

遺伝子改変動物を用いた生物試験研究

井上 達

The Use of Biotechnological Recombinant-Mice in Biological Safety Research

Tohru Inoue

Number of transgenic and knock-out mice increased rapidly during the last decade. This review article describes a potential usefulness of transgenic and knock-out mice for biological safety research with respect to each toxicological category for safety evaluations, such as studies for carcinogenicity, general toxicology, genotoxicologic testing, and immuno-toxicological evaluations. In the carcinogenicity, a possible model required for a short-term study in carcinogenicity was discussed. Further, a couple of future subjects were focused specifically on the biotechnology-derived pharmaceuticals and the biotechnical recombinant-mice as a second generation, i.e. experimental mice with double or multiple gene-recombination. Those usefulnesses were also introduced briefly. Establishing the biotechnical recombinant-mice for each safety testing contributes not only to simplify and qualify the on-going evaluation system, but also to the traditional animal studies to be re-evaluated, so that the solutions may lead them to a future in vitro-alternative system much smoothly. For general references, historical reviews on the biotechnical recombination in experimental animals were also briefly introduced to elucidate a new broad area in developmental biology.

Keywords : biotechnological recombinant-mice, transgenic animals, knock-out mice

(Received May 31, 1996)

1. はじめに

安全性にかかわる生物試験研究領域でも種々の目的で遺伝子改変動物が用いられるようになってきた^{1,2)}。この背景には、1) 細胞の分裂・増殖をはじめ、傷害や死といったごく一般的な生命現象に関連する分子や遺伝子の動態が急速に理解されるようになり、2) それらの知見がその一般性ゆえに個々の科学分野や、専門別・臓器別といった諸境界を越えて広くボーダレスに拡がり、3) 個々のノウ・ハウの幅広い相互利用が進展しつつあるという実態がある。ところでここで述べる遺伝子改変動物とは、同種もしくは異種の遺伝子を過剰もしくは新たに発現させた動物³⁾ (遺伝子導入動物=トランスジェニック動物、以下「ト」動物) および、未知もしくは既知の特定遺伝子の発現をむしろ欠失させることを目的とした動物⁴⁾ (標的遺伝子欠失動物=ノックアウト動物、以下“KO”動物) の双方を指している。両者は、遺伝子の“付加的発現”と“発現欠失”という相反した機能をもつこともさることながら、作製法も大きく異なり、したがって対象となる動物種は更に異なり、必然的に目的も異なっている。「ト」動物の場合はその目的によって導入する遺伝子は大腸菌からヒトに至る様々にわたり、また受け手の動物もこれまた大腸菌、酵母などの原核生物からマウス・ラット・ウサギのような小型

ほ乳類、ヒツジ、ヤギ、ブタ、更にはウシに至る大型家畜動物までの広範な動物⁵⁾ が対象となっている。また魚類や両生類などもその取り扱い易さなどからしばしば用いられている⁶⁾。KO動物はこれに対して現状では実際の手技と行程の煩雑さもあり、主として実験用のマウスが主な対象となっている⁴⁾。

こうした遺伝子改変動物を用いた研究の進展には眼を見張るものがあり、その歴大且つ多岐にわたる全般的な概説を行うことは本稿の目的でない。ここでは、それらのうち安全性生物試験研究に用いられつつあるか、もしくは今後積極的に利用されて良い遺伝子改変動物について通覧・考察し、この領域の将来像を展望する。特に安全性にかかわる生物試験研究に拘泥した理由は、これまでこの領域の試験研究では極く限られた遺伝子改変動物が用いられてきたに過ぎないが、その本来の可能性は広範にわたっており、近い将来は生物試験での少なからぬ部分が遺伝子改変動物を用いたものに置き換えられて行く可能性を十分に内包していると考えられるからである。当該遺伝子改変動物の作製法はすでにかなり普及しており、技術書^{3,4,7,8)} も少なくないので、これらの作製法については以下に簡単に略述するにとどめ、主に遺伝子改変動物の安全性生物試験研究への応用の現状と将来を概観し、最後に新世代の遺伝子改変動物、“複合型遺伝子改変動物”を用いた生物試験の可能

性についても展望してみたい。

2. トランスジェニック・マウス (「ト」マウス) の作製^{3,7)}

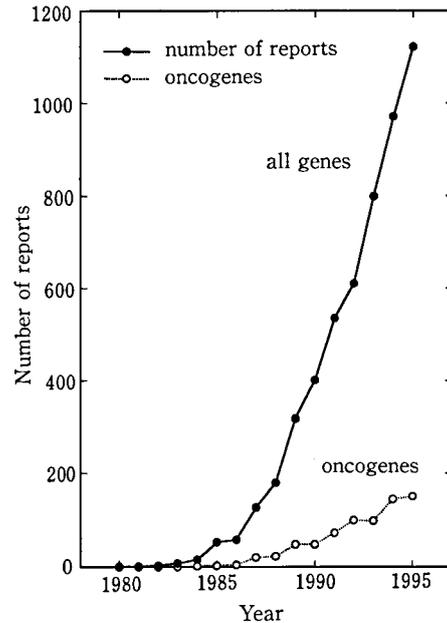
ある対象の遺伝子を株化された細胞レベルで発現させるためには、発現調節体と目的の構造遺伝子を組み合わせた“ベクター遺伝子”を構築して、電気穿孔法やリン酸カルシウム法などによって導入し、ついでこの導入クローンを選択することによって達せられる。一方こうした発現を「ト」マウスのような個体レベルで検証するためには、ベクター遺伝子をガラス・キャピラリーによる微小管で受精卵の前核に刺入する。刺入されたベクター遺伝子は、卵割過程でゲノム遺伝子に組み込まれれば、個体形成に応じて生殖細胞系列と体細胞系列とを問わず全身の細胞に組み込まれることになる。生殖系列に入った当該遺伝子がどの程度に恒常性 (stable) を維持し続けるかは異種の付加的遺伝子の場合、論理の上では未知の事柄に属するが、実質的には何世代にもわたって消失もせず、付加的な転換 (mutation) も生ずることなく維持され利用されている「ト」マウスが少なくない。

発現ベクター遺伝子を含む約 2 pl (500~1000 コピー程度) の微量な DNA 溶液を、位相差顕微鏡下で受精卵の前核に注入し、当該遺伝子の発現する「ト」マウスを Gordon たちが初めて作製したのは 1980 年のことであった^{9~14)}。ほどなく Brinster たち¹⁵⁾ が SV40 の largeT 遺伝子で、Stewart ら¹⁶⁾ が myc 遺伝子で「ト」マウスの作製に成功し、いわゆるがん遺伝子関連ではじめての「ト」マウスが誕生した。いずれも 1984 年のことであるから、がん遺伝子との関連で見るとその歴史はまだ 10 年余りを数えるに過ぎない。Fig. 1a および Fig. 1b は遺伝子一般とがん遺伝子とに分けて、「ト」マウスの報告論文数を表したもののだが、双方ともこの 10 年間にわたってその数がほぼ直線的に増加してきたことがわかる。

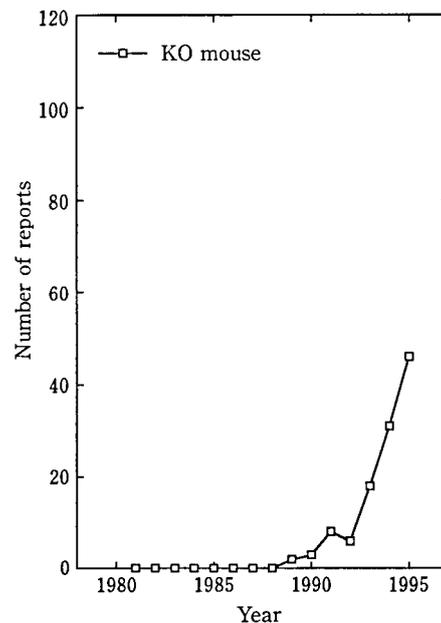
「ト」マウスの作製法には、この他に標的遺伝子の組換え法による発現法がある。このものは、標的遺伝子のノックアウト法に準じた方法によるので、次の KO 法の項で一括して述べることにする。

3. ノックアウト・マウス (KO マウス) の作製^{4,8)}

初期発生期の胚盤胞を構成する内細胞塊 (inner cell mass) 由来の細胞は多方向分化能を保持しており、これを樹立した細胞系を胚幹細胞とよんでいる。1981 年、Evans と Kaufman¹⁷⁾ および Martin¹⁸⁾ はそれぞれ別々に、この胚幹細胞を胚盤胞に戻すことにより、その移入した細胞を構成成分とするキメラ・マウスをつくることに成功した。KO マウスの作製は、この成功を基礎に、*E. Coli* などですでに進展していた相同遺伝子組換えを、あらたに発生工学的に一对の相同染色体をもつマウスへと適用したも



a)



b)

Fig. 1. Rapid increase in transgenic mice a), and the K. O. mice b) reported by year.

のである。いま胚幹細胞の遺伝子と相同遺伝子ベクターとを組替えるならば、組み換えた遺伝子の導入されたキメラ・マウスを作ることができるから、もし by chance で確率的にその相同遺伝子ベクターが生殖細胞系列に入った場合は、その F1 を交配することによって組み換え遺伝子を持ったマウスが生まれてくることになる。この方法であらかじめ標的遺伝子の発現が起こらないように破壊したベクターを用いることによって、標的遺伝子の全く働かないマウス、すなわち KO マウスを作製することができるし、

あらかじめ別の過剰発現ベクターを入れ替えておけば、前項で説明した「受精卵に遺伝子導入する方法」とは別のタイプの「ト」マウスをつくることができることになる。KOマウスは、gene targetingあるいはgene disruptionなどとも呼称される。標的遺伝子の機能を欠失させ導入細胞をクローニングする選別ストラテジーとしては、基本的にはCapecchiの“positive-negative selection法”が用いられている¹⁹⁾。この方法では、ネオマイシンやカナマイシンへの耐性遺伝子導入によって導入細胞クローンを選別(positive selection)するとともに、他方、相同組換えの目安として構築ベクターの末端にジフテリア・トキシン遺伝子やチミジン・キナーゼ遺伝子を組み込み、組み替えが非相同性で、これらが外れない場合には自滅するようにデザインしている(negative selection)。

以上の通り、「ト」マウスとKOマウスは先にも述べたとおり異なった作製法と機能をもつものであるが、両者を別々に分けて記述するのは項目毎の理解にかえて煩雑になるので、以下の論述にあたっては、両者を織りまぜて記述することとする。

4. がん原性試験

いわゆる“がん遺伝子 (oncogenes)”の導入実験は、「ト」マウスの開発当時はセンセショナルに受けとめられた。しかし、ケースを積み重ね、それら遺伝子の取られてきた背景データや、その元の遺伝子、(すなわち“がん原遺伝子 (proto-oncogenes)”)の機能の本態が明らかになるにしたがって、「ト」マウスの作製そのものは、必ずしも事前の予想以上の結果をもたらすとは限らないことが次第に明らかになってきた。しかしながら、初期のがん遺伝子の「ト」マウス作製研究は、「ト」マウスそのものに関する少なからぬ知見をもたらした。

初期のがん遺伝子「ト」マウス

実験的遺伝子発がんの例を幾つか列挙してみると、Table 1に明らかのように、*bcl-2*²⁰⁾のようないわゆるがん遺伝子を導入しても腫瘍の発現の見られなかったケース

Table 1. Classical transgenic mice and carcinogenicity

Genes transferred	
Oncogenes:	
abl	plasmacytoma
bcl-2	no lymphoma
bcr/abl	leukemia/lymphoma
Other genes:	
growth hormone	pancreatic tumors
GnR. H.*1	Neuronal tumors
IL-6*2	plasmacytoma

*1 Gonadotropin releasing hormone

*2 Interleukin 6

もある一方、成長ホルモンやサイトカインのように、細胞増殖を促す遺伝子群では、しばしばオートクライン (auto-crine) の形をとった腫瘍発現が観察されている。その背景には未知の事柄も少なくなく、「ト」マウスにおける遺伝子発現を支配する諸々の要因群にかかわる諸問題が関連しているものと考えられる。すなわちそれらの要因には、1) どんな発現調節体 (promoter/enhancer) で構造遺伝子の発現を促すか、2) 構造遺伝子そのものの構築とその性質 (周知のとおり p53 や ras などでは、野生型と変異型とでは発現態様が本質的に異なる)、3) 宿主の遺伝子の何れの部分に導入されるかに関わるいわゆる positional effect、および、4) 宿主因子とよばれる、同じ遺伝子でも導入する系統などによって遺伝子発現の態様が異なってくる現象などが知られている。例えば先の発現調節体について見ると、同じSV40のlarge Tの「ト」マウスでも、発現調節体にアルブミン・プロモータ²¹⁾やメタロチオネイン・プロモータ²²⁾を用いたものでは肝細胞がんが出現し、エラストラーゼIのそれを用いた際には膵臓の腺房腫瘍²³⁾、 α Aクリスタリンを用いたものでは眼球 (レンズ) 腫瘍²⁴⁾とそれぞれ異なって出現した。おなじSV40の初期T遺伝子プロモータと免疫グロブリンのエンハンサーをつないだ発現調節体を用いたSudaらの結果では脈絡叢の乳頭腫の発生を見ている²⁵⁾。これと逆に発現調節体の方を同じにして、構造遺伝子をいろいろ換えた場合はというと、免疫グロブリンのenhancerをSV40の初期プロモータと繋いだ同じ発現調節体で観察されたmyc, ras, およびlarge Tの誘導した腫瘍は、それぞれ全く異なった組織に全く異なった腫瘍を発生するといった結果であった²⁵⁾。宿主要因については更に未知の事柄が少なくない。Furutaらを作ったSV40 large T遺伝子の「ト」マウス^{25,26)}は、C57BL/6とCD1のF1を背景としていたが、当初この「ト」マウスはすべてがB細胞リンパ腫を発症したにもかかわらず、B6マウスに戻し交配するにしたがって発症腫瘍のスペクトラムが変化し、やがて骨髓異形成症候群を好発する極めて特異な系統に変化した^{26,27)}。遺伝子改変動物作製の基礎になっている分子生物学や発生工学が、今日なお龐大な未知の部分を抱えたままの状態のツールである以上、こうした現段階では説明のむつかしい現象との遭遇もやむを得ざる今後の課題と考えるべきものかもしれない。

この10年間、がん遺伝子を対象とした「ト」マウスの開発は、全「ト」マウスの14~5%とほぼ一定の比率で増加している。

myc 遺伝子導入マウス

バーキット・リンパ腫では、mycが免疫グロブリン・エンハンサーの下流に転座することによって活性化していることが知られている。このマウスは、それにならって遺伝子発現が構築されたもので、すでにAdamsらによって

1985年に作製されている²⁸⁾。mycは、いわゆる“がん遺伝子”が本来の調節機構から離れて過剰に発現すると腫瘍発生につながることを *in vivo* レベルで示された最初の例と考えられる。mycを単独で強制発現させた場合、Table 1でも見たように、腫瘍発生が起こる場合と起こらない場合があるが、その理由はmyc遺伝子の機能の全貌が明らかでない現時点では説明ができない。しかしこのことはmycの「ト」マウスでの腫瘍発生が、しばしば頻度は高いが、発症時期の短縮は認められないという背景と併せて興味深い²⁹⁾。myc遺伝子のこうしたいわば化学発がんにおけるプロモーター作用と似た働きは、myc導入「ト」マウスの造血幹細胞の細胞周期が未熟な幹細胞レベルでのみ亢進していて、分化型のそれでは終息している事実とも関連しているものと考えられる²⁹⁾。ここでは未熟型の幹細胞から分化型のそれに分化する過程で大々的なアポトーシスのような事態が起こっていることが想定され、そのことは先のバーキット・リンパ腫で、いわゆる starry sky 現象と呼ばれるアポトーシス所見が多発することとも符合する。以上の性質を総合すると、mycの「ト」マウスは、適当なイニシエーター高感度「ト」マウスと組み合わせることにより、がん原性試験の早期アッセイ系の開発に有用であるものと考えられるが、そうした複合遺伝子「ト」マウスについても、最後の項でふれる。

ras 遺伝子導入マウス

ras 遺伝子には、Harvey肉腫ウイルスがラットのゲノムから形質導入した、12および59番目のアミノ酸に変異をもつv-oncのv-Ha-ras³⁰⁾と、そのプロト型でヒト膀胱癌細胞株T24/EJから分離されたc-oncのc-Ha-ras³¹⁾の他、ヒト神経芽細胞腫由来の活性c-onc、c-N-rasなどras群として総称される一連の遺伝子群があり、細胞内シグナル伝達の重要な経路を構成しているものと考えられている。動物細胞における作用機構は確定していない。すでに見てきたようにこのrasの「ト」マウスは初期より作製されており、がん研究それ自体としての意義もさることながら、その比較的広範な腫瘍発生スペクトラムに着目したがん原性試験への応用の可能性が模索されてきた。v-Ha-rasの「ト」マウスでは、LederらによってTPAによる皮膚の乳頭腫 (skin papilloma) の誘発が早くから観察されており³²⁾、93年には benzoyl peroxide, 2-butanol peroxide, phenol, acetic acid などの種々の化学物質での検討も試みられた³³⁾。他方、活性型rasの遺伝子の「ト」マウスについては、発生期に異常が観察された³⁴⁾。これと相俟って、Saitohらはプロト型Ha-rasの「ト」マウスを開発した³⁵⁾。この「ト」マウスは、生後1年半までに約60%に血管肉腫や肺の腺腫などの自然発生腫瘍を生ずるという腫瘍の好発性を示したが、それらの腫瘍発生の際に導入したヒトras遺伝子特異的にその12番目や60番目のアミ

ノ酸コドンに変異を惹き起こすという特徴をもっていた³⁵⁾。この現象の理由は明らかでないようであるが、この「ト」マウスを発がん性試験に用いることにより、腫瘍の実際上の発生部位の検索にとどまらず、非腫瘍性の諸組織での変異のアッセイを行うことによって、当該物質の発がん性の臓器特異性を予測する可能性に期待が寄せられている。

p53 遺伝子欠失マウス

p53 ははじめ大腸がんなどで変異蛋白として取られたが、その後その遺伝子はいわゆる“がん抑制遺伝子”であることが明らかとなり、サイクリン依存性キナーゼの発現を介して細胞周期の抑制的制御に関与することが明らかになっていった^{36,37)}。したがって Donehower ら³⁸⁾、Tsukada ら³⁹⁾、Jacks ら⁴⁰⁾、によって相次いでこのものの欠失マウスが作られたとき、それらの胚発生過程にとくに異常が見られなかったことは驚きをもって迎えられた。p53 遺伝子発現は胎生後期で減少しているとのことなので、ここでの関与が少なかったということかもしれない。p53 遺伝子欠失マウスでは自然発症でも放射線や化学物質による誘導でも基本的に腫瘍が好発する^{38,40)}。その腫瘍発生スペクトラムは、背景となるマウスの系統によって異なるようである⁴¹⁾が、ホモ欠失では2~6ヶ月で胸腺腫、ヘテロ欠失では1年程で様々な肉腫性腫瘍が多発している⁴¹⁾。p53 欠失マウスは、放射線誘発腫瘍の感受性が高く⁴²⁾、また、dimethylnitrosamine 誘発の肝腫瘍の発生が早期に認められた⁴³⁾。放射線などによるDNAの傷害に際して誘導されるアポトーシスの阻害⁴⁴⁾や、DNA傷害の修復機構が働かなくなることなどがその背景にあるものと考えられている⁴⁵⁾。Tennant らは p53 欠失マウスを発がん性試験に利用する可能性を追求する立場から、種々の化学物質に対する試験を進めている。これによれば、DNA傷害を伴うがん原物質として、Benzene, 1-chloro-2-methyl propene, *p*-cresidine, 7,12-dimethylbenz[*a*]anthracene, urethane など、非遺伝毒性のがん原物質として、*o*-benzyl-*p*-chlorophenol, ethyl acrylate, mirex など、また、非がん原性の対照物質として、2-chloroethanol, benzethonium chloride, phenol などがすでに試みられている⁴⁶⁾。

その他の抑制遺伝子 KO マウス

Rb 遺伝子は網膜芽細胞腫で欠失の観察される抑制遺伝子であり、細胞周期の制御にかかわることが知られている。このものの欠失マウスは、ホモ欠失は、死産であることが確かめられており⁴⁷⁾、また、Jacks らは、このヘテロ欠失マウスで発がん実験を行うと、腫瘍組織ではホモ欠失となっていることを見出した⁴⁷⁾。

発がん性試験における遺伝子改変動物の問題点

発がん性試験に遺伝子改変動物を用いるとき期待される点は、主として腫瘍の好発性と早期発症性にあり、更にこれにもとづく短期アッセイ系としての可能性がある (この

場合、もとより両者間での遺伝子の不安定性の誘導効率そのものに開きが認められ、齧歯類における発がん性がヒトのそれを正しく反映するか否かについて解明すべき点があるわけだが、ここではそうした点は検討の対象としない)。そこで必然的に問題となるのは、1) 腫瘍の好発性にともなう無処置群での自然発生腫瘍頻度の上昇の有無、2) 腫瘍の病型スペクトラムの変化の有無、などといった事柄である。この場合、実験用の齧歯類が背景データとして自然発生腫瘍を生じるメカニズムと誘発性腫瘍の発症メカニズムとでは相互にどのような本質的な違いがあるかがこれらの解決の糸口となろう。現在の腫瘍学はまだ正確なこの解答をもたないが、p53 欠失マウスにおける実際のデータの示すところをみると、自然発生腫瘍と誘発性腫瘍の間には時間的に明確な分解点は、見出し難いのが実態である。発生腫瘍スペクトラムの問題も、当該の操作遺伝子がそれなりの機能をもつ限り、その機能を過剰にしたにしても、欠失させたにしても、そのことに直結しやすい腫瘍の頻度が突出してくるとか、何らかのスペクトラムのシフトが生じないとはむしろ考えにくい⁴⁸⁾。ただし、これまでに得られた結果を通覧すると、実質的には大きな変化の見られないケースもこれまた必ずしもない訳ではない⁴⁶⁾。

カロリー制限は自然発生腫瘍のみならず化学発がんや放射線発がんに対しても抑制的に作用する⁴⁹⁻⁵²⁾。その原因を求めてカロリー制限下でのがん遺伝子の発現やDNAのメチル化の測定などがなされている^{53,54)}が、この現象をよく説明する定説はない。

この現象は p53 欠失マウスでも観察されており⁵⁵⁾、自由摂餌の 60% のカロリー制限は、腫瘍発生の遅延を生ずると同時に、前者の平均寿命 16 週に対して、後者のそれを 25 週へと延長した。こうした条件下で化学発がんを見たとき、対照群との腫瘍発生時期の乖離がよくなるならば、p53 KO マウスを用いた発がん性試験の分解点のよい早期アッセイ系が樹立できる可能性がでてくる。筆者等のこうした視点にたった C3H/He 系マウスで観察される放射線誘発による肝腫瘍の解析結果では、その頻度は、3Gy 照射の実験群と非照射の対照との時期的ズレが約 90 日程度であるのに対して、カロリー制限下での両者のズレは 140 日に達し、明らかに両群の頻度分布の乖離がよくなっていた⁵⁶⁾ (Fig. 2)。

5. 一般毒性試験

一般毒性試験への応用のための戦略

もとより一般毒性は、がん原性試験の方に“腫瘍の発生”という極めて明確なエンドポイントがあることに較べれば、その観察対象は、細胞の傷害・変性・壊死などの退行性変化をはじめ、肥大、増殖、分裂、などの進行性変化、更には前腫瘍性変化などもその対象となるので、それだけ

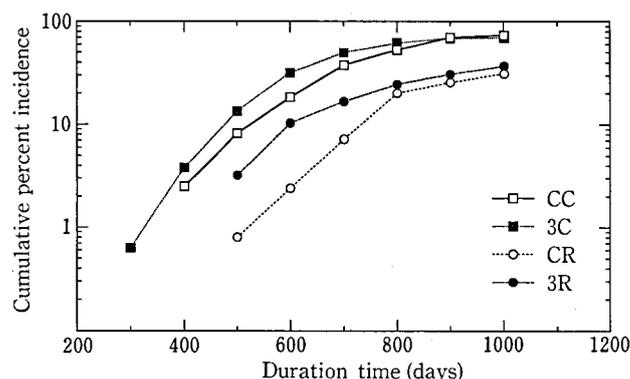


Fig 2. Effect of caloric restriction on the cumulative incidences of hepatomata in the C3H/He mice with or without 3Gy whole-body irradiation. The control diet without radiation (CC), the control diet with irradiation at 3Gy (3C), the group with restriction with or without radiation (3R and CR).

見ても多様で、しかもその発生原理は明らかに単純でない。例えば細胞の傷害ひとつをとってみても、細胞骨格の形成傷害とミトコンドリアにおける酸化的傷害では現象も原理も全く異なるわけである。細胞や分子の面から見たときに共通のルートを持たないこれらの雑多な現象をモニターする一般毒性試験を対象とした遺伝子改変動物を作製するストラテジーは、したがって必ずしも単純ではない。

一般毒性試験に遺伝子改変動物を用いる際に求められる一般論としてのメリットには、鋭敏さ、定量性、および、ヒト型反応性などがあげられる。遺伝子改変動物のそうした面からの利用を強調する報文が急増している^{1,2,57,58)}。先に述べた難しさもあって、これらの報文は多分に一般論にとどまる^{1,2)}か、特定物質のいわば特殊毒性に対する高感度検知システム、例えばダイオキシンに対する高感受性マウス⁵⁷⁾といったたぐいのいずれかを論じたものが多い。

細胞死の機構としてこのところ重要性を増しているアポトーシス (apoptosis) は、様々な細胞傷害の共通のエンドポイントをなしているかに見える。一般毒性試験を細胞傷害という点に注目して括ったとき、こうしたアポトーシスを指標とする試みは、毒性発現のかなりの部分をカバーすることができるものと期待される。増殖性の細胞毒性でさえもこれに先だって細胞傷害が生ずることが少なくないであろうから、充分検討に値するものと考えられる。こうした点に着目したアポトーシスの高発現系マウスの作製といった試みはまだ見られないようであるが、筆者等はこのものの可能性に注目している。

すでに毒性試験に用いられている幾つかの遺伝子改変動物の特徴を見てみよう。これらの遺伝子改変動物の構築ストラテジーは、1) 解毒代謝系酵素の過剰発現系「ト」マウスを作製し、当該酵素の動きの鋭敏な検出系として利用する方法、2) 逆に、当該酵素の欠失系 KO 動物をつくり、

その動物の検体への鋭敏な反応（生死など）を指標としバイオアッセイ系として用いる方法、に大別できるが、更に、3) 特定の傷害物質について、その受容体過剰発現系を作製し、通常観察できない反応の検出系を樹立する方法もある。

解毒代謝酵素の過剰発現系「ト」マウス

前述の1)の視点から代表的な遺伝子改変動物を通覧すると、ペルオキシゾーム酵素や、P450 4A1のようなものの過剰発現「ト」マウスを作製し、これらが鋭敏に働く代謝系モデルを作っておき、薬物投与にしたがって、その発現をレポーター遺伝子もしくはmRNAレベルで検知するもの⁵⁹⁾や、メタロチオネイン (metallothioneins, MTs) がアルキル化剤にたいして保護的に働くことを期待して、このものの過剰発現系を作製する試み⁶⁰⁾などが見られ、先の1)の範疇に属するものと理解される。特筆される試みとして、Kamatakiらは、CYP3A7のcDNA導入過剰発現系で且つp53を欠失した、マイコトキシンに高感受性のマウスの系統を樹立した⁶¹⁾。作製者らは、この複合型遺伝子改変マウスから樹立した肝細胞は、マイコトキシンとテラトジェンの双方への高感受性アッセイ系となるであろうとし、引いては胎生期の化学物質暴露でのよい胎児毒性標的となることを期待している⁶²⁾。

メタロチオネイン遺伝子改変動物

これに対してMTsのIおよびII遺伝子^{63,64)}や、MnタイプやCu/ZnタイプのSuperoxide dysmutase (SOD)のKOマウスが作製されており、これらは2)の範疇に該当する。これらの研究の背景としては、まずMTsの「ト」マウスが作られてる。このMTs Iの「ト」マウスは、MTレベルが通常マウスの4~5倍であった。しかし亜鉛(200 mmol/kg)、カドミウム(20 mmol/kg)、ジエチルマレイン酸(5 mmol/kg)などのMT誘導剤の投与に対しては、特段の変化が見られなかった⁶⁰⁾ということであるから、このものの利用については、更に別の角度からの検討が必要である。こうした背景に作られたMTsのKOマウス⁶³⁾の反応性は、このものから取った胚幹細胞では、硫酸カドミウムに対して高度の感受性を示した他、*tert*-butylhydroperoxideによって惹起した酸化ストレスに対しても高い感受性を示した⁶⁴⁾。このマウスでは、グルタチオン、Cu/Zn型SOD、グルタチオン・ペルオキシダーゼ、あるいはカタラーゼのレベルには変化が見られなかった。それにも拘わらずホモ欠失のこの細胞系は*tert*-butylhydroperoxideに対して更に感受性が高かったということで、作製者のChooらはMTレベルが細胞内レドックスの制御に関わるものと推測している。

アリル・ハイドロ・カーボン (Ah) 受容体欠失マウス

上記の3)に属する遺伝子改変動物としては、ゴンザレス(Frank J. Gonzalez)らが作ったダイオキシン類を媒

介するアリル・ハイドロカーボン (Ah) の受容体の欠失マウスが注目を集めている⁶⁵⁾。このマウス (*Ahr*^{-/-}) では、肝重量が50%程度と小さく、リンパ節や脾臓の発育が悪い反面、胸腺のそれには異常がなかった。このもののそうした変化とダイオキシン類の毒性との関連が明らかになるには今少し時間が必要のようであるが、ダイオキシン類の毒性発現機構の解明の糸口が切り開かれた意義は大きい。

6. 遺伝毒性試験

*In vitro*の変異原性試験の延長線上に開発された一連の変異試験用「ト」マウス、通称“ミュータ・マウス (Muta[®] Mouse)⁶⁶⁾”と“ビッグ・ブルー・マウス (Big-blue[®] transgenic mouse)⁶⁷⁾”は、前者は*lacZ*、後者は*lacI*を組み込んだλファージシャトルベクターの導入マウスで、被検物質の暴露後、種々の組織から回収したファージの変異の有無をX galの発色系で検出するものであり、変異の組織特異性の同定がポイントとなっている。

変異の組織特異性を検出する2系統のマウス

Mutaマウスは、オランダのTNOで老化研究に携わっていたKnookらのグループによって開発されたもので、λgt10の*EcoRI*制限酵素切断部位に大腸菌*lacZ*遺伝子を約80コピー変異標的として挿入したCD2F₁ (BALB/c × DBA/2)系マウス(その後種々の交配系がでてい⁶⁸⁾である。このものでは、250 mg/kg.b.w.までのENU (*N*-ethyl-*N*-nitrosourea)の単回投与で用量相関的な変異が検出され、250 mg/kg.b.w.における変異頻度は、肝臓で 3.0×10^{-5} であったのに対して、脳では 7.4×10^{-5} で、しかもGC/AT転移が生じていたという⁶⁹⁾。組織特異性が検出できる変異原性試験としてのMutaマウスの有用性はこのようなかたちで“証明”されているが、他方ビッグ・ブルーの方は、Stratagene社のC57BL/6由来マウス^{67,69)}で、前述の通り*LacI*を用いており、ガンマ線(セシウム137)の影響をみたWinegar-Richardらは、0.4~14 Gyにわたって調査し、線量に応じた変異頻度の上昇とともに、当該*lacI*遺伝子の再構成をも確認している⁷⁰⁾。これらの「ト」マウスを用いた*in vivo*変異原アッセイはその後、精力的に実用化研究がなされており⁷¹⁻⁷⁷⁾、また、それら双方を比較して検討した報文も見られる⁷⁸⁾。

権藤と勝木はHITEC (Hypersensitive *in vivo* test of carcinogenicity)マウスと呼ぶ、大腸菌の*rpsL*遺伝子を標的として導入した「ト」マウスを開発した⁷⁹⁾。これは*rpsL*遺伝子をもつ大腸菌プラスミドpML4がシャトルベクターとして導入されており、*rpsL*遺伝子がストレプトマイシン (SM)耐性の大腸菌を形質転換しSM感受性にするが、ここに*rpsL*遺伝子の変異がおおると、SM耐性そのまま維持されることを利用している。

このようにバクテリア遺伝子を標的としたこの種の一連

の「ト」マウスは、変異原性と、その組織特異性の双方のアクセスを可能にする系として期待されているが、その問題点として指摘されているのが、“鋭敏性”の問題である。ここで指摘されている“鋭敏性”とは、陽性群と対照群との分解点 (resolution) の改善の問題である。更に、先のミュータ・マウスとビッグ・ブルーの双方の「ト」マウスを評価した Sofuni らの研究グループでは、これらの系が広く普及するための隘路として、費用と労力がかかりすぎる点を指摘している⁸⁰⁾。いずれ近い将来、より分解能の良い安価で、アクセスの平易なこの種の「ト」マウスが本邦においても開発されることが強く望まれる。

7. 免疫毒性試験

免疫毒性試験に遺伝子改変動物を導入する考えは余り一般的ではない。免疫現象が多種類の細胞の特にオーケストレーションの名に相応しい共同作用によって構成されるものだけに、その免疫現象に傷害を生ずるメカニズムそのものは、必然的に多岐にわたったものとなる⁸¹⁾。それらの反応の何らかのエンドポイントを誇張して共通して観察するような系が、単一もしくは幾つかの限られた遺伝子の組み合わせ変異によって得られるとは思われない^{82,83)}ので、これはやむを得ない実態とも考えられる。そういったわけで遺伝子改変動物を用いることによって、通常免疫毒性試験で得られないメリットのあるものという視点で見直すと、つぎの2つのタイプの動物の開発が考えられる。

ヒト型動物と修復遺伝子欠損系の応用

すなわち、その第一は、一連のヒト型免疫組織機能アクセス動物で、ヒトのいずれかの免疫組織を移植したアクセス動物を構築するもので scid (severe combined immune deficiency) の系がしばしば用いられ、scid-hu 系と呼称される。第二は、免疫系の傷害が誇張された形で発現することを期待して作られる修復遺伝子傷害系の改変動物で、論理の上からは、DNA などの修復欠陥動物が対象となる。前者の例としては、勝木らによって進行中の“ヒト型マウス”作製のプロジェクトの行方が注目される他、J. G. Vos らが胸腺欠失のヌードラットを用いて長年にわたって続けているヒト胸腺移植ラットの利用⁸⁴⁾および、その延長線上の scid マウスにヒト胸腺を移植して、この移植胸腺への影響を観察する系とがある。De-Heer らの scid-hu 系でのダイオキシンの毒性観察実験⁸⁵⁾によれば、移植ヒト胸腺組織の皮質は、TCDD の濃度 (1, 5, 25 mg) に相関して萎縮し、25 mg では有意であったという。現状においてはこの scid-hu 系がヒトへの外挿のよい橋渡しとなる実験系⁸⁶⁾となることは疑いのない事実である。しかし先の De-Heer らの実験でも少なからぬ皮膚 GvH 反応が観察されており、ここに、scid-hu 系を上回る抜本的なヒト型マウスの望まれる所以がある。後者の第二のタイプに

属す例は、具体的には見られない。免疫毒性の性質にもよるが、p53 欠失マウスや scid マウスで観察される免疫毒性傷害は、少なくともこれが細胞死や遺伝子傷害を伴っている限り、これらのマウスでは回復が困難と考えられるからこれを検知系として用いる方法が期待される^{44,87)}。これらのマウスでは、その傷害がいわば“固定”された状態ともいふべき誇張された形で観察される可能性が予想されるので、これをリスク評価に応用しようというものである。ヘテロの scid マウス (+/scid) を用いて観察される免疫組織の変化は、それが免疫担当細胞の死につながる傷害ならばその回復は遅いので検出効果が高まる可能性がある。他方、p53 欠失マウスの方ではアポトーシスが生じにくいので、その場の免疫反応に見かけ上の変化は見られないかもしれないが、担当細胞系の細胞群を回収して調べると、何らかの遺伝子レベルでの変化が観察される可能性も期待される。

8. バイオ製剤と遺伝子改変動物

バイオ医薬品の安全性に関する考えかたを国際間で協調する討議が ICH (International Congress of Harmonization = 医薬品規制国際協調推進会議) のひとつの分科会で進められている。ここで検討課題となっている点は、“バイオ医薬品が、とりもなおさずヒト型蛋白製剤に他ならず、したがってこのものの多くは必然的に動物試験が意味をなさない事態が少なくない”ということであり、これに対する合理的な対応策は如何にあるべきかということについてである。

動物試験が意味をなさない事態の背景とは、1) 試験動物の被検物質に対する抗体産性ゆえに反復投与やがん原性などの試験が成立しないこと、2) 当該のリガンドがしばしば受容体との親和性を全く持たないこと、したがって何等の薬理効果も観察し得ないことなどが対象となるが、更に、3) リガンドにたまたま特異的もしくは非特異的に交差性のある別の受容体を認識して作用を惹起するという特異な可能性も論理上は想定され、従来の薬物で見られなかった甚だユニークな問題を内包している⁸⁸⁾。

バイオ製剤特有の作用機序とその対策

ヒト由来蛋白の安全性の問題には上記の諸点にとどまらない、薬効動態面からの解決の困難な現象が含まれている。この点については、もともとヒト型の物質であるだけに本来の生体内物質との同一性が確かめられてさえいれば安全性には問題はないであろうといった考えに陥りがちな面があるが、実際には、必ずしも単純ではない。これについては現在のところ十分な整理がなされているわけではないが、およそ Table 2 に示すようなバイオ医薬品に特有な幾つかの諸現象が想定される⁸⁸⁾。この表は、サイトカインを念頭に置いて作られているが、この表に見られるように、バ

Table 2. Possible sample problems by biotechnologically produced cytokines

Phenotypes	Molecular background	Possible sample hazards or outcome
selective action based on receptor(s)	requirement for receptor(s)	receptor diseases (possible hypersensitive reactions)
species difference	possible different sub-unit system	requirement of homologous protein for animal testing
pleiotropism	inter-organic wide-distribution of receptor(s)	unfavorable side effects in distant organ(s)
redundancy	subunits-sharing, and signal cross-talk	unfavorable down-moduration of receptors for related cytokine(s)
discontinuity of dose response	hetero-oligomerization of subunit system	difficulty in experimental or preclinical dosimetry
possible signals for cell death or cell growth	intra-cytoplasmic signal cross-talk	unfavorable accidental signal for cell-death/cell-growth

イオの薬物にあっては、先ずその影響は受容体の有無とその程度によって影響される。そしてそれら受容体は、種が異なるにしたがって対リガンド親和性の面、あるいは受容体の構造上の違いによって作用が異なることも知られている。プレイオトロピズムとは臓器を越えた広範な部位での受容体発現を、リダンダンシーと呼ばれる現象は、種々のリガンドが受容体のサブ・ユニットを共用することがあることを意味している。こうしたサブ・ユニットの存在様式によっては用量相関関係が直線性を示さないということも想定される。こうした予想の困難なヒト型サイトカインの作用の把握は、通常の薬理動態によって把握できる可能性は乏しい。ここで強調されるのは、受容体遺伝子の「ト」マウスなどによるヒト型受容体動物⁸⁹⁾の利用についてである。受容体「ト」マウスが正しくヒトとミミックな受容体分布を示すかどうかは分からないし、homologousな受容体遺伝子の機能が、同じ機能をもつ保証はない。ヒトにおける発現分布様式と異なったものとなる可能性はむしろ否定できない。しかし上記のような背景にあっては、安全性を確かめる上では有効な手段のひとつといわねばならない。併せて、これらのマウスでもがん原性試験などのような長期投与実験は行うことができないので、ここでも文字どおりのヒト型マウスの樹立が強く期待されるのである。

9. 第2世代遺伝子改変動物の将来

遺伝子改変動物の機能を概観すると、がん原性試験にとどまらず、種々の生物試験で、単一の遺伝子の変異改変のみでは充分な検知システムの樹立には無理があるということが次第に明らかになって来つつある。もちろんこうした見地から作られるマウスがかえって複雑になりすぎては、従来の生物試験の実験系の単純化と理論化への方向性から本末転倒してしまうが、実例をあげて検討するとその有用性は明らかである。一般毒性の項で引用したKamatagiらの試みたp450酵素、CYP3A7のcDNA導入過剰発現系で、かつp53遺伝子を欠失した、マイコトキシンに高感受性のp53欠失マウスなどは、そうした延長線上に開発さ

れた複合遺伝子改変動物である^{61,62)}。ある種の遺伝子毒性検出系をより高度の感受性を持ち、かつ、その遺伝子傷害の修復系を欠失させることによりpotential lethal damageのような更に潜在的な変化をもカバーする遺伝子改変動物なども開発の期待されるものである。この領域の研究はまだ緒についたばかりなのでここでレビューする段階ではないが、将来の展望としては重要な点であるので、最後にわざわざ一項を設けた。

10. 補遺：プリオン遺伝子研究をめぐる最近の話題

伝達性海綿状脳症、いわゆるプリオン (prion=PrP) 病は、その“伝達”様式や病因に未知の事柄が多く、大きな問題となっているが、この研究での遺伝子改変動物の果たしている役割には注目すべきものがある。PrP遺伝子は、Oeschらによって1985年に明らかになったが、その後間もなく作製された、マウス型のPrP遺伝子をハムスター型に置換した「ト」マウスは、プリオン病の一種であるスクレイピーの発症が有意に早かった⁸⁹⁾。変異PrPの遺伝子を導入したものでは自然発症も認められ⁹⁰⁾、更にマウスのPrP遺伝子の一部をヒトのPrPと置換したキメラ遺伝子「ト」マウスでは、クロイツフェルト・ヤコブ病で死亡した患者の脳組織の移植により対照の40%という短時間で病変が伝達された⁹¹⁾。驚きを持って迎えられたのは、このもののKOマウスであり、Bülerらの報告⁹²⁾によれば、このものではマウスの発育に全く異常がなかったばかりでなく、スクレイピー感染マウス脳乳剤の接種で発症がみられなかった。そして翌年、このマウスがPrPに対する抗体を作ることも直ちにPrusinerによって突き止められた⁹³⁾。最近Fischerらは、マウスのPrPのKOマウスに対して、あらたに人為的に一部を削った変異PrP遺伝子を導入するという複合操作を行い、脳乳剤による発症の極めて短い変異マウスを作製⁹⁴⁾し、安全性研究の面からも鋭敏で実用的なアッセイ系を開発することに成功した。伝達性海綿状脳症におけるこうした遺伝子改変動物のすばやい開発過程は、基礎と応用が同時に進行しつつある今日

の科学の方向性を如実に示しているように思われる。

11. おわりに—代替法試験研究などに関連して—

生物試験研究に種々の「ト」マウスやKOマウスを用いる可能性について、各々の毒性試験においてその意義を論じた。発がん試験や遺伝毒性にとどまらず、種々の毒性を含む生物試験全般にわたった「ト」マウスやKOマウスの利用の展望は、毒性学に関連した日米非エネルギー研究交流計画の一環で米国のFDAを訪問した際、Cordaro博士との討論の際にも話題になった。Cordaro博士は氏の考えを1989年のRisk Analysis誌に掲載していたが、その内容は、実質的には発がん試験を主としたもので、他の毒性面を対象とした論議は殆どしていなかった。それは「ト」マウスやKOマウスの当時の開発状況から考えるならば、そして僅かばかり前とはいえ、この領域の急速な進展の度合いからみるならば、それはやむを得ない事情であったともいえる。翻って、今日にあっては、もっと有機的で効果的な遺伝子改変動物の将来展望が可能となっている。それだけ多くの進展がここ数年に集中している。こうした認識にたつて本稿を新しく纏めてみようという動機が芽吹いてきた。本稿は、こうした背景に基づいている。

遺伝子改変動物を用いた試験研究の進展と相まって、他方、動物実験に対しては、*in vivo*の試験法を*in vitro*試験への置き換えることの可能性を追求する波が押し寄せている。こうした“代替法 (alternative methods)”研究の牽引力は、科学技術本来が内包する原理の解明・メカニズム研究への意欲と、製品を生産する立場からの将来的な経済効果への期待とが複合している。意外な印象をもって受けとめる向きもあろうが、今回論じた遺伝子改変動物の開発と利用は、こうした代替法を推進する科学の流れと同一線上の重要な一課題であり、それはむしろ代替法を推進する科学的・理論的基礎となるものである。このことは、もっと広く認識されてよいが意外に知られていない。蓋し少なからぬ個体動物試験が、しばしば幅広い標的スペクトラムをもった応用性の高い試験法である反面、それら個々の現象に対する原理的意味は必ずしもよく分析されないまま、“毒性現象”という龐大な現象論が一人歩きし、その枠内からみることが“毒性”を認識する唯一の手段と錯覚されていることが少なくない。今日の動物試験法にはそうした従来の試験法の、細胞機能や分子機能への置き換えによる理論化が求められている。先にOhnoら⁹⁰⁾によって分析の進められているDraizeの眼粘膜刺激試験法⁹⁰⁾の*in vitro*代替法試験への置き換えへの試みは、そうした意味で貴重な試みといえよう。現象の理論化の延長線上に位置する遺伝子改変動物の作製は、こうした試みと同一線上の意味を持つことを改めて強調しておきたい。他方、代替法の推進にとっても、そうした*in vivo*試験と*in vitro*試験

の綿密な摺り合わせ過程を踏まずに直接*in vitro*の系への置き換えを急ぐと、意外なデッド・ロックに直面することが少なくないという代替法の側の問題点を内包している⁹¹⁾。代替法研究の推進のために遺伝子改変動物の開発がますます重要性を帯びていることが代替法推進のためのワークショップで強調される背景がこのあたりに在ることも併せて紹介しておきたい。

たまたま筆者らには、畏友、相澤慎一教授 (熊本大学) との共同研究を通じて、諸領域の少なからぬ遺伝子改変動物と接触する機会が与えられた。筆者ら自らも、サイトカイン受容体を中心とした少なからぬ「ト」マウスの作製に関わり合ってきた。こうしたこれまでの経過が、結果としてこの主題での執筆を引き受けることに繋がったものであるが、安全性分野の生物試験研究は広範にわたり、それらすべてをカバーすることはなかなか困難なことである。いずれこれら遺伝子改変動物の将来的な普及とともに、諸家の協力も得つつ更にきちんと纏め直す時期が遠からずやってくるものと思われる。

文 献

- 1) Cordaro J. C.: Transgenic mice as future tools in risk assessment. Risk Analysis 9: 157-68 (1989)
- 2) Andrews G. K.: Environmental toxicology using transgenic mouse models. Crisp Data Base National Institutes of Health. (1994)
- 3) Hogan B, Constantini F, Lacy E.: Manipulating the Mouse Embryo. New York, Cold Spring Harbor Laboratory Press, 232 (1986)
- 4) Robertson E. J. Ed.: Teratocarcinomas and Embryonic Stem Cells. A Practical Approach, IRL Press, Oxford, pp. 260 (1987)
- 5) First N. L.: New animal breeding techniques and their application. J Reprod Fertil Suppl 41: 3-14 (1990)
- 6) Du S. J, Gong Z, Hew C. L, Tan C. H, Fletcher G. L.: Development of an all-fish gene cassette for gene transfer in aquaculture. Mol Mar Biol Biotechnol 1: 290-300 (1992)
- 7) 野村達次, 勝木元也: 発生工学実験マニュアル—トランスジェニックマウスの作り方, 講談社サイエンティフィック, 東京, pp. 232 (1987)
- 8) 相澤慎一: ジーンターゲティング—ES細胞を用いた変異マウスの作製, 実験医学別冊バイオマニュアルシリーズ 8, 羊土社, 東京, pp. 174 (1995)
- 9) Gordon J. W, Scangos G. A, Plotkin D. J, Barbosa J. A, Ruddle F. H.: Genetic transformation of mouse embryos by microinjection of purified DNA. Proc Natl Acad Sci USA 77: 7380-4 (1980)
- 10) Gordon J. W, Ruddle F. H.: Integration and stable germ line transmission of genes injected into mouse pronuclei. Science 214: 1244-6 (1981)
- 11) Gordon J. W, Ruddle F. H.: Germ line transmission in transgenic mice. Prog Clin Biol Res 85PtB: 111-24 (1982)
- 12) Palmiter R. D, Brinster R. L, Hammer R. E, Trumbauer M. E, Rosenfeld M. G, Birnberg N. C, Evans R. M.:

- Dramatic growth of mice that develop from eggs micro-injected with metallothionein-growth hormone fusion genes. *Nature* **300**: 611~5 (1982)
- 13) Palmiter R. D, Chen H. Y, Brinster R. L.: Differential regulation of metallothionein-thymidine inase fusion genes in transgenic mice and their offspring. *Cell* **29**: 701~10 (1982)
- 14) Gordon J. W.: Studies of foreign genes transmitted through the germ lines of transgenic mice. *J Exp Zool* **228**: 313~24 (1983)
- 15) Brinster R. L, Chen H. Y, Messing A, van Dyke T, Levine A. J, Palmiter R. D.: *Cell* **37**: 367~79 (1984)
- 16) Stewart T. A, Pattengale P. K, Leder P.: Spontaneous mammary adenocarcinomas in transgenic mice that carry and express MTV/myc fusion genes. *Cell* **38**: 627~37 (1984)
- 17) Evans M. J, Kaufman M. H.: Establishment in culture of pluripotential cells from mouse embryos. *Nature* **292**: 154 (1981)
- 18) Martin G. R.: Isolation of a pluripotent cell line from early mouse embryos cultured in medium conditioned by teratocarcinoma stem cells *Proc natl Acad Sci USA* **78**: 7634 (1981)
- 19) Capecchi M. R.: Altering the genome by homologous recombination. *Science* **244**: 1288~1292 (1989)
- 20) McDonnell, Deane N, Platt F. M, Nunez G, Jaeger U, McKearn J. P, Korsmeyer S. J.: bcl-2-immunoglobulin transgenic mice demonstrate extended B cell survival and follicular lymphoproliferation. *Cell* **57**: 79~88 (1989)
- 21) Hino O, Kitagawa T, Nomura K, Ohtake K, Cui L, Furuta Y, Aizawa S.: Hepatocarcinogenesis in transgenic mice carrying albumin-promoted SV40 T antigen gene. *Jpn J Cancer Res* **82**: 1226~33 (1991)
- 22) Dyer K. R, Messing A.: Metal-inducible pathology in the liver, pancreas, and kidney of transgenic mice expressing SV40 early region genes. *Am J Pathol* **135**: 401~10 (1989)
- 23) Ornitz D. M, Hammer R. E, Messing A, Palmiter R. D, Brinster RL.: Pancreatic neoplasia induced by SV40 T-antigen expression in acinar cells of transgenic mice. *Science* **238**: 188~93 (1987)
- 24) Mahon K. A, Chepelinsky A. B, Khillan J. S, Overbeek P. A, Piatigorsky J, Westphal H.: Oncogenesis of the lens in transgenic mice. *Science* **235**: 1622~8 (1987)
- 25) Suda Y, Aizawa S, Hirai S, Inoue T, Furuta Y, Suzuki M, Hirohashi S, Ikawa Y.: Driven by the same Ig enhancer and SV40 T promoter ras induced lung adenomatous tumors, myc induced pre-B cell lymphomas and SV40 large T gene a variety of tumors in transgenic mice. *EMBO J* **6**: 4055~65 (1987)
- 26) Furuta Y, Aizawa S, Suda Y, Ikawa Y, Nishikawa S, Hayashi S, Hirabayashi Y, Inoue T.: MDS-like experimental myelodysplasia: multilineage abnormal hematopoiesis in transgenic mice harboring the SV40 large T antigen under an immunoglobulin enhancer. *Exptl Hematol* **21**: 806~15 (1993)
- 27) Inoue T, Hirabayashi Y, Mitsui, Furuta Y, Suda Y, Aizawa S, Ikawa Y.: Experimental model for MDS-like myelodysplasia in transgenic mice harboring the SV40 large T antigen under an immunoglobulin enhancer. *Leukemia* **8**: S202~5 (1994)
- 28) Adams J. M, Harris A. W, Pinkert C. A, Corcoran L. M, Alexander W. S, Cory S, Palmiter R. D, Brinster R. L.: The c-myc oncogene driven by immunoglobulin enhancers induces lymphoid malignancy in transgenic mice. *Nature* **318**: 533~8 (1985)
- 29) Hirabayashi Y, Inoue T, Suda Y, Aizawa S, Ikawa Y.: Hemopoietic neoplasms in lethally irradiated mice repopulated with bone marrow cells carrying the human c-myc oncogene: a repopulation assay. *Exptl Hematol* **20**: 167~72 (1992)
- 30) Chang E. H, Gonda M. A, Ellis R. W, Scolnick E. M, Lowy D. R.: Human genome contains four genes homologous to transforming genes of Harvey and Kirsten murine sarcoma viruses. *Proc Natl Acad Sci USA* **79**: 4848~52 (1982)
- 31) Dhar R, Ellis RW, Shih T. Y, Oroszlan S, Shapiro B, Maizel J, Lowy D, Scolnick E.: Nucleotide sequence of the p21 transforming protein of Harvey murine sarcoma virus. *Science* **217**: 934~6 (1982)
- 32) Leder A, Kuo A, Cardiff R. D, Sinn E, Leder P.: v-Ha-ras transgene abrogates the initiation step in mouse skin tumorigenesis: effects of phorbol esters and retinotic acid. *Proc Natl Acad Sci USA* **87**: 9178~82 (1990)
- 33) Spalding J. W, Momma J, Elwell M. R, Tennant R. W.: Chemically induced skin carcinogenesis in a transgenic mouse line. *Carcinogenesis* **14**: 1335~41 (1993)
- 34) Katsuki M, Kimura M, Hata J, Takahashi R, Nozawa S, Yokoyama M, Izawa M, Sekiya T, Nishimura S, Nomura T.: Embryonal tumors from transgenic mouse zygotes carrying human activated c-Ha-ras genes. *Mol Biol Med* **6**: 567~72 (1989)
- 35) Saitoh A, Kimura M, Takahashi R, Yokoyama M, Nomura T, Izawa M, Sekiya T, Nishimura S, Katsuki M.: Most tumors in transgenic mice with human c-Ha-ras gene contained somatically activated transgenes. *Oncogene* **5**: 1195~200 (1990)
- 36) Zambetti G. P, Quartin R. S, Martinez J, Georgoff I, Momand J, Dittmer D, Finlay C. A, Levine A. J.: Regulation of Transformation and the cell cycle by p53. In: *Cell Cycle, Cold Spring Harbor Symposia on Quantitative Biology* **56**: 219~25 (1991)
- 37) Dulic V, Kaufmann W. K, Wilson S. J, Tlsty T. D, Lees E, Harper J. W, Elledge S. J, Reed S.I.: p53-dependent inhibition of cyclin-dependent kinase activities in human fibroblasts during radiation-induced G1 arrest. *Cell* **76**: 1013~23 (1994)
- 38) Donehower L. A, Harvey M, Slagle B. L, McArthur M. J, Montgomery C. A, Butel J. S, Bradley A.: *Nature* **356**: 215~21 (1992)
- 39) Tsukada T, Tomooka Y, Takai S, Ueda Y, Nishikawa S, Yagi T, Tokunaga T, Takeda N, Suda Y, Abe S, Aizawa S.: Enhanced proliferative potential in culture of cells from p53-deficient mice. *Oncogene* **8**: 3313~22 (1993)
- 40) Jacks T, Remington L, Williams B. O, Schmitt E. M, Halachmi S, Bronson R. T, Weinberg R. A.: *Curr Biol* **4**: 1~7 (1994)
- 41) Harvey M, McArthur M. J, Montgomery Jr, C, Bradley A, Donehower L. A.: Genetic background alters the spectrum of tumors that develop in p53-deficient mice. *Faseb J* **7**: 938~43 (1993)

- 42) Kemp C. J, Wheldon, Balmain A.: p53-deficient mice are extremely susceptible to radiation-induced tumorigenesis. *Nat Genet* 8: 66~69 (1994)
- 43) Harvey M, McArthur M. J, Montgomery Jr, C, Butel J. S, Bradley A, Donehower L. A.: Spontaneous and carcinogen-induced tumorigenesis in p53-deficient mice. *Nature Genet* 5: 225~9 (1993)
- 44) Hirabayashi Y, Matsuda M, Matsumura T, Mitsui H, Sasaki H, Tsukada T, Aizawa S, Yoshida K, Inoue T.: The p53-deficient hemopoietic stem cells: their resistance to radiation-apoptosis, but lasted transiently. *Leukemia*, in press. (1996)
- 45) Tennant R. W, French J. E, Spalding J. W.: Identifying chemical carcinogens and assessing potential risk in short-term bioassays using transgenic mouse models. *Environ Health Perspect* 103: 942~950 (1995)
- 46) Tennant R. W.: Unpublished personal communication. (1996)
- 47) Jacks T, Fazeli A, Schmitt E. M, Bronson R. T, Goodell M. A, Weinberg R. A.: Effects of an Rb mutation in the mouse. *Nature* 359: 295~300 (1992)
- 48) Inoue T.: The use of biotechnical recombinant-mice to test the safety of potential carcinogenic pharmaceuticals. *J Toxicol Sci* 20: 468~470 (1995)
- 49) Yoshida K, Inoue T, Hirabayashi Y, Matsumura T, Nemoto K, Sado T.: Radiation-induced myeloid leukemia in mice under calorie restriction. *Leukemia Res*, in press. (1996)
- 50) Albanes D.: Total calories, body weight, and tumor incidence in mice. *Cancer Res* 47: 1987~92 (1987)
- 51) Kritchevsky D, Klurfeld D. M.: Influence of caloric intake on experimental carcinogenesis: a review. *Adv Exp Med Biol* 206: 55~68 (1986)
- 52) Fu P. P, Dooley K. L, von Tungeln L. S, Bucci T, Hart R. W, Kadlubar F. F.: Caloric restriction profoundly inhibits liver tumor formation after initiation by 6-nitrochrysene in male mice. *Carcinogenesis* 15: 159~61 (1994)
- 53) Hass B. S, Hart R. W, Lu M. H, Lyn-Cook B. D.: Effects of caloric restriction in animals on cellular function, oncogene expression and DNA methylation *in vitro*. *Mutat Res* 295: 281~9 (1993)
- 54) Himeno Y, Engelman R. W, Good R. A.: Influence of caloric restriction on oncogene expression and DNA synthesis during liver regeneration. *Proc Natl Acad Sci USA* 89: 5497~501 (1992)
- 55) Hursting S. D, Perkins S. N, Phang J. M.: Calorie restriction delays spontaneous tumorigenesis in p53-knockout transgenic mice. *Proc Natl Acad Sci USA* 91: 7036~40 (1994)
- 56) Hirabayashi Y, Yoshida K, Inoue T.: unpublished data. (1996)
- 57) Bradfield C. A.: Transgenic models of dioxin action. *Crisp Data Base National Institutes of Health*. (1994)
- 58) Liggitt H. D, Reddington G. M.: Transgenic animals in the evaluation of compound efficacy and toxicity: will they be as useful as they are novel? *Xenobiotica* 22: 1043~54 (1992)
- 59) Glauert HP.: Peroxisomal genes and environmental carcinogenesis. *Crisp Data Base National Institutes of Health*. (1992)
- 60) Iszard M. B, Liu J, Liu Y, Dalton T, Andrews G. K, Palmiter R. D, Klaassen C. D.: Characterization of metallothionein-I-transgenic mice. *Toxicol Appl Pharmacol* 133: 305~12 (1995)
- 61) Shimoji M, Hattori K, Itoh S, Nakayama K, Katsuki M, Aizawa S, Yokoi T, Kamataki T.: Establishment of immortal hepatocytes from a CYP3A7-transgenic/p53-knockout mouse. *Biochem Biophys Res Commun* 217: 1001~5 (1995)
- 62) Kamataki T, Hashimoto H, Shimoji M, Itoh S, Nakayama K, Hattori K, Yokoi T, Katsuki M, Aizawa S-I.: Expression of CYP3A7, a human fetus-specific cytochrome P450, in cultured cells and in the hepatocytes of p53-knockout mice. *Toxicol Lett* 82-83: 879~82 (1995)
- 63) Michilska A. E, Choo K. H.: Targeting and germ-line transmission of a null mutation at the metallothionein I and II loci in mouse. *Proc Natl Acad Sci USA* 90: 8088~92 (1993)
- 64) Lazo J. S, Kondo Y, Dellapiazza D, Michalska A. E, Choo K. H, Pitt B. R.: Enhanced sensitivity to oxidative stress in cultured embryonic cells from transgenic mice deficient in metallothionein I and II genes. *J Biol Chem* 270: 5506~10 (1995)
- 65) Fernandez-Salguero P, Pneau T, Hilbert D. M, McPhail T, Lee S. S. T, Kimura S, Nebert D. W, Rudikoff S, Ward J. M, Gonzalez F. J.: Immune system impairment and hepatic fibrosis in mice lacking the dioxin-binding Ah receptor. *Science* 268: 722~726 (1995)
- 66) Myhr B.: Validation studies with Muta[®] Mouse-transgenic mouse model for detection mutations *in vivo*. *Environment Mol Mutagen*. 18: 308~315 (1991)
- 67) Short J. M, Kohler S. W, Provost G. S, Ferik A, Kretz P. L.: The use of lambda phage shuttle vectors in transgenic mice for development of a short-term mutagenicity assay. In: *Mutation and the Environment, Part A*, Eds. M. Mendelsohn and R. Albertini. pp. 355~367, Wiley-Liss, NY. (1990)
- 68) Gossen J. A, de Leeuw W. J, Tan C. H, Zwarthoff E. C, Berends F, Lohman P. H, Knook D. L, Vijg J.: Efficient rescue of integrated shuttle vectors from transgenic mice: a model for studying mutations *in vivo*. *Proc Natl Acad Sci USA* 86: 7971~5 (1989)
- 69) Kohler S. W, Provost G. S, Fieck A, Kretz P. L, Bullock W. O, Sorge J. A, Putman D. L, Short J. M.: Spectra of spontaneous and mutagen-induced mutations in the lacI gene in transgenic mice. *Proc Natl Acad Sci USA* 88: 7958~62 (1991)
- 70) Winegar R. A, Lutze L. H, Hamer J. D, O'Loughlin K. G, Mirsalis J. C.: Radiation-induced point mutations, deletions and micronuclei in lacI transgenic mice. *Mutat Res* 307: 479~87 (1994)
- 71) Myhr B. C.: Validation studies with Muta Mouse: a transgenic mouse model for detecting mutations *in vivo*. *Environ Mol Mutagen* 18: 308~15 (1991)
- 72) Brooks T. M, Szegedi M, Rosher P, Dean S. W.: The detection of gene mutation in transgenic (Muta Mouse) following a single oral dose of 2-acetylaminofluorene. *Mutagenesis* 10: 149~50 (1995)
- 73) Shephard S. E, Gunz D, Schlatter C.: Genotoxicity of agaritine in the lacI transgenic mouse mutation assay: evaluation of the health risk of mushroom consumption. *Food Chem Toxicol* 33: 257~64 (1995)

- 74) Skopek T. R, Kort K. L, Marino D. R.: Relative sensitivity of the endogenous hprt gene and lac I transgene in ENU-treated Big Blue B3C3F1 mice. *Environ Mol Mutagen*. **26**: 9~15 (1995)
- 75) Suzuki T, Hayashi M, Myhr B, Sofuni T.: Diethylnitrosamine is mutagenic in liver but not in bone marrow of lacZ transgenic mice (Muta Mouse). *Mamm Mtagen Study Group Commun* **3**: 33~9 (1995)
- 76) Young R. R, Rogers B. J, Provost G. S, Short J. M, Putman D. L.: Interlaboratory comparison: liver spontaneous mutant frequency from lambda/lacI transgenic mice (Big Blue) (II). *Mutat Res* **327**: 1~2, 1995 (1995)
- 77) Suzuki T, Hayashi M, Sofuni T, Myhr B. C.: The concomitant detection of gene mutation and micronucleus induction by mitomycin C *in vivo* using lacZ transgenic mice. *Mutat Res* **285**: 219~24 (1993)
- 78) Lefevre P. A, Tinwell H, Galloway S. M, Hill R, Mackay J. M, Elcombe C. R, Foster J, Randall V, Callander D, Ashby J.: Evaluation of the genetic toxicity of the peroxisome proliferator and carcinogen methyl clofenapate, including assays using Muta Mouse and Big Blue transgenic mice. *Hum Exp Toxicol* **13**: 764~75 (1994)
- 79) Gondo Y, Katsuki M.: Unpublished. Personal communication. (1996)
- 80) Suzuki T, Hayashi M, Sofuni T.: Initial experiences and future directions. *Mutat Res* **307**: 489~94 (1994)
- 81) Burleson G. R, Dean J. H.: Immunotoxicology: Past, present and future. In: Burleson G. R, Dean J. H, Munson A. E.: (Eds) *Methods In Immunotoxicology*, Wiley-Liss, NY, pp. 3~10 (1995)
- 82) Pallardy M, Mishail Z.: Interleukin-2 receptor and sensitivity assay. In: Burleson G. R, Dean J. H, Munson A. E.: (Eds) *Methods In Immunotoxicology*, Wiley-Liss, NY, pp. 277~93 (1995)
- 83) Schook L. B, Lockwood J. F, Witsell A. L, Yang S-D.: Molecular approaches for monitoring interleukin-1 gene expression. In: Burleson G. R, Dean J. H, Munson A. E.: (Eds) *Methods In Immunotoxicology*, Wiley-Liss, NY, pp. 295~325 (1995)
- 84) Schuurman H. J, Vaessen L. M, Vos J. G, Hertogh A, Geertzema J. G, Brandt C. J, Rozing J.: Implantation of cultured thymic fragments in congenitally athymic nude rats: ignorance of thymic epithelial haplotype in generation of alloreactivity. *J Immunol* **137**: 2440~7 (1986)
- 85) De-Heer C, Schuurman H. J, Liem A. K. D, Penninks A. H, Vos J. G, Van-Loveren H.: Toxicity of 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin (TCDD) to the human thymus after implantation in SCID mice. *Toxicol Appl Pharmacol* **134**: 296~304 (1995)
- 86) De-Heer C, Schuurman H. J, Houben G. F, Pieters P. H. H, Penninks A. H, Van-Loveren H.: The SCID-hu mouse as a tool in immunotoxicological risk assessment: Effects of 2-acetyl-4 (5)-tetrahydroxybutyl-imidazole (THI) and di-n-butyltin dichloride (DBTC) on the human thymus in SCID-hu mice. *Toxicology* **100**: 203~11 (1995)
- 87) Taniguchi S, Hirabayashi Y, Inoue T, Kanisawa M, Sasaki H, Komatsu K, Mori KJ.: Hemopoietic stem-cell compartment of the SCID mouse: Double-exponential survival curve after g irradiation. *Proc Natl Acad Sci USA* **90**: 4354~48 (1993)
- 88) Inoue T.: Promotion of further safety research on biotechnology products. In: *Proceedings of The Third International Conference on Harmonisation Yokohama 1995*. P. F. D'Arcy and D. W. G. Harron Eds. W. & G. Baird Ltd, Northern Ireland, 1996. pp. 237-244.
- 89) Oesch B, Westaway D, Walchli M, McKinley M. P, Kent S. B. H, Aebersold R, Barry R. A, Tempst P, Teplow D. B, Hood L. E, Prusiner S. B and Weissmann C.: A cellular gene encodes scrapie PrP 27-30 protein. *Cell* **40**: 735~46 (1985)
- 90) Hsiao K, Baker H. F, Crow T. J, Poulter M, Owen F, Terwilliger J. D, Westaway D, Ott J, Prusiner S. B.: Linkage of a prion protein missense variant to Gerstmann-Sträussler syndrome. *Nature* **338**: 342~5 (1989)
- 91) Telling G. C, Scott M, Hsiao K. K, Foster D, Yang S. L, Torchia M, Sidle K. C, Collinge J, DeArmond S. J, Prusiner S. B.: Transmission of Croetzfeldt-Jakob disease from humans to transgenic mice expressing chimeric human-mouse prion protein. *Proc Natl Acad Sci USA* **91**: 9936~40 (1994)
- 92) Büler H, Fischer M, Lang Y, Bluethmann H, Lipp H, DeArmond S. J, Prusiner S. B, Aguet M, Weissmann C.: Normal development and behaviour of mice lacking the neuronal cell-surface PrP protein. *Nature* **356**: 577~582 (1992)
- 93) Prusiner S. B, Groth D, Serban A, Koehler R, Foster D, Torchia M, Burton D, Yang S. L, DeArmond S. J.: Ablation of the prion protein (PrP) gene in mice prevents scrapie and facilitates production of anti-PrP antibodies. *Proc Natl Acad Sci USA* **90**: 10608~12 (1993)
- 94) Fischer M, Rütcke T, Raeber A, Sailer A, Moser M, Oesch B, Brandner S, Aquzzi A, Weissmann C.: Prion protein (PrP) with amino-proximal deletions restoring susceptibility of PrP knockout mice to scrapie. *EMBO J* **15**: 1255~64 (1996)
- 95) Ohno Y, Kaneko T, Kobayashi T, Inoue T, Kuroiwa Y, Yoshida T, Momma J, Hayashi M, Akiyama J, Atsumi T, Chiba K, Endo T, Fujii A, Kakishima H, Kojima H, Masamoto Y, Masuda M, Matsukawa K, Ohkoshi K, Okada J, Sakamoto K, Takano K, Suzuki T, Takanaka A.: First phase inter-laboratory validation of the *in vitro* eye irritation tests for cosmetic ingredients: (1) Overview, organization and results of the validation study. *Alternat Animal Test Exp (AATEX)* **3**: 123~36 (1995)
- 96) Draize J. H.: Dermal toxicity. In: *Appraisal of the safety of chemicals in Food, Drugs and Cosmetics*. P46, The Association of Food and Drug Officials of the United States, Austin, TX. (1959)
- 97) Environment Directorate Chemicals Group and Management Committee, Organisation for Economic Co-operation and Development.: *Test Guidelines Programme: Draft report of the OECD workshop on harmonization of validation and acceptance criteria for alternative toxicological test methods*. January 22~24, Solna, Sweden, pp. 55 (1996)