

ナショナルバイオリソースプロジェクト「ラット」主催

第1回ラットリソースリサーチ研究会 抄録集

平成20年1月18日（金）13:00－17:30

聖護院御殿荘（京都市）第2ホール

第1回 ラットリソースリサーチ研究会 プログラム

第1部 ラットリソース

座長：芹川忠夫（京都大学大学院医学研究科附属動物実験施設）

吉木淳（（独）理化学研究所バイオリソースセンター）

1. *Sleeping Beauty* トランスポゾンを用いたラットにおけるミュータジェネシス
北田一博（北海道大学創成科学共同研究機構）
2. レンチウイルスベクターを用いた *in vivo* 遺伝子機能解析法の開発
伊川正人（大阪大学微生物病研究所附属感染動物実験施設）
3. ENU ミュータジェネシスによる標的遺伝子変異ラットの開発
真下知士（京都大学大学院医学研究科附属動物実験施設）
4. 量的形質遺伝解析ツール：FXLE/LEXF リコンビナント近交系
庫本高志（京都大学大学院医学研究科附属動物実験施設）

第2部 ラットリサーチ

座長：庫本高志（京都大学大学院医学研究科附属動物実験施設）

並河徹（島根大学医学部病態病理学）

5. アミロイド β 注入によるアルツハイマー病モデルラットを用いた研究

新田淳美（名古屋大学医学部附属病院薬剤部）

6. Zitter ラットの神経生物学

上田秀一（獨協医科大学基礎医学科解剖学講座）

7. 外因性高コレステロール血症ラットの連鎖解析

朝比奈誠（九州大学大学院農学研究院栄養化学）

8. 白内障モデル SCR 系ラットにおける多因子性の分子遺伝学的機序

森政之（信州大学大学院医学研究科加齢適応医科学系）

9. HIV/HTLV-1 感染ラットモデルの作成に向けて

志田壽利（北海道大学遺伝子病制御研究所感染病態分野）

1. *Sleeping Beauty* トランスポゾンを用いたラットにおけるミュータジェネシス

北田一博

北海道大学創成科学共同研究機構

ショウジョウバエ等の実験生物では、(1) トランスポゾンを用いた挿入突然変異誘発、(2) 化学変異原を用いた点突然変異誘発、(3) 相同組換えを用いた遺伝子機能改変の技術が開発され、遺伝学的研究に大いに利用されている。それぞれが独自の利点を有し、他の技術がそれぞれの欠点を補完することから、各々の研究では最も適した突然変異誘発が実施され、場合によっては複数の方法が併用される。たとえば、網羅的に **null mutation** を得たい場合は挿入突然変異誘発を、網羅的にさまざまな突然変異を得たい場合は点突然変異誘発を、欲しい機能を確実に得たい場合は相同組換えを用いて、という具合にである。われわれが研究に使用している実験動物のラット (*Rattus norvegicus*) においても、このような研究環境が用意されることが望ましい。

大阪大学の竹田教授らのグループにより、マウスにおいて、*Sleeping Beauty* トランスポゾンを用いた挿入突然変異誘発が効率よく実施し得ることが報告されていた。そこで、共同研究で、(1) ラットにおいても *Sleeping Beauty* トランスポゾンが効率よく機能するか、(2) 実際に得られる挿入突然変異は **null mutation** になっているか、について検討してみたところ、挿入突然変異誘発効率は作出産仔の約 10% で、挿入箇所は 1 精子あたり約 1 箇所、胚性致死や欠失形態と考えられる表現型が観察されることから実際に **null mutation** が得られていることが示された。これはとりもなおさず、2 万強の遺伝子を網羅的に破壊したかったら、約 20 万強の産仔を生産すれば事足りる（誤差はあるにせよ）、ことを意味しており、国家プロジェクトとするならばたいした規模ではなく容易に実現可能である。なお、選択マーカーは全身に発現する蛍光タンパク質の GFP であり、全ゲノムに散在する優性の可視標識マーカーが得られることをも意味する。

ショウジョウバエにおいては、バランス染色体の開発がなされているが、ラットでこのような研究ツールが準備されると、ミュータント系統の維持が容易になるばかりでなく、さまざまな研究アイデアが実現可能となる。また、連続的な欠失ミュータントが準備されていると、これまでコンジェニック系統を作出せねば正確な遺伝マッピングができなかった量的形質のマッピングも容易となる。理論的にはトランスポゾンを用いて、染色体レベルの改変（欠失、逆位）が可能であり、上記は国家プロジェクトとするならば実現可能である。

研究会においては、以上のように、トランスポゾンを用いたミュータジェネシスで、ラットの研究環境をどのように向上できるかを考えてみたい。

2. レンチウイルスベクターを用いた *in vivo* 遺伝子機能解析法の開発

伊川正人

大阪大学・微生物病研究所

レンチウイルスベクターは、非分裂期にある細胞にも効率良く感染できる特徴や、*in vivo* で遺伝子発現が抑制されにくい特徴を併せ持つ。我々はこれまでに、生殖細胞や受精卵にレンチウイルスベクターを感染させた場合にはトランスジェニック動物ができることを報告している。通常のマイクロインジェクション法（処理卵の3%程度しか遺伝子導入されない）に比べて、約20%程度と作製効率が高く、またレトロウイルスベクターと異なり *in vivo* で効率良く遺伝子発現することから、新しい遺伝子組換え動物の作製法として注目されている^{1,2)}。我々は shRNA を発現させることで個体レベルでの RNAi への応用も可能であることを報告している³⁾。さらにレンチウイルスベクターを精細管内に注入するとセルトリ細胞特異的に遺伝子導入できることや⁴⁾、透明帯を除去した胚盤胞に感染させると栄養芽細胞系列のみに遺伝子が導入され胎盤特異的な遺伝子発現が見られることを見出した⁵⁾。講演では、我々の生殖生理学研究への応用知見を中心にレンチウイルスベクターを用いた個体レベルでの遺伝子機能解析法について紹介したい。

- 1) Transgenesis by lentiviral vectors: lack of gene silencing in mammalian embryonic stem cells and preimplantation embryos. Pfeifer A, Ikawa M, Dayn Y, Verma IM. **Proc Natl Acad Sci U S A**; 99: 2140-2145.2002
- 2) Generation of transgenic mice using lentiviral vectors: a novel preclinical assessment of lentiviral vectors for gene therapy. Ikawa M, Tanaka N, Kao WW, Verma IM. **Mol Ther**; 8: 666-673.2003
- 3) A general method for gene knockdown in mice by using lentiviral vectors expressing small interfering RNA. Tiscornia G, Singer O, Ikawa M, Verma IM. **Proc Natl Acad Sci U S A**; 100: 1844-1848.2003
- 4) Restoration of spermatogenesis by lentiviral gene transfer: offspring from infertile mice. Ikawa M, Tergaonkar V, Ogura A, Ogonuki N, Inoue K, Verma IM. **Proc Natl Acad Sci U S A**; 99: 7524-7529.2002
- 5) Complementation of placental defects and embryonic lethality by trophoblast-specific lentiviral gene transfer. Okada Y, Ueshin Y, Isotani A, Saito-Fujita T, Nakashima H, Kimura K, Mizoguchi A, Oh-Hora M, Mori Y, Ogata M, Oshima RG, Okabe M, Ikawa M. **Nat Biotechnol**; 25: 233-237.2007

3. ENU ミュータジェネシスによる標的遺伝子変異ラットの開発

真下知士

京都大学大学院医学研究科附属動物実験施設

ラットは、ゲノムシーケンスが解読されたマウスに近縁の実験用哺乳動物であること、マウスと同様に遺伝要因と環境要因を厳格にコントロールして実験が行えること、適当なサイズをもつことなどから、多様な研究や試験に利用されている。しかし、ラットでは遺伝子改変技術を行うための ES 細胞が未だ樹立されていないため、マウスのように人為的に遺伝子を改変することができない。もし標的遺伝子変異ラットを作製することができれば、個々の遺伝子機能をより深く理解することができるばかりでなく、ヒト疾患のモデル動物として創薬・試験研究等に利用することができる。そこで我々は、gene-driven ENU ミュータジェネシスをラットに応用することにより、ヒト疾患原因遺伝子に変異を持つ遺伝子変異ラットが作製できないかと考えた。

Gene-driven ENU ミュータジェネシスは、化学変異原であるエチルニトロソウレア (ENU) を雄ラット (F344/NSlc) に投与して雌 F344 ラットと交配することで、ゲノム上にランダムに点突然変異が導入された G1 ラットを作製する。多数の G1 ラットの中から標的とする遺伝子に点突然変異を有する個体を同定することで、標的遺伝子変異動物を作製することができる。ショウジョウバエやメダカ、マウスなどサイズの小さな生物においては汎用技術であるが、サイズの大きなラットではスクリーニングの間、多数の動物を維持しておかなければならず費用、スペース等の問題が生じる。我々は、多数の G1 ラットを短時間、効率的にスクリーニングする技術として、トランスポゾン Mu と DNA プーリング法を組み合わせた MuT-POWER 法を開発した (特許公開中: 特開 2007-185116)。また、G1 ラット 1735 匹の精子を凍結精子アーカイブとして保存し、標的遺伝子変異動物を同定した後に、顕微授精法により変異個体を復元することに成功した。

これらの技術を用いた効果的ラット ENU ミュータジェネシスにより、ヒト疾患原因遺伝子のラット相同遺伝子を標的として、標的遺伝子変異ラットを作製することが可能となった。本研究会では、ヒト全般てんかん熱性痙攣プラス (GEFS+) の原因遺伝子の一つであるナトリウムチャンネル (SCN1A) 遺伝子内にミスセンス変異を検出したので、実例として紹介する。この方法により G1 ラットを増産すれば、遺伝子変異ラットの有用な公共バンクを構築できると期待される。

4. 量的形質解析ツール：LEXF/FXLE リコンビナント近交系

庫本高志

京都大学大学院医学研究科附属動物実験施設

リコンビナント近交系 (RI) は、量的形質座位 (Quantitative Trait Loci; QTLs) を効果的に同定できる遺伝解析ツールである。高密度の Strain Distribution Pattern (SDP) を準備することによって、より高精度に QTLs を同定できる。すなわち、RI 系統を用いた QTLs の同定においては、できるだけ多くの RI 系統のセットを準備し、それらについてできるだけ多くの遺伝マーカーをタイピングすることが望ましい。

LEXF/FXLE ラット RI 系統は、LE/Stm と F344/Stm を親系統とし、世界最大規模の 34 系統のセットからなる。ラットは、血液生化学値、血圧、体重などの量的形質を支配する遺伝因子の研究に広く利用されていることを考慮すると、LEXF/FXLE は QTL 解析において大きな潜在能力を有すると考えられる。ナショナルバイオリソースプロジェクト「ラット」(NBRP-Rat) では、この RI 系統の全セットを生体保存している。その活用を目指して、LEXF/FXLE RI 系統の遺伝基盤整備、すなわち、高密度 SDP の作成とフレームワーク地図の作成、及び、QTLs 同定を実施した。

SDP の作成には、NBRP-Rat の遺伝検査用に整備された 357 個の SSLP マーカーを用いた。この 357 個の SSLP マーカーのうち、LE/Stm と F344/Stm との間で 256 個 (72%) において多型があり、各マーカーについて SDP を作成することができた。SDP をもとに作成されたフレームワーク地図はラットゲノムの約 90% をカバーし、マーカー一間の平均距離は約 12Mb であった。

このフレームワーク地図を利用して、NBRP-Rat のフェノームプロジェクトにより決定された 76 の量的形質についてその QTLs の同定を試みた。MapManager QTXb20 を用いて解析したところ、91 個の suggestive な QTLs と 27 個の significant な QTLs が検出された。後者の中には、血中総コレステロール、血中アルカリフォスファターゼ、心拍数についての QTL が含まれていた。

以上のように、LEXF/FXLE RI 系統のセットを活用できる基盤は整った。個々の研究者は、興味ある表現形質の表現型値を決定することにより、その QTLs が同定できる。また、SDP の高密度化については、近日中に、約一万個の SNP マーカーが追加される予定である。世界最大規模の系統セットからなり、1 万個以上の遺伝マーカーを含む SDP を有する FXLE/LEXF リコンビナント近交系は、迅速かつ高精度な QTL 同定を可能にする。

5. アミロイド β 注入によるアルツハイマー病モデルラットを用いた研究

新田淳美¹、伊東亜紀雄¹、山田清文¹、鍋島俊隆^{1, 2, 3}

¹名古屋大学大学院医学系研究科・医療薬学・医学部附属病院・薬剤部、²名城大学大学院薬学研究科臨床薬学専攻病態解析学コース薬品作用学教室、³特定非営利活動法人 医薬品適正使用推進機構

アルツハイマー病の研究はこの10年に画期的に進捗し、治療薬や治療法の開発も進み、本邦でも、エステラーゼ阻害剤であるアリセプトが使用されるようになり、同症患者や家族にとって大きな福音となった。しかし、本剤は、コリンエステラーゼを阻害することによってアセチルコリンを増加させるという対象療法でしかないことから病状の進行を遅らせるに過ぎず、治療効果に限界があり、最近、中度アルツハイマー病患者にも本剤の投与が承認されたものの重度のアルツハイマー病患者には奏効が期待されていない。他のアプローチによる抜本的に病因を取り除くまたは抑制することを目的とする治療薬への期待が高まっている。アルツハイマー病の原因タンパクと考えられているアミロイド β タンパクの前駆体を過剰発現させた遺伝子組み換えマウスやアミロイド β タンパクの代謝を促す酵素を欠損させたマウスをアルツハイマー病モデル動物として治療薬の開発が進められている。遺伝子組み換え動物を作成するには、ラットよりもマウスのほうが **Know How** の蓄積が進んでいるが、学習・行動実験を行うには、脳での高次機能がより発達しているラットを使用することにプライオリティがあると考えられる。我々は、アミロイド β タンパクをラット脳室にミニ浸透圧ポンプを用いて持続注入することによるアルツハイマー病モデル動物を1994年に報告した。本モデルでは、水迷路学習法や受動的回避試験法において学習記憶障害が観察された。さらに、アルツハイマー病患者脳での特徴の1つであるコリン作動性神経系の機能低下、すなわち、コリンアセチルトランスフェラーゼやコリンエステラーゼの機能低下が観察された。また、*in vivo* マイクロダイアリシスを用いた実験においては、ニコチンによる刺激によるアセチルコリン遊離量増大が本も出るでは抑制された。我々の報告以来、我々のグループだけでなく、製薬企業等他の研究グループにおいても、抗認知症治療薬の開発にも用いられていることから、それらの研究成果についても、あわせて紹介を行う予定である。

6. Zitter ラットの神経生物学

上田秀一、中舘和彦、榊原伸一

獨協医科大学 解剖（組織）教室

Zitter (Zi/Zi)ラットは膜結合型 *attractin* 遺伝子の機能欠失変異ラットであり、神経病理変化として、早期に発生する脳の空胞変性および髄鞘の低形成、加齢と伴に進行する黒質線条体ドーパミンニューロンの変性を特徴とする。我々はこれまで黒質線条体ドーパミンニューロンの変性が *reactive oxygen species (ROS)* によることを明らかにしてきた。しかし、早期に発生する神経病理変化については不明な点が多く残っていた。この解明のために、まず脳内での *attractin* 蛋白の存在部位を知ることが大切と考え、特異抗体の作製を行った。Western Blot の結果、成熟 SD ラット脳において、170KDa のシングルバンドが検出され、Zi/Zi ラットではバックグラウンドレベルであることが明らかとなった。また、免疫染色により、*attractin* 蛋白は広く分布し、神経細胞体ならびに神経突起にシグナルが認められた。免疫電顕法での解析からゴルジ装置、ミトコンドリア膜および前シナプス部に存在することが明らかとなった。さらに共焦点レーザー顕微鏡による各種神経膠細胞のマーカーとの二重染色から、*attractin* 蛋白は神経細胞のみならずグリアにも発現することを初めて明らかにした。特にミクログリアには高頻度に発現することならびに種々の神経変性疾患において活性型ミクログリアの関与が報告されていることから、Zi/Zi ラットにおける神経病理変化とミクログリアの変化を検討した。Zi/Zi ラットでは生後発達に伴い成熟型へ形態変化が起こらず、生後早期から活性型変化をすることが明らかとなった。生後発達時期に Zi/Zi 脳の軸索は正常伸展を示すのに対してオリゴデンドログリアは突起の形態異常を示した。しかしながら、初代培養による検討の結果、Zi/Zi オリゴデンドログリア前駆細胞は正常な分裂能と分化能を有していること、*attractin* 蛋白は *oligo2* 陽性の前駆細胞から *CNPase* 陽性の分化細胞までの系譜細胞に認められないことから、Zi/Zi の髄鞘の低形成はオリゴデンドログリアそのものの異常が原因でなく、外因性因子による分化阻害の可能性が示唆された。

7. 外因性高コレステロール血症ラットの連鎖解析

朝比奈誠、春山和佳、市田康弘、坂本麻衣、佐藤匡央、今泉勝己

九州大学農学研究院栄養化学分野

動脈硬化症の進展には、血清総コレステロール濃度の増加と正の相関が、高密度リポタンパク質(HDL)コレステロール濃度の増加とは負の相関があることが、疫学的に知られている。そこで、脂質代謝異常のモデル動物として血清総コレステロールが高く、血清 HDL コレステロール濃度の低い ExHC ラットと、複数の近交系ラットを用いた遺伝学的解析により、血清総コレステロール、および HDL コレステロール濃度を規定する責任遺伝子を同定することを研究目的とした。

血清総コレステロール：血清総コレステロール濃度の異なる ExHC ラットと BN ラットより、量的形質座解析を行った。そして、血清総コレステロール濃度を規定する遺伝子座をラット第 5, 14 染色体に決定した(Diet-induced hypercholesterolemia 1,2 = Dihc1,2)。各遺伝子座について、単一遺伝子座モデルであるコンジェニック系統を作製し、Dihc2 が血清総コレステロール濃度に関与することを見出した。同遺伝子座における組換え体 850 匹の表現型と遺伝型を解析することにより、Dihc2 領域 46Mbp を遺伝子 33 個が存在する 4.1Mbp まで限局した。更に発現解析、配列解析を行い、ある遺伝子においてナンセンス変異を引き起こす 10 塩基欠失を同定した。

血清 HDL コレステロール：血清 HDL およびアポ A-I 濃度の異なる WKY ラットと ExHC ラットより、血清アポ A-I 濃度を規定する遺伝子座をラット第 3 染色体上に決定した。そして、同遺伝子座について血清 HDL コレステロール濃度の低い BN, ExHC ラット、高い WKY/Izm, WKY/NCrlCrlj ラットを用いたハプロタイプマッピングを行い、1 遺伝子のみが存在する領域を同定した。同遺伝子をノックアウトしたマウスの解析により、同遺伝子が血清 HDL、アポ A-I 濃度に関与することが確認された。

これら 2 つの遺伝子は、既存の脂質代謝関連遺伝子ではなく、脂質代謝研究に新たな局面の展開をもたらすと考えられる。

8. 白内障モデル SCR 系ラットにおける多因子性の分子遺伝学的機序

森 政之

信州大学大学院医学系研究科加齢生物学分野

Shumiya Cataract Rat (SCR)は遺伝的に劣性の遺伝子と胎生致死遺伝子により規定される成熟期核性白内障を自然発症する近交系ラットである。白内障個体どうしの兄妹交配により維持され、1 腹の仔の約 2/3 は白内障を発症するが、1/3 は正常となる。我々は、これらの遺伝子の同定から本ラットにおける白内障発症の分子遺伝学的機序の解明を試みた。

(SCR x ACI) x SCR 戻し交雑仔と(SCR x ACI)F2 交雑仔についてマイクロサテライトマーカーを用いた連鎖解析を行なった結果、白内障の主原因遺伝子は第 20 番染色体上で、コレステロール生合成に関与するラノステロール合成酵素 (*Lss*)遺伝子近傍に存在することが明らかとなった。また、ACI 系ラットの第 15 番染色体上に白内障発症を不完全ながら抑制する遺伝子の存在が明らかとなり、SCR における白内障発症はオリゴジェニックであることが示唆された。*Lss* 遺伝子の突然変異を検索した結果、白内障発症 SCR は同遺伝子の第 4 エクソン内の塩基置換により生じる D139N アミノ酸置換、および潜在的スプライスドナー配列の活性化による異常スプライス産物の生成が複合的に酵素活性を低下させる白内障型対立遺伝子 (*Lss^S*) と、第 15 エクソン内での塩基欠失に起因する 4 つの連続するアミノ酸の欠失 (H469-C472del) による活性喪失型の胎生致死型対立遺伝子 (*Lss^L*) をヘテロで有し (*Lss^{S/L}*)、また正常 SCR は *Lss^S* をホモで有する (*Lss^{S/S}*) ことが判明した。第 15 番染色体上の白内障抑制遺伝子はコレステロール生合成経路において LSS の 2 段階上流の反応を触媒するファルネシルピロリン酸ファルネシル転移酵素をコードする遺伝子 (*Fdft1* 遺伝子) 上の、K196I アミノ酸置換を生じさせるミスセンス変異であることが示唆された。ACI 系ラットの *Fdft1^A* にコードされる酵素は SCR 系ラットの *Fdft1^S* のものと比較して約 1.5 倍高い活性を示した。正常 SCR および白内障 SCR のレンズのコレステロール含量は正常 ACI 系ラットのそれぞれ約 76%、57%に低下していた。以上の結果から、SCR 系ラットにおける白内障発症は極めてユニークな多因子支配を受けていること、すなわち「*Fdft1^{S/S}* 遺伝子型、および *Lss^{S/L}* 遺伝子型の組み合わせをもつために、低い FDFT1 活性により LSS に対する基質量が低下し、さらに LSS 活性低下によりラノステロール合成が一層低下するために、レンズのコレステロール含量が、正常の 57~76%の閾値以下に低下することに起因する」とのメカニズムが考えられた。

一方、ナショナルリソースプロジェクト「ラット」に委託されている他のラット系統を調査した結果、*Lss^S* および *Fdft1^S* 対立遺伝子は SCR 系ラットに限らず、他のラット系統にも広く保有される多型的対立遺伝子であることが明らかとなり、実験用ラット集団中でのコレステロール合成や恒常性に関する遺伝的多型性の高さが窺われた。

9. HIV/HTLV-1 感染ラットモデルの作成に向けて

志田 壽利

北海道大学遺伝子病制御研究所

HIV-1 は、昨年世界中で 250 万人が新規感染し、感染の拡大は止まっていない。2004 年に台湾、2005 年に韓国で感染者の急上昇が報告され、日本における感染爆発が憂慮される。ワクチン開発は難航しており、エイズ治療薬を用いても根治には遠い。他方、ヒト T 細胞白血病ウイルス (HTLV-1) は、国内で 100 万人以上が感染しており、白血病 (ATL) をはじめ脊髄症 (HAM) など各種関連疾患を引き起こす。やはり、根本的な治療法は無い。

これらのウイルスの分子レベルでの研究は目覚ましいものがあり、予防・治療へと結実する事が望まれている。分子機構の成果と感染個体での免疫学的知見を統合し、新しい治療と予防法を開発するためには小動物感染モデルが有用である。特に、少し感染を許し、近交系が確立され、発生工学の利用できるラットは両ウイルスの良い感染動物モデルに改良できる可能性を持つ。

高感受性ラットモデルを開発するためには、ラットの欠いているウイルス増殖支持因子と阻害因子を同定して、対応するヒト遺伝子の Tg/阻害遺伝子のノックダウンラットを作成してやれば良いと考えられる。

我々は HTLV-1 のラットでの増殖不全の原因として、ウイルス粒子構成蛋白である Gag と Env の mRNA を運ぶべきラット rCRM1 が働かないためであることを明らかにした。さらに、ヒト対応因子である hCRM1 を発現するトランスジェニック (Tg) ラットを作成する事に成功し、CD4⁺ T 細胞が *ex vivo* で non Tg ラット由来の細胞の千倍量の HTLV-1 粒子を生産し、ヒト T 細胞と同等であることを見出した。

HIV-1 の種特異性を決める因子として、受容体である CD4 とケモカイン受容体 (CCR5/CXCR4) が良く知られているが、細胞内での増殖過程にも非効率な段階がある。我々は、ラット T 細胞において①転写効率が低く、Tat のコファクターである CyclinT1 を発現させる必用があり、②hCRM1 の発現は少し有効で、③ウイルス粒子形成段階での非効率はないことを見いだした。実際に、ラット T 細胞にヒト CD4/CCR5/CRM1/CyclinT1 を発現させるとヒト T 細胞株の約 1/3 の HIV 粒子が生産された。現在 CD4/CXCR4/CRM1/CyclinT1 4 因子を共発現する Tg ラットの作成を終えており、感染実験を期待している。

しかし、HIV/HTLV-1 高感受性ラットは作成途上であり、問題も多い。ここでは我々の現状を報告し、課題についても言及する。