厚 生 省 神経疾患研究委託費

筋ジストロフィー症モデル動物 の開発に関する研究

野 村 班

昭和60年度研究報告書

昭和 61年 3月

研究報告書作成にあたり

厚生省神経疾患研究委託費による「筋ジストロフィー症動物の開発・供給に関する研究」班は昨昭和59年度をもって3年間の研究期間を終了し、一応の成果をあげることができました。しかし、ヒト疾患のモデルとなる動物の開発は一朝一夕にできるものではなく、また、モデル動物の開発は研究がおこなわれている限り続けねばなりません。そこで今年度より「筋ジストロフィー症モデル動物の開発」班が発足することになりました。

モデル動物の開発には異常形質の発見、特性の分析、遺伝的背景の均一化など、極めて長い年月を要するものであります。また、飼育・維持方法によっては疾病感染により実験に供することができなくなるなどの問題点もあり、モデル動物の飼育・管理の方法も併せて開発する必要があります。従って、この班の目的は、前の班での目的、1)筋ジストロフィー症モデル動物の生産・供給、

2) 新しい筋ジストロフィー症モデル動物の開発・改良、および 3) 筋ジストロフィー症動物の 飼育管理方法の検討、をそのまゝ引きつぐことになりましたが、本研究班では新しい技術、例えば 発生工学の手法をもちいてモデル動物の開発・改良に一層の重点をおくために、一部班員の交代が 行なわれました。

本研究班では、筋シストロフィー症研究の進展のため、より良いモデル動物の開発・改良を目指すとともに、大量の実験動物を供給できるよう努力を致す所存であります。

今後も、諸班の先生方のご協力をお願い申しあげる次第であります。

おわりに、ご協力下さった班員各位、ならびに本研究委託費の取扱いに種々お世話いただいた厚 生省当局、国立神経センター、日本筋ジストロフィー協会の方々に心から感謝いたします。

昭和61年3月

野 村 達 次

筋ジストロフィー症に関する文献調査(1984)		••••					1
			村	達	次		
筋 ジストロフィー筋の発育分化と壊死発現に関す	る組織学的、	組織	兔化学	的研	・ 究・		11
	,,,,,,,,,,,,,,,,,,,,,,,,,,,,,,,,,,,,,,,	埜	中	征			
	研究協力者	禹			満		
		横	Щ	峯	介		
		江	崎	孝:	郎		
キメラマウスによる筋ジストロフィー症の解析・						•••••	33
			-		也		
	研究協力者		· 川	峯			,
		高	橋	利	_		
		日	下部	₹	昭		
膜結合蛋白質の単離と構造解析							37
		髙	松		研		. *
	研究協力者	藤	城	īE	敏		
		高	坂	新	_		
		塚	田	裕	Ξ		
and a State of the							4 5
新たに発見された後肢麻痺ラット		 Т		- * -	三郎	•••••	45
	研究協力者	_	中	-			
	奸先勋刀 有	空津		隆			
		ff-	312.	KE.	^		
後肢麻痺マウス ムレp の病態と遺伝について		·••••					63
· · · · · · · · · · · · · · · · · · ·		富	田		武		
	研究協力者	菊	池	建	機		
		埜	中	征	哉		
		若	杉		昇		
		111	섮		٠L		

矮性鶏における筋ジストロフィー遺伝子発現 …	•••••••	•••••	•••••	•••••	•••••	69
		菊	池	建	機	
	研究協力者	武	Ħ	伸	_	
糖原病Ⅱ型ウズラの改良				•••••		77
		水	谷		誠	
	研究協力者	新	海	久	夫	
		小	池	雅	春	
		中	山	_	彦	
筋 シストロフィーハムスターの繁殖ならびに系紡	ī育成について	···		•••••		89
		斉	藤	宗	雄	
	研究協力者	田	中		亨	
		松	崎	哲	也	

. .

筋ジストロフィー症に関する文献調査(1985)

野村達次*

筋ジストロフィー症モデル動物の開発研究の 一環として「疾患モデル動物」、「哺乳類、トリ類における筋ジストロフィーとその近縁疾患」 ならびに「筋ジストロフィーとその近縁疾患に

関する動物実験」についての文献調査をおこなった。それらの中から、海外における筋シストロフィーに関する文献(1985年分)を以下に紹介する。^{1~6})

MICE

Dick, D.J., Boakes, R.J., Harris, J.B.: A cerebellar abnormality in the mouse with motor end-plate disease. Neuropathol. Appl. Neurobiol., 11(2), 141-7, 1985.

Peterson, A.C.: Peripheral nerves in shiverer --Dystrophic mouse chimeras: evidence that a non-schwann
cell coponent is required for axon ensheathment in vivo.
J. Neurosci., 5(7), 1740-54, 1985.

Srivastava, U., Sebag, M., Thakur, M.: Biochemical changes in progressive muscular dystrophy. XIII. Nucleic acids, proteins, and total nucleotides in the thymus and spleen of dystrophic mice. Can. J. Biochem. Cell Biol., 63(5), 325-32, 1985.

Infante, J.P.: Defective synthesis of glycerophosphorylcholine in murine muscular dystrophy; The primary molecular lesion? Febs. Lett., 186(2), 205-10, 1985.

Hoh, J.F., Fitzsimons, R.B.: Myosin isoforms in normal and dystrophic human and murine muscles. Adv. Exp. Med. Biol., 182, 43-62, 1985.

Pette, D., Klug, G., Reichmann, H.: Parvalbumin reduction in relateion to possible perturbations of CA2+-homeostasis in muscular dystrophy. Adv. Exp. Med. Biol., 182, 265-7, 1985.

^{* (}財)実験動物中央研究所

Watson, A.Y., Leonard, J.L., Radie, K.A., Mellen, S.A., Murphy, R.A.: Alterations in the pituitary-thyroid axis and 5'-deiodinase activity in mice with muscular dystrophy. Endocrinology, 116(6), 2201-8, 1985.

Beuche, W., Friede, R.L.: A quantitative assessment of myelin sheaths in the peripheral nerves of dystrophic, quaking, and trembler mutants. Acta neuropathol. (Berl.), 66(1), 29-36, 1985.

Noireaud, J., Leoty, C.: Potassium and caffeine contractures in limb muscles of normal and dystrophic (C57BL/6J dy2J/dy2J) mice. Exp. Neurol., 87(3), 495-502, 1985.

Beuche, W., Friede, R.L.: Maked axon bundles enclosed by single segments of myelin sheaths in the nerves of non-dystrophic C57BL-ob/+ mice. Neuropathol. Appl. Neurobiol., 10(5), 369-77, 1984.

Parry, D.J., Desypris, G.: Fatiguability and oxidative capacity of forelimb and hind limb muscles of dystrophic mice. Exp. Neurol., 87(2), 358-68, 1985.

Mobley, B.A.: CA2+ capacity and uptake rate in skined fibers of myodystrophic muscle. Exp. Neurol., 87(1), 137-46, 1985.

Younger, L.E., Silverman, H.: Breeding and offspring rearing ability of C57BL/6J dystrophic mice. Lab. Anim. Sci., 34(5), 471-4, 1984.

Cohen, A.I.: Some contributions to the cell biology of photoreceptors. Proctor lecture. Invest. Ophthalmol. Vis. Sci., 25(12), 1354-65, 1984.

Whalen, R.G., Johnstone, D., Bryers, P.S., Butler-Browne, G.S., Ecob, M.S., Jaros, E.: A developmentally regulated disappearance oc slow myosin in fast-type muscles of the mouse. Febs. Lett., 177(1), 51-6, 1984.

Marcucci, F., Colombo, L., De Ponte, G., Mussini, E.: Decrease in N-acetyl-L-aspartic acid in brain of myodystrophic mice. J. Neurochem., 43(5), 1484-6, 1984.

Peterson, A.C., Bray, G.M.: Normal basal laminas are

realized on dystrophic schwann cells in dystrophic in equilibrium shiverer chimera nerves. J. Cell Biol., 99(5), 1831-7, 1984.

Semple, J.W., Wade, A.W., Szewczuk, M.R.: Natural killer (NK) cell activity in murine muscular dystrophy. II. Age-related tissue distribution and enhanced NK activity in the thymus of dystrophic mice. Clin. Immunol. Immunopathol., 33(2), 144-53, 1984.

Cossu, G., Eusebi, F., Senni, M.I., Molinaro, M.: Increased endocytosis of acetylcholine receptors by dystrophic mouse myotubes in vitro. Dev. Biol., 110(2), 362-8, 1985.

Gordon, T., Stein, R.B.: Temperature effects on the kinetics of force generation in normal and dystrophic mouse muscles. Exp. Neurol., 89(2), 348-60, 1985.

Noireaud, J., Leoty, C., Schmidt, H.: Acetylcholine-sensitivity in fast and slow twitch muscle of normal and dystrophic (C57BL/6J dy2J/dy2J) mice. Pflugers Arch., 404(2), 185-9, 1985.

Kirkeby, S., Moe, D.: Biochemical and histochemical studies on alkaline phosphatase in normal and dystrophic muscle. Exp. Pathol., 27(3), 131-6, 1985.

Hayden, M.R., Nichols, J.L.: Molecular genetic approaches to the study of the nervous system. Dev. Neurosci., 6 (4-5), 189-214, 1983.

Parry, D.J., Desypris, G.: Succinic dehydrogenase activity of forelimb and hindlimb muscles of the dystrophic mouse. Can. J. Physiol. Pharmacol., 62(8), 905-11, 1984.

HAMSTERS

Walkiewicz, M.J., Nicholls, D.M.: Phosphorylation of the sarcolemma of dystrophic and normal hamster muscle following denervation. J. Neurol. Sci., 69(1-2), 93-102, 1985.

Karpati, G., Jacob, P., Carpenter S., Prescott, S.: Hypophysectomy mitigates skeletal muscle fiber damage

in hamster dystrophy. Ann. Neurol., 17(1), 60-4, 1985.

Hofker, M.H., Wapenaar, M.C., Goor, N., Bakker, E., Van Ommen, G.J., Pearson, P.L. Isolation of probes detecting restriction fragment length polymorphisms from X chromosome-specific librapies: Potential use for diagnosis of Duchenne muscular dystrophy. Hum. Genet., 70(2), 148-56, 1985.

Ingle, C., Williamson, R. De La Chapelle, A., Herva, R.R., Haapala, K., Bates, G., Willard, H.F., Pearson, P., Davies, K.E.: Mapping DNA sequences in a human X-chromosome deletion which extends across the region of the Duchenne muscular dystrophy mutation. Am. J. Hum. Genet., 37(3), 451-62, 1985.

Roncuzzi, L., Fadda, S., Nochi, M., Prosperi, L., Sangiorgi, S., Santamaria, R., Sbarra, D., Besana, D., Morandi, L., Rocchi, M., et al.: Mapping of X-linked Becker muscular dystrophy through crossovers identified by DNA polymorphisms and by haplotype characterization in somatic cell hybrids. Am. J. Hum. Genet., 37(2), 407-17, 1985.

Francke, U., Ochs, H.D., De Martinville, B., et al.: Minor XP21 chromosome deletion in male associated with expression of Duchenne muscular dystrophy, chronic granulomatous disease, retinitis pigmentosa, and McLeod syndrome. Am. J. Hum. Genet., 37(2), 250-67, 1985.

De Martinville, B., Kunkel, L.M., Bruns, G., et al.: Localization of DNA sequences in region XP21 of the human X chromosome: Search for molecular markers close to the Duchenne muscular dystrophy locus. Am. J. Human Genet., 37(2), 235-49, 1985.

CHICKENS

Sohar, I., Fekete, E., Yorke, G., Cosentino, B., Roisen, F.J., Bird, J.W.: Proteinase activities in normal and dystrophic chicken myoblasts in culture. Prog. Clin. Biol. Res., 180, 629-31, 1985.

Dietert, R.R., Sanders, B.G.: Leukocyte cell populations in hereditary muscular dystrophic chickens. J. Hered., 76(4), 285-8, 1985.

Feit, H., Domke, R.: Changes in turbidity during microtubule assembly in brain extracts from normal chickens and chickens with muscular dystrophy. J. Neurogenet., 1(2), 141-52, 1984.

Huszar, G., Vigue, L., Haines, J.: Myosin heavy chain in avian muscular dystrophy corresponds to the neonatal isozyme. J. Biol. Chem., 260(18), 9957-60, 1985.

Demichele, S.J., Brown, R.G., Krasin, B.W., Sweeny, P.R.: Connective tissue metabolism in muscular dystrophy. Amino acid composition of native types I, III, IV, and V collagen isolated from the gastrocnemius muscle of embryonic chickens with genetic muscular dystrophy. Comp. Biochem. Physiol. (B), 81(1), 149-57, 1985.

Sokolove, P.M.: Altered membrane association of glycogen phosphorylase in the dystrophic chicken. Biochim. Biophys. Acta, 841(2), 232-6, 1985.

Bennett, V.D., Hall, N., Deluca, M., Suelter, C.H.: Decreased mitochondrial creatine kinase activity in dystrophic chicken breast muscle alters creatine-linked respiratory coupling. Arch. Biochem. Biophys., 240(1), 380-91, 1985.

Misra, L.K., Kasturi, S.R., Kundu, S.K., Harati, Y., Hazlewood, C.F., Luthra, M.G., et al.: Evaluation of muscle degeneration in inherited muscular dystrophy by nuclear magnetic resonance techniques. Magn. Reson. Imaging, 1(2), 75-9, 1982.

Thacore, H.R., Kibler, P.K., Gregorio, C.C., Pollina, C.M., Hudecki, M.S.: Characterization of lymphocyte interferons with different species specificities from normal and genetically dystrophic chickens. J. Interferon Res., 5(2), 279-88, 1985.

Baxter, J.H., Suelter, C.H.: Resolution of the low-molecular-weight acid phosphatase in avian pectoral muscle into two distinct enzyme forms. Arch. Biochem. Biophys., 239(1), 29-37, 1985.

Bandman, E.: Distribution of slow myosin in dystrophic chicken muscle. Adv. Exp. Med. Biol., 182, 63-72, 1985.

Matsuda, R., Strohman, R.C.: Myotrophic factor(s) in

normal and dystrophic chicken skeletal muscle. Adv. Exp. Med. Biol., 182, 137-40, 1985.

Oh, T.H., Markelonis, G.J., et al.: Stimulation of the synthesis of fructose 1,6-diphosphate aldolase by transferrin. Adv. Exp. Med. Biol., 182, 129-35, 1985.

Huszar, G., Vigue, L., Delucia, J., Elzinga, M., Haines, J.: Structure of myosin heavy chain in avian muscular dystrophy. J. Biol. Chem., 260(12), 7429-34, 1985.

Rushbrook, J.I., Somes, R.G., Jr.: Myosin light chain1: Genetic analysis of three variants found in fast
white chicken muscle and investigation of linkage with
the muscular dystrophy gene. Biochem. Genet., 23(12), 17-27, 1985.

Davidson, W.S., Murphy, D.G.: Aldehyde reductases and their involvement in muscular dystrophy. Prog. Clin. Biol. Res., 174, 251-63, 1985.

Misra, LK., Luthra, M.G., Amtey, S.R., Elizondo-Riojas, G., et al.: Enhanced T1 differentiation between normal and dystrophic muscles. Magn. Reson. Imaging, 2(1), 33-5, 1984.

Lebherz, H.G.: Content and synthesis of glycolytic enzymes in normal, denervated, and dystrophic skeletal muscle fibers. Int. J. Biochem., 16(12), 1201-5, 1984.

Wright, W.E.: Myoblast senescence in muscular dystrophy. Exp. Cell Res., 157(2), 343-54, 1985.

Petell, J.K., Lebherz, H.G.: Content and synthesis of glycolytic enzymes and creatine kinase in skeletal muscles and normal and dystrophic chickens. Arch. Biochem. Biophys., 237(1), 271-80, 1985.

Bandman, E.: Continued expression of neonatal myosin heavy chain in adult dystrophic skeletal muscle. Science, 227 (4688), 780-2, 1985.

Entrikin, R.K., Larson, D.B.: Avian muscular dystrophy: Serum thyroid defect and limited improvement with methimazole and propylthiouracil. Exp. Neurol., 87(2), 318-25, 1985.

Shackelford, J.E., Lebherz, H.G.: Synthesis of apolipoprotein A1 in skeletal muscles of normal and dystrophic chickens. J. Biol. Chem., 260(1), 288-91, 1985.

Demichele, S.J., Brown, R.G.: Connective tissue metabolism in muscular dystrophy. Levels of collagen and mucopolysaccharides in embryonic chickens with genetic muscular dystrophy. Comp. Biochem. Physiol. (B), 79(2), 203-9, 1984.

Kester, M., Privitera, C.A.: Plasmalogenase activity in normal and dystrophic chicken erythrocytes. Comp. Biochem. Physiol. (B), 79(1), 51-4, 1984.

Kester, M., Privitera, C.A.: Phospholipid composition of dystrophic chicken erythrocyte plasmalemmae. II. Characterization of a unique lipid from dystrophic erythrocyte membranes as ethanolamine plasmalogen. Biochem. Biophys. Acta, 778(1), 121-8, 1984.

Kester, M., Privitera, C.A.: Phospholipid composition of dystrophic chicken erythrocyte plasmalemmae. I. Isolation of a unique lipid in dystrophic erythrocyte membranes. Biochem. Biophys. Acta, 778(1), 112-20, 1984.

Allen, E.R.: The musculus complexus of normal and dystrophic chicken embryos. Poult. Sci., 63(10), 2087-93, 1984.

Kang, C.W., Sunde, M.L., Swick, R.W.: Characteristics of growth and protein synthesis in skeletal muscles of normal and dystrophic chickens. Biochim. Biophys. Acta, 802(1), 1-8, 1984.

Chown, P.J., Barvard, E.A., Barnard, P.J., Liu, P.K., Carter, N.D.: Plasma phosphoglycerate mutase as a marker of muscular dystrophy. J. Neurol. Sci., 65(2), 201-10, 1984.

Yeagle, S.P., Albuquerque, E.X.: Reinnervation of normal and dystrophic skeletal muscle. Exp. Neurol., 86(1), 1-17, 1984.

McLennan, I.S.: Inhibition of prostaglandin synthesis produces a muscular dystrophy-like myopathy. Exp.

Neurol., 89(3), 616-21, 1985.

Murphy, D.G., Davidson, W.S.: Inhibition studies on chicken muscle aldose reductase. Biochem. Pharmacol., 34(16), 2961-5, 1985.

Barnett, R.I.: Developmental neuron cell death in dystrophic and normal chickens. Exp. Neurol., 89(2), 382-90, 1985.

OTHERS

Promkhatkaew, D., Komaratat, P., Wilairat, P.: Ascorbic acid-FE2+ treatment mimics effect of vitamin E deficiency on sarcoplasmic Ca-Atpase of rabbit muscle. Biochem. Int., 10(6), 937-43, 1985.

Schultz, E.: Satellite cells in normal, regenerating and dystrophic muscle. Adv. Exp. Med. Biol., 182, 73-84, 1985.

Chupukcharoen, N., Komaratat, P., Wilairat, P.: Effects of vitamin E deficiency on the distribution of cholesterol in plasma lipoproteins and the activity of cholesterol 7 alpha-hydroxylase in rabbit liver. J. Nutr., 115(4), 468-72, 1985.

Hidiroglou, M., Proulx, J., Jolette, J.: Intraruminal selenium pellet for control of nutritional muscular dystryophy in cattle. J. Dairy Sci., 68(1), 57-66, 1985.

Turner, R.J., Wheatley, L.E., Beck. N.F.: Impaired mitogen responses in lambs with white muscle disease. Res. Vet. Sci., 37(3), 357-8, 1984.

Roneus, B., Jonsson, L.: Muscular dystrophy in foals. Zentralbl. Veterinarmed. (A), 31(6), 441-53, 1984.

Davies, K.E., Briand, P., Ionasescu, V., Ionasescu, G., Williamson, R., Brown, C., Cavard, C., Cathelineau, L.: Gene for OTC: Characterisation and linkage to Duchenne muscular dystrophy. Nucleic Acid Res., 13(1), 155-65, 1985.

Sirken, S.M., Fischbeck, K.H.: Freeze-fracture studies

of denervated and tenotomized rat muscle. J. Neuropathol. Exp. Neurol., 44(2), 147-55, 1985.

Lunkenheimer, P.P., Muller, R.P., Konermann, C., Lunkenheimer, A., Kohler, F.: Architecture of the myocardium in computed tomography. Invest. Radiol., 19(4), 273-8, 1984.

対 対

- 1) 野村達次:筋ジストロフィー症に関する文献調査(1978),厚生省神経疾患研究委託費「筋ジストロフィー症動物の生産・開発に関する研究」班、昭和54年度研究報告書,1-7,1980.
- 2) 野村達次:筋ジストロフィー症に関する文献調査(1979),厚生省神経疾患研究委託費「筋ジストロフィー症動物の生産・開発に関する研究」班,昭和55年度研究報告書,1-15,1981。
- 3) 野村達次:筋ジストロフィー症に関する文献調査(1980,1981),厚生省神経疾患研究委託費「筋ジストロフィー症動物の生産・開発に関する研究班,昭和56年度研究報告書,1-12,1982.

- 4) 野村達次:筋ジストロフィー症に関する文献調査(1982),厚生省神経疾患研究委託費「筋ジストロフィー症動物の開発・供給に関する研究」班,昭和57年度研究報告書,1-5,1983.
- 5) 野村達次:筋ジストロフィー症に関する文献調査(1983),厚生省神経疾患研究委託費「筋ジストロフィー症動物の開発・供給に関する研究」班,昭和58年度研究報告書,1-9,1984.
- 6) 野村達次:筋ジストロフィー症に関する文 献調査(1984), 厚生省神経疾患研究委 託費「筋ジストロフー症動物の開発・供給 に関する研究」班,昭和59年度研究報告 書,5-12,1985.

筋ジストロフィー筋の発育分化と壊死発現に 関する組織学的、組織化学的研究

進行性筋ジストロフィーは、筋の変性・壊死 がその主病変である。筋の壊死発現のメカニズ ムを明らかにすることは、進行性筋ジストロフ ィーの病態を解き明かす鍵である。近年動物モ デルの研究により、病態解明のための知見が多 く得られるようになった。筋ジストロフィーの 動物モデルは、現在までに様々なものが見出さ れているが、マウスでは今日主に2種類が知ら れている。1つは、Michelson らが最初に報 告し1)、後に遺伝子名 dy を与えられた常染色体 性劣性遺伝を示す 129/ReJ-dy/dy である。こ の遺伝子はC57BL/6J系に導入され、C57BL /6Jdy/dy として一般化している。もう1つは、 最近 Bulfield ら²⁾ が最初に報告したX染色 体性劣性遺伝の形式をとる C57BL/10ScSn の mutant マウスで、遺伝子名 mdx が与えら れている。

これらのマウスの間には、臨床的に明らかな 差がみられる。mdxマウスでは、進行性の筋力 低下はなく、見かけ上は正常と変わらない⁸⁾⁴⁾。 これに対して、dyマウスでは、生後約2週目 に後肢のひきずりや痙攣(twitching)が出現 し、これらの症状は成長に従って強くなり、3 ヶ月頃より後肢は常に伸展したままとなり、前 肢だけで移動するようになる。mdxマウスは2 年以上生存するのに対して、dyマウスでは 飼 育条件にもよるが生後5~6ヶ月以内に死亡す

* 国立武蔵療養所神経センター

る。これらの2種類の筋ジストロフィーマウスの臨床症状の違いが、一体どのようなところから起因するのか、又、両者では組織病理上の違いがあるが、特にその壊死・再生の過程の違いがどこから起因するのかを明確にする必要がある。今回我々は、筋の発育分化という観点から壊死発現との関連について検討を加えたので報告する。

<対象・方法>

対象は、C57BL/10ScSn-mdx (mdxマウス) とC57BL/6Jdy/dy(dyマウス)及び対照と して C57BL/10ScSn (対照マウス)を用いた。 dy マウスは、 体外受精によって得たホモを使 用した。mdx マウスと対照マウスは、生直後、 5日、10日、15日、20日、30日、60 日、90日、180日目を、dv マウスは、5日、 10日、15日、20日、30日、60日目の 各時点を経時的にみた。mdxマウスと対照マウ スは各5匹、dy マウスは各3匹から、各時点 で、下肢の筋を採取し、電顕用と光顕用に固定 した。15日目までは下腿全体を、20日目以 後は右長指伸筋、右前脛骨筋(白筋)、右ヒラ メ筋(赤筋)をとり出し、トラガカントゴムを 用いてコルク片の上に筋の線維方向が垂直にな るように立てて、液体窒素で冷却したイソペン タン中で凍結固定した。クリオスタットで横断

^{** (}財) 実験動物中央研究所

面での連続凍結切片を作製し、haematoxylin and eosin (HE),Gomori trichrome変法、NADH-TR, acid phosphatase,ATPase(routine, pH4.5,4.3) の各染色を施した。) HE染色のヒラメ筋を写真 撮影し、総線維数及び筋線維中の中心核線維の 比率(%)を算定し、定量的検討を行なった。

光顕用固定と同時に、左ヒラメ筋を採取しカコジル酸ナトリウム緩衝グルタールアルデヒド固定を行なった。Os O4 後固定(lanthanum法),アルコール脱水ののちにエボキシ樹脂に包埋し、電顕用標本とした。横断面の1 μ厚切片を作製し、トルイジンブルー染色を施こし、最終倍率1000倍に写真撮影し、image analyzer(Kontron)を用いて、平均筋線維径を測定した。酢酸ウランと鉛の二重染色を

した後に電顕観察(日立H-600型)を行ない、 弱拡大で写真撮影したものから、線筋維数・筋 線維の核数・筋衛星細胞の数及び筋衛星細胞の 核の数をそれぞれ算定し、筋衛星細胞の出現頻 度を検討した。

<結 果>

(1) 組織学的所見

(a) mdx マウス:昨年の報告⁶⁾のように、生後15日日頃より壊死線維が大きな集塊を成してみられるのが、その特徴の1つであった(図1)。 壊死線維群は貪食反応を伴ない、またHE染色で胞体が basophilic に染まり中心核を持った再生線維を含んでいた。この時期の電顕では(図2)、empty sarcolemmal tube や opaque 線維などの変性線維がみら

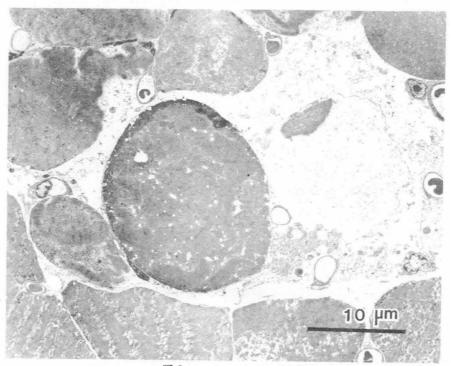


図 2. mdx マウス 30 日目

過収縮を呈するOpaque 線維と empty sarcolemmal tube の存在など、壊死の早期を示す。

れた。これら壊死線維は、続いて中心核をもつ 再生線維となり、次第にその直径を増し、60 日目以後は中心核線維は大きな集塊を形成して 存在した(図3)。壊死線維の出現頻度は次第 に減少したが180日目にも散在性に存在した。 最も壊死線維が多くみられたのは、生後30-60日目であった。180日目においても、脂肪 の増加や fibrosis は、ほとんどみられなかった。

(b) dyマウス: 5日目には壊死性の変化は みられず、筋線維は細胞境界が明瞭でやや大型 の核を持っていた。しかし、10日目には壊死 線維が散見するようになった(図4)。これら の壊死線維はまだ数が少なく、非壊死部の筋線 維は核が胞体の辺縁部に存在し、筋線維内構造 も良く保たれていた(図5)。15日目に なると中心核線維は増加し、壊死線維に貪食細胞が多く見られ、また比較的大型の筋衛星細胞を伴なった未熟な筋線維などもみられるようになった(図6,7)。20日目には、さらに壊死再生の過程が活発になっていた(図8)。筋線維は大小不同が目立ち、壊死線維とそれを取り囲む貪食細胞もさらにその数を増していた。しかしながら、この壊死線維はmdxマウスの時のように大きな集塊を形成することはなかった。未熟で大型の核で明瞭な核小体のみられる線維も増加している。さらにfibrosisや脂肪組織の増加がみられた。

mdx マウスと dy マウスの筋組織像の変化を まとめたのが図 9 である。

(2) 平均線維径、総線維数、中心核線維 前述の方法でヒラメ筋の平均線維径、総線維

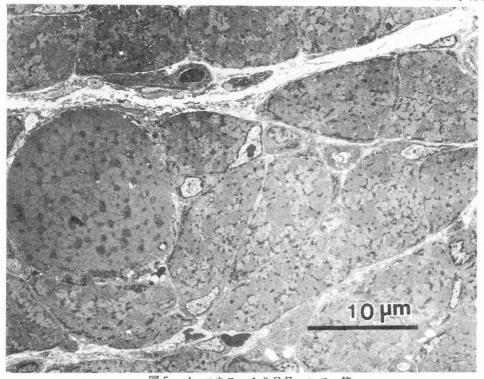


図 5. dy マウス 10日目、ヒラメ筋 核は細胞の辺縁に存在しており、筋線維内構造も良好である。

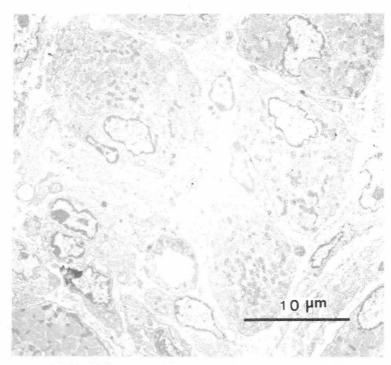


図 6. dyマウス 15日目、ヒラメ筋 多くの貪食細胞を認める。大型の筋衛星細胞がみられる。中心核線維は増加している。

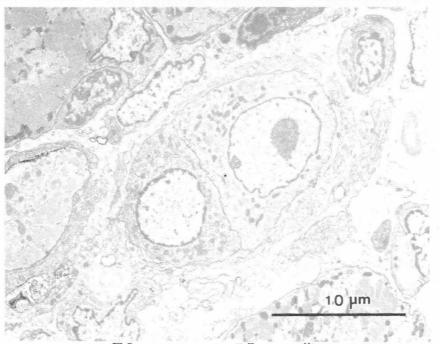
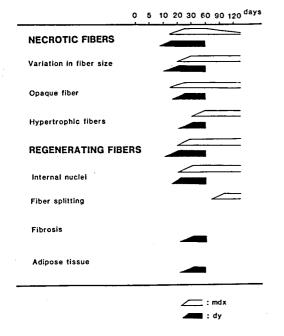


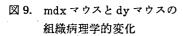
図 7. dyマウス 15日目、ヒラメ筋

未熟で明瞭な核小体をもつ中心核線維とそれを取り囲む多くの貪食細胞、活動化している筋衛星細胞もみられる。



照、mdx, dy マウスともに次第に増加していく傾向がみられた(図10)。dy マウスでは、15日目より線維径のバラつきが大きいが、これは筋線維の大小不同が目立つ時期と一致していた。ただし平均直径でみると、他の二者と大きな差は認めなかった。

対照及びmdxマウスヒラメ筋の総線維数は、 生後20日目まで両者に大きな差はなく、成長 と共にその数を増していた。しかし、 dy マウスでは、生後15日から筋線維の総数が減少していく傾向がみられた(図11)。 これは、壊死再生の過程が活発になってくることと逆相関しており、後述する中心核線維出現の時期にも一致していた。20日目には筋線維総数はさらに減少し、mdx、対照マウスに比して有意に低い値となっていた。



数、中心核線維の出現比率を、生後5日目より **400** 検索した。

平均線維径は、5日目から30日目まで、対

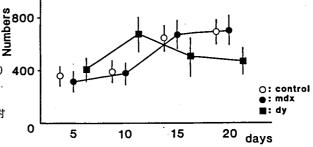
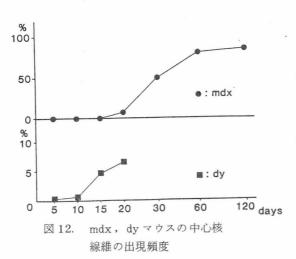


図 11. 対照、mdx, dyマウス の 総線維数の経時的変化

20 0: control 0: mdx m: dy 0 30 days
図 10. 対照、mdx , dy マウスの

図 10. 対照、mdx, dy マウスの 筋線維の直径の推移 次に中心核線維の出現頻度についてみると (図12)、mdxマウスでは、20日目から中心核線維が増加しはじめ、30日目にはほぼ半数、60日目以後は大部分が中心核線維で占められていた。これに対して、dyマウスでは、中心核線維の占める比率の値がmdxよりも低いのではあるが、15日目よりその出現頻度が増加しており、これは壊死再生の過程が活発化

してくる時期に一致していた。



(3) 組織化学染色

mdxマウスは、NADH-TR 染色で、15日目まで筋線維のタイプ分別は良好で、その染色性では対照と差は認めなかった。壊死再生が活発になってくる20日目でも、非壊死部の線維

は同様であった(図 13)。ATPase 染色でも、20日目までは type 1, type 2の分別は良好であった(図 14)。 しかし、30日目には、ほとんどタイプ分別が不良となり、intermyofibrillar networkの乱れがみられるようになった(図 15)。

dyマウスでは、生後10日目では、NADH-TR 染色で、対照と差は認めなかった(図16)。壊 死再生の活発な20日目には、筋線維タイプの 分別は悪くなり、ATPase 染色で未熟な線維 が目立つようになった(図17)。

(4) 筋衛星細胞 (satellite cell)

筋衛星細胞は、lanthanum 染色をすると、 母細胞である筋線維細胞と明瞭に境界されており、また母細胞と基底膜を共有していた(図18)。 700倍の低倍率で写真撮影した電顕写真より、 筋線維(MF)、筋線維核(MN)、筋衛星細胞 (SC)、筋衛星細胞核(SN)の各々の総数を

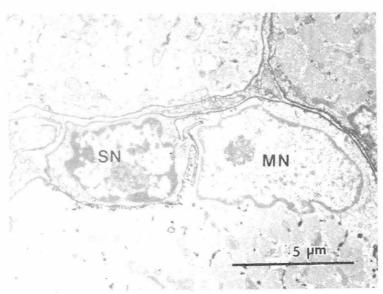


図 18. 対照マウス 5日目、ヒラメ筋 筋衛星細胞が、lanthanum で母細胞と明瞭に境界されている。 MN: 筋線維核 SN: 筋衛星細胞核

各検体ごとに算定した。今回、筋衛星細胞の出現頻度をみる指標として、総核数に対する筋衛星細胞の核数の比を百分率で表わしたもの(SN/MN+SN×100(%))を用いた。

壊死再生が活発になってくる前の15日目までの筋衛星細胞の出現を重点的にみた(図19)。

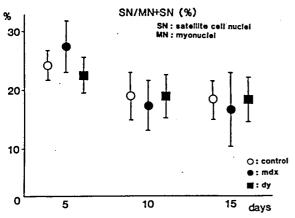


図 19. 対照、mdx, dy マウスの筋衛星 細胞の出現頻度。

対照、mdx, dy マウスともに5日目には25 %前後であるが、10日目には20%前後となり15日目にはそれよりわずかに減少していく傾向がみられた。すなわち、生直後は筋衛星細胞は多く出現するが、その発育に従って、出現頻度が三者ともに減少していくことがわかった。

<考 察>

筋ジストロフィーハムスターでは生下時にホモが識別できるため¹⁰、また筋ジストロフィー 鶏やmdxマウスでは確実に発症動物が得られるので²⁾⁴⁾⁷、これらのモデル動物では出生直後からの研究が可能となった。これに対して、dyマウスは、従来よりヘテロとヘテロをかけ合わせてホモを得るため、ホモであるか否かは臨床症状が出現してからでなければわからず、生直 後から生後2-3週頃までの間の検索が困難であった¹⁴⁾¹⁵⁾¹⁶。実中研の横山らは、体外受精によってホモとホモとをかけ合わせて100%に発症マウスを得ることに成功した。¹⁷⁾これによってdyマウスでも生直後からの検索が可能になったばかりでなく、さらには胎生期の検索をも可能となったということは、特筆すべき事柄である。

dy マウスは、筋ジストロフィー鶏と同様に⁷⁾筋線維の発育分化に遅れがあるのではないかと 考えられていた。今回我々は、この体外受精に よって得たdy マウスを用いて、筋線維の発育 分化について検索を行った。それと同時にmdx マウスに関しても同様に筋の発育分化について 検討した。

dy マウスもmdx マウスも、出生直後より発 育に従って筋線維の直径は徐々に増大しており、 組織化学分析でも筋線維タイプの分化がすすみ、 筋は成熟している。また、筋衛星細胞の出現で みると、生後5日目に高かった値が、対照と差 はなく、下がってきている。この筋衛星細胞は、 胎生期に多く出現しており、筋が発育分化する に従って、その出現頻度が減少してくる。よっ て、もし筋の発育分化に遅れがある場合には、 筋衛星細胞の出現頻度が高い値をとりつづける ことになる。dy マウス及びmdx マウスでは、 壊死発現までの間筋衛星細胞の出現は対照と差 はなかった。このことは筋ジストロフィーマウ スでも筋の発育分化には、特に遅れがみられな いことを示していると思われる。すなわち、両 者ともに筋の発育分化の途上に異常なく、筋線 維が一度成熟した時点で壊死がおこってくると いうことが推定される。

壊死発現の次には、再生という過程がおこるが、dy, mdx マウスでは、再生線維は中心核

線維で特徴づけられると考えられている。すな わち、dy, mdx マウス両者において、 中心核 線維の周辺にしばしば貧食細胞を多く認める (図7)。貪食細胞の存在は、その場所に壊死 の過程が以前存在したことを物語っており、こ の中心核線維はその前に壊死という過程を経た と考えられ得る。言い換えれば、この中心核線 維は再生線維であることを裏づける所見といえ る。塩酸ブピバカインによって人為的に筋の壊 死をおこさせる実験では、経時的にみると壊死 線維が中心核線維に置き換わることが確認され ている⁸⁾。また、dyマウスでは、autoradiography を用いて、中心核線維は種々の段階 の再生線維であると報告されている? 従って、 壊死の発現したあとに出現してくる中心核線維 が即ち再生線維であることは、これらのことか らも疑いのないところである。

dyマウスとmdx マウスでは、壊死再生を中心とした筋組織病理学上での相違点がいくつかあげられる。

まず壊死・再生の発現の時期である。dyマウスの方がmdxに比して壊死線維の発現の時期がやや早く、また、これに伴なう再生を反映する中心核線維の出現時期も、dyマウスの方がやや早い。壊死の発現は、mdxマウスが大きな集塊を形成して壊死に陥いるのに対して、dyマウスではそのように大きな集塊を成すことがない。しかしながら、次の再生の過程をみると、mdxマウスではほとんど全てが中心核線維として置換されるため、総線維数は対照と変わることなく増加しており、いったん広範に壊死に陥ったものがほぼ完全に再生されているのがわかる。しかし、dyマウスでは、壊死再生の活発になってくる15日目より総線維数が減少しており、壊死が再生によって完全には代償されて

いないことがうかがわれる。mdx マウスと dy マウスの臨床上の差は、この再生の相違を反映していると考えられる(図 20)。

		MOUSE		
	DMD	_dv_	mdx	
CLINICAL FINDINGS				
Prog. muscle weakness	***	-111-	(±)	
Cardiac Involvement	+	Θ	$\overline{\Box}$	
Increased serum CK and PK	+	+	¥	
MUSCLE & NERVE PATHO	LOGY			
Necrosis and regeneration	+	+	+*	
Complete recovery after myonecrosis	- '	_	.⊕	
Delayed muscle fiber type differentiation	+	+	-	
Fibrosis	+	+	⊕	
Intracytoplasmic vacuoles	-	-	_	
involved fiber type	1,2	1,2	1,2	
Dysmyelination	-	(+)	-	

DMD: Duchenue muscular dystrophy

* : ocasionally seen in large groups

: different from DMD

図 20. ヒト Duchenne 型筋ジストロフィーと筋ジストロフィーマウスの比較

同じ壊死線維であっても、その再生の仕方が

異なるのは何故であろうか。両者の筋線維以外での組織学上の差は、結合織増生の有無である。ほぼ完全に再生のおこるmdxマウスではfibrosisや脂肪織の増加がほとんどみられないが、完全に再生で代償されないdyマウスではfibrosisや脂肪織増加が早期よりみられる。この結合織の増生が再生の過程において何らかの抑制因子となっている可能性は否定できない。他の動物モデル、例えば筋ジストロフィーハムスターでも10、mdxマウスと同様に、群を成して壊死再生がおこり、末期まで結合織増生をみることなく、再生はよく壊死を代償し

ている。 dy マウスにおける結合織増生が、原 因なのか結果なのか、つまり fibrosis によ り筋全体の伸展性が悪くなり同時に脂肪織によ って再生すべき Space を占拠されるために再 生が悪くなるのか、あるいは、何らかの原因に より再生過程がスムースにいかないために非特 異的な反応の結果として fibrosis や脂肪織 への置換がおこるかは、明らかではない。前者 では、結合織そのものに dy マウスと mdx マウ スに差があることになる。dyマウスはin vitro で fibroblastと筋原線維の関連性が 研究されているが、Summers ら¹¹⁾は、dvマ ウス筋の培養で筋新生の減少がみられ、それは fibroblastの出現によって相対的に筋原線 維が減少するからとしている。だが fibroblast そのものには差がないと述べている。 後者では、再生がおこってくる前の段階での両 者の差である。

dyマウスとmdxマウスが次に異なる点が、神経病理学的所見にある。 dy マウスでは、神経系の異常所見が存在する。 dy マウスでは脊髄の根神経に髄鞘形成不全 (amyelination, dysmyelination) が認められている 12 。しかしながら、組織病理学的にみると、筋には神経原性の変化はほとんどみられない。壊死に陥った線維が再生してくる reinnervationの段階で、この脱髄した神経の影響が出てくる可能性もある。 mdxマウスでは神経終末は正常であり 2)、 坐骨神経では dyマウスの如く著しい脱随はみられないが、7週目のmdxマウスで無髄神経野がわずかにみられたと報告されている 13 。 神経性因子の関与については、今後さらに検討が必要と思われる。

<結 語>

dy, mdx マウスのヒラメ筋では

- 1) 生後 1 5 2 0 日目までの筋の発育と分化 に異常はなかった。
- 2) 生後15日目まで筋衛星細胞の形態、頻度 は対照と差はなかった。
- dyマウスでは生後10日目、mdxマウスでは15日目頃より壊死・再生が開始した。
- 4) 発育・分化途上筋は壊死に陥りにくいと思われた。
- 5) 再生過程には、結合織増生などの2次的因 子も関与すると考えられた。

< 文 献 >

- 1) Michelson, A.M., Russell, E.S. and Harman, P.J. (1955): Dystrophia muscularis: A hereditary primary myopathy in the house mouse. Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 41,
- 2) Bulfield,G., Siller,W.G., Wight,P.A.L. and Moore,K.J. (1984): X chromosome-linked muscular dystrophy (mdx) in the mouse. Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 81, 1189-1192.
- 3) Dangain, J. and Vrbova, G. (1984): Muscle development in mdx mutant mice. Muscle Nerve, 7, 700-704.

- 4) Tanabe,Y., Esaki,K. and
 Nomura,T. (1986): Skeletal
 Muscle pathology in X
 chromosome-linked muscular
 dystrophy (mdx) mouse. Acta
 Neuropathol(Berl), 69, 91-95.
- 5) Dubowitz, V. and Brooke, M.H. (1973): Muscle biopsy. A modern approach. Saunders, London.
- 6) 杉田秀夫(1985):筋ジストロフィー症モデル動物の開発,mdxマウス骨格筋の病理学的研究,厚生省神経疾患委託費「筋ジストロフィー症動物の開発・供給に関する研究」野村班 昭和59年度研究報告書,13-31。
- 7) Nonaka, I. and Nakamura, H.

 (1982): Muscle differentiation and regeneration in chiken muscular dystrophy.

 In Muscular Dystrophy. Ed. by Ebashi, S. University of Tokyo Press, Tokyo, p.63-77.
- 8) Nonaka, I., Takagi, A., Ishiura, S., Nakase, H. and Sugita, H. (1983): Pathophysiology of muscle fiber necrosis induced by bupivacaine hydrochloride (Markaine). Acta Neuropathol. (Berl.), 60, 167-174.
- 9) Walker, B.E. (1962): A radioautographic study of muscle

- regeneration in dystrophic mice. Am.J.Pathol., 41,41-53.
- 10) Homburger, F. (1979):

 Myopathy of hamster dystrophy; history and morphologic aspects. Ann. N.Y. Acad. Sci., 317,2-17.
- 11) Summers, P.J. and Parsons, R.

 (1981); A quantitative
 assessment of dystrophic mouse
 (129ReJ dy/dy) myogenesis
 in vitro. Neuropathol. Appl.
 Neurobiol. 7, 269-277.
- 12) Bradley, W.G. and Jenkinson, M. (1973): Abnormalities of peripheral nerves of normal and dystrophic mouse muscle. J. Neurol. Sci., 18, 227-247.
- 13) 中村晴臣(1985): mdx マウスの坐骨神経 所見,厚生省神経疾患委託費「筋ジストロフィー症の臨床,病態と成因に関する研究」 杉田班 昭和59年度研究報告書,39-41
- 14) Wirtz,P., Loermans,H.M.Th.,
 Peer,P.G.M. and Reitjes,A.G.
 (1983): Postnatal growth and
 differentiation of muscle
 fibers in the mouse, II.
 A histochemical and
 morphometrical investigation
 of dystrophic muscle. J.Anat.,
 137,1, 127-142.

- 15) Ontell,M., Feng,K.C.,
 Klueber,K., Dunn,R.F. and
 Taylor,F. (1984):
 Myosatellite cells, growth,
 and regeneration in murine
 dystrophic muscle:
 A quantitative study. Anat,
 Rec. 208, 159-174.
- microscopic study of satellite cells and regeneration in dystrophic mouse muscle. Neuropathol. Appl. Neurobiol. 7, 257-268
- 17) 江崎孝三郎, 横山峯介(1985): 体外受精 法による筋ジストロフィーマウス(C57BL /6-dy/dy) の作出, 厚生省神経疾患研 究委託費「筋ジストロフィー症動物の開発・ 供給に関する研究」野村班 昭和59年度 研究報告書, 119-122.

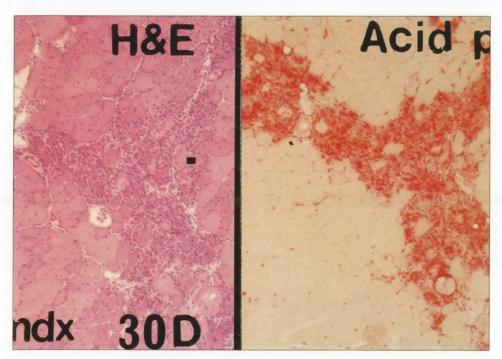
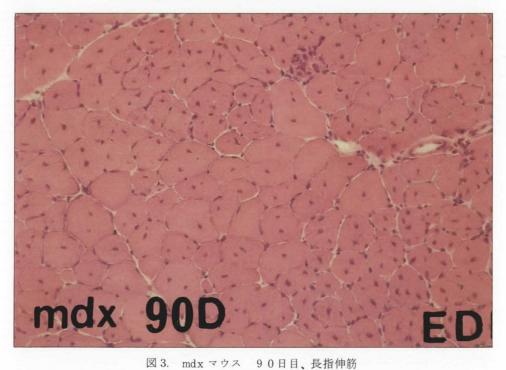


図 1. mdx マウス 30日目 生後30日目のmdx マウスにみられる壊死巣。多数の貪食細胞 がみられる部位は、酸フォスファターゼで活性が高い。



中心核線維が群を成して存在する。中心核線維の直径は、正常と同じ位になっているものも多数みられる。結合織の増生はほとんどみられない。 H&E

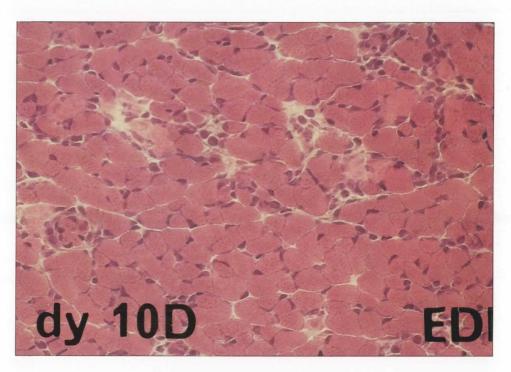


図 4. dy マウス 10日目、長指伸筋 壊死線維が散見される。 H&E

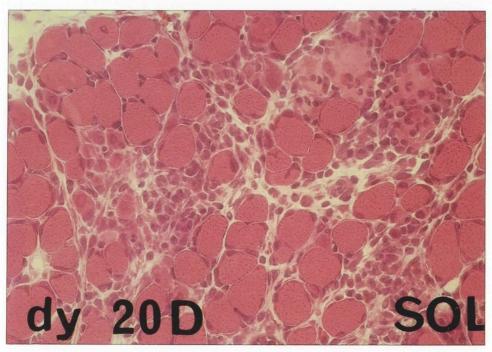


図 8. dy マウス 20日目、ヒラメ筋 壊死線維、貪食細胞、中心核線維が多くみられ、壊死再生が 活発である。 H&E

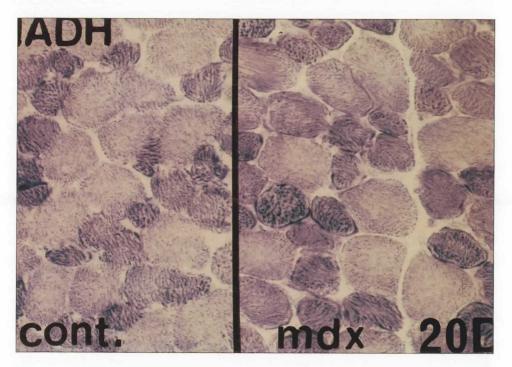


図 13. 対照マウス (cont) も mdx マウスの非壊死部 (mdx) も、生後 2 0 日目までは、筋線維経と筋線維タイプの分化には変わりない。 NADH-TR.

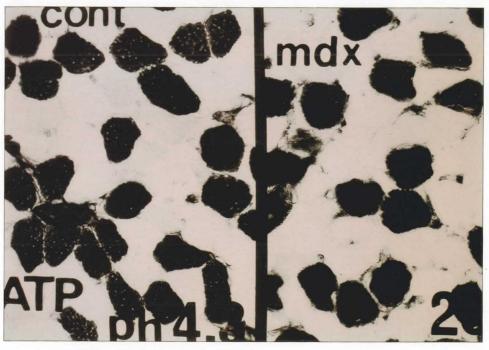


図 14. 対照 (cont) も mdx マウス (mdx) も、 2 0 日目までは筋線維タイプはよく分化していて未分化な線維はみられない。ATPase(pH4.3)。

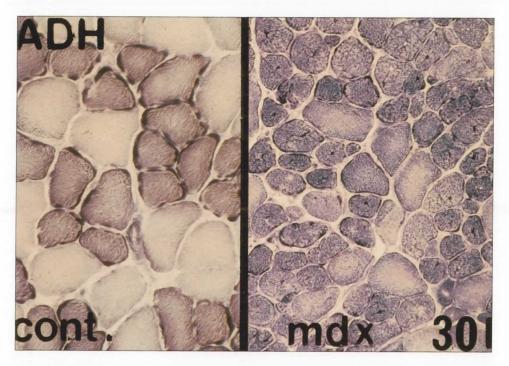


図 15. 左対照マウス (cont)、右mdxマウス (mdx)
mdxマウスで筋線維タイプの分別が不良で、intermyofibrillar
network の乱れがある。 NADH-TR.



図 16. dy マウスも 1 0 日目までは筋線維の直径および筋線維タイプの分布に 異常はない。 NADH-TR、

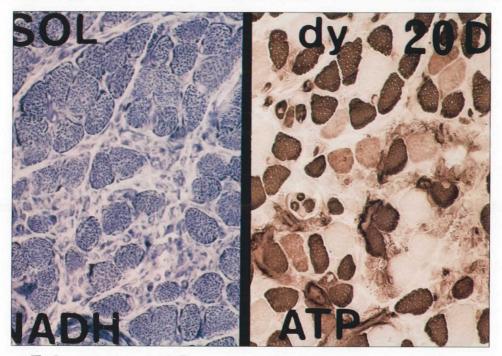


図 17. dy マウス 2 0日目 酸化酵素染色で筋線維のタイプの分別が悪く、ATP 染色で中間色に染まる タイプ 2 C 線維が増加している。 左 NADH-TR, 右 ATPase(pH4.3)

キメラマウスによる筋ジストロフィー症の解析

勝 木 元 也^{1,3)} 研究協力者 横山峯介¹⁾ 高橋利一¹⁾ 日下部守昭²⁾

2種以上の遺伝的にことなる細胞からなる個体をキメラという。キメラマウスは、ことなる2種の系統の胚を集合し、1個の胚に発生した後、偽妊娠レシピエントメスマウスの子宮内に移植することによって得られる。キメラマウスは1個体中に、遺伝的性質を異にする細胞が接して存在するため、自然には決して生ずることのない動物実験系となり得ると考えられる。

筋ジストロフィー症のモデルの可能性があるマウスのうちmdx 変異の性質について解析をキメラマウスを用いて行なった。正常と筋ジストロフィー症マウスとの間にキメラを作出し、筋の耐久力を調べた。また一部の個体の骨格筋については免疫組織化学的な方法により、筋肉の性質を観察した。

(方 法)

1) キメラマウスの作出

B10-mdx および BALB/c のメスマウスをホルモン処理し、排卵を誘発し、それぞれのオスマウスと交配後、8細胞期胚を採取した。プロナーゼ処理で透明帯を除去したそれぞれの系統の胚を1個づつとり出し、レクチンを含む培養液中で接着し、一夜培養した。単一の集合胚に発生した胚を、偽妊娠3日目のレンピエントメスマウスの子宮内に移植し、産仔へと発生させた。

2) 筋の耐久力試験

筋シストロフィー症の筋力測定法として一般的に用いられている金網登り試験(55℃のホットプレート上に金網で作った円筒を置きマウスを入れる。マウスは即座に金網に登りホットプレートから逃避する。を実施した。7分間のテスト期間中における金網からの落下回数と落下した後、ホットプレート上にとどまった時間を調べた。人道上の立場から、連続1分間ホットプレートから逃避できなかったマウスは、テストを中止した。このテスト後、マウスは通常通りの活動を示し、後遺症はみられなかった。

3) 筋の免疫組織化学的観察

マウスを95%エタノール・1%酢酸固定液で、灌流固定し、エタノール脱水、ポリエステルワックス包埋後、4μm 切片を作成し、脱ワックス後、特異抗体を用いて間接螢光抗体法により観察した。

(結果)

1) キメラマウスの作出

接着させた胚は培養により97%(33/34)が単一集合胚へと発生した。これらの集合胚をレシピエントメスマウスの子宮内へ移植したところ14匹(42%)の産仔が得られた。離乳した13匹の個体は、その被毛色からキメラ型5匹、B10-mdx型6匹、BALB/c型2匹に分類された。

^{1) (}財) 実験動物中央研究所

²⁾ 名古屋大学医学部

³⁾ 東海大学総医研

筋の耐久力試験の結果、B10-mdxでは落下 回数が多く、落下している時間も長かったが、 正常なB10やBALB/cでは回数は少く、時間も短かった。キメラでは個体差がみられたが、 B10-mdxに近い傾向がみられた。

キメラ個体の骨格筋の組織化学的観察の結果、B10-mdx と BALB/c の両方の細胞が筋センイ中でモザイク状に混り合っていることが確認された。

(討論)

筋ジストロフィー症マウス mdx と正常との間のキメラの性質を調べることにより、 mdx の機能欠損が正常細胞によって正常化されるか、あるいは同一個体中の正常細胞をmdx 化するか、あるいは混在の割合によって機能欠損が表われるかを知ることができる。また、神経一筋接合部におけるmdx型と正常型との相互関係が観察できれば、mdxの性質が筋肉に由来するのか、神経に由来するのか、あるいはどちらとも無関

係なのかが解かるはずである。すなわち、キメ ラマウスは動物実験系としては、遺伝的疾患の 原因の診断に用いることができるものと考えら れる。

キメラマウス作出の方法は、すでに20通り

以上の系統の組み合わせで成功しており、系統によってはキメラになる率が少ないものも存在するが、今回行なったB10-mdxとBALB/cとの組み合わせは、C57BL/6とBALB/cなど正常近交系同志の組み合わせに比しても、高い作出効率を示した。作出されたキメラマウスの被毛の割合(表3)には偏よりがみられ、B10-mdxの割合が多いもののみが得られたが、個体数が少ないため、このような偏よりに意味があるかどうかについては討論できない。この

筋ジストロフィー症の症状を解析する方法の一つとして、一般的に用いられている筋の耐久力試験を行なった。表1,2に示される通り、

点に関しては、現在キメラ個体数を増やす努力

		7 W	11W	15W	19W	23W
B 10-mdx	å 1	9(23)	4(99)*	2(4)	17(62)	14(39)
	2	18(111)*	1(2)	3(66)*	27(90)	38(107)
	3	16 (144) *	7(80) *	3(63) *	11(31)	49(160)
	4	7(97)*	9(97) *	4(97) *	30(85)	9(27)
	5	8(92)*	0	0	1(5)	2(10)
	₽ 1	6(83)*	1(5)	0	0	1(6)
	2	5(35)	2(13)	0	1(15)	3(18)
	3	2(26)	1(10)	0	1(5)	1(5)
	4	3(32)	2(9)	0	3(21)	2(8)
	5	1(7)	0	0	0	0

表 1. 筋の耐久力試験 (1) 筋ジストロフィー症

をしている。

落下回数(落下していた時間:秒)

*途中で実験を中止(1分間以上落下したまゝのとき)

表 2. 筋の耐久力試験 (2) 正 常

_		7W	11W	15W	19W	23W
B 10	ô 1	2(3)	0	0	0	0
	2	12(61)	6 (15)	0.	0	0
	3	0	0	0	0	0
	4	0	9 (55)	0	0	1(5)
	5	3(8)	3 (5)	0	1(2)	6(23)
	۷ 1	0	1(21)	0	0	0
	2	0	4(24)	0	0	0
	3	1(6)	0	0	0	0
	4	0	0	0	0	0
	5	0	6(31)	0	0	3(14)

落下回数(落下していた時間:秒)

表 3. 筋の耐久力試験 (3) キメラおよび筋ジストロフィー症

		被毛の割合(%) (黒:茶:白)	29W
$B 10 - mdx \longleftrightarrow BALB/c$	ð 1	(20:40:40)	5(118)
	2	(80:10:10)	6(137)
	♀ 1	(85:10:5)	3(60)
	2	(95:5:0)	3(40)
	3	(100: 0: 0)	4(60)
B 10-mdx	♀ 1		7(121)
	2		4(63)
	3		5(87)
	4		4(98)

落下回数(落下していた時間:秒)

週齢およびメス・オスによって多少の相異がみられたが、19週齢以降では、B10-mdxとその対照となるB10では筋の耐久力に差がみられ、mdxと正常とを機能的に識別する方法として適当であると考えられた。とくにmdxのオスはメスに比べ、落下回数においても落下した時間においても対

照との差は顕著であった。そこでB10-mdxの メスを対照とし、29週齢のキメラマウスを用い て筋の耐久力試験を行なった(表3)。

被毛の割合から、正常 BALB/c の被毛である白の占める割合は少く、mdx 由来のものが多い個体が得られた。被毛のキメラ性と筋肉の免

疫組織化学的観察との結果は必ずしも対応する ものではなかった。すなわちキメラの筋肉に占 める正常の割合は、少なくとも 5 0%以上のよ うであったが、さらに確認の必要がある。

筋の耐久力試験の結果、キメラマウスはいずれもB10-mdx筋ジストロフィー症型であり、キメラ個体に存在する正常細胞によってはその機能を正常化できないことを示している。

今後、キメラマウスを用いた動物実験系の開発課題として、系統別の細胞標識となり得る抗体を作り、機能とは別に細胞の構造がキメラ個体で変化するかどうかを、それぞれの細胞系統に沿って研究する必要があると思われる。また、発生の進み方にともなう筋ジストロフィー症の進行性について、キメラ個体でも調べる必要があると思われる。

膜結合蛋白質の単離と構造解析

高 松 研 研究協力者 藤城正敏,高坂新一 塚田裕三

膜結合型の難溶性蛋白質には、形態形成、維持に係わる興味ある多くの蛋白質が存在しているが、可溶化が難しくまた量的にも微量であることや一般に分子量が大きいため構造解析に関しては充分な検討がなされていない。最近、気相プロティンシークエンサーの利用が可能となり微量サンプルにて蛋白質のアミノ末端アミノ酸配列の決定が可能となり、また遺伝子工学的手法により部分アミノ酸配列からcDNAをクローニングしその構造解析から蛋白質の構造を解析する手法が行われるようになっている。そこで我々は中枢神経系の髄鞘膜に存在し、その内側の裏打ち構造の一つと考えられているWolfgram protein Ia, Ibの単離と構造解析を試みているので、この結果について報告する。

現在までの研究状況

Kurihara ら¹⁾ が髄鞘組織(ミリェン)に 2;3′-cyclic nucieotide を3′の位置で 水解する phosphodiesterase(CNPase)活性が高度に存在することを見い出して以来、本酵素の生理的役割については多くの議論がな されているが、いまだ明らかとなっていない。一方、いくつかの精製法が試みられているが、活性を保持した完全な形での精製は行われていない。当研究室の Snda ら²⁾はウシ脳ミェリン 分画より Ammonium Acetate, Tritonで CNPase 活性を可溶化後 phenyil sepha-

rose, CM sepharose 等で精製を繰り返 し、比活性で約200倍の部分精製を行ない分子 量約 50,000 の蛋白質が CNPase であることを 示した。酵素活性を保持した状態でのこれ以上 の精製は困難であった。Kohsakaら³⁾は、こ の部分精製標品でウサギを免疫し、CNPase を免疫沈降させるが、活性には影響を及ぼさな いポリクローン抗体を作製した。ミエリン分画 のタンパクをこの抗体を用いたイムノブロット 法で検索し、分子量47K、45Kに相当する 2種の蛋白質が抗体に反応することを見い出し た。この二種の蛋白質は、従来 Wolfgram protein Ia, Ib (WP Ia, WP Ib : * = リン蛋白質を Laemmli系の SDS-ポリアクリ ルアミドゲル電気泳動にて分離した際47K、 45K dalton 付近に泳動される比較的多量 に存在する蛋白質)と呼ばれているものに相当 していた。しかし、抗原が部分精製標品である 点やポリクローナル抗体であることなどから、 WP Ia, WP Ibとの免疫学的類似性やCNPase の抗原本体がいずれであるのかといった点に関 しては何ら知見が得られていない状況である。 そこで今回は、1) CNPase に対するモノク ローナル抗体を作製し、イムノブロット法にて WP Ia, WP Ib いずれに反応するか、2) WP Ia, WP Ib を分離精製し、限定分解を行ない そのパターンから相同性について検討した。

慶応義塾大学医学部生理学教室

方 法

1) CNPase の部分精製

Suda らの方法に準じて行った。ウシ脳白質 を20倍量0.5M Ammonium Acetate, 10mM Tris HCl(pH6.9) でホモゲナイ ズ後 1000g 20min 遠心し沈査をさらに 20 倍量 10 mM Tris・HCl(pH6.9)、 0.5 % Triton x-100 でホモゲナイズし 1000g 20 min 遠心し沈査に酵素活性を回収した。沈 在の1M Ammonium Acetate, 1% Triton x-100 抽出液を Phenyl-Sephaiose CL-4B カラムにかけ 1M Ammonium Acetate & 10% Triton x-100% double linear gradient で溶出し活性分画を得 た。これを50%グリセロールで濃縮後、Tris-HEPES(pH6.5)、1% グリセロール、 0.1% Triton に対して透析し、部分精製標品とし た。

2) モノクローナル抗体の作製

Lewis ラットに部分精製標品(タンパク量で100 μg)をComplete Freund's adjuvantとともに腹腔内投与した。Spleen cell (1×10⁸)を mouse myelom のcell(SP 2/0-Ag/4,2×10⁷)と混合しポリエチレングリコール、DMSO存在下で融合させた。
HAT培地で融合細胞を選択しCNPaseに対する IgG モノクローン産生細胞を ELISA, CNPaseに対する binding assay、免疫組織染色でスクリーニングした。

3) binding assay

抗 rat IgG を 48 欠 プレートに吸着後、 培養上清を反応させた。さらに部分精製 CNP ase を反応させ洗浄後 プレート上で酵素反応を行わ せ吸着された酵素活性を Tsukada ら $^{4)}$ の方法 に従がい測定した。

4) 免疫組織染色

ウシ小脳、坐骨神経、マウス脳切片(ホルマリン固定、パラフィン包埋)を HRP conjugated anti Rat IgG を用いた間接法にて免疫組織染色を行った。

5) ミエリン分画の調整

ウシ脳白質あるいはマウス (BAIB/cAn Crj) 全脳より Whittaker ら⁵⁾ の方法に従い Sucrose density gradient により 調整した。

6) SDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動 (SDS-PAGE)

Laenmli $^{6)}$ の方法に準じた 10-20% linear gradient ε 用いた。サンプルは 6% SDS, $2\%\beta$ -mercaptoethanol に 溶解後、100%で10分間処理した。

7) イムノブロッティング

Towbinら^りの方法に準じ、ニトロセルロースフィルターに転写後、ニトロセルロースフィルターを5%BSA・PBSで bloking し、培養上清と反応させた。 HRP conjugated anti-rat IgG を用いた間接法で染色した。 染色されたバンドの位置は、ニトロセルロースフィルターをアミドブラックで染色し確認した。

8) SDS-PAGE ゲルよりの蛋白質の回収

SDS-PAGE後、ゲルをクマジーブリリアントブルー(CBB)にて染色し目的の蛋白質バンドを切り出した。

① Electro elution

切り出したゲルを 0.1 N NaOH で 1時間処理 後、Max Yield (ATTO社製) にて抽出し た。抽出バッファーには、 25mM Tris・Hci pH9.5, 1% SDS、 泳動槽バッファーには 250mM Tris・Hcl pH9.5, 1% SDS を 用いた。

② 蟻酸抽出

ゲルをホモゲナイズ後 2 0 倍量の 7 0 % 蟻酸 で 2 4 時間抽出した。抽出液を濃縮後 Bio Gel P-10(0.7cm×30cm、溶出バッファー 7 0 % 蟻酸)にて CBB および遊離の SDS を除去し単離標品とした。

9) 酸加水分解

6N NC1(定沸点塩酸)中で 20時間酸加水 分解を行ない、アミノ酸分析を行った。

10) 限定分解

プロムシアン分解後、生成するペプタイドを

10-20% linerar gradient SDS PAGEで分離し、そのバターンを比較した。

結果及び考察

得られたハイブリドーマ約 2000 クローンをスクリーニングし、CNPase と反応するクローン (TFK-1)を得た。作製されたモノクローン抗体は、Fig 1 Aに示した如く Binding assay により CNPase 分子と結合することが示された。しかし、この抗体を酵素反応液に添加しても活性の抑制は認められなかった

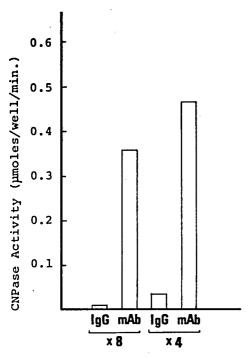


図1a. モノクローナル抗体(TFK-1) の CNPase に対する binding assay モノクローナル抗体であらかじ め処理したプレートには CNPase 活性が回収されるが正常 ラット 血清で処理したプレートには回収されない。

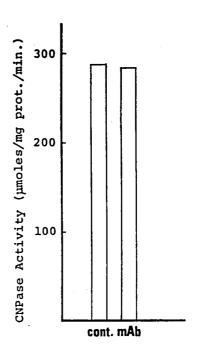


図 1b. モノクローナル抗体(TFK-1) のCNPase活性に対する影響 酵素活性測定の反応液中にモノクローナル抗体を添加しても活性には全く影響を及ぼさない。

(Fig 1B)。このことから、この抗体は CNPase 分子は識別し得るが、酵素活性部位とは結合し ないものと思われる。この点に関しては Kohsakaらが得たウサギ polycloual 抗体 の性質と同様であった。この抗体のサブクラス は、double immunodiffusion test から IgG2c であった。本抗体を用いて、HRP conjugated 抗ラット IgG による間接法に てウシ小脳及び坐骨神経の免疫組織染色を行っ たところ、白質部分が強く染色され(Fig 2a) 白質部分の拡大像にて軸索と並走するあるいは 軸索周囲にリング状に染色される像が得られ (Fig 2b)、ミエリンの膜構造と強く反応する ことが示された。一方、末梢神経組織(坐骨神 経)に同様の染色を行ったが、末梢ミエリン膜 は全く反応しなかった(Fig 2c)。末梢ミエリ ン膜にも CNPase は酵素活性として 5分の1 ~10分の1量存在するにも拘らずこのモノク ローナル抗体が反応しなかったことから、中枢 神経系と末梢神経系の CNPase の分子構造が 異なる可能性が考えられる。そこで、中枢ミエ リン組織および末梢ミエリン組織の蛋白質を SDS-PAGEにて分離し、CNPase モノクロ ーナル抗体を用いてイムノブロットを行った結 果、やはり中枢ミエリンには反応する2本のバ ンド (濃染される 47K dalton と比較的薄く 染る 45K dalton のパンド) が得られるにも . 拘らず (Fig 3)、末梢ミエリンには全く反応が 認められなかったことから、中枢型 CNPase と末梢型 CNPase は免疫学的に異なるもので あることが示された。またこのモノクローナル 抗体と反応する2種中枢ミエリン蛋白質のうち 強く反応する 47Kは Wolfgram Ia (W 1a) で、比較的反応の弱い 45Kは Wolfgram Ib (W1b)であった。この結果はウサギポリクロ

ーナル抗 CNPase 抗体を用いて得られた結果³⁾ と全く同様であった。また、Balb/cAnCrj マウスを用い実験においても、上記と全く同様 の結果を得た。そこで、この2つの蛋白質Wla とW1b の構造解析を行ない CNPase 活性と構 造との関係、W1a とW1b の免疫学的類似性を 明らかにするとともに、これら蛋白質の遺伝子 をクローニングし発現メカニズムを索ぐるとこ とを目的として、まず、マウス脳ミエリン分画 よりW1a およびW1b の単離を試みた。マウス 脳ミエリン分画を2次元電気泳動にて分離した 結果から、W1aとW1b は分子量的に近い(47 Kと45K)ばかりでなく、等電点もいずれも約 9と塩基性で近似していることから、両者を分 離精製することは困難と思われた。そこで両者 を SDS PAGE で分離後、 CBB染色を行ない W1a, W1bの位置を確認し各々のバンドを切り 出し、ゲルからの抽出精製を行った。Electro elutionでは、抽出液イオン強度を変化させ る、抽出液 SDS 濃度を変化させる、ゲルをア ルカリ処理後抽出する、抽出時間を72時間ま で行う等試みたが抽出効率が5%以下であった。 一方、70%蟻酸抽出では、抽出効率50%以 上、抽出過程で多少分解するものの CBB 染色 率で90%以上が元の分子量を保つ型で回収さ れた。抽出標品からのCBB および遊離のSDS 除去に逆相系高速液体クロマトグラフィーの利 用を検討した。モデル系として使用した BSA 蛋白質の場合にはカラムに TSK Phemyl-5PWRP を使用し、 溶出バッファーに 0.1%ト リフルオロ酢酸、アセトントリル(20-80% grodient)を用い良効な分離パターンを得 たが、WlaおよびWlb の場合には溶出バッフ ァーを変化させても樹脂に吸着し溶出条件を得 ることができなかった。そこで蟻酸抽出液を濃

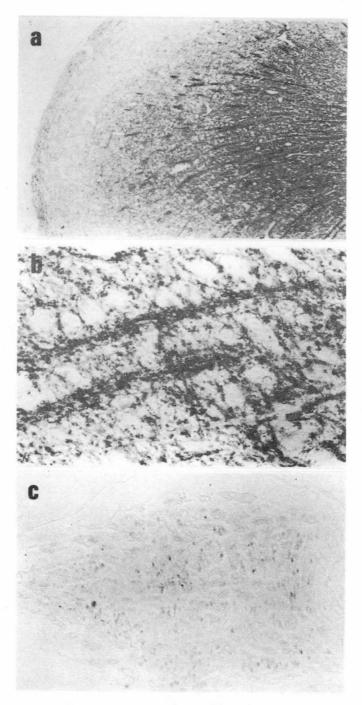


図 2. モノクローン抗体による免疫組織化学染色

- a. ウシ小脳、白質部分が強く染め出されている。 b. aの拡大像、軸索にそった double track staining pattern や軸索周囲のring-like staining pattern が見られる。
- c. 坐骨神経、軸索周囲に全く染色像が認められない。

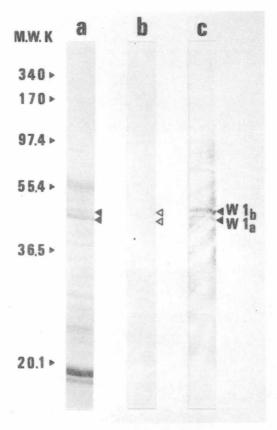


図3. モノクローナル抗体(TFK-1)による ミエリン蛋白質の immunoblot analysis ウシ脳白質ミエリン分画 をSDS-PAGEにて分離後ニトロセル ロース膜に転写した。

a。 アミドブラック染色

b. 対照培養上清を用いた間接法で染 色した。

c. モノクローナル抗体(TFK-1)を 用いた間接法で染色した。

左端の数字は分子量マーカーの位置を示した。モノクロー抗体はW1aと強く反応し、W1bと比較的弱く反応した。

縮後Biogel P-10にて溶出バッファーを70 %蟻酸を用いて分離を試みたところ、CBB および遊離の SDS が分離され、W1aおよびW1b の単離標品が得られた。蛋白質と結合したCBB および SDS は完全に除去されているとは思え ないが、以下の実験には支障はなかった。W1a 及びW1bをアミノ酸組成の分析から得られたメチオニン残基数の約500倍のモル数のブロムシアン存在下、70% 機酸中でブロムシアン分解を行った。分解されたペプチドの分子量バターンをSDS-PAGEで検討したところ、35K、30K、25K daltonの共通するバンドとW1aからは 12K、W1bからは 8K daltonの異なるバンドが得られた。したがってW1aとW1bとは大部分共通する構造を持っており、おそらくW1aのC末端あるいはN末端の数十個のアミノ酸が欠損しているものがW1bであるものと推定された。等電点の類似性や免疫学的類似性もこれで充分説明し得るものと思われる。

今後は、W1aおよびW1bのN端末アミノ酸配列の決定、これらを限定分解して得られたペプチドフラグメントの分離精製を行ないW1aおよびW1bのアミノ酸配列の部分構造を明らかとし、それをもとにCDNAのクローニングを行う予定である。

文 献

- 1) Kurihara T. and Tsukada Y. (1967) The regional and subcellula distribution of 2',3'-cyclic nucleotide 3'-phosphohydrolase in the central nervous system. J. Neurochem. 14, 1167-1174.
- 2) Suda H. and Tsukada Y.

 (1980) Improved method for purification of 2',3'-cyclec

- 3'-phosphodiesterase from bovine white matter. J. Neurochem. 34, 941-949.
- 3) Kohsaka S., Nishimura Y., Takamatsu K., Shimai K. and Tsukada Y. (1983) Immunohistochemical localization of 2',3'-cyclic nucleotide 3'-phosphodiesterase and myelin basic protein in the chick retina. J. Neurochem. 7) Towbin H., Staehelin T. and 41, 434-439.
- 4) Tsukada Y., Nagai K. and Suda H. (1980) A rapid micro methos for 2',3'-cyclic nucleotide 3'-phosphohydrolase assay using micro high performance liquid chromatography. J. Neurichem. 34, 1019-1022.

- 5) Whittaker V.P. and Barker L.A., In R. Fried (Ed.), Methods of Neurochemistry, vol.2, Marcel Dekker, New York, 1972, pp.1-52.
- 6) Laemmli U.K. (1970) Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. Nature 227, 680-685.
 - Gordon J. (1979) Electrophoretic transfer of proteins from acrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 76, 4350-4354.

新たに発見された後肢麻痺ラット

江 崎 孝三郎¹⁾ 研究協力者 埜中征哉。津金降夫¹⁾

筋ジストロフィー症のモデル動物としては、 dy マウス、mdx マウス、my ハムスター、am チキンなどが知られ、研究に使用されている。 いずれのモデル動物もヒトの筋ジストロフィー と部分的類似点をもち、研究への利用価値の高 いものであるが、一方では相違点も次第に明ら かにされている。ヒトの筋ジストロフィー症の 原因の解明のためには、さらに多くの筋異常動 物を発見し、モデルとしての評価を行う必要が ある。

我々は最近 Wistar ラットコロニーの中に 後肢の麻痺を起こし、歩行不能となる異常を発 見し、その臨床症状の観察、遺伝様式の調査、 組織学的検索を行ったので報告する。

異常動物発見の経過:1980年以来無菌環境下で維持されていた、Wistar ラットコロニーの中に、1985年1月に離乳前の仔が後肢の麻痺を起こし、歩行不能となるのを発見した。また、異常仔を出産した交配の組と同じ家系の他の交配の組からも同様の異常仔が出現し、この異常が遺伝的であることが推測された。

後肢の麻痺は生後2週頃から発現し、日の経過とともに重篤となり歩行も不可能になる。発育は正常のものより著しく遅れ、生後3~4週. で死に至る。

遺伝様式の検討:異常動物の発見の経過から、この異常は遺伝性であることが推測された。そこで、異常仔を出産した交配の組、6組におけ

- 1) (財)実験動物中央研究所
- 2) 国立武蔵療養所神経センター

る異常仔発現の様子を表1に示した。6組の交配から16回の出産によって122匹の仔が得られた。このうち、異常発現の時期まで生存した仔108匹の内75匹(メス39匹、オス36匹)が正常で、33匹(メス16匹、オス17匹)であった。異常の発現率は、この異常が常染色体上の1つの劣性遺伝子によって支配され、両親がヘテロであったと仮定したときの分離比3:1(25%)に近い値であった。

表 1. 後肢麻痺 ラットの発現状況

母親数	総産仔数	観察数	正常	異常
6	122	108	75	33(30%)

組織学的検索:ヒラス筋および前脛骨筋の H.E. 染色像を図1,2に示した。異常動物では筋線維が一様に細くなっている。しかし、筋ジストロフィーの時のような壊死、再生所見はみられない。また、神経原性疾患の時のような、group atrophyもみられない。上腕二頭筋の組織像を図3に示した。後肢ほど顕著ではないが、筋線維の細化が認められる。

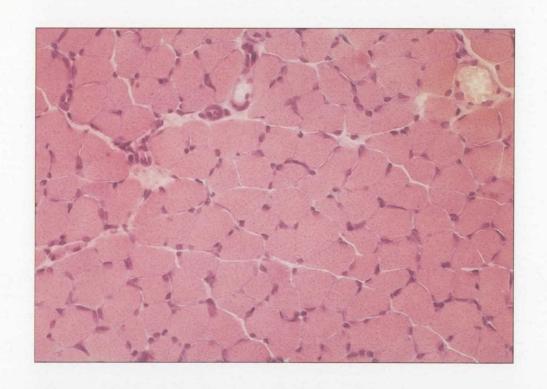
長指伸筋のNADH-TR染色像を図4に示した。 正常筋では、酸化酵素活性の高い線維、低い線 維の分別が明確であるのに対し、異常動物の筋 ではその分別が悪く、筋の発育、分化の遅れが 見られる。同様な所見はヒラメ筋においても観 察された。

前脛骨筋のcytochrome c oxidase染

色像を図5に示した。図4のNADH-TR染色の場合と同様の所見がみられる。 ヒラメ筋のATPase 染色像を図6に示した。 この染色でみるかぎり、異常動物の筋のタイプ1線維、タイプ2線維の分布には異常はみられず、個々の筋線維は神経支配を受けていると考えられる。

長指伸筋の modified Gomori trichrome 染色像を図7に示した。末梢の有髄 神経に著明な異常はみられない。前脛骨筋の acetylcholinesterase 染色像を図8に 示した。異常動物の筋においても神経・筋接合 部の酵素活性に異常は認められない。 以上の検索から今回発見された異常動物は、 筋シストロフィーとは異なるものと判断される。 筋の未熟性を主病変とする疾患に先天性ミオバ チーが考えられるが、これは進行性ではない点 で異常ラットの所見と異なる。

また、図1,2,3および7において、異常動物の筋において末梢神経の分布密度が高いように感じられるが、これが異常所見であるか否かについては、今回の検索のみでは判断できない。今後、電顕的検索、脊髄前根の検索、神経、筋の電気生理的検索を行う必要がある。



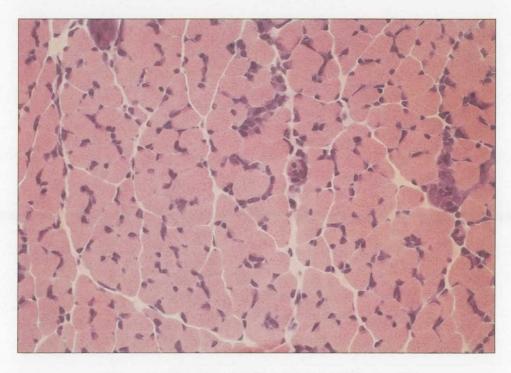
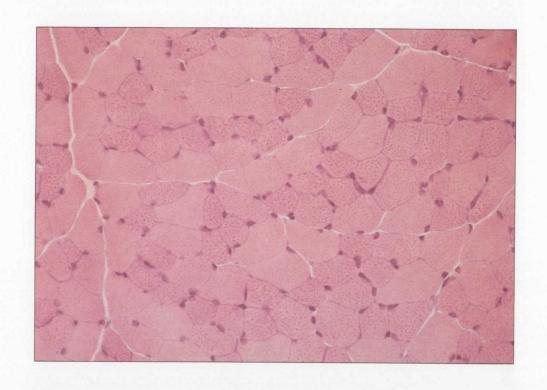


図 1. ヒラメ筋のH.E. 染色像、×80. 上:正常、下:異常



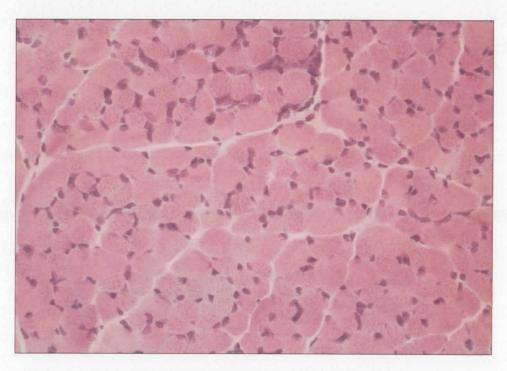
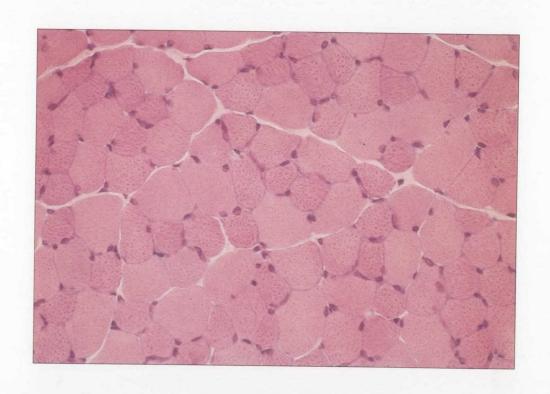


図 2. 前脛骨筋のH.E. 染色像、×80. 上:正常、下:異常



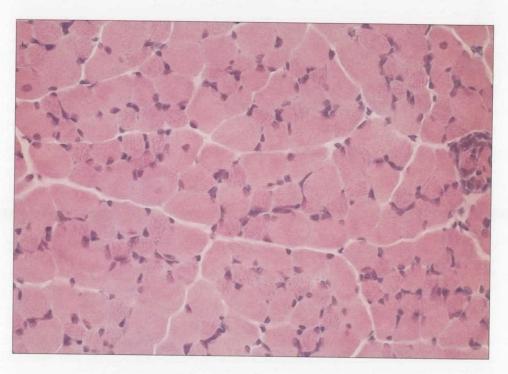
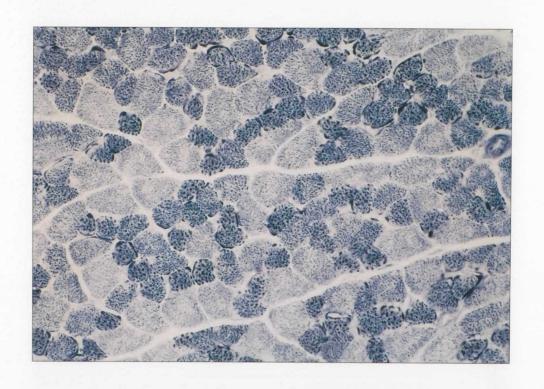


図 3. 上腕二頭筋のH.E.染色像、×80. 上:正常、下:異常



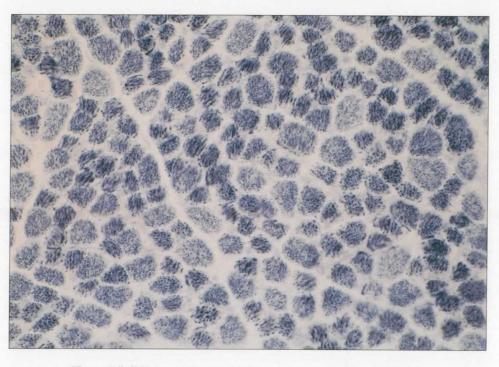


図 4. 長指伸筋のNADH-TR染色像、×80. 上:正常、下:異常



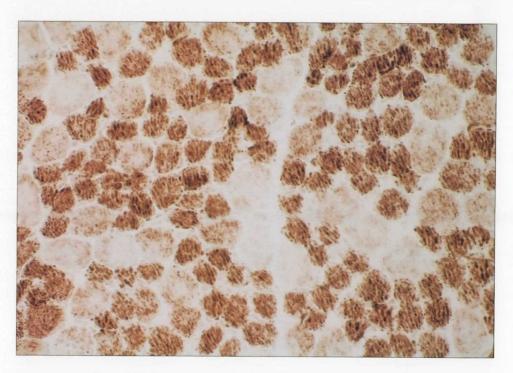
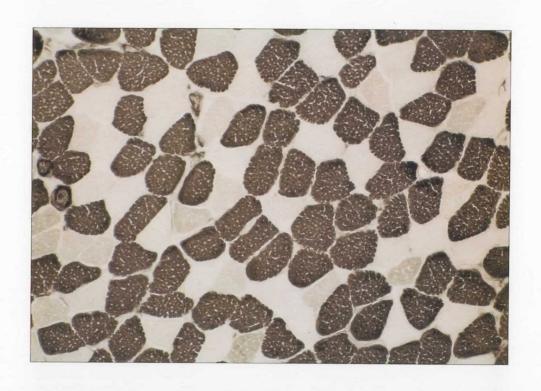


図 5. 前脛骨筋の cytochrome c oxidase 染色像、×80. 上:正常、下:異常



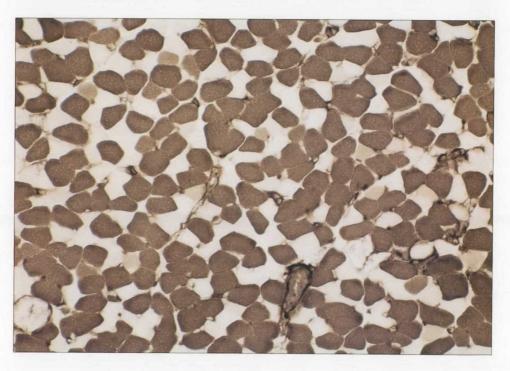
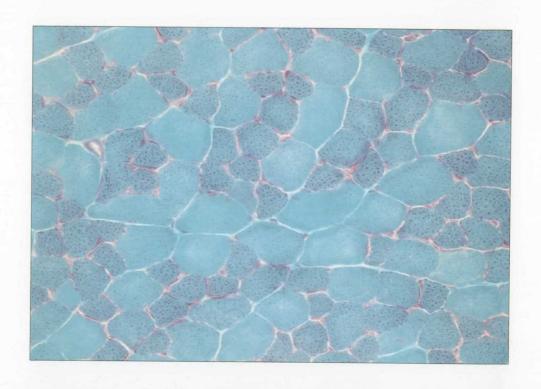


図 6. ヒラメ筋のATPase 染色像、×80. 上:正常、下:異常



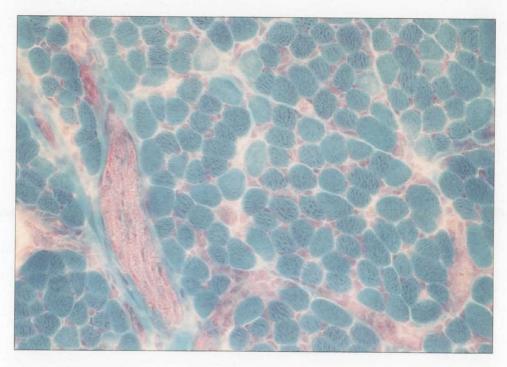
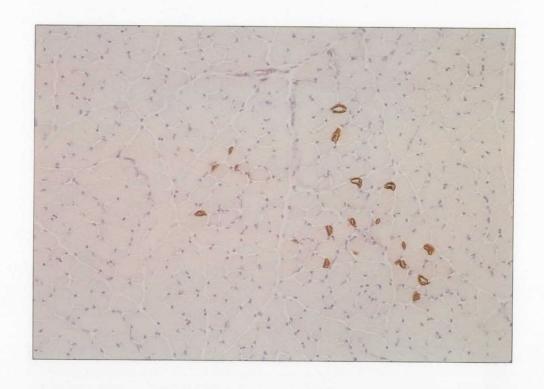


図7. 長指伸筋の modified Gomori trichrome 染色像、×80. 上:正常、下:異常



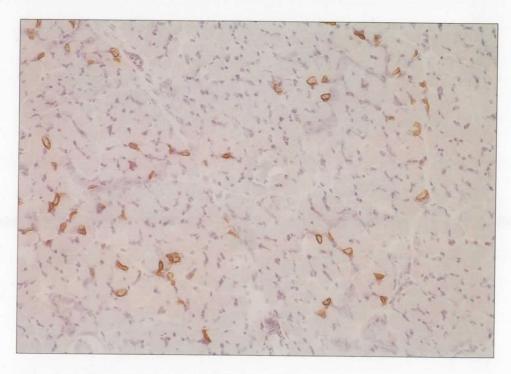


図 8. 前脛骨筋の acetylcholinesterase 染色像、 $\times 40$. 上:正常、下:異常

後肢麻痺マウスhlp の病態と遺伝について

富 田 武 研究協力者 菊池建機², 埜中征哉²) 若杉 昇¹, 山崎一斗¹⁾

はじめに

ヒトの筋シストロフィー症のモデルマウスとしては、すでにC57BL/6J-dy¹⁾およびC57BL/6J-mdx²⁾が開発されて、わが国でも病態解析や治療法開発のため用いられている。しかし筋シストロフィー症およびこれと密接に関連する脳・神経の異常による筋症患はヒトにおいて数多く知られており、病態や遺伝に関する解析を必要としている。したがって、実験動物においてさらに多くのモデル動物が開発されると同時に、既知の疾患遺伝子との複合症例の病態についての解析も必要である。

· われわれはこのような認識のもとに新しい脳・

神経・筋の疾患モデル動物の開発を目指し、病態解析と遺伝解析を同時に進めるために最も適当と考えられるマウスを対象動物として、検索と開発を進めた。その結果、RFM/NgaとCBA/Ngaの交配よりのF₂世代に後肢麻痺を生後80日前後に発症し、約200日で死亡する雌雄合計4個体を発見し、それらの後代よりこの症状を多発する系統を確立しつつある。今回はその病態と遺伝について報告する。

後肢麻痺マウス、hlp の発見と命名

CBA/Ngaの1匹の雌とRFM/Nga の1匹の雄との交配により得られたFi世代はすべて正

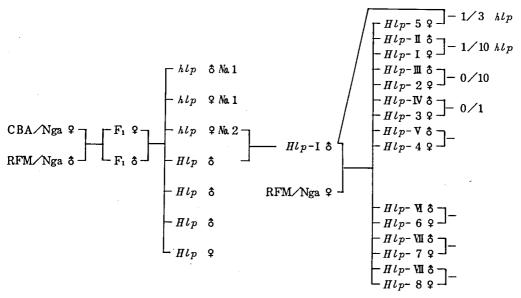


図 1. 後肢麻痺症(hlp)マウスを生んだ交配形式(Hlpは正常個体)

- 1) 名古屋大学農学部
- 2) 国立武蔵療養所神経センター

常であった。F₁の雌雄 1 対の交配により得られたF₂世代の雌 4 匹、雄 3 匹、合計 7 匹のうち、雌 2 匹および雄 1 匹の合計 3 匹が、生後 8 0 日前後より後肢を伸長したまま引きずる症状を示したのが発見の端緒である。

これら 3 匹のうち雌雄各 1 匹は発症後に殺処分して剖検に付したが、1 匹の雌は同腹の正常雄と交配したところ幸にも初産で 3 匹を得て、そのうち生存したただ 1 匹の正常雄を RFM/Nga 雌に Backcrossして初産 9 匹、第 2 産6 匹で雌 8 匹、雄 7 匹の合計 1 5 匹の子を得たが何れも正常であった。これらの雌雄を同腹間で兄妹交配したところ、後肢麻痺を示す個体が次代に散見されるようになった。また、ただ1 匹生存した F2 雄を Backcross世代の正常雌に交配したところ、1 腹 3 匹の中に 1 匹の発症

個体を得た。これらの交配結果を図1に示した。 正常同士の雌雄の交配より後肢麻痺を示す子 が少数出現することより、この症状を発現する 遺伝的要因は常染色体上の劣性遺伝子によると 仮定し、後肢麻痺を示すことから仮に hlp (hind limb paralysis)と命名した。

hlp マウスの病態

最初に発見された雌2匹と雄1匹の hlp マウスの体重の推移、発症時期、死亡または殺処分時期および出産状況を表1にまとめた。これらの3匹は生後81日目に発症を認めたが Ma 2の雌は初産をして3匹の子を残した。前述のごとくこの中よりただ1匹の雄が生存し、離乳し、そしてhlp マウス確立のもととなったのである。Ma 1の雌雄は101日齢で殺処分したが、体重は

表 1. 後肢麻痺症マウス (hlp)と正常同腹マウス (Hlp)の体重と症状または経過

月 日	生後日齢	hlp 8 Ma 1 の 体重と症状	<i>hlp</i> ♀ Ma 1 の 体重と症状	<i>hlp</i> ♀№2の 体重と症状	<i>Hlp</i> るの 体重と経過	<i>Hlp</i> ♀の 体重の経過
10. 1	0	出産	出産	出産	出 産	出 産
19	18	離乳	離乳	雕乳	離乳	離 乳
26	25	17.3 (g)	15. 3 (g)	14.5 (g)	17.5 (g)	15. 2 (g)
11. 2	32	23.0	19. 1	19.0	24.0	20.0
9	39	25. 5	22. 1	21.8	26. 2	22.6
16	46	27.8	25. 6	23.8	27.8	24. 0
30	60	28.7	25. 1	27.0	31.8	45.0 近娠
12. 7	67	29.4	25. 5	30.5	32.8	34.7
14	74	29.1	25. 5	40.5 妊娠	34.6	36.6
21	81	28.6 発症	24.4 発症	31.8 (初産 3匹 発症	32. 1	32.7
1.11	101	26.9 殺処分	22.8 殺処分	26.1 食殺 2匹	38. 0	34.8
18	108			29.3	39. 6	33.9
2. 1	122			25.7 子1匹離乳	39. 8	36. 4
8	1 29			25. 8		
15	136			正常 8 交配		
4. 26	198			衰弱死		

発症後増加せず、やがて減少して末期に至った。 そしてM2の雌は生後200日前後で衰弱死した。 同腹の正常雌1匹および正常雄1匹の体重と繁殖記録を次欄に示す。正常な個体は順調に発育をつづけ、雌では出産前に体重の急増が認められ、出産後はもとの体重に近い所まで復するが、雄では生後100日前後まで体重が増加し続けた。

発症個体では図2に示すように後肢をひきづり、またミオクロヌス様のふるえを示しており、外的刺激により全身性強直を起すのを特徴としていた。

Mp疾患の遺伝的支配

図1に示される hlp の発症個体の出現状況は、

正常個体雌雄の交配の子に hlp が出現することと、雌雄で hlp の出現に差がないことより、常染色体性劣性遺伝子による支配が推定された。このことを証明するために hlp を産した交配結果をまとめて表2に示した。4組の Carrier同士と思われる交配よりの子の分離比は合計して正常51個体に対して hlp 20個体であり、明らかに3:1の分離比に合致することより、hlp は常染色体性単純劣性遺伝子により支配されていると結論することができる。対照としておこなった交配5(正常×Carrier)よりの子は、正常16個体、hlp 0個体の結果が得られ、上の結論と矛盾しない。

表 2. 後肢麻痺症(ルレp)の遺伝解析

交配番号	推定維伝子型	× 推定遺伝子型	正常な子の数	hlp の子の数	合 計
1	Hl_p/hl_p	Hlp/hlp	6	3	9
2	Hlp/hlp	Hlp/hlp	17	7	24
3	Hlp/hlp	Hlp/hlp	9	3	12
. 4	Hlp/hlp	Hlp/hlp	19	7	26
5	Hlp/Hlp	Hlp/hlp	16	0	16

考 察

脳・神経・筋の疾患モデル動物の検索と開発を目指し、病態解析と遺伝解析を同時に進めるため最も適当であると考えられたマウスを対象とした研究により、後肢麻痺を示す ルpマウスを発見し、発症より死に至る病態の推移を明らかにすると同時に、その遺伝的支配が常染色体上の単純劣性遺伝子によることを確定することができた。

*Mp*マウスは、高度に近交された CBA/Nga 系 (F80)と RFM/Nga 系 (F32)の F₂世代よ り発見されたものであり、さらにF₂の発症雌と 正常雄との交配より得た正常雄を、父系である RFM/Nga 雌に交配して Mp 遺伝子を継代した。このような経緯より考えるに、近交系間の交配 は対立遺伝子間のわずかな構造的差異により、新しい突然変異を引き起す可能性を示している。 実際に近交系交配群の後代より突然変異体が発見された例をまとめた記録はなく、また意図的に近交系間交配をおこなっても容易に突然変異体を分離することもなく、極めて経験的、結果論的議論であったが、最近の組換えDNA技術を駆使した研究により、次第に遺伝子の微細構造が明らかにされてきたので、今や、この問題の

解明への足がかりが得られつつあるもの考えられる。

ともあれ、期待した後肢麻痺を発症する脳・神経・筋疾患のモデル動物が得られ、その遺伝子支配も解明されたので、今後この Mpマウスを増殖して、広く病態解析と治療開発のために活用が望まれる。したがって、次には疾患モデル動物としての有用性の評価に努力が向けられるべきであり、すでに筋病理像および中枢神経病理像の研究が協力班員により開始されている。また、Mp遺伝子がどの染色体のいかなる位置にあるかを明らかにするため、リンケージ・テストが開始されている。これらの情報をもとに、さらに既知のジストロフィー遺伝子との複合の実験に進みたいと考えている。

んしアマウスの増殖と供給に関しては、この疾患の遺伝が解明されて常染色体性単純劣性遺伝子によることが明らかにされたので、遺伝的固定は容易である。この疾患の発現時期が生後80日前後であり、んしか雌が順調に発育すれば初産の子を得ることが可能である。その点では他の劣弱な疾患モデル動物よりは供給にも問題が少ない。また、最近開発された体外受精法³⁾ や、すでに確立されている卵巣移植法⁴⁾ を併用すれ

ば、増殖効率の向上と実験条件の精密化にも役立つものと期待される。

- 辻 繁勝,松下 宏: 筋ジストロフィー 症の実験モデルー筋萎縮症マウスについて - 日本臨床,35(11):54-60,1977.
- 2) Bulfield, G., Siller, W.G., Wight, P.A. and Moore, K.J. X chromosome-linked muscular dystrophy (mdx) in the mouse. Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 81 (4), 1189-1192, 1984.
- 3) 横山峰介, 江崎孝三郎 : 私信
- 4) Wakasugi, N. Studies on fertility of DDK mice: reciprocal crosses between DDK and C57BL/6J strains and experimental transplantation of ovary. J.Reprod. Fert. 33, 283-291. 1973.



図 2. 後肢麻痺症マウス(生後101日)

矮性鶏における筋ジストロフィー遺伝子発現

菊 池 建 機¹ 研究協力者 武 田 伸 一²

はじめに

常染色体不完全優性の遺伝様式に従う1)鶏の 筋ジストロフィー(以下筋ジスと略)遺伝子 (am)は、伴性劣性遺伝に従う矮性遺伝子(dw) が導入されると、浅胸筋筋線維の急激な萎縮と 消失、それに付随する著しい脂肪組織の増生を 起こし、症状を著しく悪化する2) 鶏体を小型 化する dw 遺伝子は am 遺伝子に対して強い変更 遺伝子として作用する3~50 am遺伝子をヘテロ 接合体として持つヘテロ鶏は、筋組織の病変や 血中酵素活性の上昇において、ホモ接合体の筋 ジス鶏と正常鶏のほぼ中間値を示すり。しかし、 筋線維を構成するトロポミオシン、トロポニン Τ、デスミンおよびビメンチンという 4 つの蛋 白には異常が認められない。筋ジス鶏浅胸筋 の筋線維はトロポミオシンα鎖に加えて、成熟 した正常筋では見られないβ鎖を含んでいるが、 ヘテロ鶏ではこのβ鎖の合成が抑制される。こ の意味で、am遺伝子の筋組織レベルでの発現は 優性、蛋白レベルでは劣性遺伝の様式をとる6)。

本報告は、ヘテロ鶏 (am/+)に dw 遺伝子を 導入し、この遺伝子が筋の組織および蛋白に対 しどのように作用するかを解析した。 dw 遺伝 子は筋ジス鶏において強い変更遺伝子として作 用すると同時に、ヘテロ鶏浅胸筋においても同 様に働き、筋の組織病変を悪化し、かつ本来へ テロ鶏筋では合成されないトロポミオシンβ鎖 を出現させた。

材料及び方法

実験矯は白色レグホン種 (WL)と矮性鶏 (WLdw)のそれぞれに筋ジス am 遺伝子を導入した白レグ筋ジス鶏 (WL-am)と筋ジス矮性鶏 (WL-am, dw)を用いた。種々の遺伝子型を有する実験鶏はこれらの鶏の交配によって得られた(表-2)。

1) 組織学的所見

10,16週、1年齢の鶏浅胸筋の中央部から組織を採取し、10%中性ホルマリン溶液にて固定した。固定終了後、組織は四酸化オスミ

表 一 1.	14週齢の白色 レグホン、矮性、	および筋ジストロフィー矮性鶏における
	生体重および血中T4,T3濃度	

Body weight(g)		Plasma T4 concentration(µg/1)			Plasma T3 concentration (#g/1)				
Sex	WL	WL-dw	WL-dw,am	WL	WL-dw	WL-dw,am	WL	WL-dw	WL-dw,am
Meles	1.536.7 ± 40.4	936.7±81.5	866.7 ± 41.6	14.3 ± 3.4	17.2±21	17.9±1.8	1.8 ± 0.1	1.0±0.1	0.9 ± 0.1
Female								•	•
	11733±32.2	693.3±31.1	606.7 ± 30.6	17.8± 2.5	18.9 ± 0.8	18.7 ± 3.0	1.6 ± 0.2	10±02 .	0.7 ± 0.1

注:値は平均値±標準偏差で示す(個体数は各々6羽) 白色レグホン種と他品種を比較した(t-検定:* p<0.05, ** p<0.001)

- 1) 東北大学農学部、国立武蔵療養所神経センター
- 2) 信州大学医学部第三内科

表-2. 筋シストロフィーおよび矮性遺伝子型 と浅胸筋トロポミオシンタ 鎖合成との関係

Mal	le
-----	----

	am/am	am/+	+/+
dw dw Z Z	++	+	_
Z Z dw + Z Z + + Z Z	++	_	_
+ + Z Z	++	_	_
mala			

Female

	am/am	am/+	+/+	
dw Z W	++	+	_	_
zw	++	_		

注: この結果は孵化後10 および16 週齢で得られた。 +、一は2次元電気泳動法で得られたスポ

+、一は2次元電気泳動法で得られたスポットの強度を印象的に示した。

ウムーバラフィン包埋法²⁾で処理され、脂質を染め出す組織病理標本を作或した。ニューハンプシャー種筋ジス鶏 (NH-413) は日生研の水谷誠班員から供与された。

- Thyroxine(T4)とTri-iodothyronine(T3)の血中濃度
- 14週齢の白レグ種(WL)、矮性鶏(WL-dw)、筋ジス矮性鶏(WL-am,dw)雄雌、各6 羽ずつを供試した。翼下静脈より採血し、血漿を分離後、RIA法により測定するまでプールし、 -20℃に凍結保存した。甲状腺ホルモンの血中濃度はトラベノール社のキットを用い、T4 は Gamma Coat T4 Kit、T3は Gamma Coat T3 Kit で測定した。
- 3) 筋線維の収縮蛋白の分析

組織学的検索のため採取された部位とほぼ同

じ位置から数本の筋束をガラス棒に結索したまま切出し、-20℃の50% グリセリン中に保存した。筋線維の蛋白はIEF-SDS. PAGEによる2次元電気泳動により分析した。アクリルアミドの濃度は15%に調整した。ゲルは最終的に0.05% CBBで染色した。

結 果

14週齢において各品種の生体重と血中甲状腺ホルモンの濃度を測定した。矮性鶏(WL-dw)は雄雌とも大型の白レグ鶏(WL)に比べて約40%体重を滅ずる。矮性鶏にさらに am 遺伝子が導入された筋ジス矮性鶏(WL-am dw)では雄で約44%、雌で約48%体重を滅ずる。血中Thyroxine(T4) 濃度は雄雌、品種間で有意差は認められない。しかし、血中Triiodothyonine(T3) 濃度は、dw遺伝子が導入されると正常値のほぼ半分に低下する。T3値は矮性鶏と、am遺伝子が導入された筋ジス矮性鶏との間で有意差は見られないが、後者でやや低い傾向を示す。

筋ジス a m 遺伝子がニューハンプシャー種筋ジス鶏(NH-413) から白レグ筋ジス鶏(WL-am,dw)へと移行するに従い、浅胸筋の筋線維の萎縮、消失は一層顕著になり、次第に周辺での脂肪組織の急激な増生を誘発する(図-1)。一方、白レグ種へテロ鶏(am/+)の浅胸筋は、筋線維の大小不同、線維核の増殖を示すが、顕著な脂肪組織の増生は見られない。しかし、ヘテロ鶏にdw遺伝子が導入されると、浅胸筋線維の大小不同は一層顕著になり、萎縮した小径線維の割合が大となる。筋ジス矮性鶏筋と同様に大量の脂肪が浸潤する(図-2)。

10週齢矮性鶏においてam遺伝子をホモ(am

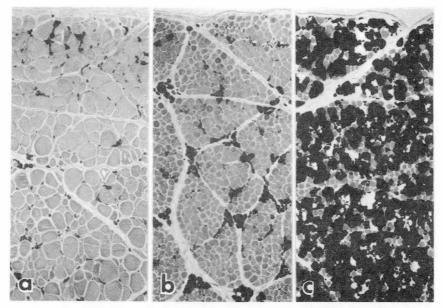


図 1. 筋ジストロフィー症のニューハンプシャー種 (NH-413)、白色レグホン種 (WL-am)、および矮性鶏 (WL-am, dw) 浅胸筋における組織学的変化 a:NH-413, b:WL-am, c:WL-am, dw

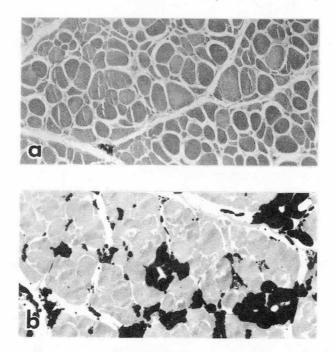


図 2. 16週齢におけるヘテロ鶏 (am/+)浅胸筋の dw遺伝子ヘテロ接合個体 (Z^{dw}Z⁺)(a)とホモ接合個体 (Z^{dw}Z dw) (b) 間の組織学的比較

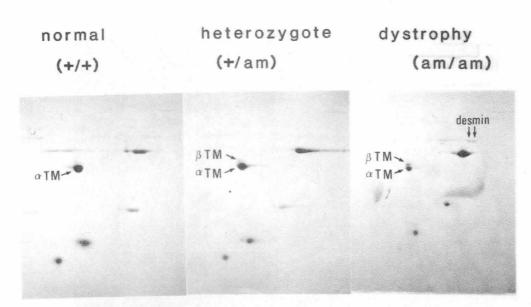


図 3. 10週齢矮性鶏 (+/+)、筋ジス矮性鶏 (am/am)、およびヘテロ矮性鶏 (am/+) 浅胸筋の全筋線維抽出蛋白の比較 α TM:トロポミオシン α 鎖。 β TM:トロポミオシン β 鎖。 デスミンが筋ジス筋にみられる。

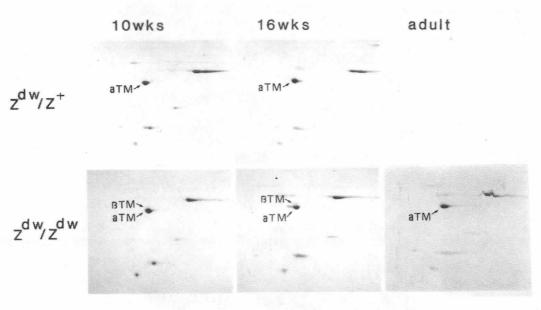


図 4. 10, 16週、および1年齢におけるヘテロ鶏 (am/+)浅胸筋トロポミオシンの dw 遺伝子ヘテロ接合個体 $(Z^{dw}Z^+)$ とホモ接合個体 $(Z^{dw}Z^{dw})$ 間の比較 $\alpha TM:$ トロポミオシン α 鎖。 $\beta TM:$ トロポミオシン β 鎖。

/am)、またはヘテロ(am/+) に導入して浅胸 筋の収縮蛋白、特にトロポミオシンの質的変化 に焦点をあてて解析したのが図-3である。正 常矮性鶏の筋蛋白はニューハンプシャー種正常 鶏(NH-412)での結果とよく一致する。ミオ シン軽鎖は速筋 タイプの f LC-1, f LC-2, fLC-3の3種より成り、トロポニン-Cも凍 筋タイプである。トロポミオシンは殆どα鎖か ら成る。一方、筋ジス矮性鶏筋のトロポミオシ ンはα鎖に加えてβ鎖のスポットが認められ、 デスミンのスポットも出現する。 am 遺伝子を ヘテロに持ち、かつ dw 遺伝子がホモ化した矮 性鶏では、トロポミオシンα鎖に加えて、僅か ではあるがβ鎖が出現する。このヘテロ鶏での トロポミオシンβ鎖の合成の状態を、dw遺伝 子をホモにもつ小型な雄個体(am/+,Zdw Z^{dw})と、dw遺伝子をヘテロにもつ大型の雄個 体 (am/+, Z^{dw}Z⁺) の間で比較した (図-4)。 dw 遺伝子を ヘテロにもつ大型個体の浅胸筋筋 線維にはトロポミオシンβ鎖は出現しない。した がって、dw遺伝子の変更遺伝子としての作用 はヘテロ接合体の場合は十分に発揮されない。 一方、 dw 遺伝子をホモにもつ小型個体は、強 い変更遺伝子として作用し、野生型対立遺伝子 によって抑制されていた am 遺伝子の作用を強 調し、僅かではあるがトロポミオシンβ鎖を合 成する。このβ鎖のスポットは10,16週齢 で観察されるが、充分に成熟した1年齢では消 失する。以上に述べた筋ジストロフィーおよび 矮性遺伝子型と、浅胸筋トロポミオシンβ鎖の 出現との関係を表-2にまとめた。

考 察

変更遺伝子は遺伝子の相互作用によって、他の遺伝子座にある遺伝子の形質発現に影響を与

える遺伝子である。この遺伝子は他の遺伝子の 形質発現を強調したり、その突然変異性を増加 させたりする強調遺伝子と、他の遺伝子の働き を弱めたり、その働きを完全に抑えてしまった りする抑制遺伝子や抑圧遺伝子とに分けられる。 筋ジス矮性鶏は、2種の遺伝子、すなわち筋ジ ス遺伝子(am)と矮性遺伝子(dw)を有する。 乙染色体上にある dw 遺伝子がホモまたはへミ 接合体の場合は、常染色体上にある am 遺伝子 に対して強調遺伝子として作用し am 遺伝子の 発現を増大する。従って、dw 遺伝子を有する 筋ジス矮性鶏浅胸筋の筋線維は萎縮、消失し、 さらに、それらと平行して脂肪組織の浸潤が顕 著となる。同様の結果はヘテロ鶏(am/+)に dw 遺伝子が導入された場合にも見られる。

正常鶏浅胸筋のトロポミオシンはα鎖から成 るが、筋ジス筋のそれはα鎖に加えてβ鎖が長 期にわたって残存する 7) ヘテロ鶏 (am/+) 浅 胸筋は正常筋と同様にトロポミオシンβ鎖は出 現しない⁶⁾。 しかし、 dw 遺伝子をホモに持つ ヘテロ鶏は、体形が小型化するに伴い、野生型 対立遺伝子によって制限されていた am 遺伝子 の発現が解除され、筋線維の収縮蛋白レベルで の異常が現れる。 dw遺伝子をヘテロ接合体と して持つ大型のヘテロ鶏の浅胸筋筋線維はトロ ポミオシンβ鎖を合成せず、正常筋と同じ反応 を示す。これらの事実は、導入された dw 遺伝 子がヘテロ鶏浅胸筋筋線維において、本来 am 遺伝子の発現が抑制されることによって合成さ れることのない収縮蛋白、特にトロポミオシン β鎖を僅かではあるが合成する方向へ修飾した ことを示唆する。

伴性劣性遺伝に従う矮性鶏の血中甲状腺ホルモン、Tri-iodothyronine(T3) 濃度は 孵化後早期にすでに著しく低下していることが 報告されている80 14週齢で行った我々の測 定結果もこのことを裏付けている。鶏体を小型 化する dw遺伝子の一義的形質発現の場は甲状 腺ホルモンの低下であり、筋レベルでの筋ジス の発現は、am遺伝子とホルモンとの相互作用 の結果として把握される。甲状腺ホルモンは筋 線維の収縮蛋白や、酵素反応に作用し、過量の ホルモンは筋線維を速筋へ分化させ、ホルモン 濃度の低下は逆に筋線維を遅筋へと変換させる ことが知られている9。 今回ヘテロ鶏浅胸筋で みられたトロポミオシンβ鎖の出現は、血中甲 状腺 ホルモン濃度の低下による筋線維 の遅筋化 と関連があるように思われる。このような甲状 腺ホルモンの筋への作用は神経を介するとも報 告されているが¹⁰⁾、詳細なメカニズムは尚明ら かとなっていない。

要 約

- 1) 矮性 dw遺伝子はZ染色体上にあり、血中 甲状腺ホルモン濃度を低下させることによっ て鶏体を小型化する。
- 2) 筋シス am 遺伝子はこの dw 遺伝子が導入 され、ホモ化した場合、強い修飾を受ける。 この意味で、dw 遺伝子は am 遺伝子の変更 遺伝子として作用する。
- 3) dw遺伝子の発現は、am遺伝子をヘテロ接合体として持つヘテロ鶏浅胸筋にも強い影響を示し、本来この筋線維にないトロボミオッンβ鎖の合成を誘発する。

引用文献

 Kikuchi, T. et al.: Genetic heterozygous carriers in hereditary muscular dystrophy

- of chickens. Tohoku J. Agr. Res., 32:14.1981.
- 2) Kikuchi, t. et al : Gene expression of muscular dystrophy in dwarf chicken. Tohoku J. Agr. Res., 36: 17 1985.
- 3) 菊池建機等:筋ジストロフィー鶏の発症過程の品種間差ー特に矮小鶏をめぐって一. 昭和58年度厚生省研究報告書(野村班), 29,1984.
- 4) 菊池建機:筋ジストロフィー鶏骨格筋の脂質と血管系の構築。昭和59年度厚生省研究報告書(野村班),93,1985。
- 5) 菊池建機:筋ジストロフィー鶏ーその多面 的生物反応ー。日本疾患モデル動物研究会 (講演要旨), 1984。
- 6) 野々村禎昭等:筋ジストロフィー症鶏浅胸筋の筋線維構成蛋白一筋ジス遺伝子の白レグ鶏への導入一。昭和57年度厚生省研究報告書(江橋班),114,1983。
- 7) Takeda, S. and Y. Nonomura:
 Presence of the tropomyosin
 B-chain in dystrophic chicken
 breast muscle. Biomed. Res.,
 1: 176,1980
- 8) Scanes, C.G. et al.:

 Abnomalities in the plasma concentrations of thyroxine, tri-iodothyronine and growth hormone in sex-linked dwarf and autosomal dwarf White

Leghorn domestic fowl Berlin, N.Y., p593,1980 (Galls domesticus). J. Endocr., 10) Johnson, M.A. et al.: A 97: 127, 1983 neurally mediated effective.

9) Ianuzzo, C.D. et al.: A possible thyroidal trophic influence on fast and slow skeletal muscle myosin. In:Pette, D. ed., Plasticity of Muscle. Walter de Gruyter,

Berlin, N.Y., p593,1980

Johnson, M.A. et al.: A

neurally mediated effect of
thyroid hormone deficiency
on slow-twitch skeletal muscle?

In:Pette, D. ed., Plasticity of

Muscle. Walter de Gruyter,
Berlin, N.Y., p607,1980.

糖原病 II 型ウズラの改良

水 谷 誠 研究協力者 新海久夫,小池雅春 中山一彦

糖原病I型を発症するRW系は野生型羽装で有色卵殼卵と白色卵殼卵を産卵するウズラが混在する閉鎖集団である。有色卵殼卵は検卵が困難であるため胚を実験に使用する際1つの障害となる。また、野生型羽装は胚に黒色の色素が沈着するため、これも胚を実験に使用する際の原書になると思われる。そこで、これらの欠点を改良するため、常染色体性の劣性遺伝子により支配されている白色卵殼卵を産卵する形質IIの表でのではいる白色羽装を含む3種の羽装形質を糖原病II型系へ導入することを試みた結果、その系統化に成功した。本報告はこの新しく確立された糖原病I型発症系(RWE系)の特徴、繁殖成績および今後、標識遺伝子として使用可能な血液型の検索結果である。

I. RWE系の確立とその特徴

1. RWE系の確立過程

RW系¹⁾は有色卵殻卵および白色卵殻卵(以下白卵と略、図1)を産卵する個体が存在する閉鎖集団である。一方、MWE系²⁾はすでに報告したごとく、糖原病I型形質に関しては非発症系であるが、白卵に固定しているとともに常染色体性の優性遺伝子に支配されているdilution(ホモ半致死)、yellow(ホモ致死)および常染色体性の劣性遺伝子に支配されている panda ⁸⁾の各羽装を示す個体の混在する閉鎖集団である。そこで、この2系統を用い、す

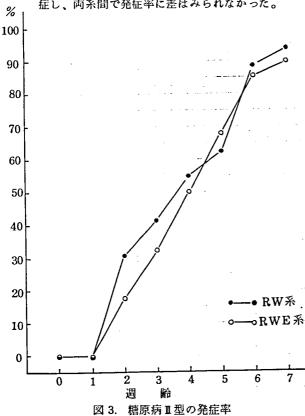
べての雌が白卵を産卵する(白卵形質に固定) とともに panda, yellow, wild および dilution の各羽装の混在する系統を作出す るため以下の交配を行った。

panda でdilution 羽装を呈するMWE 系の雄とRW系の白卵を産卵する雌の交配およ び yellow の羽装を呈するMWE系の雄と RW系の白卵を産卵する雌の 2交配を行い、そ れぞれの交配から得られた dilution および yellow の各羽装を呈する雄にRW系の白卵 を産卵する雌をもどし交配した。これらのもど し交配から得られたwild, dilution およ yellow の各羽装を呈し糖原病Ⅱ型を発症す る個体をRWE系の基礎集団とした。なお、 panda 羽装で糖原病 II型を発症する個体はこ れら基礎集団から得られた後代において出現し た。今後、panda, dilution および yellow の各羽装を呈する個体を選抜し、最 終的に panda 羽装に関しては固定化する予定 である。

2. RWE系の特徴

RWE系の特徴は、前述のごとく、すべての 個体が糖原病 I型を発症するとともにすべての 雌は白卵を産卵する。一方、羽装に関しては wild, panda, yellow および dilution の各羽装が混在する(図2)。

RWE系の糖原病 I型の加齢に伴う発症率を 翼の挙上により判定し、RW系のそれと比較し た。結果は図3に示すごとく、両系とも2週齢より発症しはじめ7週齢で約90%の個体が発症し、両系間で発症率に差はみられなかった。



成長に関しては、RWE系、RW系およびWE系(コントロール系、白卵、野生型羽装)の0~7週齢までの体重を測定した。結果は表1および図4に示すごとく、RW系およびRWE系は類似の成長を示したが、WE系のそれより劣り、7週齢において体重差は15-20gであった。

II. RW系の繁殖成績

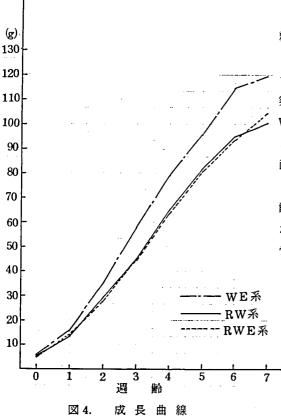
RWE系およびRW系の受精率およびふ化率はWE系のそれらより低い。このため、RWE系およびRW系の維持には両系の性成熟以後の受精率およびふ化率の推移を知る必要がある。そこで、糖原病発症系としてはRW系を、正常系としてはWE系を用い、両系の8-29週齢までの受精率およびふ化率の推移を調査した。・RW系 結果は図5および図6に示すごとく、両系の受っRWE系精率は8-14週齢で高く、以後減少する傾向がみられた。なお、RW系の受精率はWE系のかられた。なお、RW系の受精率はWE系のより常に10-15%低値を示した。特に20週齢以後のRW系の受精率の低下は著しく、25週齢において32%まで低下した。この受

表 1. 発育の比較

系統名	0	1	2	3	4	5	6	7
RWE	6.6±0.6	14.0±2.3	28.9±5.0	47.2±6.4	63.9±7.2	81.0±9.0	93.2±125	105.3±15.8
RW	6.8±0.5	13.9±2.1	29.6±4.2	47.3±6.2	65.5±6.7	81.3±8.4	95.5±12.7	100.5±16.3
WE	7.1±0.7	16.7±2.1	35.5±3.8	58.7±5.7	79.2±7.5	96.6±8.6	113.1±13.1	119.8±14.3

※雌雄を含む

単位:g



精率の低下の1原因として翼の挙上不能が考えられる。一方、ふ化率の加齢に伴う推移に関してはRW系とWE系において明らかな差異は観察されなかった。しかし、RW系のふ化率はWE系のそれより低い傾向がみられた。このことは、糖原病I型形質が胚の生存に不利に働く面もあることを示唆しているかもしれない。

RWE系、RW系およびWE系の2-7ヵ月 齢の間の受精率およびふ化率の平均値を算出した。結果は表2に示すごとく、糖原病発症系の 受精率はRW系で60.7%、RWE系で47.0%

表 2. 受精率およびふ化率の比較

系統名	受精率	ふ化率		
RWE	4 7.0	5 6.3		
RW	6 0.7	6 0.9		
WE	7 7.3	7 9.3		
(2- 7ヵ日絵)				

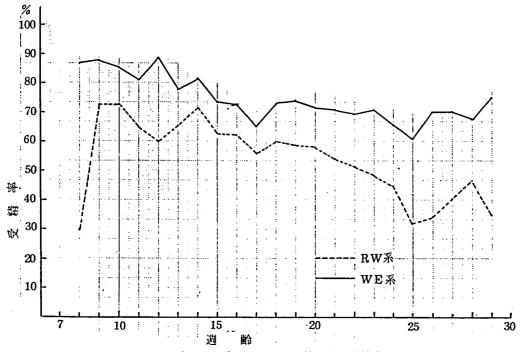
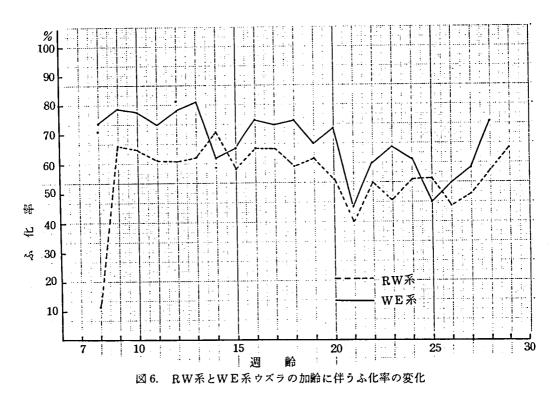


図 5. RW系とWE系のウズラの加齢に伴う受精率の変化



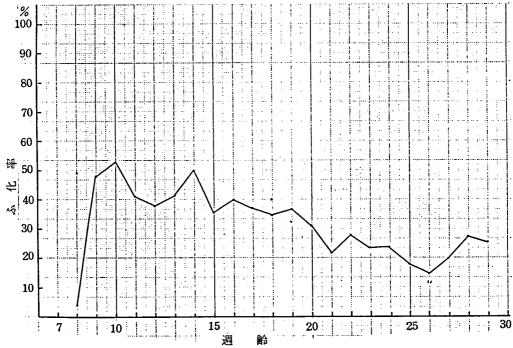


図 7. 加齢に伴う入卵数に対するふ化率の変化(RW系)

と正常系の77.3%よりかなり低値となった。特にRWE系において低く、今後改良すべき点と考えられる。ふ化率に関しては、RWE系において56.3%、RW系では60.9%とWE系の79.3%より低値であったが、受精率において観察されたほどの差はみられなかった。

入卵数に対するふ化羽数の率はヒナを実験に使用する際および次代のヒナを得る際、入卵する種卵の個数をきめるめやすとなる。そこで、RW系の8-29週齡までのこのふ化率を算出した。結果を図7に示す。図からも明らかなようにRW系の入卵数に対するふ化率は20週齡以後30%以下となり回復はみられない。

これらの結果から、RW系を継代する際、種 親が20週齢になる以前に次代のヒナを得るの が適当と考えられる。すなわち、少くとも5カ 月に1回は種親の更新を行うのがよい。この更 新期間はWE系の約½である。

II. RWE系およびRW系の血液型標識遺伝 子

糖原病 I 型発症形質を支配する遺伝子の存在する染色体および連関関係にある遺伝子を解明することは今後の糖原病 II 型に関する遺伝子のクローニングなどの研究に必要になると思われる。そこで、第1段階として連関関係の検索を行うためRW系およびRWE系の血液型の標識遺伝子に関して調査した。

ウズラの血液型は免疫抗血清、自然凝集素および植物性凝集素(植物レクチン)により識別されるものとに大別されるも

1. 免疫抗血清により識別される血液型

これまで同種免疫抗血清および異種免疫抗血 清により識別される血液型が報告されている⁵⁾⁶⁾ しかし、今回筆者らが用いた抗血清は同種免疫 抗血清あるいは異種免疫抗血清ではなく、ウズラの赤血球あるいは白血球をウズラ(雌)とニワトリ(雄)の交配から得たハイブリッドに免疫して作成した抗血清である。ウズラよりハイブリッドが約3倍大きいため同種免疫による方法より多量の抗血清を得られる利点がある。免疫の組合せを表3に示す。免疫方法は20%の赤血球浮遊液あるいは2元の血液より FicollーPaque 液を用いて得た白血球浮遊液各1元化を

表 3. 抗血清の作出法

ウズラ(系統名)	免疫に用いた 血球	ハイブリッド
2554 (SBPN)	赤血球	7984
2991 (CWE)	"	9035
4482 (CWE)	"	2018
5638 (B)	白血球	4692
5168 (PNN)	"	5047
5610 (CWE)	"	5579

表 4. 白血球を免疫して作成した 3 種の 抗血清の凝集力価

抗血清・血球	4692	5047	5579	
5024	0	0	16	
5610	0	0	16	
5168	0	128	0	
5638	8	0	16	

毎週1回ハイブリッドの翼下静脈に免疫した。 白血球を5週連続免疫して得た3種の抗血清の 異なるウズラ個体に対する凝集力価を表4に示 す。表からも明らかなようにこれらの抗血清は 抗原特異性が高く、ニワトリの同種免疫抗血清 のように吸収操作を必要としない。この点に関 しては同種免疫抗血清と同様である。なお、今 回用いた抗血清と反応する抗原のシステムと同種免疫抗血清により識別されるシステムとの異同は未検索である。また、今回用いた6種の抗血清により識別される抗原間の同座性も未検索である。

RWE系およびRW系の6種の抗血清に対す る赤血球凝集性を検索した結果を表5に示す。 4692, 5579 および 2018 の各抗血清に対する 両系の陽性・陰性各個体の出現頻度は類似し、 陽性個体が陰性個体より多い傾向がみられた。 9035 に対する陽性・陰性各個体の出現頻度は 両系で類似し、陰性個体が陽性個体より多く存 在した。また、5047 および 7984 両抗血清に 対する陽性・陰性各個体の出現頻度は両系間で 異なり、5047 抗血清に関してはRWE系はほ とんどの個体が陰性であったが、RW系では陽 性・陰性各個体は同程度であった。一方、7984 抗血清に関しては両系とも陰性個体が陽性個体 より多く存在した。今後、RW系は 4692, 5047, 5579, 7984 および 2018 の各抗血清 に関しては陽性形質に 9035 抗血清に関しては 陰性形質に固定する予定である。一方、RW系は 4692,5047,7984 および 9035 の各抗血清に関しては陰性形質に、5579 および 2018 両抗血清に関しては陽性形質に固定する予定である。4692,5047 および 5579 の各抗血清に対する凝集性を固定することは、これらの抗血清と反応する抗原がニワトリのBシステムと同様に組織適合性遺伝子座である可能性が考えられるため今後これらの系統を用い筋肉の移植実験などを行う際に有利になると思われる。

2. 植物 レクチンにより識別される血液型植物 レクチンの血液型特異性は高く、ヒトのA,B,OおよびNなどの血液型を判定する際使用されている。また、カツォ⁷⁾、ハト⁸⁾およびニワトリ⁹⁾など種々の動物の血液型を識別するレクチンも報告されている。

ウズラの血液型を識別することが知られているレクチンにはダイズ¹⁰⁾、クリタケ¹¹⁾ およびキクイモ(水谷ら未発表)の各レクチンがある。これら3種のレクチンに対する陽性・陰性各個体の出現頻度をRWE系およびRW系において

表 5.	6種の抗血清に対す	トる RWE系お	よびRW系の陽性	・陰性各個体数

抗血清	46	92	50	047 5	579	79	84	90	35	20	18
系統	+	_	<u> </u>	- , +	_	+		, +	-:	+	-
RWE	' 26	14	1	39 38	2	' 3	37	4	36 י	23	17
RW	24	16	17	13 ' 30	10	. 14	26	6	34	30	10

表 6. 3種の植物 レクチンに対するRWE系およびRW系の陽性・陰性各個体数

レクチン	/ <u>'</u>		ダ・	1 7	< .	1	クリ	タケ		1	キク	イモ	
					♀ .					ı á	\$	ς	?
系統		+	-	+	_	' +	_	+	_	1 +		+	_
RWE		14	0	0	26	. 0	14	5	11	14	0	16	10
RW	1	17	0	0	23	, 0	17	17	6	17	0	19	3

検索した。結果を表6に示す。

ダイズレクチンと反応する凝集原 "Sb"はすべてのウズラに存在する凝集原である。しかし、産卵雌ではこの凝集原の消失 (Sb消失形質)する個体と存続 (Sb存続形質)する個体が存在する。Sb消失形質が 常染色体性の単一優性遺伝子により支配されている。RWEおよびRW両系はともに Sb 消失形質に固定していた。

クリタケレクチンと反応するNs 凝集原は一部の雌においてのみ産卵に伴い出現する凝集原で、常染色体性の単一優性遺伝子により支配されている。RW系は産卵時Ns 凝集原陽性の個体が多く、RWE系は産卵時陰性個体の多い傾向がみられた。

キクイモレクチンと反応する Ht 凝集原は前述の 2種の凝集原と性質が異なり、産卵状態の変化により凝集原の存否が影響をうけない凝集原である。現在、遺伝様式は不明である。両系とも陽性個体の多い傾向がみられた。

今後、RW系はNsおよびHt両凝集原とも陽性形質に、RWE系はNs 凝集原に関しては陰性形質に、Ht 凝集原に関しては陽性形質にそれぞれ固定する予定である。

文 献

- 1) 水谷誠:糖原病 I 型ウズラの育成。筋ジストロフィー症動物の生産・開発に関する研究。昭和56年度研究報告書。35-52。1982。
- 2) 水谷誠:糖原病 I型ウズラの遺伝子分析. 筋シストロフィー症動物の生産・開発に関する研究. 昭和 58年度研究報告書. 47 - 56. 1984.
- 3) 水谷誠、茅野和夫、梅沢英彦、倉益茂実: ニホンウズラの新しい羽装パンダ(panda)

- についての遺伝子分析。実験動物。23。 59-61.1974。
- 4) 水谷誠:ニホンウズラの赤血球凝集原(抗原)探索の現状,遺伝. 32. 34-39. 1978.
- 5) Hideki Katoh and Noboru
 Wakasugi.: Studies on the
 blood groups in the Japanese
 quail: detection of three
 antigens and their inheritance.
 Dev. Comp. Immunol. 4. 99-110.
 1980.
- 6) Hideki Katoh and Noboru

 Wakasugi: Studies on blood
 groups in the Japanese quail:

 The common antigen possesed by
 red blood cells and leukocytes
 and their inheritance.

 Immunogenetics 13. 109-114. 1981.
- 7) Sprague, L.M., Erythrocyte antigens of the oceanic skipjack (Katsuwonus pelamis) recognized by phytohemagglutimins. Genetics 46. 901. 1961.
- 8) 水谷誠,梅田茂和,倉益茂実:エンドゥ植物性血球凝集素(PHA)により見出されたハト赤血球凝集原に関する研究。日畜会報。 52. 82-87. 1981.
- 9)水谷誠、梅沢英彦、倉益茂実:アメリカヤマゴボウレクチン(PWA)と反応するニワトリ赤血球凝集原 "Pw₁"および "Pw₂" に関する研究、ABRI、12、16-19、1984、

- 10) 水谷誠,梅沢英彦,倉益茂実:ダイズPHA 11) 水谷誠,斉藤司,梅沢英彦,倉益茂実:ク により見出されたニホンウズラ赤血球凝集 原に関する研究. 日畜会報. 48. 227-234, 1977,
 - リタケPHAにより新たに見出されたニホ ンウズラ赤血球凝集原. ABRI. 9. 43 **-45.1981.**



図 1. 有色卵殻卵および白色卵殻卵









RWE系に出現する羽装 (上段:左 panda、右 dilution、下段:左 wild、右 yellow) ⊠ 2.

筋ジストロフィーハムスターの繁殖ならびに 系統育成について

斉 藤 宗 雄¹⁾ 研究協力者 田中 亨¹⁾ 松崎哲也¹⁾

筋ジストロフィーの研究には、筋ジストロフィーマウスを始め、各種の疾患モデル動物が使われている。我々は、1982年よりBIO14.6 ならびにUM-X7.1系筋ジストロフィーハムスターを導入し、これらの供給体制確立のための生産ならびに筋ジストロフィーハムスターに対応したコントロール系統の育成を行なっている。以下にこれらの経過を報告する。

1. 筋ジストロフィーハムスターの繁殖成績

筋シストロフィーハムスターならびに飼育・ 繁殖方法

動物は、1981年BIO-Reseach consultants. Incより導入したBIO14.6系、ならびに、1982年 Dr Jasmin, Canadaより導入したUM-X7.1系である。

飼育は、飼育室の温度 23 ± 2 ℃、湿度 55± 5%、照明は 8時~2 0時の 1 2時間明 1 2時間暗、換気回数は 1 0回/時 に統御した。ケージはラット用プラスチックケージ(日本クレア製クリンケージ)を用い、床敷にはカンナクズを用いた。飼料は r線 3 Mrad 照射滅菌済固型飼料(日本クレア製 CA-1)る給与し、飲水は水道水をフラジオマイシン(69 4 μg/1mg力価)500 倍の溶液にして与えた。 なお、飼育器具器材はすべて高圧蒸気滅菌して用いた。

繁殖は、生後 2.5ヶ月齢以上のメス1匹オス

1) (財) 実験動物中央研究所

1匹を1週間同居交配し、その後オスを分離し、 メスは個別に飼育し妊娠・出産・哺育させた。 哺育仔の離乳は生後3週齢以上で行った。

2) 繁殖成績

(1) BIO14.6系

1985年1月から12月までの1ヶ年の繁殖 状況は、延交配メス数408匹で、出産メス数 170匹(出産率42%)、総産仔数1,059匹 (平均産仔数6.2匹)、総離乳仔数656匹 (離乳率61%)であった。この成績を生産指 数(1匹のメス親から1回の交配で得られる仔 数)として求めると1.6であった。

(2) UM-X7.1 系

BIO14.6系と同様に、1985年1月から12 月の繁殖状況をみると、延交配メス数は392 匹で、出産メス数148匹(出産率38%)、 総産仔数950匹(平均産仔数6.4匹)、総離 乳数697匹(離乳率73%)であった。生産 指数でみると1.7であった。

以上、2系統の成績は、昨年・一昨年の生産 指数が約2.0であったことと比べや1低い。特 に出産率の低下が著しいことから、これは、コ ロニーの拡大後に生ずる、親動物の更新の遅れ によるものと予想される。今後、留意したい問 題である。

2. 筋ジストロフィーハムスターのコントロール系の育成

1) BIO 14.6 系舌白斑の観察

筋シストロフィーハムスターの舌に白斑が生 ずることが知られている。しかしながら、その 発生率、出現部位ならびに時期についての報告 は少ない。我々は、コントロール系育成の一環 として、これらの観察を行なった。

(1) 方法

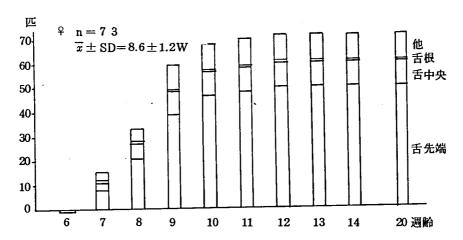
動物は、当研究所で得られたBIO14.6系 ハムスター 6 週齢メス 7 3 匹、オス 6 0 匹を用いた。飼育ケージは日本クレア製 クリンケージを

用い、1ヶージに5~10匹を収容した。飼育管理は前述の繁殖に順じて行なった。観察は白斑の有無ならびに形状を1週に1度20週齢迄肉眼的に行なった。

(2) 成績

20週齢迄の観察において、舌白斑の認められたのは、メスで73匹中72匹(発生率98.6%)オスで60匹中48匹(発生率80.0%)であった。

白斑の形状は直径 1~5 mmの円型で、発現部位は、舌先端に 1~2 個のもの、中央部に 1 個のもの、舌根部に 1~2 個のもの、ならびにこれらが混在するものなどであった。これら部位



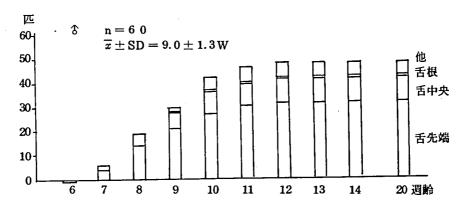


図 1. BIO 14.6 系筋ジスハムスターの舌白斑の出現状況

毎の発現状況は、オスで舌先端部31匹、中央部9匹、舌根部2匹、その他2匹であった。メスでは、舌先端50匹、中央部10匹、舌根部1匹、その他11匹であった。このように、舌先端部に発現するものが6~7割を占めていた。

発現時期についてみると、オス・メスともに 7週齢より認められ、発現する個体は12週齢 までに発現する。平均発現時期はメスで8.6± 1.2週齢、オスで9.0±1.3週齢であった。な お、部位による発現時期の差はみられなかった。 (図1)

以上、BIO14.6系の舌白斑は生後12週齢 迄にオス・メスほとんどの個体で発現する。し かしながら、少数ではあるが舌白斑の発現しな い個体も認められた。このことは、コントロー ル系育成を進めるうえで、極めて重要な知見で ある。

2) CPKの測定

BIO14.6系の舌白斑の観察において、発現 状況にバラッキがみられ、コントロール系育成 に当って、舌白斑のみを指標としては、充分で ないと予想された。

そこで、筋ジストロフィーハムスターのもう ひとつの特徴である、血清中のCPK値を測定 し、これに基づいた、コントロール系の育成を 試みた。

(1) 方法

動物は、BIO14.6系、N:Syrian(1983年NIH, USAから導入)、ならびに、BIOF₁B系にBIO14.6系を4回戻し交配したものを基に育成したコントロール系である。CPKならびに血液測定は、当研究所附属前臨床研究所血液化学部谷本義文先生に依頼して行った。動物はすべて6週齢以上のものを用いた。

表 1. BIO14.6. N:Syrianならびに Control ハムスターの血液性状

系 統	GPT (IU)	GOT (IU)	LDH (IU)	CPK (IU)	Aldorase (IU)	無機リン mg/dl
BI014.6 (8)	710	1270	13671	205224	7056	8.7
•	574 469	1151 1046	8127 6941	119748 67116	5208 3255	6.7 5.8
(♀)	540	877	5874	96900	5397	5.6 6.9
(+)	289	448	2083	32640	2118	6.3
N:Syrian (8)	74	33	132	226	26	5.9
. (9)	96	30	141	359	33	5.7
	65	25	151	328	29	5.2
Control (8)	227	588	2772	64668	1656	5.0
(育成中)※	111	54	265	975	46	4.9
(月以下ノ深	97	44	180	548	44	4.6
(2)	100	51	182	381	48	6.1
	90	36	130	304	46	6.9

※ BIO F₁Bへ、BIO14.6を4回戻し交配後繁殖

(2) 成績

BIO14.6, N:Strian ならびにコントロール系の主な血液性状

BIO14.6 ♀ 2 & 3 匹、N:Syrian ♀ 2 & 1 ならびにコントロール系♀ 2 & 3 の主な血液性状を表1に示す。筋ジストロフィーのBIO 14.6 系と、正常の N:Syrian を比較するとGPT, GOT, LDH, CPKならびにAldorase値は、BIO14.6 系は N:Syrian 系に比べ高く、とくに CPK値の差は著明であった。コントロール系についてみると、BIO14.6 系と同等または、N:Syrian 系と同等な値を示すものが混在していた。

② コントロール系コロニーの CPK 全数検 査

コントロール系として維持している♀63、

847すべての CPK 値を測定した。その結果、低値(1000単位以下)を示す個体はメス59 匹オス40匹であったが、高値(1000単位以上)を示す個体がメス4匹、オス7匹にみられた。このように、このコントロール系には、舌白斑は認められないが、 CPK 値の高い筋ジストロフィー個体が混在することが確認された。

③ 後代検定による正常ホモ (+/+)の選抜
②の成績から、このコロニーを確実なコントロール系とするため、CPK低値を示すコントロール系 (+/+又は+/my)メス・オスにBIO 14.6系 (my/my)オス・メスを交配し、得られる仔全数の CPK を測定し、同腹仔全てが低値を示す親ペアの、コントロール系を正常ホモ(+/+)とした。確実なコントロール系は、正常ホモ(+/+)メス・オス間の交配により育成

表 2.	コントロール系コロニー、C	CPK 全数検査成績 ·
数	CPK 低 值	CPK 高 値

検	查数	CPK 低 值	CPK 高値
â	47	40 (246~870 IU)	7 ^匹 (1128~49560IU)
Ş	63	59 (72~876IU).	4 (1422~36900IU)
計	110	99 (72 ~ 876 IU)	11 (1128 ~ 49560 IU)

表 3. 後代検定:コントロール系へのBIO14.6 系交配実験

	後代検定♀・8	CPK検査仔数
Exp 1	BIO14.6 ♀ 匹 IU コントロール系 & 23(246~870)	匹 IU 135 (78~100192)
8	+/+ å 5 (246~630) 推定 +/my å 17 (264~870)	33 (78 ~ 948) 102 (180 ~ 100192)
Exp 2	BIO14.6 8 × コントロール系♀ 21 (72~876)	142 (162 ~ 163923)
Ф	+/+ ♀ 6 (72~756) 推定 +/my ♀ 15 (156~876)	55 (162 ~ 990) 87 (168 ~ 163923)

される。

オスの後代検定:コントロール系オス23匹 に BIO14.6 系メス23匹を交配し計135匹 の仔を得、これらの仔が6週齢に達した時点で CPKを測定した。その結果、同腹全仔のCPK が低値を示したのは、5腹であった。高値が混在していたのは17腹であった。

メスの検定:コントロール系メス21匹に BIO14.6 系オス21匹を交配し、合計142 匹の仔を得た。これらが6週齢に達した時点で CPKの測定を行った。その結果、同腹仔全数 のCPKが低値を示したのは、6腹であった。 高値が混在したのは15腹であった。

以上、舌白斑を指標として育成したコントロール系の中から、CPKを指標とした後代検定により、正常ホモ(+/+)メス6、オス5匹を選んだ。そして、この中から動物の状態のよいメス3オス3匹選び、確実なコントロール系コロニーの育成に着手した。

まとめ

今年度、筋ジストロフィーハムスターの維持はBIO-14.6系、UM-X7.1系ともに順調に行なわれた。繁殖成績は昨年度と比べるとやゝ低かった。タネ動物の繁殖使用期間を検討する必要がある。

筋シストロフィーハムスターの舌白斑の観察を行なったところBIO14.6系において、ほとんどの個体で出現するものの、出現しない個体もみられた。このことから、従来行なわれた舌白斑の有無を指標としたコントロール系の育成方法は不充分であることが予測され、このコロニーの動物の血清中 CPK 値を測定したところ、CPK 高値を示す個体が混在することが判った。

そこで、CPK 値を指標としてBIO14.6 との 後代検定により正常ホモ (+/+)メス・オスを 選び、このメス3オス3を基にコントロール系 コロニーの再育成を図っている。

さて、筋ジスBIO14.6系から"my" 遺伝子を省く戻し交配は、継代に当って、筋ジスの舌白斑やCPK値の特徴を指標(発現しない個体を選ぶ)として用いるため、特徴の稍かなバラツキによっても、選抜ミスの可能性がある。幸いにも今回のコロニーは、十/+ 因子が継代されていた。しかし、今後継代した場合、どのような経過となるか不明である。

一方、系統育成としては、既存のハムスターに my 遺伝子を導入する方法もある。この場合 舌の白斑陽性を指標 (発現する個体を選ぶ)と するので、継代は確実に行なうことができる。 我々は、この方式による新しい筋ジストロフィーハムスターの育成も試みる予定である。

参考文献

- 1) HOMBURGER. F, : Myopathy of hamster dystorophy : History and morphologic aspects N.Y. Acad Sci, 2-17 (1979)
- 2) 斉藤宗男:筋ジストロフィーハムスターの 繁殖ならびに改良について、昭和57年度 厚生省神経疾患委託研究「筋ジストロフィ 一症動物の開発・供給に関する研究」報告 書.

昭和60年度第5班(野村班)名簿

区	分	氏	名	所属機関名	電話番号
班	長	野村	達 次	財団法人 実験動物中央研究所 〒 213 川崎市宮前区野川 1430	044-755-5441
運営	幹事	江 崎	孝三郎	財団法人 実験動物中央研究所 〒 213 川崎市宮前区野川 1430	044-755-5441
幹	事	野々村	禎 昭	東京大学医学部薬理学教室 〒113 東京都文京区本郷7-3-1	03-812-2111
		埜 中	征哉	国立武蔵療養所神経センター 〒 187 東京都小平市小川東町 4-1-1	0423-41-2711
斑	員	勝木	元 也	東海大学医学部細胞生物学教室 〒 213 伊勢原市望星大	0463-93-1211
		髙 松	研	慶応義塾大学医学部生理学教室 〒160 東京都新宿区信濃町 35	03-353-1211
,		富田	武	名古屋大学農学部家畜育種学教室 〒 464 名古屋市千種区不老町 1	052-781-5111
		菊 池	建機	国立武蔵療養所神経センター 〒 187 東京都小平市小川東町 4-1-1	0423-41-2711
		水 谷	誠	財団法人 日本生物科学研究所 〒 409-16 山梨県北巨摩郡小渕沢町上笹尾	055136-2333
		斉 藤	宗 雄	財団法人 実験動物中央研究所 〒 213 川崎市宮前区野川 1430	044-755-5441