準”に定める

ということとなるものと思われる。

このように考えると実験動物の麻酔あるいは安楽死はどのような概念の行為であるかを議論するためには“実験動物の飼養及び保管並びに苦痛の軽減に関する基準”の詳細を検討刷る必要があると思われる。

表3 実験動物の飼養及び保管並びに苦痛の軽減に関する基準

(2006年4月28日 環境省告示第88号)の基本的な考え方

- ・ 第1 一般原則
- ・ 1 基本的な考え方

動物を科学上の利用に供することは、生命科学の進展、医療技術等の開発等のために必要不可

欠なものであるが、その科学上の利用に当たっては、動物が命あるものであることにかんがみ、科学上の利用の目的を達することができる範囲において、できる限り動物を供する方法に代わり得るものを利用すること、できる限り利用に供される動物の数を少なくすること等により動物の適切な利用に配慮すること、並びに利用に必要な限度において、できる限り動物に苦痛を与えない方法によって行うことを徹底するために、動物の生理、生態、習性等に配慮し、動物に対する感謝の念及び責任をもって適正な飼養及び保管並びに科学上の利用に努めること。

この基準における基本的な考え方を単純化すると3Rsの方法によって動物実験を行うことを徹底するためには、実験動物の生理学的特性等に通曉し、感謝の気持ちをもって動物実験を行う必要があるとしている。さらに適正な飼養及び保管を行うこととなっているのである。どうも以前に述べたような、一部の識者が解説した、動物実験と実験動物の取り扱いが別物であるという解説とこの基準とは若干整合性に欠けるように思われる。

そこで麻酔、安楽死に関する法を精神を理解するために我々が通常検討しない、実験動物以外の動物についての基準について検討を進めることとする。ここでは主に家庭動物と実験動物との違い、とりわけ苦痛の排除などについて検討する。

家庭動物等の飼養及び保管に関する基準では実験動物と同様の構成となっており、第3“共通基準”に苦痛排除の規定が示されている。

1 健康及び安全の保持

- ・ 所有者等は、次の事項に留意し、家庭動物等の種類、生態、習性及び生理に応じた必要な運動、休息及び睡眠を確保し、並びにその健全な成長及び本来の習性の発現を図るように努めること。
- ・ (1) 家庭動物等の種類、発育状況等に応じて適正に及び水を給与すること。
- ・ (2) 疾病及びけがの予防等の家庭動物等の日常の健康管理に努めるとともに、疾病にかかり、又は負傷した家庭動物等については、原則として獣医師により速やかに適切な措置が講じられるようにすること。傷病のみだりな放置は、動物の虐待となるおそれがあることについて十分認識すること。また、家庭動物等の訓練、しつけ等は、その種類、生態、習性及び生理を考慮した適切な方法で行うこととし、みだりに殴打、酷使する等の虐待となるおそれがある過酷なものとならないようにすること。

ここで注目すべきは以下に示す実験動物の基準とほとんど同じ事が謳われている点である。まず動物の生理生態について良く理解して、それ合わせて適正な飼育を行うことが規定されている。また疾病や傷害の予防だけでなく、傷病のみだりな放置は動物の虐待となるおそれがあることから、獣医師による速やかで適切な措置を規定しているのである。すなわち、苦痛排除のためには獣医師の診療を受けさせることにより虐待防止となると規定されているのである。

そこで、この点を実験動物の基準ではどのように規定しているかを検討しよう。

実験動物等の飼養及び保管並びに苦痛軽減に関する基準

第3 共通基準

1 健康及び安全の保持

(1) 飼養及び保管の方法

実験動物管理者、実験実施者及び飼養者は、次の事項に留意し、実験動物の健康及び安全の保持に努めること。

ア 実験動物の生理、生態、習性等に応じ、かつ、実験等の目的の達成に支障を及ぼさない範囲で、適切に給餌（じ）及び給水を行うこと。

イ 実験動物が傷害（実験等の目的に係るものを除く。以下このイにおいて同じ。）を負い、又は実験等の目的に係る疾病以外の疾病（実験等の目的に係るものを除く。以下このイにおいて同じ。）にかかることを予防する等必要な健康管理を行うこと。また、実験動物が傷害を負い、又は疾病にかかった場合にあっては、実験等の目的の達成に支障を及ぼさない範囲で、適切な治療等を行うこと。

ここでも全く家庭動物と同じように、動物の生理生態について良く理解し、適正な飼育を行うだけでなく、疾病や傷害の予防（もちろん実験動物は動物実験のために飼養されている動物であるから、動物実験に係る障害はわざわざ疾病や傷害ではないと断ってはいる）を行うだけでなく、適切な治療についても言及している。すなわち家庭動物と同じように扱う事が規定されているものと見なされる。

さらに実験動物の基準の方の個別基準をみると実験等を行う施設という項目があり、そこでは麻酔薬、鎮痛薬を投与することが規定されている。

実験動物等の飼養及び保管並びに苦痛軽減に関する基準

第4 個別基準

1 実験等を行う施設

(1) 実験等の実施上の配慮

実験実施者は、実験等の目的の達成に必要な範囲で実験動物を適切に利用するよう努めること。また、実験等の目的の達成に支障を及ぼさない範囲で、麻酔薬、鎮痛薬等を投与すること、実験等に供する期間をできるだけ短くする等実験終了の時期に配慮すること等により、できる限り実験動物に苦痛を与えないようにするとともに、保温等適切な処置を採ること。

この目的は明確で、出来る限り実験動物に苦痛を与えないようにするためであるから、麻酔、鎮痛を期待して薬剤を投与することが規定されていると解される。

(2) 事後措置

実験動物管理者、実験実施者及び飼養者は、実験等を終了し、若しくは中断した実験動物又は疾病等により回復の見込みのない障害を受けた実験動物を殺処分する場合にあっては、速やかに致死量以上の麻酔薬の投与、頸（けい）椎（つい）脱臼（きゅう）等の化学的又は物理的方法による等指針に基づき行うこと。

さらにこの個別基準では実験等を行う施設では安楽死処分を適切に行う事が規定されている。またこの際の方法についても致死量以上の麻酔薬の投与という具体的な方法も示されている。ただ頸椎脱臼が方法の中に示されているが、これは近年の動物愛護思想の向上により、国際的には麻酔下で行うことが適当であるとされるようになりつつあることに留意する必要がある。

麻酔および安楽死処分の法的位置づけ

以上、関連法令等を概観してきたが、これらをまとめてみると麻酔及び安楽死処分を実験動物に行うに当たっての法的な位置づけは次のようにまとめられよう。

- ・ 動物愛護法では動物をみだりに殺し、傷つけ、又は苦しめることのないようにするとした
- ・ 動物の処分、動物実験という行為に関しては国民の意見が分かれている問題だと基本指針で指摘された
- ・ 動物愛護法の細則ともいえる各種基準では動物の健康及び安全の保持が規定されている
- ・ そこでは負傷、疾病について規定され、治療等を行うこととなっている。

こうしたまとめが正しいとするならば続いて実行行為である動物の治療について考えをすすめてみることにしよう。

“動物の負傷疾病の治療獣医診療行為である。”としてもとくにおおかたの方は賛同されるであろう。とくに動物愛護家の方々からは当然のこととして受け止められる事と思われる。続いて“動物の麻酔は獣医診療行為である。”とすることにも特に異論はでないと思われる。ただ一部の医学関係者ではない方々には麻酔が治療であるということにはなじみがないかもしれない。しかし、昨今は医学ではペインクリニックなどの麻酔科の医師が外来診療することもとくに珍しい特殊な医療行為ではなくなっているので、それが動物に行われるのであれば獣医診療とすることに抵抗は少ないものと思われる。

こうした行為の面を離れて実際的に麻酔安楽死に使用する薬剤について考えてみよう。まず“薬”というと医療の現場では医薬品を指し示すし、一般的な社会生活においても多くの方は薬といえば医薬品を指す言葉であると理解しているであろう。またやや詳しい方の中には医薬品には医療用医薬品と大衆薬の2種類があることや、劇薬、毒薬、要指示薬など薬事法の最新の規定では処方箋医薬品というものが存在することを指摘する向きもいるかもしれない。当然医療従事者であれば薬という用語からはこうしたものを思い浮かべるのである。とくに今回の本論である麻酔および安楽死に用いられる薬剤は医薬品であり薬事法で規制され誰でもが使用して良いとはなっていないことを知る方は多い。さらに一部の麻酔薬ではより規制の厳しい麻薬及び向精神薬取締法により規制されるものが含まれることを多くの医療関係者、実験動物関係者は知っている。しかし、これがひとたび、研究の現場にはいと薬というのは試薬が含まれる化学薬品一般の意味であると解釈する人々が現れるようである。

一般の化学薬品、試薬と医薬品とは何処が異なるのであろうか？これは実験動物学の関係者であれば誰でも知っているように、医薬品とは治療等の目的で安全性試験さらには臨床試験などを行って、その副作用などが十分知られ、さらには行政当局から承認されたものである。すなわちこうしたプロセスを経ない薬品は健康被害などを頻繁におこしたので安全性試験などが実験動物等を用いておこなわれてきているのである。動物愛護法および関連規定により苦痛の軽減を求めるのは、動物の健康などのためとしている。とすると一部の研究の現場で使われる化学薬品、試薬は麻酔薬となりえるであろうかとの疑念がわく。ひょっとして現在まで実験動物の麻酔薬として使われてきた薬剤の中に医薬品ではないものが含まれてはいないであろうか？動物への健康被害のもととなるかもしれないものを使用してはいなかったであろうかが気になるところである。この例としてはジエチルエーテル、アパーチンなどがある。実はジエチルエーテルも数年前までは医薬品それも麻酔薬として行政の承認を得たものが市販されていた。しかし、現在は市販されていない。とすると現在使われているジエチルエーテルは試薬であって動物等に健康被害を及ぼす可能性を否定できないものではなかろうか。またアパーチンはいかなる前臨床試験を経て麻酔薬として行政当局は認可した麻酔薬であろうか？そもそも動物愛護法の規定により動物

の健康を守る、苦痛を軽減するために行うべきであるとされる、麻酔、安楽死といった行為が健康被害をもたらす可能性のあるもので行われているとすると、極めて滑稽なことである。

最後にまとめとして実験動物の麻酔について疑問文で問題提起をしておく。

- ・ 動物実験で麻酔をしたくない研究があるのではないかな？
- ・ 麻酔は本来は研究のためにはしたくない行為ではないかな？
- ・ 昔から動物実験のために麻酔は行われたかな？
- ・ 実験動物の麻酔は動物愛護法の法規定があるから行うのではないかな？
- ・ 動物実験で麻酔しない行為は動物実験そのものだが、麻酔鎮痛するのは基準の規定にしたがっているのではないかな？
- 実験動物の麻酔は動物実験ではないのではないかな？ こうしたことを考えると次のような結論が得られると考えられる。
- ・ 動物実験をする行為と実験動物の飼養保管苦痛軽減は別物とされたので、実験動物の麻酔は動物実験ではない。法の規定による苦痛の軽減措置、すなわち獣医診療行為である。

同じく実験動物の安楽死については

- ・ 安楽死したくない研究はないのかな？
- ・ 実験動物は昔から動物実験時に安楽死させられていたかな？
- ・ 実験動物の安楽死は動物愛護法、飼養保管基準に規定されているので行っているのではないかな？
- ・ 動物実験で安楽死させない行為は動物実験そのものだが、安楽死させるのは基準の規定にしたがっているのではないかな？
- ・ 実験動物を安楽死させる行為は動物実験かな？

ということで安楽死についても結論として、

- ・ 動物実験をする行為と実験動物の飼養保管苦痛軽減は別物とされたので、安楽死は動物実験ではない、法の規定による苦痛の軽減措置である

ということとなる。

すなわち実験動物の麻酔および安楽死処分は、動物実験としての行為ではなく法の規定によって行われる苦痛軽減措置ということであり、科学者が自主管理して行う行為ではなく法的な規制の中で、もっとも適正な方法で行うことが規定された行為ということとなる。またそうした行為をもっとも適正に行うことが出来そうなのは獣医師であり、実験動物の苦痛軽減は獣医診療行為として行うのが法的にはもっとも適切であることとなる。

実験動物施設における設備の管理運営 — PFI 事業における管理運営—

町田永世, 雨宮和男, 北林厚生
株式会社 日立製作所 都市開発システムグループ

1) はじめに

国立大学の附属実験動物施設の整備として、初めてPFI (Private Financial Initiative) 方式による運営が筑波大学生命科学動物資源センターにて平成17年10月より開始された。

PFIは1992年英国にて、民間資金の有効活用と運営の効率化などの要望により実施され、現在日本においても多くの施設整備に利用されてきている。

本施設では、事業運営の特別目的会社 (SPC: Special Purpose Company) として (株) つくばバイオサービス (TBS) を設立させ現在運営管理を行っている。

施設全体の改修工事は平成18年10月に終了し、本事業の維持管理は平成30年3月までの間実施される。TBSは、(株)日立製作所を代表企業とする8社の出資により設立され事業の終了とともに解散する。

2) PFI (Private Finance Initiative) とは、

民間の資金、経営能力および技術的能力を活用して公共施設などの建設、維持管理、運営などを行う行政手法で日本においては、1999年9月「PFI推進法」が施行された。

3) 筑波大学生命科学動物資源センターでの事業スキーム

事業の主な内容は、「遺伝子改変マウス」の作成、保存、供給の機関であるとともにライフサイエンス研究の一翼を担う実験動物飼育・研究施設として研究への更なる推進と、実験動物を単なる「研材」として捉えず「動物愛護の精神」のもと、コンソーシアム各社が蓄積してきた、ノウハウ・実績を活かした安全で快適な信頼性の高い業務を行う事を目的として構成した。

代表企業である(株)日立製作所による事業全体のトータルマネジメントと参加各社の技術を結集するとともに、研究施設の性質・必要機能の大切さに求められる維持管理にも日立製作所による管理を行う事とした。

4) 施設概要

本事業は、発生工学棟 (新設)、動物実験棟 (既設改修) の整備と維持管理から構成されている。維持管理には、建物・設備 (付帯設備含む) の維持管理並びに保守・点検、洗浄・清掃、保安・警備の各業務を行う。

施設の規模は、鉄骨鉄筋コンクリート造4階建ての発生工学棟: 4606 m² (マウス約50,000匹: 10,000ケージ)、既設棟: 4363 m²で発生工学棟には大型プロジェクト対応マウス飼育エリアと遺伝子改変マウス受託エリアを保有している。エリアごとの空調システムを導入し省エネルギー対策や事故防止を考慮したバックアップシステムを構成している。

麻薬を含む麻酔薬の管理と使用

黒澤 努

獣医畜産新報 J V M, Vol.60 No.8, 2007年8月号

特集 獣医師に求められるコンプライアンス法規制 —知らなかったでは済まされない—
646-652 頁

麻薬を含む麻酔薬の管理と使用

黒澤 努

要約

獣医師にもコンプライアンスが求められるようになってきた。とくに研究にかかわる実験動物の扱いに際しては、研究費の大元が税であることから、世間の耳目を集めやすい。コンプライアンスの大きな柱は遵法精神であるが、麻薬を含む麻酔薬はいずれも種々の法律により規制されている医薬品である。これを実験動物に施用するのは、動物愛護法に関連した諸規制が、実験動物の苦痛軽減を求めているからである。諸外国では実験動物の苦痛軽減は獣医学的管理によって達成さるとして、そうした法律、基準、指針などが整備されている。しかし、我が国では実験動物の苦痛軽減における獣医師の関わりは明確ではない。しかし、現実的な対応として動物実験を行うに当たって、麻酔薬、鎮痛薬を使うことが法律で定められただけでなく、広く行きわたっていることから、適切なその使用について獣医師の責任は重い。ついうっかりして、あるいは法の規定を十分承知せず、違法行為を行ったり、それを手助けしたことになってしまうのは避けるべきである。明確な規定がない問題については、明らかに違法と認められない線を守るべきである。ここでは実験動物の苦痛軽減を定めている動物愛護法およびそのために用いられる麻酔鎮痛薬に関する規制法さらにはそれを扱う獣医師として、実験動物医学専門医について解説する。

はじめに

塩酸ケタミンが若者の間での乱用のため麻薬指定されることとなった。すでに各分野で塩酸ケタミンの麻薬指定の対策は進んでいるが、ここでは麻薬を含む麻酔薬全般について、その管理と使用、とりわけ動物実験に使われる、実

Tsutomu KUROSAWA : 大阪大学大学院医学系研究科実験動物医学教室 (〒565-0871 吹田市山田丘 2-2)

験動物に対する使用について考える。とくにここでは獣医師に求められるコンプライアンスという観点で物事を整理してみたい。

コンプライアンスとはすなわち法令の遵守のことである。しかし、コンプライアンスには単に法令遵守だけでなく、社会的規範や企業倫理を守ることにも含まれるともされる。これまで動物実験を行ってきた研究機関の多くは国立大学であり、企業コンプライアンスあるいは企業倫理という観点から、バイオメディカルサイエンスの研究活動を考える習慣は研究者、教育研究機関ともに希薄であった。

国立大学の法人化により、教育研究機関である国立大学法人も一般の企業と同様な法的な規制を受けるようになって始めてコンプライアンスが論じられることとなった。大学での研究活動は税金により行われることが多く、また法人化したといっても国立大学法人である大学の教員はみなし公務員であり、一般の人々から見れば制度は変わったが、相変わらずお役人の一部となる。ところがこのお役人が、国の税金である研究費を不正流用する例が多数露見し、こうしたことから大学のコンプライアンス、研究者のコンプライアンスが論ぜられることも多くなった。

我が国は資本主義国家であり、社会での経済活動はもつとも重要なものともされ、したがって我が国の法令でもその点に関しての規程、規制が多く存在する。実験動物を使用して動物実験を行うことは科学的な活動であり、自由な発想の元で行うことが期待されるし、実際そうでなければ創造的な発見などは、とても期待できるものではない。しかし、真実を極めるためには殺人をおかしても良かったり、他人の金品を窃取しても良いということはある得ず、自ずと何らかの社会規範の範囲内での研究の自由である。我が国の法体系のなかでも、こうした科学研究に関しては極めておおらかで、それにより科学の発展が支えられてきた側面はたしかに存在しそうである。そうなると動物実験を伴う研究活動に関する直接的法的規定ないし規制は少なくなって当然である。しかし、間接的な規定ないし規制は経済

活動に関連して適用されることが多い。企業活動であれば業務停止あるいは免許取り消しなどの経済的制裁をとまなう規制により、適切なコンプライアンスを求めるとなっている。ようするに企業コンプライアンスが論じられる際には、企業活動、とりわけ経済活動が規制されることにより、利益を生み出すことができなくなるような制裁を防止する事が目的となる。それに対して研究機関における制裁といっても業務停止、すなわち研究活動の停止といわれても短期的には、研究者である教員は制裁期間中は仕事が休みになってかえって好都合かも知れないなどということもあり、企業のコンプライアンスとはいささか意味が異なるかも知れない。しかし大学間競争も激しさを増しており、とくに国立大学法人ではその収入の多くを依存している運営交付金の交付額に影響したり、少子化による入学者の減少それに伴う学生獲得競争などもあり、長期的には大学のコンプライアンスも本当は重要なものであろう。また昨今は研究も外部資金を獲得して行うことが求められているが、コンプライアンスを無視するような大学に外部資金が集まることは極めて考えにくい。したがって、今回の問題は単に獣医師のコンプライアンスの問題というより、研究活動を行う研究機関のコンプライアンスという側面が大きい。当然その組織の一員である獣医師の専門性から考えて、研究機関に対して獲得した知識を提供し、研究機関コンプライアンス向上に寄与しなければならないのはいうまでもない。

こうした実験動物を巡るコンプライアンスという観点で関連法令を考えてみよう。

実験動物の麻酔の関連法令

- ①動物の愛護及び管理に関する法律（以下、動物愛護法）
- ②実験動物飼養保管並びに苦痛軽減に関する基準
- ③麻薬及び向精神薬取締法
- ④薬事法

動物愛護法の第41条第3項では事後措置の規定があり、その第4項において別によるべき基準を定めることができると規定されており、これをうけて動物の処分方法に関する指針が制定された（平成7年7月4日総理府告示第40号）。この指針では麻酔薬の過量投与が安楽死法として記載されており、実験動物の麻酔関連法令としてとらえられよう。具体的な安楽死の方法は実験動物飼養及び保管並びに苦痛軽減に関する基準にも記載されている。

これ以外に薬物を規制する法律に覚醒剤取締法、大麻取締法、毒物及び劇物取締法などがある。

これとは観点がことなるが、動物に麻酔薬を使用するという行為を考えると獣医師法、獣医療法なども関連する。さらに実験動物として使われる動物種によっては、感染症の予防及び感染症の患者に対する医療に関する法律第54条第1号の輸入禁止地域等を定める省令に基づく指定の審査基準等ならびに特定外来生物による生態系等に係る被害の防止に関する法律のうち、環境大臣及び農林水産大臣が所掌する特定外来生物に係る特定飼養等施設の基準の細目等を定める件において、当該動物の飼育管理体制あるいは作業手順にて逸走した際の措置を考慮する必要がある。これは当該動物の飼養保管施設認可の際に申請書に記載すべき事柄の一部となろうが、実験動物として使われる可能性の高い霊長類では、その捕獲方法に麻酔銃ないし、吹き矢などが使われる。この際の麻酔薬に関しては適切な管理を行う旨の記載が必要と考えられ、これらの法律も関係する。さらに麻酔銃を整備する場合には銃砲刀剣類所持等取締法も関連法令となる。

動物愛護法の内容

動物愛護法の制定の意義はその第2条に規定されている。

（基本原則）

第2条 動物が命あるものであることにかんがみ、何人も、動物をみだりに殺し、傷つけ、又は苦しめることのないようにするのみでなく、人と動物の共生に配慮しつつ、その習性を考慮して適正に取り扱うようにしなければならない。

この中でも実験動物に関しては、その研究目的達成のためには殺さず、傷つけず、苦しめずに動物実験を行うことはほぼ不可能であるから、別に第41条に科学上の利用に供する場合の規程を設けて他の動物とは区別している。

（動物を科学上の利用に供する場合の方法、事後措置等）

第41条 動物を教育、試験研究又は生物学的製剤の製造の用その他の科学上の利用に供する場合には、科学上の利用の目的を達することができる範囲において、できる限り動物を供する方法に代わり得るものを利用すること、できる限りその利用に供される動物の数を少なくすること等により動物を適切に利用することに配慮するものとする。

- 2 動物を科学上の利用に供する場合には、その利用に必要な限度において、できる限りその動物に苦痛を与えない方法によつてしなければならない。
- 3 動物が科学上の利用に供された後において回復の見込みのない状態に陥っている場合には、その科学上の利用に供した者は、直ちに、できる限り苦痛を与えない方法によつてその動物を処分しなければならない。
- 4 環境大臣は、関係行政機関の長と協議して、第2項の方法及び前項の措置に関しよるべき基準を定めることができる。

ようするに動物実験を行う場合にもその目的を達成するのに差し支えない限りできるだけ苦痛を軽減して実験を行うことが規定されているのである。したがって実験動物の苦痛軽減は最大限図つたうえで動物実験の施行が許可されていることとなる。

(1) 第41条第2項 苦痛を与えない方法

動物の苦痛軽減法はいろいろある。患部を優しくさすだけで苦痛は緩和されることもある。しかし、鎮痛薬、麻酔薬を用いて苦痛を緩和するのが獣医学では一般的な処置となっている。実験に用いる動物の苦痛に対しても獣医学の知識があれば相当程度に苦痛緩和は可能である。とくに実験処置による苦痛は科学のためとはいえ意図的に動物に傷害を与えるのであるから積極的に苦痛緩和を図らねばならない。

しかし、この極めて常識的な考えも動物愛護法成立以前にはなんらの法的規制もなかったのである。動物愛護法は実験動物に対してはできるだけ苦痛の少ない方法によつて動物実験を行うことを1973年の制定時から規定している。

しかしその当時、実験動物界で知られていた注射麻酔方法はペントバルビタールNaの静注等であり、その後塩酸ケタミンが筋注も可能であるとして普及しただけであった。しかし、塩酸ケタミンにしても、その鎮痛効果を良く理解して使われることは希で、安全域が高いという理由と動物種を問わず麻酔効果、さらには不動化が計られることから使われてきた。また吸入麻酔薬として当時、すでに医学界ではほぼ使われなくなったジエチルエーテル、クロロフォルムが実験動物の教科書に記載されてきた。

しかし、諸外国ではすでに実験動物に関しても獣医学の知識、技術を駆使して苦痛軽減を図るのが適当とされ、所

謂、実験動物の獣医学的管理が強調されている。

(2) 第41条第3項 事後措置

動物実験終了時の規定が本法には記載されている。

- 3 動物が科学上の利用に供された後において回復の見込みのない状態に陥っている場合には、その科学上の利用に供した者は、直ちに、できる限り苦痛を与えない方法によつてその動物を処分しなければならない。

これは安楽死処分を行うことの規程であるが、この規程では第4項に“よるべき基準を定めることができる”とあり、動物の処分方法に関する指針がさだめられている。また具体的方法は実験動物の飼養と保管並びに苦痛軽減に関する基準にも記載されていることは前述した。

実験動物の飼養と保管並びに苦痛軽減に関する基準

2005年の動物愛護法の改正時の議論の中で、動物実験を行う行為と、実験動物の飼養保管ならびに苦痛軽減を図ることは法的には若干異なることであることが指摘された。すなわち動物実験は研究上の行為であり、研究の自由を考えると法律で規制するのには馴染まないのではないかと議論である。それに対して実験動物を飼養保管し苦痛軽減を図るということに関しては動物愛護法により規制されるものと考えとする意見である。実際改訂作業にあたった行政側およびその策定の審議を行った各種委員会の学識経験者もそのように解説している。国際的にはそのような考え方は少なく、たとえば古くから動物愛護法制が充実しているとされる英国ではAnimal (Scientific Procedure) Actsという名称の法律に顕れているように、動物実験自体を法律で律しているのであるから、動物実験とそれ以外に分けて考えるというのは我が国独自の考えのように思われ、国際的に進めるべき科学の推進に必要な動物実験を考えると、その妥当性に反論の余地がありそうである。

実験動物の飼養保管ならびに苦痛軽減は本基準に従って法的規定を受けて行われることとなった一方、動物実験に関しては各省庁が傘下の研究機関に対して動物実験指針等を告示し、研究機関の自主的規制を求めている。各省庁の指針等はきわめて類似のものであるが、これとは別に日本学術会議は文科省と厚労省の依頼を受け、いわゆる詳細指針を発表している。この詳細指針は説明にあるとおり米国の動物実験の律しかたを参考に作成され、とくに米国で動物実験指針のバイブルとされているILAR (Institute of