

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61年度研究報告書

昭和62年3月

研究報告書作成にあたり

この報告書は、昭和60年度より発足した厚生省神経疾患研究委託費による「筋ジストロフィー症モデル動物の開発」に関する研究の2年目の報告書であります。

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、この研究班では、筋ジストロフィー症モデル動物の生産・供給、新しい筋ジストロフィー症モデル動物の開発・改良、筋ジストロフィー症動物の飼育管理方法の検討等の研究を継続すると共に、新しい技術、例えば発生工学の手法をもちいてのモデル動物の開発・改良に一層の重点をおいて研究が行われました。昭和61年度の研究成果をここにまとめました。

私共は、今後とも、筋ジ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いたす所存でありますので、諸班の先生方の御協力をお願い申し上げます。

おわりに、御協力下さった班員各位、ならびに本研究費の取り扱いに種々お世話頂いた厚生省当局、国立精神神経センター神経研究所、日本筋ジストロフィー協会の方々から感謝いたします。

昭和62年3月

野 村 達 次

目 次

筋ジストロフィー症に関する文献調査 (1985)	1
野村達次	
筋ジストロフィー (<i>mdx</i> , <i>dy</i>) マウス骨格筋における血管変化	7
埜中征哉	
研究協力者 禹 満	
横山峯介	
江崎孝三郎	
キメラマウス (C57BL/10- <i>mdx</i> ↔ C3H/He) による筋ジストロフィー 症の研究	15
勝木元也	
研究協力者 横山峯介	
日下部守昭	
体外受精による筋ジストロフィー (C57BL/6- <i>dy</i>) マウス受精卵の作出と 凍結保存	25
横山峯介	
研究協力者 小島博子	
ミエリン <i>wolfgram</i> タンパクの cDNA クローニング	31
高松 研	
Shaking rat Kawasaki (SRK) の臨床 - 神経病理学的研究	39
埜中征哉	
江崎孝三郎	
研究協力者 相川久志	
津金隆夫	

GAD(gracile axonal dystrophy) マウスの遺伝育種学的研究 49

富田 武
研究協力者 山崎 一斗
若杉 昇
菊池 建機
向山 昌邦
安藤 一也

軸索ジストロフィーのモデル動物としてのGAD(gracile axonal dystrophy) 59

菊池 建機
研究協力者 向山 昌邦
山崎 一斗
富田 武

糖原病II型系(RWE系)と正常系(AWE系)との交配からのF₁に出現した翼の挙上不能個体 65

水谷 誠
研究協力者 布谷 鉄夫

(財)実中研における最近の筋ジストロフィー症モデル動物の維持と繁殖状況 75

斉藤 宗雄
研究協力者 田中 亨
日置 恭司

筋ジストロフィー症に関する文献調査(1986)

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、トリア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、海外における筋ジストロフィーに関する文献(1986年分)を以下に紹介する。

CHICKENS

- Cauwenbergs, P., Butler, J. and Cosmos, E.: Intraspecific chick/chick chimaeras: Dystrophic mesoderm transplanted to a normal host forms muscles with a dystrophic phenotype. *Neurosci. Let.*, 68(2), 149-154, 1986.
- Narayana, P.A., Delyre, J.L. and Misra, L.K.: In vivo ³¹P NMR studies of avian dystrophic muscles. *Magn. Reson. Med.*, 3(4), 549-553, 1986.
- McLean, B., Mazen-Lynch, L. and Shotton, D.M.: Quantitative freeze-fracture studies of membrane changes in chicken muscular dystrophy. *Muscle Nerve*, 9(6), 501-514, 1986.
- Demichele, S.J., Atallah, M.T., Sweeny P.R. and Brown, R.G.: Connective tissue metabolism in muscular dystrophy. early amino acid changes in collagen types isolated from the gastrocnemius muscle of developing dystrophic chicken embryos. *Comp. Biochem. Physiol. (B)*, 84(2), 225-233, 1986.
- Howlett, S.E., Triggle, C.R. and Hoekman, T.B.: Effects of noradrenaline, serotonin, and selected antagonists on the vascular smooth muscle of normal and dystrophic chickens. *Can. J. Physiol. Pharmacol.*, 64(5), 545-549, 1986.
- Hudecki, M.S., Kibler, P.K., et al.: Abnormal expression of the calmodulin gene in muscle from the dystrophic chicken. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 137(1), 507-512, 1986.
- Allen, E.R. and May, J.F.: A delay in the appearance of myosin in dystrophic chicken embryos. *Anat. Anz.*, 161(3), 239-242, 1986.

.....
* (財)実験動物中央研究所

Mitkowski, J.A.: Tissue culture studies on muscle disorders: Part 2. Biochemical studies, nerve-muscle culture, metabolic myopathies, and animal models. *Muscle Nerve*, 9(4), 283-298, 1986.

Zeza, D.J. and Heywood, S.M.: Analysis of tcrNA102 associated with myosin heavy chain-MRNPS in control and dystrophic chick rectoralis muscle. *J. Biol. Chem.*, 261(16), 7461-7465, 1986.

Zeza, D.J. and Heywood, S.M.: The localization of a tcrNA102 Gene near the 3' OH terminus of a fast myosin heavy chain gene. A comparison between normal and dystrophic chickens. *J. Biol. Chem.*, 261(16), 7455-7460, 1986.

Hollands, K.G., Grunder, A.A. and Gavora, J.S.: Divergent selection for incidence of degenerative myopathy of the musculus supracoracoideus of meat-type chickens. *Poult. Sci.*, 65(3), 417-425, 1986.

Kawamoto, R.M. and Baskin, R.J.: Isolation and characterization of sarcoplasmic reticulum from normal and dystrophic chicken. *Muscle Nerve*, 9(3), 248-256, 1986.

Murphy, M.E. and Kehrer, J.P.: Activities of antioxidant enzymes in muscle, liver and lung of chickens with inherited muscular dystrophy. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 134(2), 550-556, 1986.

Repasky, E.A., Pollina, C.M., et al.: Increased concentration of spectrin is observed in avian dystrophic muscle. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 83(3), 802-806, 1986.

Leskawa, K.C., Erwin, R.E. and Hogan, E.L.: Phospholipid biosynthesis during normal and dystrophic avian muscle cell differentiation in culture. *Life Sci.*, 38(2), 147-153, 1986.

Perry, G., Wible, L. and Brinkley, B.R.: Microtubules are not altered in the dystrophic chicken. *Exp. Cell Res.*, 163(1), 266-272, 1986.

MICE

Fink, R.H., Stephenson, D.G. and Williams, D.A.: Calcium and strontium activation of single skinned muscle fibres of normal and dystrophic mice. *J. Physiol.*, 373, 513-525, 1986.

- Manda, P. and Kakulas, B.A.: The effect of the myotoxic agent iodoacetate on dystrophic mice 129/Re. *J. Neurol. Sci.*, 75(1), 23-32, 1986.
- Semple, J.W. and Szewczuk, M.R.: Natural killer cells in murine muscular dystrophy. IV. Characterization of percoll fractionated splenic and thymic natural killer cells and natural killer-sensitive thymocyte targets. *Clin. Immunol. Immunopathol.*, 41(1), 116-129, 1986.
- Semple, J.W. and Szewczuk, M.R.: Natural killer cell activity in murine muscular dystrophy. III. NK-sensitive myoblast cells and lack of NK activity in beige/dystrophic hybrid mice. *Cell Immunol.*, 100(1), 20-33, 1986.
- Fong, C.N., Atwood, H.L. and Charlton, M.P.: Intracellular sodium-activity at rest and after tetanic stimulation in muscles of normal and dystrophic (dy2J/dy2J) C57BL/6J mice. *Exp. Neurol.*, 93(2), 359-368, 1986.
- Cossu, G., Adamo, S., et al.: Altered distribution of protein kinase C in dystrophic muscle cells and its modulation by liposome-delivered phospholipids. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 137(2), 752-758, 1986.
- Johnstone, D., Jaros, E. and Harris, J.B.: Spontaneous electrical activity in muscles of dystrophic (dy/dy) mice. *J. Neurol. Sci.*, 73(3), 339-349, 1986.
- Ontell, M.: Muscular dystrophy and muscle regeneration. *Hum. Pathol.*, 17(7), 673-682, 1986.
- Johnson, M.I. and Ovalle, W.K.: A comparative study of muscle spindles in slow and fast neonatal muscles of normal and dystrophic mice. *Am. J. Anat.*, 175(4), 413-427, 1986.
- Butcher, L.A. and Tomkins, J.K.: Protein profiles of sarcoplasmic reticulum from normal and dystrophic mouse muscle. *J. Neuro. Sci.*, 72(2), 159-169, 1986.
- Bridges, L.R.: The association of cardiac muscle necrosis and inflammation with the degenerative and persistent myopathy of mdx mice. *J. Neurol. Sci.*, 72(2-3), 147-157, 1986.

Wirtz, P., Loermans, H. and Wallinga-de Jonge W.: Long term functional improvement of dystrophic mouse leg muscles upon early immobilization. Br. J. Exp. Pathol., 67(2), 201-208, 1986.

Infante, J.P.: Defective synthesis of polyunsaturated phosphatidylcholines as the primary lesion in duchenne and murine dy muscular dystrophies. Med. Hypotheses, 19(2), 113-116, 1986.

Akindede, J., Oresajo, C., et al.: Enrichment of dystrophy-associated antigen from erythrocyte membranes of mice with muscular dystrophy. J. Neurogenet., 3(1), 49-59, 1986.

Kang, E.S., Capaci, M.T., et al.: Fatty acid metabolism and mitochondrial proteins in the C57BL/6J-dy2Jdy2J dystrophic mice. Comp. Biochem. Physiol. (B), 83(3), 545-550, 1986.

Bourke, D.L. and Ontell, M.: Modification of the phenotypic expression of murine dystrophy: A morphological study. Anat. Rec., 214(1), 17-24, 1986.

Eusebi, F., Cossu, G., et al.: Liposome-delivered phosphatidylcholine enhances the acetylcholine sensitivity of dystrophic mouse myotubes. Biochim. Biophys. Acta, 855(1), 197-9, 1986.

Parry, D.J. and Falconer, A.: Number and size of motoneurons in a forelimb motor nucleus of normal and dystrophic (C57BL/6J dy2J/dy2J) mice. Exp. Neurol., 91(1), 183-192, 1986.

HAMSTERS

Davis, E.C. and Shivers, R.R.: Freeze-fracture analysis of intramembrane particles of erythrocytes from normal and dystrophic hamsters. Anat. Rec., 215(2), 95-98, 1986.

Kopecky, J., Sigurdson, L., et al.: Thyroxine 5'-deiodinase in brown adipose tissue of myopathic hamsters. Am. J. Physiol., 251(1), Pt. 1, E8-13, 1986.

Campbell, J.B. and Stoward, P.J.: Acid phosphatase activity in soleus and plantaris muscle fibres of normal and dystrophic hamsters. A quantitative histochemical study. *Histochemistry*, 84(4-6), 580-585, 1986.

Nicholls, D.M., Teichert-Kuliszewska K. and Kuliszewski, M.J.: Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase mRNA. Activity and amount in dystrophic hamster muscle. *J. Neurol. Sci.*, 73(1), 97-110, 1986.

Desautels, M. and Dulos, R.A.: Effects of cold acclimation in dystrophic hamsters: Reduction of heart necrosis. *Am. J. Physiol.*, 250(2), Pt. 2, R167-174, 1986.

OTHERS

Vos, J.H., Van der Linde-Sipman, J.S. and Goedegebuure, S.A.: Dystrophy-like myopathy in the cat. *J. Comp. Pathol.*, 96(3), 335-341, 1986.

Witkowski, J.A.: Tissue culture studies of muscle disorders: Part 2. Biochemical studies, nerve-muscle culture, metabolic myopathies, and animal models. *Muscle Nerve*, 9(4), 283-298, 1986.

Roneus, B. and Essen-Gustavsson, B.: Muscle fibre types and enzyme activities in healthy foals and foals affected by muscular dystrophy. *Zentralbl. Veterinarmed. (A)*, 33(1), 1-12, 1986.

Norton, S.A. and McCarthy, F.D.: Use of injectable vitamin E and selenium-vitamin E emulsion in ewes and suckling lambs to prevent nutritional muscular dystrophy. *J. Anim. Sci.*, 62(2), 497-508, 1986.

文 献

- 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「筋ジストロフィー症動物の開発・供給に関する研究」班，昭和59年度研究報告書，5-12，1985.
- 7) 野村達次：筋ジストロフィー症に関する文献調査（1985），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60年度研究報告書，1-9，1986.

筋ジストロフィー (mdx, dy) マウス 骨格筋における血管変化

梶 中 征 哉*

研究協力者 禹 満*, 横山峯介**
江崎孝三郎**

<はじめに>

前回、筋ジストロフィーのモデル動物である dy マウス (C57BL/6J-dy/dy) と mdx マウス (C57BL/10ScSn-mdx) における筋線維の発育分化と壊死線維との関連について述べた¹⁾。すなわち、dy マウスでは生後10日目頃より壊死線維が散見されるが、その後の再生過程が壊死を完全には代償し得ず、進行性の経過をたどる。これに対して mdx マウスでは、生後15日目頃より群を成して壊死線維が現われ、そのほとんど全てが中心核線維として再生し、壊死を再生がほぼ完全に代償する。壊死線維が出現するまでの生後早期には、dy, mdx マウスともにその発育分化に遅れは認められず、両者ともいったんある程度まで筋線維が成熟したのちに壊死に陥ることがわかった。この壊死発現の成因を考えるうえで筋肉内血管の変化について検討する必要がある。特に mdx マウスでは、大きな群を成して筋線維が数十本の単位で一度に壊死に陥るのであるが、これが血管の閉塞等による虚血性の変化が関与しているか否かを確認せねばならない。今回、我々は、dy および mdx マウスの筋線維の壊死再生がはじまってくる生後15日目に重点を置き、その筋肉内毛細血管について形態学的定量的分析を行なった。

<対象・方法>

対象は、mdx マウスおよび体外受精法によって作出された dy マウス²⁾ の生後15日目のもの各4匹と、対照として C57BL/10ScSn マウス4匹である。

それぞれのマウスからヒラメ筋を採取し、1.5%グルタルアルデヒドで前固定ののち1.3%四酸化オスミウムで後固定した。エタノール脱水ののちエポキシ樹脂 (Epon 812) で包埋し、超薄切片作製後に酢酸鉛とウラニールで二重染色を施こして電顕観察 (H-600) を行なった。

最終倍率3,000倍の電顕写真を作製し、その写真中の筋線維数 (MF) とそれを取り囲む毛細血管数 (Cp) をかぞえ、筋線維当たりの毛細血管数 (Cp/MF) を算出した。さらに、壊死あるいは再生線維に接している毛細血管 (壊死部) と、非壊死線維に接している毛細血管 (非壊死部) とに分けて、それぞれの毛細血管の面積 (CA)、内腔の面積 (LA)、短径が $1 \mu m$ 以上の核をもつ内皮細胞1個の面積 (ENA) を semiautomatic image analyzer (Kontron) を用いて計測した。また、毛細血管を構成している内皮細胞が占めている部分の面積 (EA = CA - LA) および、EAのCAに対する面積比 (%E = EA/CA × 100%) を算出した。なお、今回対象とした毛細血管は CAが $60 \mu m^2$ 以下のものに限った。

* 国立精神神経センター神経研究所微細構造研究部

** 財実験動物中央研究所

<結 果>

(1) 電顕所見 (図1-6)

非壊死部では、dy, mdx マウスともに対照マ

ウスと同様の毛細血管がみられ、内皮細胞の腫大や内腔の閉塞といった所見はみられなかった

(図1, 2, 3)。壊死部では、過収縮線維や

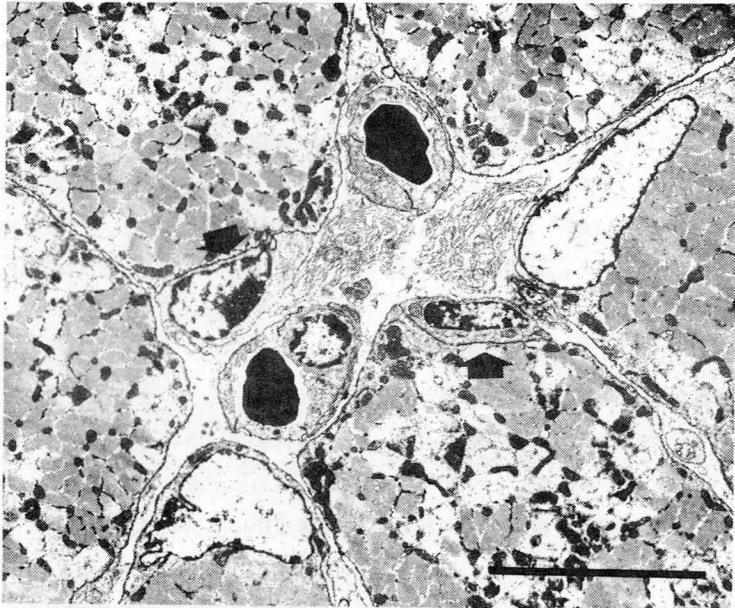


図1. 対照マウス、15日目
矢印：筋衛星細胞 bar = 10 μ m

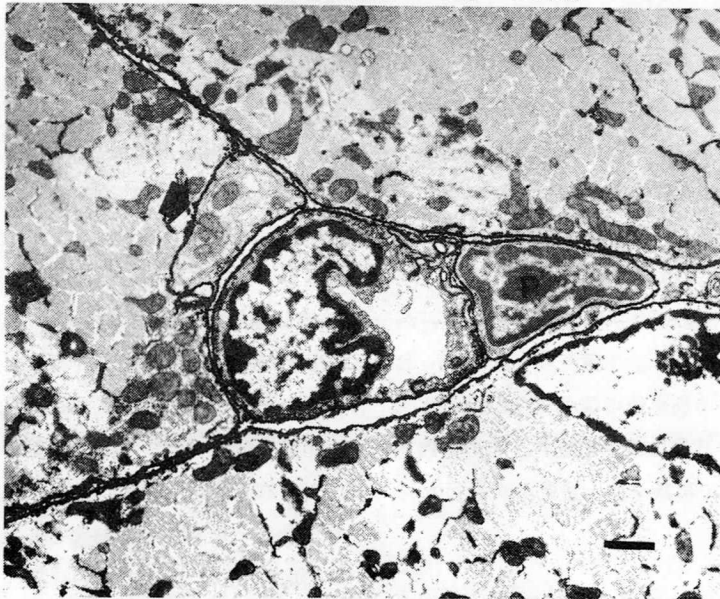


図2. mdx マウス、15日目、非壊死部
P : pericyte、矢印：筋衛星細胞
内腔の閉塞はみられない bar = 1 μ m

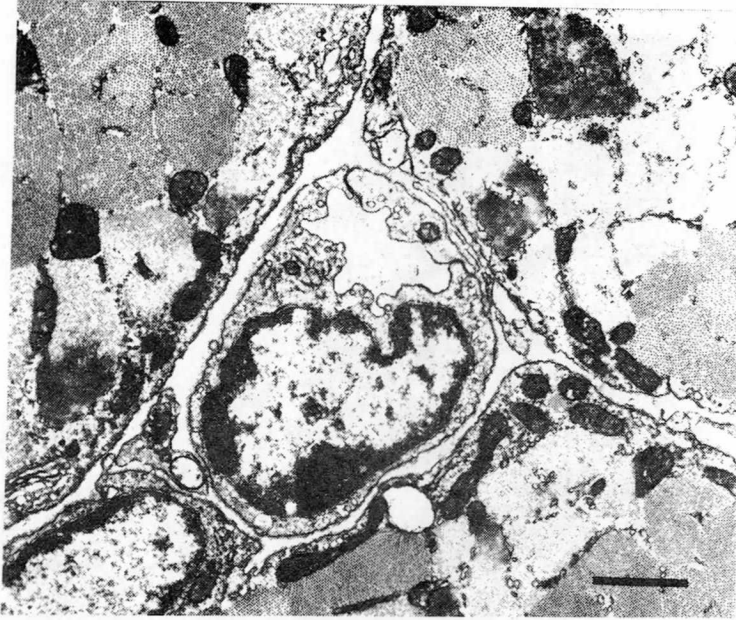


図 3. dy マウス、15日目、非壊死部
内皮細胞の腫大や基底膜の変化はみられない
bar = 1 μ m

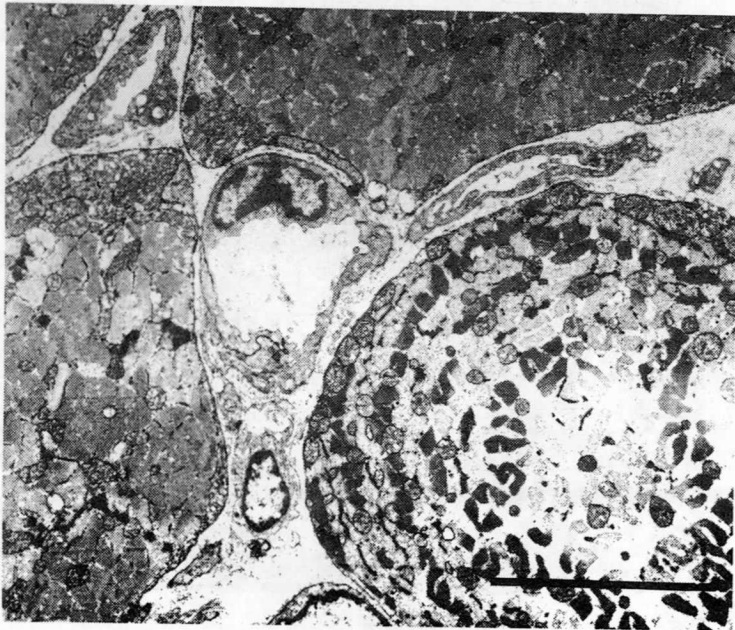


図 4. mdx マウス、15日目、壊死部
壊死線維に接する毛細血管の内腔はよく
開いている bar = 10 μ m

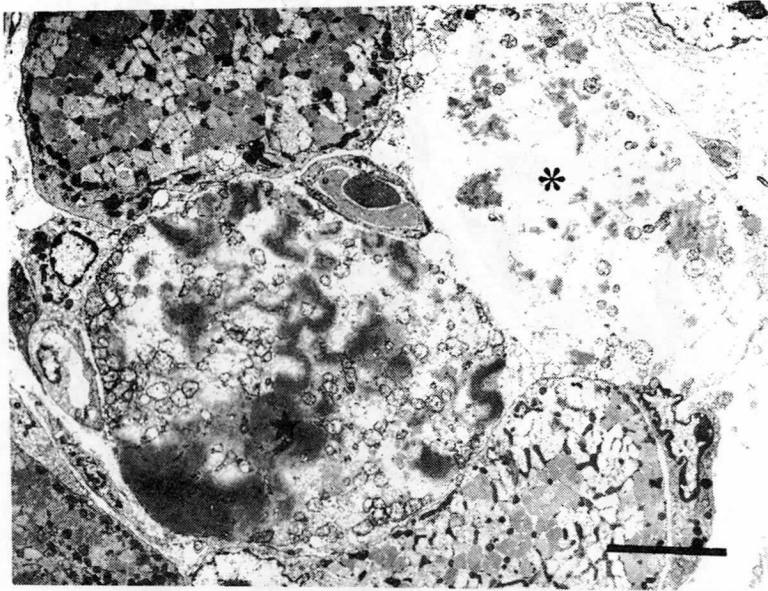


図 5. dy マウス、15 日目、壊死部
 星印：過収縮線維、*印：empty sarcolemmal tube
 壊死線維に接する毛細血管の内皮細胞の腫大はなく、基底膜
 の変化も認めない。 bar = 10 μ m

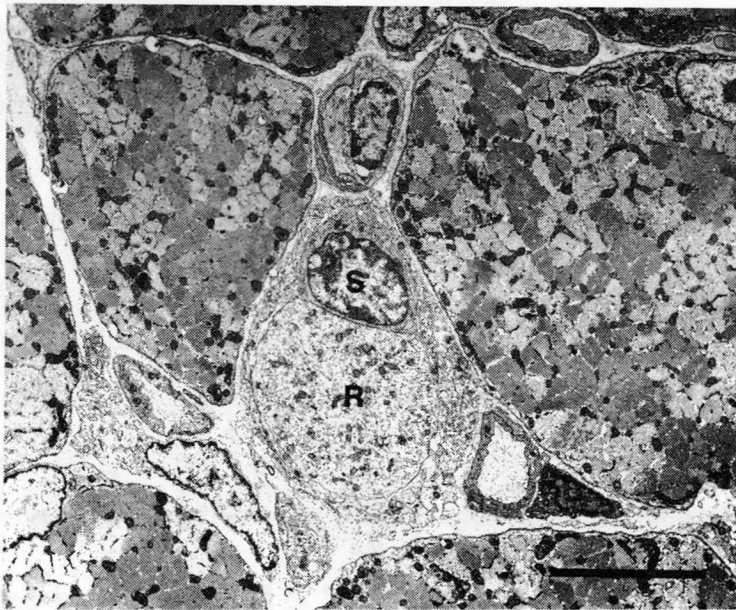


図 6. dy マウス、15 日目、壊死部
 S：筋衛星細胞、R：再生線維
 大型の活動化した筋衛星細胞と再生線維に接する毛細血管に
 閉塞はみられない。 bar = 10 μ m

いわゆる empty sarcolemmal tube と いった壊死・変性に陥った筋線維がみられたが、これらの線維を取り囲む毛細血管では、dy, mdx マウスともに、内皮細胞の顕著な腫大や内腔の閉塞はみられず、さらに毛細血管の基底膜にも

特に変化は認めなかった(図4, 5)。また activate された筋衛星細胞をいくつか含む再生途上にある線維や、中心核線維に接する毛細血管でも、特に対照のそれとは形態的な差を見出し得なかった(図6)。

表1. 毛細血管の分布

QUANTITATIVE ANALYSIS OF CAPILLARY POPULATIONS IN MURINE DYSTROPHY

	number of MF	number of Cp	number of CpN	Cp/MF	CpN/Cp (%)
mdx (n=4)	555	499	149	0.92 ± 0.45	27.6 ± 5.5 *
dy (n=4)	1079	708	279	0.66 ± 0.33 ***	39.3 ± 5.6
control (n=5)	615	585	224	0.96 ± 0.07	37.7 ± 4.7

MF : muscle fibers
Cp : capillaries
CpN : capillaries with nuclei

mean ± SD
* : p<0.05
*** : p<0.005

(2) 毛細血管の分布(表1)

対照マウスでは、MF 615本に対してCpは585本で、Cp/MFは0.96±0.07と、ほぼ1本の筋線維に対して1本の毛細血管が対応していた。mdxマウスではMF 555本当たり499本の毛細血管があり、Cp/MFは0.92±0.45で、対照マウスとは特に統計学的有意差はみなかった。これに対して、dyマウスでは1,079本のMF当たり708本の毛細血管が分布しており、Cp/MFは0.66±0.33と、対照およびmdxマウスに比べて約2/3の値であった(P<0.005)。

(3) 内皮細胞の面積(図7, 8, 表2)

短径が1μm以上の核をもつ内皮細胞のみらるる毛細血管につき、その内皮細胞の面積を定

量的に分析した。

対照マウスのENAは、13.2±3.7μm²であった。非壊死部におけるmdxマウスのENAは11.1±3.0μm²で、対照に比して小さかった(P<0.01)。dyマウスのENAは、11.9±3.9μm²で、mdxマウスとは差をみなかったが、対照と比べると小さかった(P<0.05)。

%Eについてみると、対照は74.8±13.0%で、dyマウスは77.1±16.9%と若干大きい傾向があるが有意差はなかった。mdxマウスの%Eは、67.4±13.3%と対照に比して小さかった(P<0.001)。

壊死部と非壊死部での毛細血管の内皮細胞を比較してみると、mdxマウスでは、%Eは壊死部・非壊死部間で差はないものの、ENAで

SCHEMA OF CAPILLARIES
IN DYSTROPHIC MICE

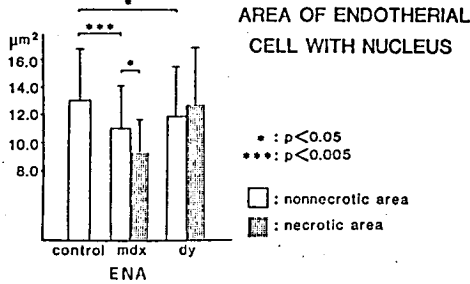


図7. 内皮細胞の面積 (ENA)

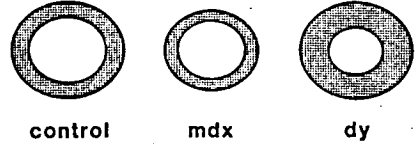


図9. 対照, mdx, dy マウスの毛細血管の模式図

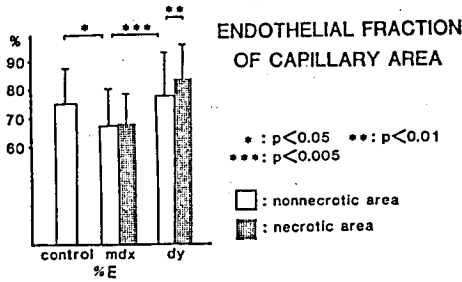


図8. 内皮細胞の占める部分の面積比 (%E)

は壊死部で $9.5 \pm 1.7 \mu\text{m}^2$ と非壊死部に比して有意に低値をとっており ($P < 0.05$)、mdx マウスでは、内皮細胞はかえって小さい傾向にあることが示唆された。dy マウスでは、壊死部での内皮細胞は非壊死部のそれに比してやや大きい傾向があり、特に %E は壊死部で $83.5 \pm 12.9\%$ と有意に高値であった ($P < 0.01$)。

<考 察>

Duchenne 型筋ジストロフィーの極めて早期の生検筋では、しばしば数本~10数本の壊

表2. 内皮細胞の面積の定量的分析

AREA OF ENDOTHELIAL CELLS OF
CAPILLARIES IN MURINE DYSTROPHY

	non-necrotic area			necrotic area		
	number of examined capillaries	%E(%)	ENA(μm²)	number of examined capillaries	%E(%)	ENA(μm²)
control (n=5)	180	74.8 ± 13.0	13.2 ± 3.7	-	-	-
mdx (n=4)	95	67.4 ± 13.3	11.1 ± 3.0	13	68.4 ± 9.8 ^{n.s.}	9.5 ± 1.7*
dy (n=4)	95	77.1 ± 16.9	11.9 ± 3.9	130	83.5 ± 12.9 ^{**}	12.8 ± 4.0 ^{n.s.}

%E : endothelial fraction of capillaries area (%)
ENA : area of endothelial cells

* : P < 0.05
** : P < 0.01
*** : P < 0.005
n.s. : no significance

死線維あるいは再生線維が小群を成しているのがみられる。筋ジストロフィーでは、筋肉内血管に変化がありそれによって壊死が引き起こされるのではないかと考えられ、いわゆる血管説が唱えられた。血管の変化をきたして筋肉の変化をもたらす疾患としては、代表的なものに多発性筋炎が知られている。多発性筋炎では、病初期より筋肉内毛細血管の変化がみられ、内皮細胞の腫大およびそれに伴う内腔の閉塞、基底膜の肥厚、内皮細胞内の管状構造物(undulating tubules)などがみられる^{5),6),7)}しばしば筋線維は数10本~筋束単位で虚血から壊死に陥いる。mdx マウスでは、生後15-20日目頃より壊死に陥いるのであるが、^{1),3),4)}何故このような大きな群を成して壊死が発現してくるのかを考えるにあたって血管の検討を避けることはできない。

今回の電顕観察では、毛細血管の内腔を閉塞するほどの顕著な内皮細胞の腫大、さらには基底膜の変化や内皮細胞内の異常構造物等は、mdx, dy マウスともに認めなかった。内皮細胞の面積の定量的分析の結果からは、mdx マウスでは、%E、ENAともに対照に比して小さく、すなわち内腔は相対的に広がっている。これに対してdy マウスでは%Eが大きい傾向にあるがENAでは対照と差を認めなかった。これらの結果を模式図で描くと図7のようになる。このような定量的分析上の変化は、実際の電顕観察上の所見と合わせて考えてみても、壊死を引き起こしてくるほどの大きな変化ではない。特にmdx マウスでは、群を成して発現してくる壊死をこれらの微細な血管の変化からは説明することはできず、逆に内腔がよく開いていることを示唆することから、この大きな群を成す壊死は、内皮細胞の腫大による血管の閉塞

といったもので引き起こされるのではないといえる。この定量的分析上の内皮細胞の面積の微細な変化がみられた原因としては、固定の条件、結合織の増生、筋線維の壊死再生に伴う二次的な変化を考慮に入れる必要はある。

血管分布に関しては、対照マウスでは筋線維と毛細血管がほぼ1:1の割合で分布しており、mdx マウスでも同様にほぼ1:1の分布をしていた。しかしながらdy マウスでは、対照に比して血管数が約2/3と少なくなっていた。血管数の減少が壊死の二次的な変化のみによるとするならば、mdx マウスにおいても減少して然るべきであるが、しかしながら今回の結果ではmdx では減少していない。著者らはmdx マウスとdy マウスでは、壊死にひきつづく再生過程に差があり、すなわちmdx マウスではほぼ完全な再生がみられるのに対してdy マウスでは不完全であることを述べた¹⁾。dy マウスで血管数が少ないことは、局所での血液供給が少ないことを意味し、これは、再生が不良であることの一因となっている可能性があると考えられる。今回の検討は生後15日目を的を絞ったが、このような点をさらに明確にするためには、もっと早期および30日目ないしそれ以後のマウスについても検討をする必要があると思われる。

<結 語>

- (1) mdx マウス：血管数/筋線維数比の値に差はみられず、内皮細胞腫大傾向はなく、また血管閉塞の所見もなかった。
- (2) dy マウス：血管数/筋線維数比は対照に比し小さく、内皮細胞腫大傾向はみられず、さらに血管閉塞の所見はなかった。
- (3) 上記血管変化は、壊死発現を説明できるほ

ど強いものではなかった。

- (4) 微細な血管変化は、固定の条件、結合織増生、筋線維の壊死再生に伴う二次的変化の可能性が強いと考えられた。

<文 献>

- 1) 埜中征哉, 禹 満, 横山峯介, 江崎孝三郎 (1986) : 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, 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60年度研究報告書, 11-31.
- 2) 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.
- 3) 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.
- 4) 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.
- 5) Banker, B.Q. (1975) : Dermatomyositis of childhood, ultrastructural alterations of muscle and intramuscular blood vessels. *J. Neuropathol. Exp. Neurol.* 34, 46-75.
- 6) Carpenter, S., Karpati, G., Rothmsn, S. and Watters, G (1976) : The childhood type of dermatomyositis. *Neurology*, 26, 952-962.
- 7) Jerusalem, F., Rakusa, M., Engel, A.G. and MacDonald, R.D. (1974) : Morphometric analysis of skeletal muscle capillary ultrastructure in inflammatory myopathies. *J. Neurol. Sci.*, 23, 391-402.

キメラマウス (C57BL/10-*mdx* ↔ C3H/He) による筋ジストロフィー症の研究

勝木元也^{1),2)}

研究協力者 横山 峯介²⁾

日下部 守昭³⁾

はじめに

キメラマウスは、1個体内に遺伝的に起源のことなる細胞を合わせ持っており、この特性を利用することによって、発生ならびに分化の過程における遺伝子発現の機構や細胞間の相互作用等を調べることができる。

我々は、このキメラマウスを用いて、筋ジストロフィー症の病因を解析するための検討を進めてきた。本研究ではさらに、筋ジストロフィー症のモデル動物として使用されているC57BL/10-*mdx* (以下B10-*mdx*)マウスと正常なC3H/Heマウスとの間でキメラ個体の作出を行ない、さらに骨格筋を免疫組織化学的な手法で観察した。

方 法

1) キメラマウスの作出

B10-*mdx*とC3H/Heの成熟メスマウスに、5IUのPMSG(Pregnant mare serum gonadotropin)とhCG(human chorionic gonadotropin)を48時間間隔で腹腔内注射し、それぞれ同系のオスと交配させた。交尾の確認されたメスは、妊娠3日目(陰栓確認日を妊娠第1日とする)に殺処分し、卵管と子宮を少量の培養液で灌流して胚を回収した。形態的に正常な8細胞期胚を0.5%プロナーゼで処理して透明帯を除去した後、新鮮培養液で

3回洗浄し、PHA(Phytohemagglutinin-P)を含む培養液内で両系統の胚を1個づつ接着・集合させた。さらに20~24時間培養して、単一の集合胚に発生した胚を、精管結紮オスとの不妊交配で偽妊娠を誘起した3日目のレシビエントメスの子宮内に移植した。得られた産仔は、成体へと育成し、被毛色を指標としてキメラ個体であるか否かを判定した。

2) 筋の免疫組織学的観察

被毛からキメラと判定された個体は、エーテルで麻酔し、開腹ならびに開胸して心臓からの灌流によって固定を行なった。固定液としては、95%エタノール・1%酢酸を冷やして用いた。灌流固定後に骨格筋を切り出し、さらに新鮮な冷固定液に約1時間保持した後、95%エタノールならびに100%エタノールで脱水した。これをポリエステルワックスに包埋後、4 μ mの連続切片とした。さらに脱ワックスの後、C3H/He組織に特異的に反応する抗体で処理し、蛍光顕微鏡下で観察した。

結果および考察

1) キメラマウスの作出

B10-*mdx*とC3H/HeのメスマウスにPMSGとhCGを投与した後、それぞれ同系のオスと1:1同居させたさいの交配成績は、16.7%

- 1) 東海大学医学部
- 2) 財団法人実験動物中央研究所
- 3) 名古屋大学医学部

(2/12)と100%(10/10)であった。交尾したB10-*mdx* 2匹からは合計21個、C3H/He 10匹からは165個の8細胞期胚が回収された。したがって、21ペアのB10-*mdx*とC3H/Heの接着胚を作ることができた。これらは培養により16個(76.2%)が単一集合胚へと発生し、レシピエントメスの子宮内への移植によって9匹(56.3%)の産仔が得られた(表1)。離乳された9匹の個体は、その被毛

からキメラタイプ3匹(1♀:2♂)(図1)、B10-*mdx*タイプ1匹(1♀:0♂)ならびにC3H/Heタイプ5匹(4♀:1♂)に分類され

表1. B10-*mdx* ↔ C3H/He キメラマウスの作出成績

	集合胚数	移植胚数	産仔数
B10- <i>mdx</i>	21	16	9
↔ C3H/He			(5♀:4♂)

表2. 得られた個体の外見

動物 No.	性別	被毛の割合(%)		キメラの判定
		黒	茶	
1	♀	30	70	キメラタイプ
2	♀	0	100	C3Hタイプ
3	♀	0	100	C3Hタイプ
4	♀	0	100	C3Hタイプ
5	♀	0	100	C3Hタイプ
6	♂	100	0	B10- <i>mdx</i> タイプ
7	♂	90	10	キメラタイプ
8	♂	20	80	キメラタイプ
9	♂	0	100	C3Hタイプ

た(表2)。キメラタイプの個体は全体の1/3にすぎず、C3H/He単独のタイプのものが半数以上であった。集合法によってキメラを作出する場合、胚発生速度の速い系統の細胞が内部細胞塊の形成に優位に働くことが知られており、その結果として生まれてくる仔の形質も発生速度の速い胚の系統の方に偏る傾向があると考えられている。本実験の組み合わせでも、C3H/He胚の方がB10-*mdx*胚よりも発生速度が速いことから、C3H/Heタイプに偏ったことが窺われた。今後より効率よくキメラ個体を得るためには、使用系統の排卵や受精の時期、胚の接着・集合の時期等を調節するなどの検討も必要と考えられる。

2) 筋の免疫組織学的観察

C3H/Heの組織に特異的に反応する抗体で処理したキメラタイプの個体、№1(♀)の骨格筋の蛍光染色像を図2に示した。抗体に染り、明るくグリーンにみえる部分がC3H/He由来の組織、染まらずに暗くみえる部分がB10-*mdx*由来の組織を示している。両者の細胞はかなり複雑にモザイク状に混っており、1本の筋線維でもB10-*mdx*とC3H/He両者の細胞で構成されているものも認められた。これらの筋線維には細化等の現象もみられず、安定したかたちが保たれていることが知られた。

また、被毛では№1(♀)と同じような形態を示す№8(♂)の組織像は、図2の№1(♀)とほぼ同様

であることが知られた。

B10-*mdx* 由来の黒色の被毛を90%の値で持つ№7(♂)の組織像を図3に示した。№1ならびに№8の個体と同様に、B10-*mdx* と C3H/He 両者の細胞は複雑に混り合っている。しかし、予想に反して、抗体に強く染まり、グリーンに見えるC3H/He由来の筋線維には、細化がみられ、変性の可能性が示唆された。このことは、B10-*mdx* 由来の筋線維が崩壊し、

中心核から新たに再生したC3H/He由来の筋線維の存在を考えれば説明できる。このことは、図3にみられるように中心核が抗体に染まったB10-*mdx* 由来の線維からも示唆される。しかしながら、B10-*mdx* でみられる壊死巣と、このC3H/He由来の細胞の存在とが一致するかどうかについては、現在HE染色との対応を進めており、決定的な結論を下すに至っていない。



図 1. 集合法によって作出された B10 -*mdx* ↔ C3H/He
キメラマウスの 1 匹 (No. 1 (♀))

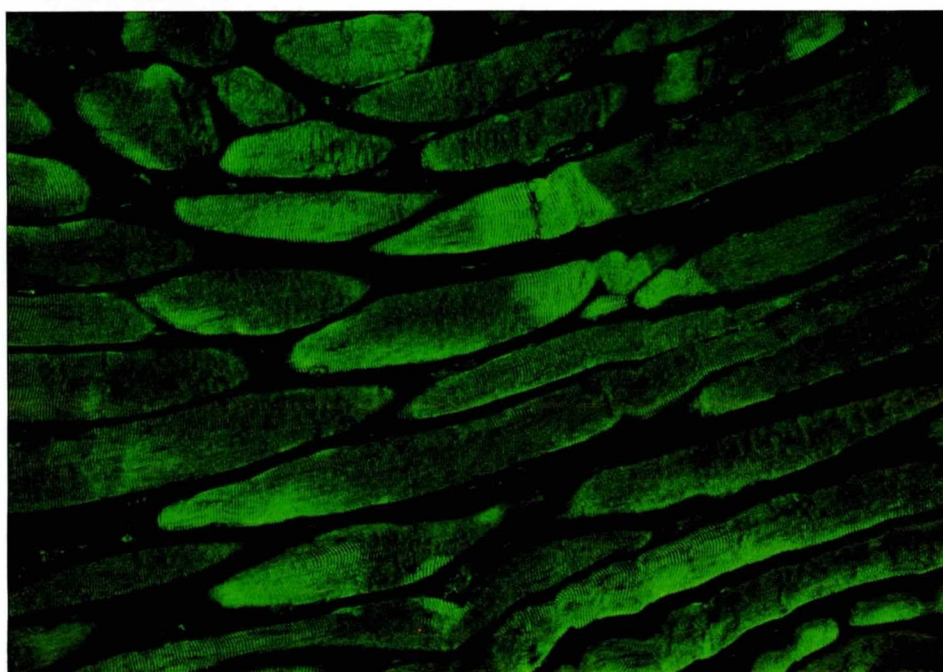
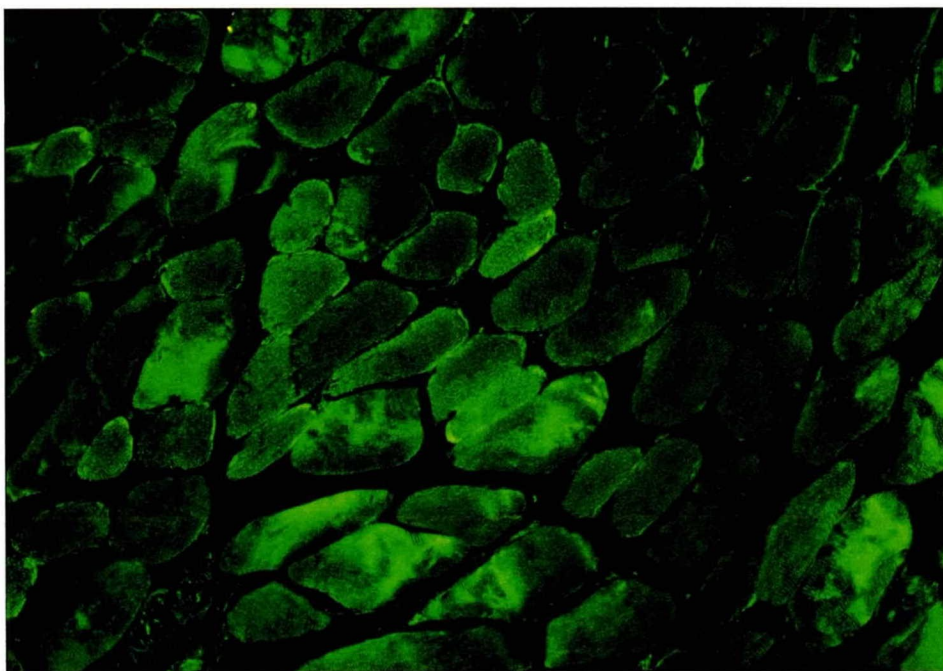


図2. キメラマウスNo.1(♀) 骨格筋の蛍光染色像
上：横断面、 下：縦断面

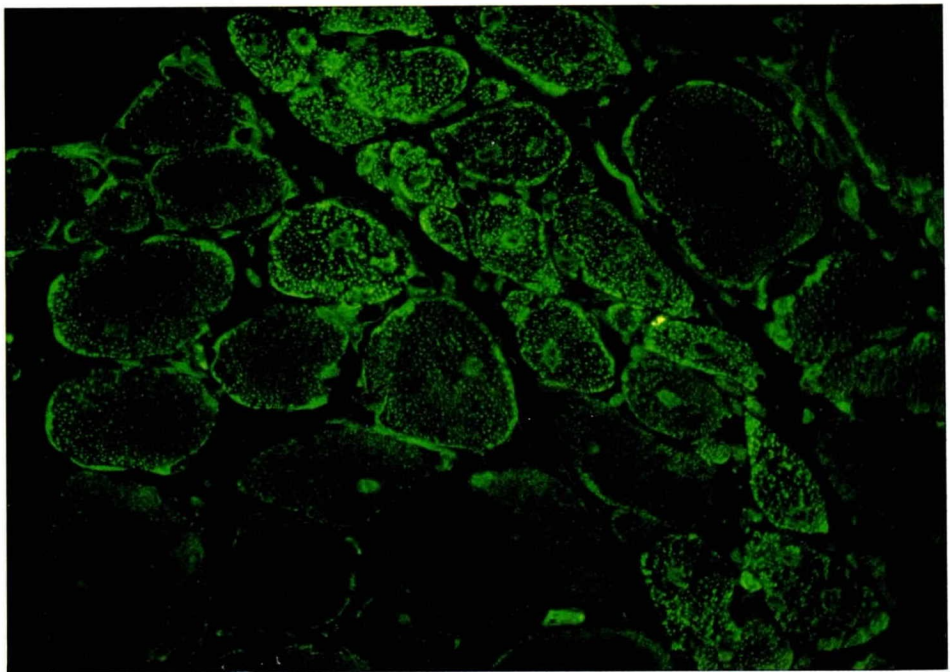
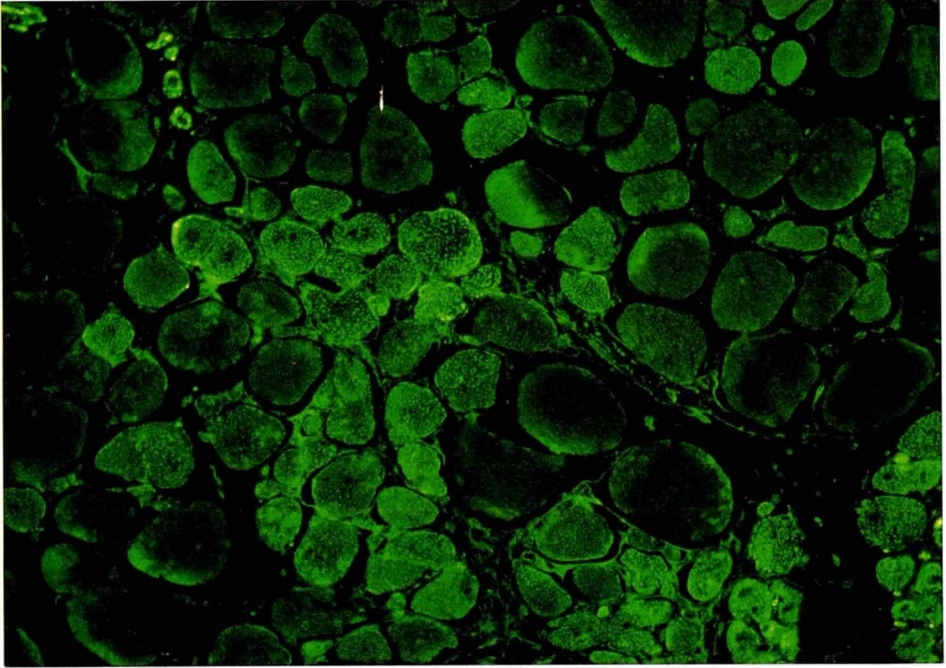


図3. キメラマウスNo.7(♂) 骨格筋の蛍光染色像
上：弱拡、 下：強拡

体外受精による筋ジストロフィー (C57BL/6-*dy/dy*) マウス受精卵の作出と凍結保存

横山 峯 介¹⁾

研究協力者 小島 博 子¹⁾

はじめに

ヒトの進行性筋ジストロフィー症のモデル動物として使用されるC57BL/6-*dy/dy*マウスは、常染色体劣性遺伝のホモ型で発症する。*dy*ホモマウスは、生後2~3週齢で発症しはじめるが、その後の成長が不良で性成熟時に達しても体重は15g前後にしかならず、正常系の半分位である。また、メス・オスとも交尾が不能なために、通常とられる交配という方法ではその仔を得ることはできない。このため、*dy*ホモマウスを得るためには、*dy*遺伝子をヘテロで持つメスとオスを交配するのが従来とられている方法である。

筆者らは、これまで繁殖不能なC57BL/6-*dy/dy*マウスの卵子と精子を使って体外受精を行ない、得られた受精卵を移植することによって産仔へと発生させることが可能なことを報告した¹⁾。今年度は、さらに筋ジストロフィー*dy*マウスの生産ならびに系統保存への応用を目的に、体外受精による受精卵の作出と、胚の凍結保存を検討したので報告する。

材料および方法

動物と飼育条件

体外受精には、筋ジストロフィー症のC57BL/6-*dy/dy*マウスとその正常系であるC57BL/6マウスを使用した。また、胚移植を行なうためのレシピエントと、帝王切開した仔を

里子するための里親には、Jcl:MCH(ICR)マウスを用いた。

動物の飼育条件は、6時点灯、20時消灯の14時間明:10時間暗、温度 $24 \pm 2^\circ\text{C}$ 、湿度60~70%とした。飼料は固型飼料(CA-1;日本クレア)ならびに飲水は水道水を不断給与した。ケージはポリプロピレン製で、床敷はカンナクズとした。

メディウム

精子懸濁ならびに体外受精から前核期までの培養には、TYHメディウム²⁾を使用した。また、前核期以降の培養にはmodified Whitten(MW)メディウム⁴⁾を、凍結保存の基準液としてはPBIメディウム⁵⁾を使用した。

体外受精と培養

体外受精は豊田ら^{2,3)}の方法に準じて行なった。卵子はメスに5IUのPMSG(Pregnant mare serum gonadotropin)とhCG(human chorionic gonadotropin)を48時間間隔で腹腔内注射し、排卵を誘起した。hCG注射後14~17時間にメスを殺処分して卵管を摘出し、メディウムを配したプラスチックシャーレ(35×10mm; Falcon)内のパラフィンオイル中に入れた。実体顕微鏡下で、解剖針を用いて卵管膨大部を切開し、卵丘細胞に包まれた卵の集塊を得、0.4mlの受精用TYHメディウム中に導入した。精子は十分に成熟(3ヶ月齢以上)したオスを殺処分し、精

1) 財実験動物中央研究所

巢上体尾部から採取した。これを0.4 mlのTYH メディウムに懸濁し、1時間インキュベーション(37°C, 5% CO₂)して受精能獲得を誘起した後、媒精に供した。媒精は卵子の入った0.4 mlのメディウムに、約10 μLの精子懸濁液を添加して行なった。体外受精時の最終精子濃度は100~150精子/μLと推定された。卵子は、媒精後約6時間に検査し、極体の放出と雌雄前核形成の有無をもって受精の判定を行なった。受精卵と判定したものは、MW メディウムに移し換え、20~24時間の培養(37°C, 5% CO₂・5% O₂・90% N₂)を行ない、2細胞期胚への発生を調べた。

胚の凍結保存

胚の凍結保存はWhittinghamら⁶⁾の方法に修正を加えた筆者らの手法⁷⁾により行なった。体外受精後の培養によって2細胞期に発生した胚は、PBI メディウムで洗浄し、凍結用メンクチューブ(1.8 ml;メンク, №363401)に20~30個の割合で移した。DMSOが最終濃度1Mになるように添加し、-7°Cまで冷却して植水(seeding)を行なった。その後の冷却は、-7~-5.0°C間を0.3°C/分、-50~-7.0°C間を0.5°C/分の速度で行なった。-7.0°Cまで冷却したサンプルは、液体窒素内(-196°C)に浸漬して一定期間保存した。融解は、凍結チューブを液体窒素内から取り出し、室温に静置する方法で行なった。この際の一7.0°Cから-1.0°Cまでの温度上昇速度は約10°C/分であった。完全に融解後、新鮮なPBI メディウムを加えてDMSOを希釈・除去した後、胚をMW メディウム内に回収し、形態的な観察を行なった。

胚の移植

形態的に正常と判定されたものは、短時間

(1~3時)の培養を行ない、精管結紮オスとの不妊交尾によって偽妊娠を誘起したDay 1のレシピエントメスの卵管内に筆者らの方法⁸⁾に従って移植した。移植胚数は、片側の卵管当り5~7個で、合計10~14個とした。妊娠が成立したレシピエントは、自然分娩させたが、Day 20になっても分娩しないものについては帝王切開を行ない、得られた仔を里子に出す方法をとった。

育成と交配実験

得られた仔は、その発育過程を観察するとともに、体外受精における卵子と精子の組み合わせがdy×dy群の個体については、筋ジストロフィーの発症時期を調べた。

また、体外受精の卵子と精子の組み合わせが、正常の+×dy群ならびに+×+群の個体の一部は、生後8週齢でそれぞれメス1:オス1で同居させ、その繁殖成績を調べた。

結果および考察

体外受精成績

C57BL/6-dy/dyならびにC57BL/6の体外受精成績と2細胞期胚への発生成績を表1に示した。体外受精における卵子と精子の組み合わせは、dy×dy群、正常の+×dy群ならびに+×+群である。すなわち、dy×dy群の受精卵の遺伝子型はdy/dyのホモ型、+×dyは+/dyのヘテロ型さらに+×+は+/+の正常となる。受精率は、dy×dy群では57.5%、+×dy群では63.3%と、+×+群の92.4%よりも有意に低い値であった。dyホモマウスの精子は、正常系に比べて運動性が低く、奇形精子の率も高かったことから、これが受精率に影響を及ぼしているものと推察された。受精卵と判定された卵の、培養20~24時間における

表1. 筋ジストロフィー (dy/dy) ならびに正常系 (+/+) の各マウスにおける体外受精成績と2細胞期胚への発生成績

卵子	精子	検査卵数	受精卵数 (%) *	2細胞期胚数 (%) **
dy	dy	931	535 (57.5)	522 (97.6)
+	dy	1258	796 (63.3)	780 (98.0)
+	+	806	745 (92.4)	742 (99.6)

* 検査卵数に対する割合

** 受精卵数に対する割合

表2. 体外受精に由来する2細胞期胚の凍結融解後の生存成績

卵子	精子	凍結胚数	回収胚数 (%) *	形態的正常胚数 (%) **
dy	dy	85	85 (100)	62 (72.9)
+	dy	210	209 (99.5)	182 (87.1)
+	+	120	117 (97.5)	116 (99.1)

* 凍結胚に対する割合

** 回収胚に対する割合

表3. 凍結融解した体外受精に由来する2細胞期胚の移植成績

卵子	精子	移植胚数	レシビエント 妊娠成立数/使用数	出生 仔数 (%) *	離乳 仔数 (%) **	♀ : ♂
dy	dy	62	6 / 6	19 (30.6)	18 (94.7)	9 : 9
+	dy	143	11 / 13	68 (47.6)	59 (86.8)	30 : 29
+	+	116	8 / 9	62 (53.4)	57 (91.9)	33 : 24

* 移植胚に対する割合

** 出生仔数に対する割合

2細胞期胚への発生率は、97.6~99.6%と高率で各群間に差は認められなかった。

凍結融解胚の生存成績

体外受精に由来する2細胞期胚の凍結融解後の生存成績を表2に示した。凍結融解した胚の

回収率は各群とも高く、97.5~100%であった。回収された胚に対する形態的正常胚の割合は、dy×dy群では72.9%、+×dy群では87.1%さらに+++群では99.1%という高い値であった。これらの値は、筆者らが体内受

精卵に由来する C57BL/6 の 8 細胞期胚で行なった成績⁷⁾と比較しても差のないものであった。

移植成績

凍結融解処理した体外受精に由来する 2 細胞期胚の移植成績を表 3 に示した。胚移植を行なったレシピエントの妊娠成立率は、dy × dy 群では 100% (6/6) であったが、+ × dy 群では 84.6% (11/13)、+ × + 群では 88.9% (8/9) であった。移植された胚に対する出生仔の割合は、dy × dy 群では 30.6% (19/62)、+ × dy 群では 47.6% (68/143) さらに + × + 群では 53.4% (62/116) という値であった。凍結融解処理をしていない 2 細胞期胚を移植した際の成績は、dy × dy 群では約 40%、+ × + 群では約 80% であるので、これに比較すると低い値であった。離乳まで至った仔の値は非常に高く、86.8 ~ 94.7% であった。なお、この値は帝王切開によって得た産仔を里子した成績を含めたものである。離乳された仔の性比には、とくに偏りは認められなかった。なお、得られた dy × dy 群の 18 匹は、全例とも生後約

2 週齢ごろから筋ジストロフィーを発症し、本来の dy ホモマウスと変わらないことが確認された。また、得られた仔には、体外受精ならびに凍結融解の処理によって生じたと考えられる異常はとくに観察されなかった。

繁殖成績

成体まで育成した + × dy 群と + × + 群の一部の個体の繁殖成績を表 4 に示した。+ × dy 群では交配させた 30 匹のうちの 28 匹 (93.3%)、+ × + 群では 15 匹のうちの 13 匹 (86.7%) で正常な分娩が確認された。その後の哺育等にはとくに異常はなく、離乳率も生産の場における成績と比較しても差のないものであった。また、+ × dy 群のメスとオスを交配して得られた離乳仔の中には、その 2.1% に筋ジストロフィーの発症が認められた。この値は、+ / dy のヘテロ個体を交配した際に dy / dy のホモが出現する理論値 2.5% に近いものであった。このことから、dy のミュータント遺伝子の保存も正確に行なわれていたことが示唆された。

表 4. 凍結融解胚由来の個体における繁殖成績

系 統	交配メス数	分娩数 (%)	総産仔数 (平均)	離乳仔数 (%)	♀ : ♂
C57BL/6- + / dy pe ICR	30	28 (93.3)	172 (6.1)	143 (83.1)	81 : 62
C57BL/6 pe ICR	15	13 (86.7)	89 (6.8)	67 (75.3)	35 : 32

以上の結果から、筋ジストロフィーの dy マウスのような繁殖障害を呈する系統でも、正常な卵子と精子を得ることができれば、体外受精によって受精卵を作出し、凍結保存を行なって系統保存もできることが明らかとなった。とくに、体外受精では、精子の有効利用が可能であるので、1 匹のオスから得た精子を用いて 1 回

に数 100 個の受精卵を作出することも容易である。このことは、特殊なミュータント個体を量産したり、系統を保存しておく際には非常に有効な方法になり得ると考えられる。

文 献

1) 江崎孝三郎、横山峯介 : 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P119-122, 1985.
- 2) 豊田 裕, 横山峯介, 星冬四郎 : マウス卵子の体外受精に関する研究 I. 精巢上体精子による受精成績. 家畜繁殖誌, 16, 147-151, 1971.
- 3) 豊田 裕, 横山峯介, 星冬四郎 : マウス卵子の体外受精に関する研究 II. 精子侵入時期に及ぼす精子体外培養の効果. 家畜繁殖誌, 16, 152-157, 1971.
- 4) Whitten, W.K. : Nutrient requirements for the culture of preimplantation embryo *in vitro*. Advan. Biosei., 6, 129-139, 1971.
- 5) Whittingham, D.G. : Embryo banks in the future of developmental genetics. Genetics, Suppl. 78. 395-402, 1974.
- 6) Whittingham, D.G., Leibo, S.P. and Mazur, P. : Survival of mouse embryos frozen to -196°C and -269°C . Science, 178. 411-414, 1972.
- 7) Yokoyama, M., Wakasugi, N. and Nomura, T. : An attempt to store inbred mouse strains. Frozen storage of Laboratory Animals, 113-117. Gustav Fischer Verlag. Stuttgart, 1981.
- 8) 勝木元也, 横山峯介 : 哺乳類(マウス)胚を用いた発生学実験法. 243-266. 実験生物学講座(金谷晴夫, 山上健次郎編), 丸善, 東京, 1985.

ミエリンWolfgramタンパクのcDNAクローニング

高 松 研

2',3'-cyclic nucleotide 3'-phosphodiesterase(CNP)は、2',3'-cyclic nucleotide を3'の位置で加水分解するという特異な活性を持った酵素であるが、神経系とくに中枢神経系の髄鞘組織(ミエリン)に局在することが知られている。¹⁾しかし、少量ではあるが、広く生体内の細胞膜上に分布していることも知られており、その生理的意義が検討されている。本酵素に対する抗体を用いたイムノプロットにより、CNPは中枢神経系のミエリンにおいてはWolfgram protein(WP) Ia及びIbに相当することが示唆されている。²⁾そこで、Wolfgram proteinの単離及び構造解析を行い、WPに対応したcDNAクローンの解析を行うことによって、CNPとWP Ia及びWP Ibとの異同を明らかにするとともに既に明らかとなっているミエリンタンパク、BP、PCPとを合せたミエリン形成過程における遺伝子の発現調節機構を明らかにすることを目的としている。

実験方法

1. ミエリン分画の調整

ウシ脳白質及びマウス(BALB/c AuCrj)全脳よりWhittakerら³⁾の方法に準じて調整した。脳組織を10倍量の0.8M Sucroseでホモゲナイズし、ホモジネートに0.32M Sucroseを重ねして22500rpm(Beckman SW28Ti)、60分遠心した。中間層を0.32M SucroseにSuspendし、0.72M Sucrose

に重層して同様に遠心し、中間層にくるミエリン分画を得た。中間層を脱イオン水で3回洗い(10000rpm、15分)、ミエリン標品とした。

2. SDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動(SDS-PAGE)は、Laemmliの方法⁴⁾に準じ、10~20% linear gradient平板ゲルを用いた。サンプルは、6% SDS、5% β -mercaptoethanolに溶解後、100°C、15分処理した。

3. イムノプロットイング

SDS-PAGEよりニトロセルロース膜へのタンパクの転写は、セミドライ方式で行った。陽極側に0.3M Tris-HCl、20%メタノール、pH 10.4に浸したろ紙2枚と25mM Tris-HCl、20%メタノール、pH 10.4に浸したろ紙2枚を重ね、その上にニトロセルロース膜、ゲルを重ねた。陰極側には、25mM Tris-HCl、40mM 6-amino⁻ⁿ hexanoic acid、20%メタノール、pH 9.4に浸したろ紙2枚を置き、0.8 mA/cm²の定電流で、室温、1時間、転写を行った。転写後ニトロセルロースフィルターを0.5%スキムミルク、50mM Tris-HCl、0.9%NaClで37°C、1時間インキュベートした後、抗体と反応させた。染色は、HRP-conjugated anti rat IgG、Galactosidase-conjugated anti rabbit IgG及びGalactosidase conjugated anti mouse IgGを用い

慶応大学医学部生理学教室

た間接法で行った。

4. SDS-PAGEゲルよりタンパクの回収

SDS-PAGE後ゲルをクマジーブリリアントブル(CBB)にて染色し、目的のタンパクバンドを切り出した。ゲルをホモゲナイズ後、約20倍量の70% Formic Acidで4℃、3時間、3回抽出を繰り返した。抽出液を濃縮後、Bio Gel P-10にてCBB及び遊離SDSを除去した。タンパク分画を濃縮後、逆相分配カラム(Toyosoda ODS-120T, 溶出液0.1% TFA、10-90%アセトニトリル)にかけ単一ピークを得た。

5. アミノ酸組成分析

6N HCl(定沸点塩酸)中で、減圧下、120℃、20時間、加水分解を行った。アミノ酸分析にはBeckman Amino acid analyzer system 7300を用いた。

6. 限定分解

ブロムシアン分解は、サンプルを70% Formic acidに溶解後、推定Met残基数の250~300倍のブロムシアンを添加し、25℃、14時間反応を行った。反応後、直ちに減圧乾固した。

V-8プロテアーゼによる分解は、サンプルを50mM Ammonium Acetate pH 4.0に溶解後、モル比50:1のV-8 proteaseと37℃、18時間反応させた。反応後、直ちに減圧乾固した。

7. N末端アミノ酸配列

サンプルを100% TFAに溶解し、気相式プロテインシーケンサー(Applied Bio-

systems Model 470A)にかけ、Edmann分解を行った。生成するPTHアミノ酸は、PTHアミノ酸分析機(Applied Biosystems PTH analyzer)にて分析した。

8. cDNAバンクの作成

生後18日目Balb/C An Crjマウス脳より、グアニジン・セシウム法でRNAを抽出した。脳組織を10倍量の6M GTC, 5mM Sodium Citrate, 0.5% Sodium Sarcosyl, 0.1 M β -mercapto ethanolでホモゲナイズし、ホモジネートを5.7M CsCl、100mM EDTAに重層して、22500rpm、25℃、14時間遠心した。沈査をクロロホルム・ブタノールで洗浄した後、エタノール沈澱しRNAを得た。RNAをOligo dTカラムにかけpoly(A)RNAを精製した。cDNAは、Gubbler & Hoffmanの方法⁵⁾に従い作成した。T₄ DNA polymeraseでcDNAをcohesive endとし、Eco RI linkerによって λ gt 11のEco RI siteに組み込んだ。 λ gt 11 DNAをin vitro packagingによりファージとし、E. coli Y1088に感染させたcDNAバンクを作製した。

9. cDNAバンクのイムノスクリーニング

λ gt 11により産生される β -galactosidaseとの融合タンパクを、抗CNPモノクローン抗体及びポリクローン抗体を用いてスクリーニングした。

IPTGにて融合タンパクの産生を誘導し、ブランク内に産生される融合タンパクをニトロセルロース膜に転写した。ニトロセルロース膜に転写されたタンパクは、イムノプロットの場合

合と同様に HRP conjugated antirat IgG 及び β -galactosidase conjugated anti rabbit IgG を用いた間接法により染色した。

結果及び考察

CNP は、広く生体膜上に分布するがとくに中枢神経系のミエリンに高濃度に分布することが知られている。¹⁾ 一方、CNP の生理的役割については、特異な酵素活性を持つことから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。また、CNP の構造と活性の関連を追求する目的で精製が試みられているが、酵素活性を保持した完全な形での精製は行われていない現状である。当研究室の Suda ら⁶⁾ は、ウシ脳ミエリン分画より Ammonium acetate, Triton x-100 により CNP 活性を可溶化し、phenyl sepharose CL4B, CM Sepharose CL4B 等で精製を行ない、比活性で約 200 倍の部分精製標品を得、分子量約 50 kd のミエリンタンパクが CNP であることを示した。その後 Kohsaka ら²⁾ は、この部分精製標品をウサギに免疫し、CNP 活性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。この抗体を用いたイムノプロットで、ウシ脳ミエリン分画のタンパクを検索したところ、分子量 47 kd と 45 kd に相当する 2 つのタンパクが抗体と反応することを見出した。これら 2 つのタンパクは、ミエリン分画の構成タンパクの内、Wolfgram protein Ia 及び Ib (WP Ia, WP Ib) と呼ばれているものに相当していた。この抗体は、抗原が部分精製標品であること及びポリクローン抗体であることから、Fujishiro ら⁷⁾ は CNP に対するモノクローン抗体の作製を

試みた。作製されたモノクローン抗体 (TFK-1) も、CNP 活性を免疫沈降させるが活性には作用を及ぼさなかった。このモノクローン抗体を用いたイムノプロットでも、ポリクローン抗体の場合と同様に WP Ia 及び WP Ib に反応することが示された。また、ウシ末梢神経 (坐骨神経) ミエリン分画、ウシ網膜ホモジネートを用いたイムノプロットでは、TFK-1 は末梢神経ミエリンとは全く反応せず、網膜では分子量 30 kd の単一バンドと反応した。一方、抗 CNP ポリクローン抗体は、末梢神経ミエリンの分子量約 45 kd の 2 本のバンドと反応し、網膜では分子量約 30 kd のバンドと反応することから CNP は、中枢神経系、末梢神経系及び網膜の間でその構造に差異があることが明らかとなった。これら抗体の反応性は、免疫組織化学染色においても同様の結果であった。さらに以上の結果は、マウスを用いた実験でも同様であった。

そこで、WP Ia 及び WP Ib の構造解析を行ない CNP 活性と構造との関連、WP Ia 及び WP Ib の免疫学的類似性を明らかとするため、及びこれらタンパクの組織特異的発現機構を探る目的で、マウス脳ミエリン分画より WP Ia 及び WP Ib の単離を試みた。これらは、分子量、等電点とも近似していることから、両者を SDS-PAGE で分離後、ゲルより抽出精製を行った。70% Formic acid 抽出後、Bio gel P-10 かけ、CBB と遊離の SDS を除いた後、逆相クロマトグラフィーにかけると図 1 に示した如く、40~50% アセトニトリル付近に単一ピークとして溶出された。この分画を回収し、SDS-PAGE にてパターンを調べると図 2 に示した如く、WP Ia 及び WP Ib が単一標品として得られた。そこで、これらのアミ

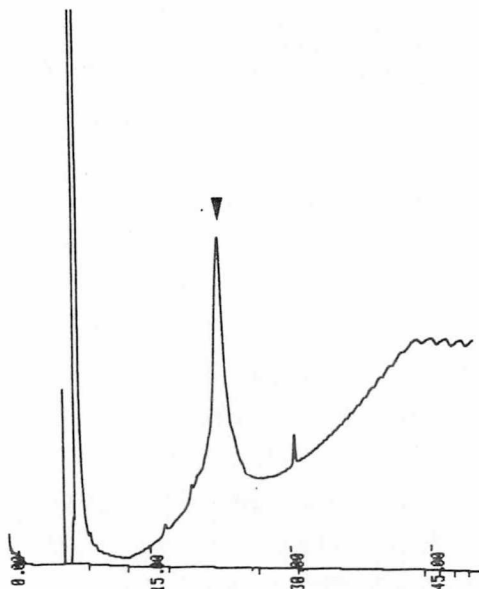


図1. WP Iaの逆相クロマトグラフィー
溶出パターン

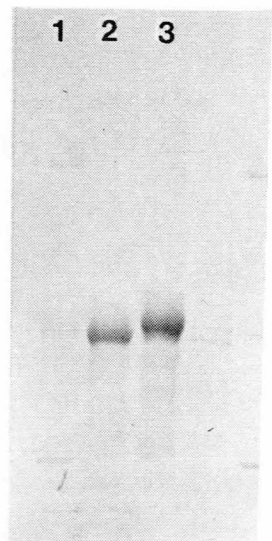


図2. 精製WP Ia及びWP IbのSDS-PAGE
lane 1. 分子量マーカー
93kd, 45kd, 21kd
lane 2. WP Ia
lane 3. WP Ib

表1. The amino acid composition of mouse

2',3'-cyclic nucleotide 3'-phosphohydrolase(CNP)

Amino acid	WP Ia		WP Ib	
Asx	9.0	0.7	8.5	0.4
Thr	4.6	0.3	4.9	0.2
Ser	10.1	0	6.9	0.6
Glx	12.7	0.1	12.6	0.5
Pro	4.0	0.2	5.4	0.4
Gly	15.7	1.3	10.1	1.0
Ala	7.3	0.6	7.7	1.0
Val	4.0	0.2	4.6	0.6
Met	0.7	0.1	1.4	0.2
Ile	2.7	0.1	3.0	0.6
Leu	9.1	0.7	10.6	0.3
Tyr	2.7	0.6	3.1	0.2
Phe	3.9	0.7	4.3	0.4
His	1.9	0.1	2.3	0.4
Lys	7.4	0.4	8.6	0.2
Arg	4.6	0	5.7	1.2

n=3 Data are expressed as moles of each amino acid per 100 mole.

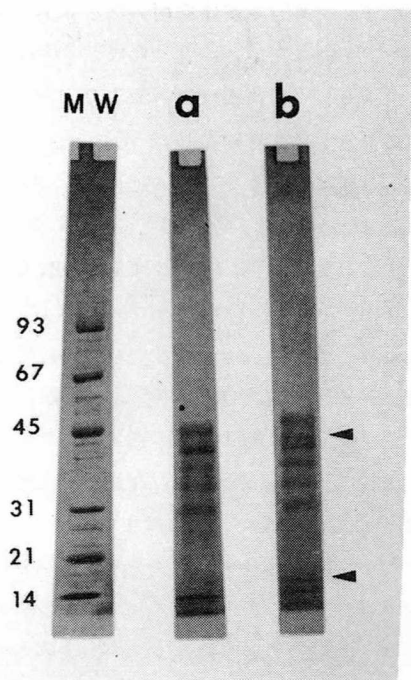


図3. WP Ia 及び WP Ib のブロムシアン分解パターン
lane a. WP Ia
lane b. WP Ib

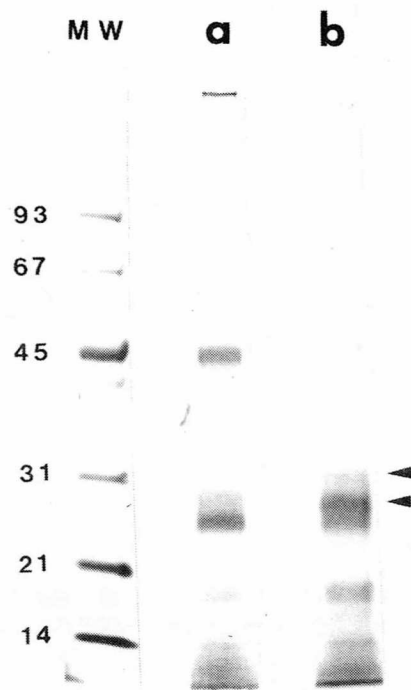


図4. WP Ia 及び WP Ib のV8-プロテアーゼ分解パターン
lane a. WP Ia
lane b. WP Ib

ノ酸組成分析を行ったところ、表1に示した如く、両者は極めてよく似ていた。なお、Met残基数はWP Ibが6~7、WP Iaが3~4と推定された。次に、WP Ia及びWP Ibのブロムシアン及びV-8 proteaseによる限定分解を行ない、ペプチドマップパターンを比較した。図3及び4に示した如く、両者はいずれの限定分解によっても極めて良く一致したペプチドマップパターンを示した。このことから、WP Ia及びWP Ibは、極く一部の構造が異なる基本的には同一のタンパクである可能性が示された。そこで次に両者のN末端アミノ酸配列を調べて見ると、WP Iaは Pro-Leu-Lys-Lys-

Ala-Lys-...であり、WP Ibは Asp-Arg-Gly-Lys-Ala-Lys-Ser-Ile-Leu-Pro-...であり、異っていた。次にWP Ia及びWP Ibをブロムシアン分解して得られるペプチドの単離を行った。ゲルろ過及び図5に示した逆相クロマトグラフィーの組み合わせで、分子量35 kdのピーク2と分子量37 kdのピーク3を分離した。各々のSDS-PAGEの泳動パターンを図6に示した。現在、これらペプチドフラグメントのN末端アミノ酸配列を検討中である。

既に得られているアミノ酸配列の中には、合成DNAプローブによるWP Ia及びWP Ibに対応したcDNAのスクリーニングに適した配列は

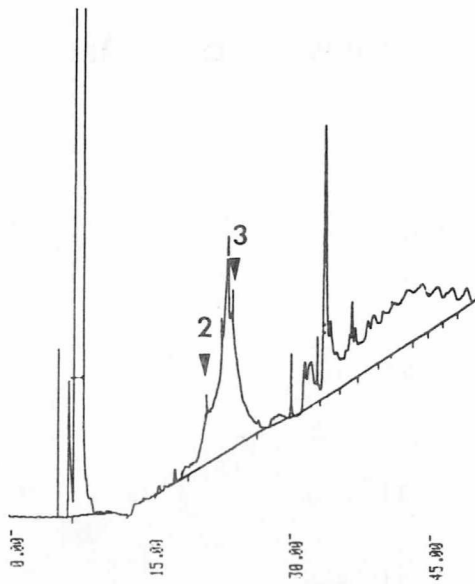


図5. WP Ia ブロムシアン分解ペプチドの逆相クロマトグラフィー溶出パターン
Peak 2. 35kd
Peak 3. 37kd

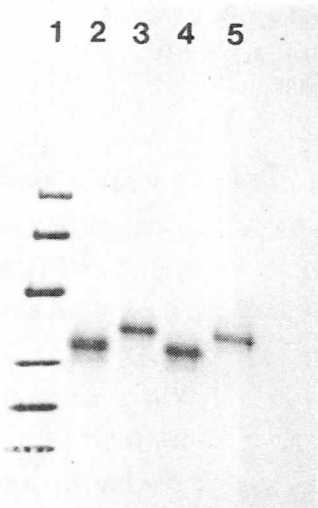


図6. 精製されたWP Ia 及びWP Ib ブロムシアン分解ペプチドのSDS-PAGE
lane 1. 分子量マーカー、93kd, 67kd, 45kd, 31kd, 21kd, 14kd
lane 2. WP Ia より得られた 35kd ペプチド
lane 3. WP Ia より得られた 37kd ペプチド
lane 4. WP Ib より得られた 35kd ペプチド
lane 5. WP Ib より得られた 37kd ペプチド

認められていない。そこで、ポリクローン抗体及びモノクローン抗体を用いたイムノスクリーニングを行った。ミエリン形成期(生後12日より20日)に当るマウス脳より、GTC/CsCl法によりRNAを抽出し、Oligo dT cellulose カラムで poly(A)RNA とし、Gubbler-Hoffman の方法⁵⁾に準じてcDNAを合成した。合成したDNAは、Eco RI linker を用いて λ gt 11 の Eco RI site に組み込み、E. coli Y.1088 に感染させたcDNAバンクを作成した。cDNAバンクの独立クローンは約 1×10^5 個であった。この λ gt ファージを E. coli Y1090 に感染させ IPTG で融合タンパクの産生を誘導し、プレート内に生じる融合タンパクをイムノスクリーニングした。約30万個の λ gt ファージをスクリーニングし、6個の陽性クローンを得た(図7)。

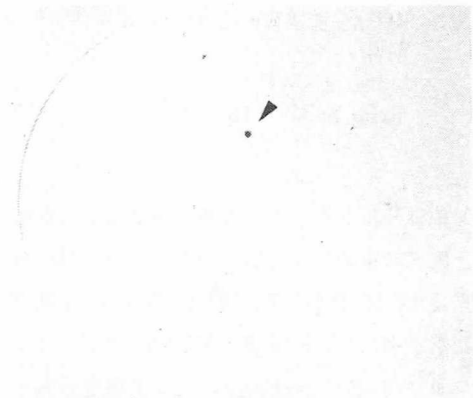


図7. 抗CNPポリクローン抗体によるイムノスクリーニング
矢印 陽性クローン

この内抗体と強く反応した2個のファージよりDNAを抽出し、insertを調べると図8に示した如く1.7 kbと2.3 kbであった。現在このDNAフラグメントの塩基配列の決定を行っている。

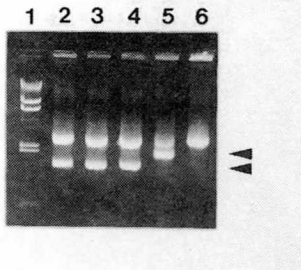


図8. イムノスクリーニング陽性クローンのインサート

lane 1. λ /Hind III
 lane 2~4. 陽性クローン 3-7
 lane 5. 陽性クローン 3-6
 lane 6. コントロール

文 献

- 1) Kurihara T. and Tsukada Y. (1967) : The regional and subcellular distribution of 2',3'-cyclic nucleotide 3'-phosphohydrolase in the central nervous system. *J. Neurochem.* 14, 1167-1174.
- 2) 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.* 41, 434-439.
- 3) Whittaker V.P. and Barker L.A., In R. Fried (Ed.), *Methods of Neurochemistry*, Vol.2, Marcel Dekker, new York, 1972, pp.1-52.
- 4) Laemmli U.K. (1970) : Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 227, 680-685.
- 5) Gubler U. and Hoffman B.J. (1983) : *Gene* 25, 263.
- 6) Suda H. and Tsukada Y. (1980) : Improved method for purification of 2',3'-cyclic nucleotide 3'-phosphodiesterase from bovine white matter. *J. Neurochem.* 34, 941-949.
- 7) Fujishiro M., Kohsaka S., Nagaike K. and Tsukada Y. (1986) : Production of monoclonal antibody to 2',3'-cyclic nucleotide 3'-phosphodiesterase from bovine cerebral white matter. *J. Neurochem.* 47, 191-195.

Shaking rat Kawasaki (SRK) の 臨床・神経病理学的研究

埜中征哉*, 江崎孝三郎**

研究協力者 相川久志*, 津金隆夫**

はじめに

本報告書の主題は江崎らにより実験動物中央研究所で新たに発見された先天異常ラット、Shaking rat Kawasaki (SRK) の病理学的検索結果に関するものである。

昨年の報告書では、SRK ラットは常染色体劣性遺伝様式を示すこと、末梢神経・筋肉系には発育・分化の遅れが見られる以外異常を認めないことが明らかにされた。¹⁾

本年度は SRK ラットの全身諸臓器並びに中枢神経を形態学的に検索し、主病変が中枢神経系における神経細胞の位置異常であることを確認したので報告する。

対象と方法

実験動物中央研究所にて発見・維持されている SRK 6 匹 (生後 20-24 日) 及び対照として、同腹の正常ラット 4 匹を検索した。体重測定のもの、両群のラットをネブタール麻酔下に 2.5% グルタル溶液で灌流固定した。脳・脊髄・肺・心臓・肝・脾臓・胸腺・腎臓など、全身諸臓器を摘出し、臓器重量を測定した。これら臓器は一部パラフィン包埋し、光顕的に観察し、残りをオスミウム酸で後固定したもの、走査型及び透過型電顕にて検索した。神経系のパラフィン切片は H & E, LFB, 及び Nissl 染色をほどこして検鏡した。

結 果

1. 臨床・行動学的観察

SRK ラットは体重減少、発毛の遅れに加え生後 10 日目より体幹振戦、四肢失調症状、後肢麻痺などの神経症状を呈し、生後 4 週間以内に死亡した。

2. 体重及び臓器別重量

表 1 に示す様に、生後 20-24 日の SRK ラットの体重は対照群のそれに比べて著しく軽く、正常群の約半分の値を呈した。

内臓諸器官も外見上、半分の大きさであったが、体重比を計算すると、表 2 の様に心臓、肺、腎は正常であり、肝、脾臓、胸腺が小さかった。

全脳重量は湿重量では幾分軽い傾向が見られたが、体重比になおすと正常群よりも大きな値を示し、異常を認めなかった。しかし、小脳は著明に小さく、湿重量・脳重比共に正常の約 5 分の 1 であった (表 3)。

3. 中枢神経系の肉眼的所見

最も顕著な異常は小脳に認められた。SRK ラットの小脳は著しく小さいばかりでなく、脳回の数も少なく、小脳虫部と片葉は多くの場合、痕跡程度にしか認められなかった。その為、四丘体や小脳・延髄槽は露呈していた (Fig. 1)。矢状断面で小脳はクローバー葉の形を呈し、皮質-白質境界部は不鮮明であった。

4. 肝、脾臓、胸腺の光顕的観察

筋肉と同様、発育・分化の遅れが肝、脾臓、

* 国立精神神経センター神経研究所

** (財) 実験動物中央研究所

表1. 体重(生後24日目)(g)

SRK (n=6)	Control (n=4)	p
15.05 ± 0.75	41.13 ± 2.87	p < 0.005

表2. 臓器重量(体重比)

	SRK (n=6)	Control (n=4)	p
Liver	35.02 ± 2.74	54.91 ± 4.22	p < 0.025
Kidney	18.93 ± 3.74	19.48 ± 0.80	(-)
Heart	8.23 ± 0.19	7.69 ± 0.44	(-)
Lung	50.85 ± 0.97	30.31 ± 4.78	(-)
Spleen	1.68 ± 0.29	3.95 ± 0.28	p < 0.01
Thymus	0.51 ± 0.19	2.54 ± 0.33	p < 0.01

表3. 脳重量及び小脳重量

§ 脳重量及び体重比

	SRK (n=6)	control (n=4)	p
wet weight (mg)	1025 ± 65	1440 ± 41.6	p < 0.01
$\frac{\text{brain weight (mg)}}{\text{body weight (mg)}}$	68.49 ± 7.73	35.24 ± 1.68	p < 0.01

§ 小脳重量及び脳重比

	SRK (n=6)	control (n=4)	p
wet weight (mg)	38.5 ± 2.5	200 ± 3.61	p < 0.005
$\frac{\text{wet weight (mg)}}{\text{brain weight (mg)}}$	3.76 ± 0.01	13.90 ± 0.22	p < 0.005

胸腺に僅かに認められたのみで、細胞構築に異常を認めなかった。

5. 中枢神経系の光顕的観察

SRK ラットの最も特徴的な病理学的変化は

大脳皮質、海馬、小脳皮質など神経細胞が層構造を呈する部位に認められた。

大脳皮質では皮質第1層である分子層が欠落し、多数の神経細胞が同部に存在していた。ま

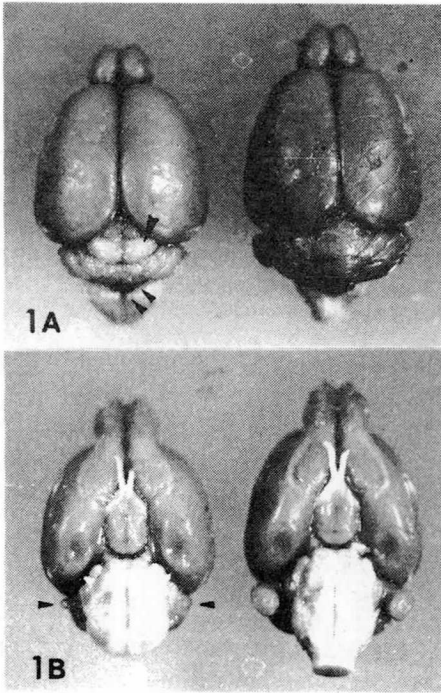


図1. SRK 及び対照ラットの脳の肉眼的所見(生後24日)(A)背面 (B)底面
左: SRKラット、右: 対照 X4

- 1A: 背面より観察すると、SRKラットの小脳が著しく小さく、小脳虫部と半球の境が不明瞭であり、小脳虫部が欠失している。そのため、下丘(大矢印)や小脳・延髄槽(小矢印)が露呈してみえる。
- 1B: 底面よりみると、対照ラットに認められる小脳片葉がSRKラットに欠落していることが分かる(矢印)。

た、正常では見られない髄鞘も分子層に散在していた。大脳皮質を構築している神経細胞の層構造は乱れ、通常、第5層に見られる錐体細胞と思われる大型神経細胞は第2、3層に散在していた。海馬の錐体細胞も大脳皮質と同様著しく層構造の乱れを呈していた(Fig. 2)。グリア細胞の増殖性変化や炎症性変化はみとめず、

髄膜、上衣細胞、血管に異常は認められなかった。

小脳では、外顆粒細胞層が生後24日のSRKラットにおいても依然として存在し、顆粒細胞の移行が遅延していた。その為、顆粒細胞の数は正常に比較して減少していた。また分子層は厚みがなく、場所により欠如している部分もあった(Fig. 3)。プルキンエ細胞とおもわれる大型神経細胞は大部分が顆粒細胞層又は中心部の白質に存在し、正常の位置には認められなかった。白質内では小脳深部核と一緒に大型神経細胞の塊(central mass)を形成していた(Fig. 4)。

脊髄では神経細胞、特に前角細胞の位置異常は認められなかった。しかし中心灰白質では髄鞘の染色性が正常に比べ高まっていた(Fig. 5)。

6. 小脳の電顕的観察

Central mass を構成する大型神経細胞は電顕的にプルキンエ細胞の特徴をよく兼ね備えていた(Fig. 6)。細胞内小器官は正常であり、軸索-樹状突起結合、軸索-胞体結合などのシナプス結合にも異常は認められなかった(Fig. 7)。顆粒細胞も正常であった。唯一の電顕学的異常はCentral Massの部分に認められた腫大した樹状突起である(Fig. 8)。しかしながら、この腫大した樹状突起がどの細胞のものかは同定し得なかった。

7. 大脳皮質の走査電顕所見

SRKラット大脳皮質を走査電顕フラクτοグラフィーにより観察した結果、分子層の欠落、神経細胞の層構造の配列異常など、光顕上見られた異常を確認した(Fig. 9)。

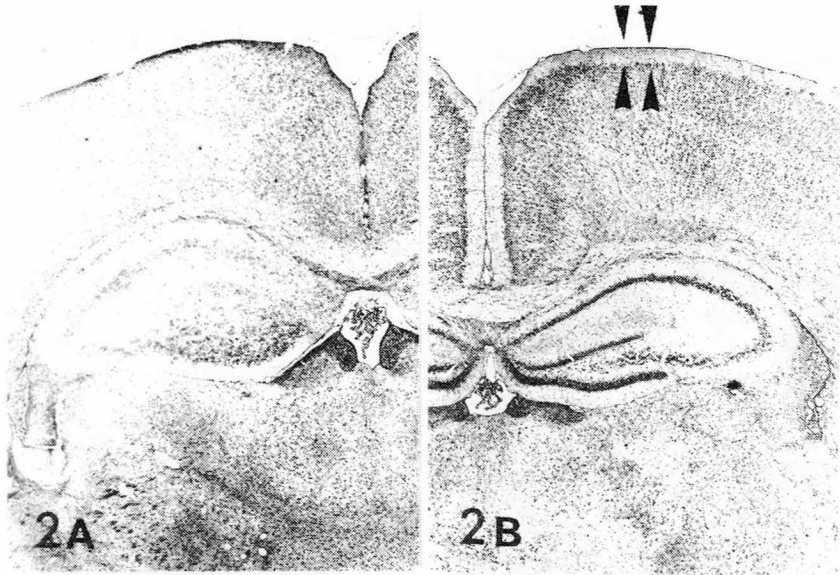


図2. SRK及び対照ラットの大脳横断面、パラフィン切片、LFB & Nissel 染色
(A)SRK (B)対照 X15

対照ラット(2B)に見られる大脳皮質第1層(分子層)(矢印)はSRKラット(2A)に見られず、大脳皮質神経細胞の層構造が判然としない。海馬においても同様に神経細胞の配列異常がみられる。

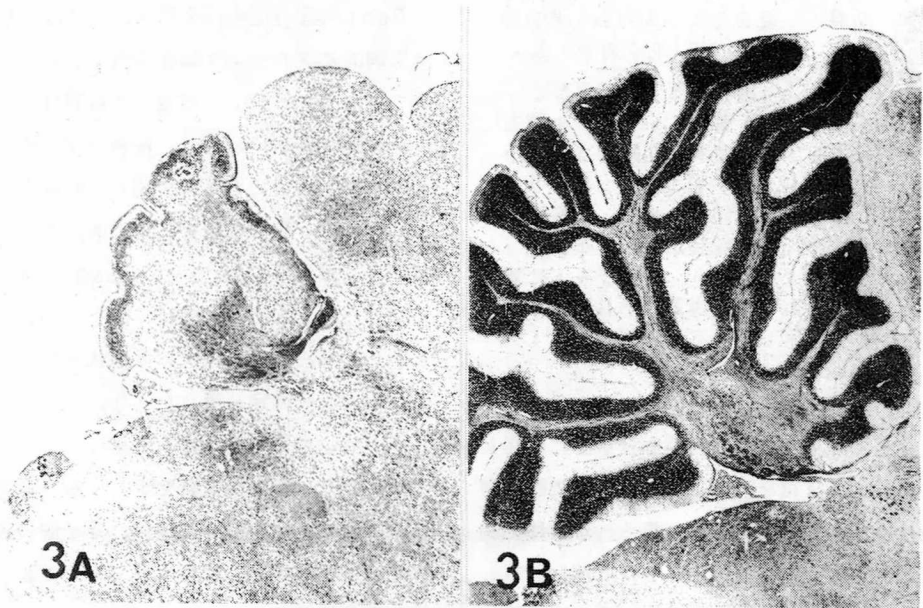


図3. SRK及び対ラットの小脳矢状断面、パラフィン切片、LFB & Nissel 染色
(A)SRK (B)対照 X15

SRKラットの小脳はクローバー葉の形を示し、分子層、顆粒細胞層及び白質の境が不明瞭であり、場所により分子層が欠落している。分子層と顆粒細胞層の厚みは著しく減少している。中心部に神経細胞の塊がみられる。



図4. SRK ラット(生後24日)の小脳、パラフィン切片、
LFB & Nissel 染色。 X 75

生後24日目にもかかわらず、外顆粒層が存在し、分子層には移動中の顆粒細胞が多数認められる。内顆粒細胞層を構成する顆粒細胞の数は著しく減少している。正常の位置にあるブルキエン細胞は殆ど認めず、ブルキエン細胞と思われる大型神経細胞は顆粒細胞層よりも深部の白質内で塊(central mass)を作っている。

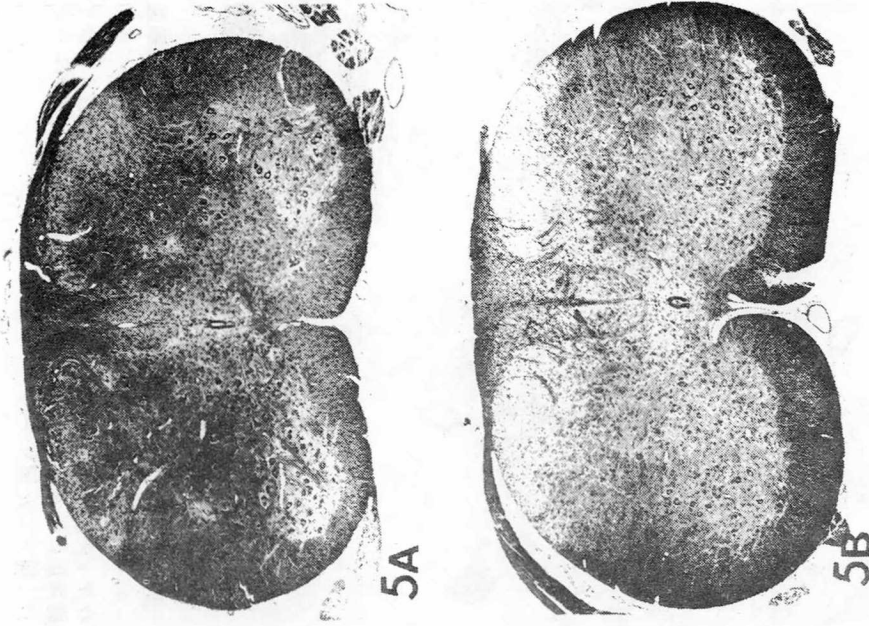


図5. SRK 及び対照ラットの頸髄横断面、パラフィン切片、
LFB & Nissel 染色 (A)SRK (B)対照 X 50
脊髄前角細胞はSRKラット(5A)においてほぼ正常の位置を占めているが、対照ラット(5B)に比べ中心灰白質の髄鞘の染色性が高まっており、走行異常がうかがわれる。

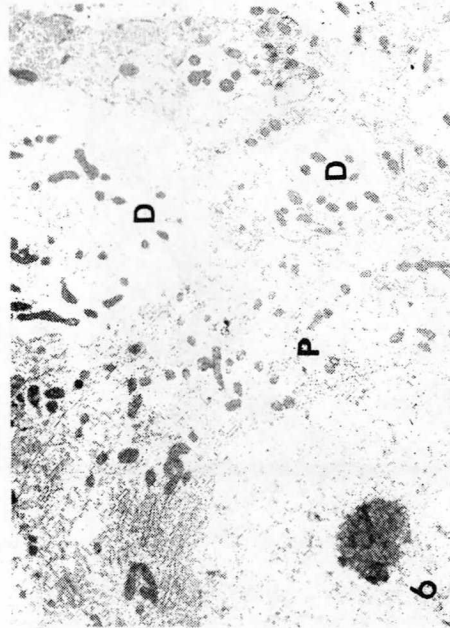


図6. SRK ラット小脳の深部に見られた大型神経細胞の電顕像
X 6,000

小脳深部白質内に認められた神経細胞(P)は、核小体を有する大型の核、良く発達した粗面小胞体やゴルジ小体、多数のミトコンドリアなど形態学的にブルキエン細胞の特徴を備えている。周辺には腫大した樹状突起(D)が散見される。

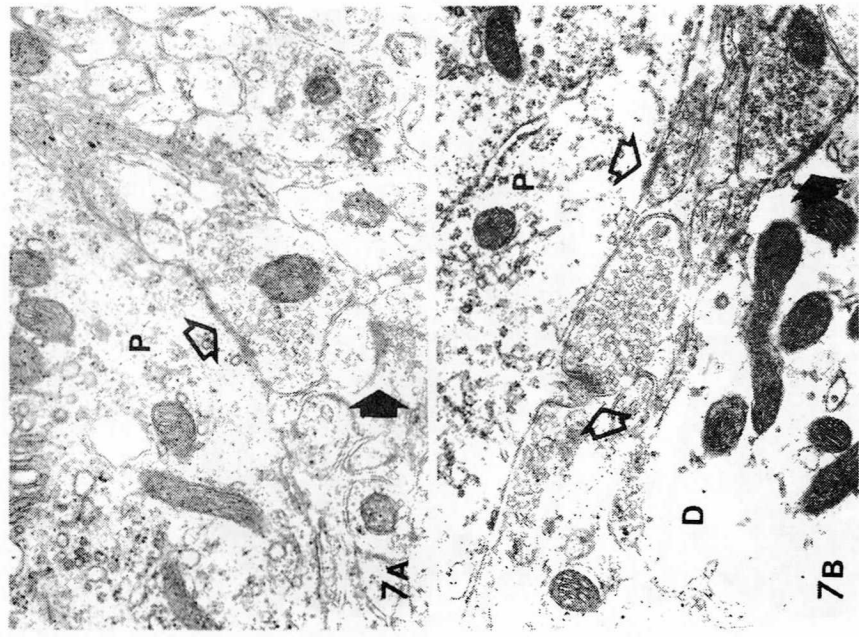


図7 A, B、ブルキエン細胞周辺のシナプス結合の電顕像
X 30,000

ブルキエン細胞(P)の胞体に接して、軸索-細胞体結合(白抜き矢印)、細胞周辺に軸索-樹状突起結合(黒矢印)が正常に認められる。
D: 腫大した樹状突起

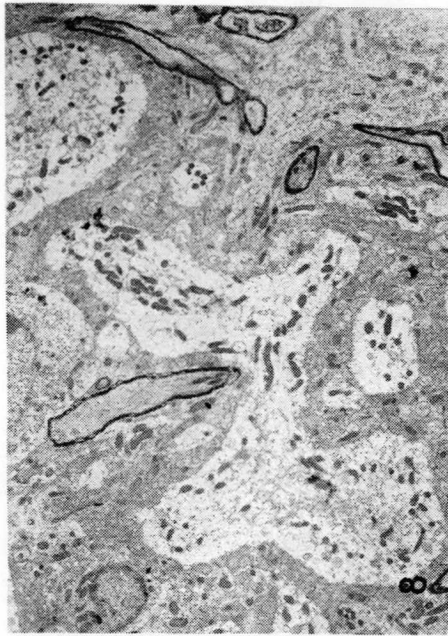


図 8. 腫大した樹状突起の電顕像

X 4,000

SRK ラット小脳白質中心部に胞体内の細胞小器官が粗となり浮腫状に腫大した樹状突起を認める。腫大した胞体内には囊胞状変化を呈する小胞体や多数の神経線維が認められるが、ミトコンドリアは正常である。

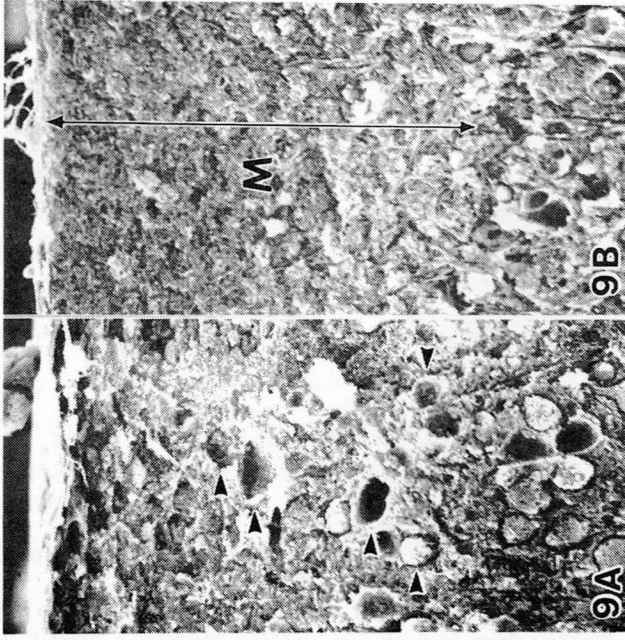


図 9. SRK 及び対照ラット大脳皮質の走査電顕フラクテングラフ
X 600

(A)SRK (B)対照

対照正常ラット(9B)では皮質第1層(分子層)(M)に神経細胞を認めないが、SRKラット(9A)の第1層には多数の神経細胞(矢印)を認める。

考 察

SRK ラットは常染色体劣性遺伝形式を示し、臨床的に体幹振戦、小脳失調を主症状とする先天異常ラットである。¹⁾

病変の主座は中枢神経系に存在し、神経細胞が層構造を示す部位、すなわち、大脳皮質、海馬、小脳などの皮質構造部位に最も顕著にみられる。病理学的には、小脳の低形成、神経細胞の位置異常、層構造の配列異常を特徴とする。

中枢神経系の神経発生は形態学的に大別して3段階の過程を経るとされている。²⁾ すなわち、上衣下の胚芽層において神経芽細胞が分裂・増殖する proliferation stage、分裂した神経細胞が皮質の定位置へ移動する migration stage、そして定められた位置において他の神経細胞の軸索突起とシナプス結合を行い神経機能を発現する synapse formation stage の3段階である。光顕上、神経細胞の数は小脳の顆粒細胞を除いて減少しているとは思われず、電顕上、シナプス結合も正常に認められる事を考えると、SRK ラットの異常は神経細胞の移動障害によるものと考えられる。

先天性脳奇形を呈する異常動物は、特にマウスにおいて、今日までいくつか報告されている。³⁾ しかしながら、神経細胞の移動障害を示すものは Reeler mutant mouse を除いて報告されていない。⁴⁾ Reeler mutant mouse も小脳の低形成と、神経細胞の位置異常を主病変とし、病理学的に SRK ラットと酷似しているとおもわれる。

筆者の知る限り、実験動物として最も頻繁に使用されているウイスター系ラットでは、髄鞘形成不全ラット⁵⁾と水頭症ラット⁶⁾の2種類の先天異常ラットが報告されているのみで、神経細胞の移動障害を示すものは知られていない。

神経発生は神経生物学の分野において最も重要な基本命題であり、種々の対立した問題が多数残されている。例えば、神経芽細胞の移動は放射状グリア線維に誘導されるという Rakic らの説⁷⁾とマトリックス細胞の脚の束に誘導されるとする藤田らの説⁸⁾は、今日迄依然として対立したままで結着が付いていない。また、小脳皮質の細胞構築において先導的な役割を果たすものは、バーグマン線維であるとする Rakic らの説⁹⁾と平行線維であるとする Altman らの説¹⁰⁾も意見の一致をみていない。更に、化学親和説などの神経回路網の形成理論についても検証されねばならぬ問題が数多くのこされている。SRK ラットの研究はこれら神経科学の基本的問題を解く貴重な鍵を提供してくれるであろう。

加えて、SRK ラットは疾患モデル動物として医学的側面からも利用することができるであろう。ヒトで神経芽細胞の移動障害を特徴とする先天性脳奇形には、無脳回、厚脳回、小多脳回、孔脳症などが知られており、ダウン症候群や福山型筋ジストロフィー症でよくみられる。¹¹⁾ 従って、SRK ラットの病態を究明することにより、上記の先天性脳奇形の病因・病態を解明する糸口を見付けることができるかもしれない。以上の様に、SRK ラットはヒト先天性脳形成不全の格好の疾患モデル動物になり得るに違いない。

文 献

- 1) 江崎孝三郎(1986)：新たに発見された後肢麻痺ラット、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年度報告

- 書, p 45 - 61.
- 2) Cowen, W.M. (1979) : Selection and control in neurogenesis.
In: Schmitt, F.O. & Worden, F.G. (eds.), The Neurosciences, MIT Press, London, p59-79.
 - 3) Caviness, V.S.Jr. & Rakic, P. (1978) : Mechanism of cortical development: A view from mutations in mice, Ann. Rev. Neurosci. 1:297-326.
 - 4) Caviness, V.S.Jr. (1976) : Reeler mutant mice and laminar distribution of afferents in the neocortex. Exp. Brain Res. Suppl. 1:267-273.
 - 5) Csiza, C.K. & Lahunta, A. (1979) : Myelin deficiency (md): A neurologic mutant in the Wistar rat, Am.J. Pathol. 95:215-223.
 - 6) Van Eden, C.G. & Mullink, J.W.M.A. (1986) : Internal hydrocephalus, optic nerve aplasia, and microphthalmia in CPB-WE (Wezob) and Cpb: WU(Wistar)rats, Lab. Animals 20:257-265.
 - 7) Rakic, P (1972) : Mode of cell migration to the superficial layers of fetal monkey neocortex. J.Comp. Neurol. 145:61-84.
 - 8) Fujita, S. (1982) : Matrix cell and cytogenesis of the central nervous system by tritiated thymidine autoradiography. J.Comp. Neurol. 120:311-328.
 - 9) Sidman, R.L. & Rakic, P (1973) : Neuronal migration, with special reference to developing human brain: A review. Brain Res., 62:1-35.
 - 10) Altman, J (1973): Experimental reorganization of the cerebellar cortex. IV. Parallel fiber re-orientation following regeneration of the external germinal layer. J.Comp. Neurol. 149:191-192.
 - 11) Takada, K et al (1984) : Cortical dysplasia in congenital muscular dystrophy with central nervous system involvement (Fukuyama Type). J.Neuropathol. Exp. Neurol. 43:395-407.

GAD (gracile axonal dystrophy) マウスの遺伝育種学的研究

富田 武*

研究協力者 山崎一斗*, 若杉 昇*

菊池建機**, 向山昌邦***

安藤一也***

はじめに

ヒトの筋ジストロフィー症のモデルマウスとしては、すでに C57BL/6J-*dy*¹⁾ および C57BL/10-*mdx*²⁾ が開発されていて、わが国でも病態解析や治療法研究のため盛んに用いられている。しかし、筋ジストロフィー症およびこれと密接に関連する脳・神経系の異常による筋疾患は、ヒトにおいて数多く知られており、これらの病態や遺伝に関する研究を必要としている。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、既知の疾患遺伝子同士を複合させた合併症モデル動物の開発も疾患の病態解析や治療法研究のため必要である。

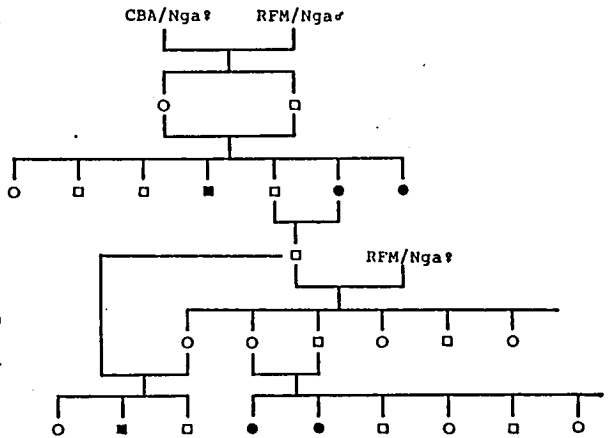
われわれは、このような認識のもとに、新しい脳・神経・筋の疾患モデル動物の開発を目指し、病態解析と遺伝解析を同時に、しかも迅速に進めるためにもっとも適当と考えられるマウスを対象動物として、検索と開発を准めた。

その結果、RFM/Nga と CBA/Nga の交配の F₂ 世代において、生後約 80 日齢より後肢をひきずって歩く個体 3 匹を発見した。これらのマウスは生後約 200 日齢で死亡したが、これらの後代より、これと同じ症状を呈するマウス系を確立しつつある。今回は、このマウスについて病理学および遺伝学的検討を進めた結果

について報告する。

発見

1984年1月、名古屋大学農学部において、RFM/Nga と CBA/Nga とを交配した F₂ 世代の 2 匹の雌と 1 匹の雄が約 80 日齢において後肢を引きずって歩くのが認められた。このうち雌雄各 1 匹は解剖に付され臓器と骨格の異常の検索にもちいられたが、1 匹の雌が同腹の正常な雄と交配されて 1 匹の正常雄を生んだ。この雄が GAD マウスの基となった貴重なマウスで、母系の 1 つである RFM/Nga に戻し交配された



第1図 GAD (gracile axonal dystrophy) マウスの家系図。

黒円および黒角は GAD マウスの雌および雄、白円および白角は正常マウスの雌および雄をそれぞれ示す。

* 名古屋大学農学部
 ** 国立精神・神経センター神経研究所モデル動物開発部
 *** 国立精神・神経センター神経研究所疾病研究第四部

り、さらにその後代と交配されたりした結果、多くの後肢異常のマウスを残した。この経過を第1図に示した。

病 態

異常個体は、80日齢までは外見上は正常個体とまったく区別が付かない。しかし、その後の観察で判明したのは、生後1か月齢頃に尾をもってつりさげると、後肢を垂直上方に突っ張る動作、あるいは腹側に折り曲げる動作がみられ、これにより正常個体と区別が可能である。80日齢より後肢を引きずり始めるが、その様子を第2図に示した。その頃より体重が次第に減少して、振戦、排泄障害および後肢の筋萎縮が認められるようになり、また雄では陰茎強直をしめすことがある。症状は進行性で、5~6か月齢で衰弱死する。雄雌ともに80日齢頃までは繁殖が可能であり、雌は1産または2産まで仔を生むことができる。

遺 伝

遺伝子解析を行うに先立って、まずGADマウスのコロニー内において、異常仔マウスを生

んではいるが両親はともに正常個体であった交配 (Carrier × Carrier)、および両親はともに異常個体であったが幸運にも仔を残した交配 (Affected × Affected) の結果を第1表にまとめてみた。この表により、前者の交配より生まれた309匹の仔マウスは、正常個体が227匹と異常個体82匹に分離した。仔マウスにおける異常個体中での雄と雌の出現には特に大きな差違を認めなかった。また、異常親同士の交配よりはすべて異常仔マウスが生まれた。

前者の交配、すなわち (Carrier × Carrier) よりの仔マウスにおける分離比は、異常個体の出現には常染色体劣性遺伝子が関与していると仮定した3:1の分離比と、よく一致していた。

このことを確認するために、GADマウスの異常個体とC57BL/6Ngaとを正逆交配して、そのF₁、F₂および戻し交配 (N₁) の各世代における正常個体と異常個体の分離比を検討した。これらの交配に先立って、GADマウスについては前に述べたように尾をもってつりさげた場合の後肢の動作で、異常個体をあらかじめ選抜

第1表 Results of test crosses within Gad/Nga.

Mating		No. progeny	Phenotypes of progeny		Expected segregation ratio	χ ²
Dam	Sire		Normal	Affected		
carrier (gad/+)	X carrier (gad/+)	309	227	82	3:1	0.389 0.50 < P < 0.70
affected (gad/gad)	X affected (gad/gad)	5	0	5	0:1	

第2表 Results of test crosses between Gad/Nga and C57BL/6.

Mating		No. progeny	Phenotypes of progeny		Expected segregation ratio	χ^2	
Dam	Sire		Normal	Affected			
normal ^a (+/+)	X	affected ^b (gad/gad)	20	20	0	1:0	
affected ^b (gad/gad)	X	normal ^a (+/+)	15	15	0	1:0	
Total		35	35	0	1:0		

carrier ^c (gad/+)	X	carrier ^c (gad/+)	66	52	14	3:1	0.505 0.30<P<0.50

carrier ^c (gad/+)	X	affected ^b (gad/gad)	81	38	43	1:1	0.309 0.50<P<0.70
affected ^b (gad/gad)	X	carrier ^c (gad/+)	31	18	13	1:1	0.806 0.30<P<0.50
Total		112	56	56	1:1	0 P>0.99	

^a Gad/Nga used.

^b C57BL/6 Used.

^c F₁ between Gad/Nga and C57BL/6 used.

した。これらの選抜個体は、すべて80日齢以後には発症をみた。第2表に示した結果は、前述のGADマウス内での交配結果より得られた結論と矛盾するものではなかった。すなわち、異常個体とC57BL/6Ngaとの正逆交配によるF₁は共に正常であり、これらのF₁同士を交配したF₂では、正常個体52匹に対して異常個体が14匹出現し、異常個体の出現率は21.2%を示した。また、F₁を異常個体へ戻し交配したN₁世代では正常個体56匹に対して、異常個体56匹で異常個体の出現率は50%であった。そこで、病理学的所見においてGoll核およびGoll索の軸索に局限して変成が認められる常染色体性の劣性形質であることから、gracile axonal dystrophyの頭文字をとって、こ

の形質を支配する遺伝子をgadと命名した。³⁾そして、この遺伝子を有するミュータント系をGad/Nga、通称GADマウスと呼ぶことにした。このマウスは、前に後肢麻痺を示したことから、仮にhind limb paralysis(hlp)と呼んだこともあったが、病理所見の確定したことにより、ここにGADマウスの呼称が与えられたのである。⁴⁾

考 察

マウスにおいては、延髄のgoll核や脊髄のgoll索の背側1/2の部位は上向感覚神経系の存在する部位であるので、臨床的に認められた後肢のひきずりと、全身のふるえは、この部位の障害に起因すると考えられる。

マウスにおいて、神経軸索に萎縮を伴う突然変異はいくつか知られている。ataxis (ax)⁵⁾, shambling (shm)⁶⁾, ducky (dy)⁷⁾などが代表的ミュータント系統である。しかし、これらのミュータントは、GAD マウスにみられるように限局した神経軸索の萎縮を示すものではない。

GAD マウスは 80 日齢頃までは雄雌ともに繁殖が可能であるので、遺伝的にホモ接合体の確認できる胎仔や発症前の幼い動物を用意して、発症時期や、発症前後の病理学的検索が可能である。また、異常個体同士の交配よりの受精卵阻と、正常個体同士の交配よりの受精卵阻を試験管内で融合させたのちに、着床条件を整えた仮雌親の子宮へ移植することにより、異常個体細胞と正常個体細胞がキメラ状に混った成体をつくるのが可能である。このようなキメラ動物における神経症状の発現の有無や、神経軸索における病変の有無を検索することにより、真の病因に迫る研究の進展が期待されるのである。

ヒトにおいて、神経軸索に萎縮を生じる疾患としては、Infantile Neuroaxonal Dystrophy^{8~10)}, Hallervorden-Spatz Disease^{11~13)}, Vitamine E Deficiency^{14~17)}, 老化^{18~20)} 薬物中毒^{21~22)}などが知られている。

Infantile Neuroaxonal Dystrophy の場合には、進行性の神経および知能の障害をともない、hyperkinesia, bulbar paralyzes, rigidity, dementia などを引き起こすことにより臨床的に特徴付けられている。発症は 2 歳前後であり、それまでの発育は、正常児と変わらない。²⁰⁾ この病気の場合、神経軸索の萎縮は中枢神経系の全体に及ぶ。

Hallervorden-Spatz Disease は進

行性の extrapyramidal syndrome を示し、rigidity と dementia を伴う。発症は 7~9 歳で、それまでの発育は正常である。この病気は常染色体性劣性遺伝子によるといわれている。また、神経軸索の萎縮は pallidum に限局して現れることと、色素沈着が globus pallidus および substantia nigra に認められる。^{11~13)}

Vitamin E Deficiency に関しては、cystic fibrosis や congenital biliary atresia の場合に、神経軸索に萎縮が認められることがあるが、vitamine E の投与により症状が改善されるとの報告もある。^{14~17)}

老化の過程では、体の各部位に変性がみられるが、ラットを用いた実験において、神経軸索の gracile nucleus と cuniate nucleus に変性が認められている。^{23~24)}

このように、GAD マウスの神経軸索の萎縮は、全く同じではないにしろ、上述のヒトの神経疾患において認められる症状と類似している。

マウス以外の動物では、Suffolk sheep において、遺伝的な神経軸索の萎縮が報告されており、²⁵⁾ またネコでも同様な萎縮が、被毛の色素が異常に薄くなる形質と関連して出現することが知られており、²⁶⁾ いずれの場合も常染色体性劣性遺伝子による。

GAD マウスの常染色体性劣性遺伝子の、連鎖群に関する解析も進行中であり、また C57 BL/6Nga や C3H/Nga へ *gad* 遺伝子を導入して、コンジュニック系統を作成する育種操作も進行している。さらに、isozyme を支配している遺伝子座を標識にして *gad* 遺伝子と伴性劣性遺伝子で筋ジストロフィー症をひき起こす *mdx* 遺伝子との複合による、神経軸索の萎縮

と筋萎縮の合併症マウスの作出も夢では無くなりつつある。

文 献

- 1) 辻 繁勝, 松下 宏 : 筋ジストロフィー症の実験モデル — 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) 山崎一斗, 若杉 昇, 富田 武, 菊池建機, 向山昌邦, 安藤一也 : GAD(gracile axonal dystrophy) マウスの遺伝育種学的研究 日疾動録, 3. 1987.
- 4) 向山昌邦, 安藤一也, 山崎一斗, 富田 武, 菊池建機 : GAD(gracile axonal dystrophy) マウスの病理形態学的研究 日疾動録, 3. 1987.
- 5) D. Amato, C. J. and Hick, S. P. Neuropathologic alterations in the ataxia (paralytic) mouse. Arch. Pathol., 80: 604-612, 1965.
- 6) Meier, H. Pathological findings in shambling, a hereditary neuropathy of mice. J. Neuropathol. Exp. Neurol., 26: 620-633, 1967.
- 7) Meier, H. The neuropathology of ducky, a neurological mutation of the mouse, Acta Neuropathol., 11: 15-28, 1968.
- 8) Cowen, P., Olmstead, E. V. Infantile neuroaxonal dystrophy. J. Neuropathol. Exp. Neurol., 22: 175-236, 1963.
- 9) Indravasu, S. and Dexter, R. A. Infantile neuroaxonal dystrophy and its relationship to Hallervorden-Spatz disease. Neurology, 18: 693-699, 1968.
- 10) Haberland, C., Brungraber, E. G. and Witting, L. A. Infantile neuroaxonal dystrophy: Neuropathological and biochemical study of a case. Arch. Neurol., 26: 391-402, 1972.
- 11) Sacks, O. W., Aguilar, M.J. and Brown, W.J. Hallervorden-Spatz disease, its pathogenesis and place among the axonal dystrophies. Acta Neuropathol., 6: 164-174, 1966.
- 12) Yanagisawa, N., Shiraki, H., Minakawa, M. and Narabayashi, H. Clinicopathological and histochemical studies

- in Hallervorden-Spatz disease with torsion dystonia with special reference to diagnostic criteria of the disease from the clinicopathological view point. *Progr. Brain Res.*, 21: 373-425, 1966.
- 13) Rozilsky, B., Cumings, J.N. and Ruston, A. F. Hallervorden-Spatz disease-late infantile and adult types. Report on two cases. *Acta Neuropathol.*, 10: 1-16, 1968.
- 14) Pentschew, A. and Schwarz, K. Systemic axonal dystrophy in vitamin E deficient adult rats. With implication in human neuropathology. *Acta Neuropathol.*, 1: 313-334, 1962.
- 15) Sung, J. H. Neuroaxonal dystrophy in mucoviscidosis. *J. Neuropathol. Exp. Neurol.*, 23: 567-583. 1964.
- 16) Sung, J. H. and Staslan, E.M. Neurodystrophy in congenital biliary atresia., *J. Neuropathol. Exp. Neurol.*, 25: 341-361, 1966.
- 17) Sung, J. H., Park, S. H., Mastro, A. R. and Warwick, W. J. Axonal dystrophy in the gracile nucleus in congenital biliary atresia and cystic fibrosis(mucoviscidosis): Beneficial effect of vitamin E therapy, *J. Neurol.*, 39: 584-597, 1980.
- 18) Brannon, W., McCormick, W. and Lampert, P. Axonal dystrophy in the gracile nucleus of man. *Acta Neuropathol.*, 9: 1-6, 1967.
- 19) Fujisawa, K. An unique type of axonal alteration (so-called axonal dystrophy) as seen in Goll's nucleus of 277 cases of controls. A contribution to the pathology of aging process. *Acta Neuropathol.*, 8: 255-275, 1967.
- 20) Sung, J. H. Mastro, A. R. and Park, S. H. Axonal dystrophy in the gracile nucleus in children and young adults: Reappraisal of the incidence and associated diseases. *Neuropathol. Exp. Neurol.*, 40: 37-45, 1981.
- 21) Blakemore, W. F. and Cavanagh, J. B. Neuroaxonal dystrophy occurring in an experimental dying back process in rats.

- Brain, 92: 789-804, 1969.
- 22) Chou, S. M. and Hartman, H.A. Axonal lesions and waltzing syndrome after IDPN administration in rats. with a concept "axostasis". Acta Neuropathol., 3: 428-450, 1964.
- 23) John, J. E. Jr., Mehler, W.R. and Miquel, J. A fine structural study of degenerative changes in the dorsal column nuclei of aging mice. Lack of protection by vitamin E. J. Gerontol., 30: 395-411, 1975.
- 24) Fujisawa, K. and Shiraki, H. Study of axonal dystrophy. I. Pathology of the neuropil of the gracile and cuneate nuclei in aging and old rats: A stereological study. Neuro-pathol. Appl. Neurobiol., 4: 1-20, 1978.
- 25) Cordy, D. R., Richards, W. P. and Bradford, G. E. Systemic neuroaxonal dystrophy in Suffork sheep. Acta Neuropathol., 8: 113-140, 1967.
- 26) Woodard, J. C., Collins, G. H. and Hessler, J. R. Feline hereditary neuroaxonal dystrophy. Am. J. Pathol., 74: 551-560, 1974.



図2 GADマウス
雄 生後 101日齢

軸索ジストロフィーのモデル動物としての GAD (gracile axonal dystrophy) マウス

菊池建機*

研究協力者 向山昌邦**, 山崎一斗***

富田武***

はじめに

昭和60年度の報告で、我々はRFM/NgaとCBA/Ngaの交配より得られたマウスに、後肢麻痺を主徴とする常染色体劣性遺伝様式に従うミュータントマウスを発見し、その経過および遺伝解析の結果を報告した。¹⁾ 発見当初、異常マウスが後肢を引きずり、前肢を使ってほふく前進する顕著な歩行障害を呈したため、仮に後肢麻痺マウス (hind limb paralysis: *hlp*) と遺伝記号を命名した。¹⁾

本報告は、異常マウスの中樞神経系の神経病理形態学的所見から、個体の示す歩行異常は上行性の知覚神経路である延髄の薄束核 (*nucleus gracilis*)、およびそれに続く脊髄の背索 (ヒトの後索に当たる) に在る薄束 (*fasciculus gracilis*) に限局する変性病変に起因することを明らかにし、さらにこの異常マウスを脊髄薄束に於ける軸索ジストロフィー (*gracile axonal dystrophy*) という神経病理学的側面からGADマウスと改めて命名し、その疾患モデル動物としての評価を行ったものである。

材料および方法

130-137日齢のGADマウス、8匹と対照正常マウス4匹を供試した。マウスは麻酔下で胸部を開き、心臓より10%ホルマリン、0.1 Mリン酸緩衝液 (PH 7.4) にて灌流固定し、常

法どうりパラフィンに包埋し、光顕標本とした。切片はH-E, Klüver-Barrera, Boodian染色を施し観察した。電子顕微鏡学的検索は、同様に、2.0%パラホルムアルデヒド、2.5%グルタルアルデヒド、0.1 Mリン酸緩衝液 (PH 7.4) で灌流固定し、1.0%オスミウム酸で後固定後エポキシ樹脂に包埋した標本を用いた。固定後、大脳、小脳、脳幹などを部位別に切出し、脊髄は頸髄、胸髄、腰髄に分けて病理標本を作製した。脊髄根、後根神経節も出来るだけ採取し検討した。筋組織はヒラメ筋、前頸骨筋においてパラフィンおよび凍結切片で観察した。

結果および考察

GADマウスは全て同様の病理所見を示す。肉眼的には脳、脊髄、末梢神経において異常を認めない。光学顕微鏡学的観察では、筋組織においてそれを構成する筋線維に廃用性の萎縮を認めるが、壊死および再生や、それに続く結合組織増生は見られず、その他の心、肺、肝、脾、腸管などの組織にも特に異常は生じていない。大脳および小脳に目立った形態学的異常はないが、GADマウスの延髄薄束核およびそれに続く脊髄の薄束を構成する神経軸索の局所的腫大を主徴とする変性所見を見出した (図-a, b: 矢印)。

薄束の腹位を占める下行性脊髄路である錐体

* 国立精神・神経センター、モデル動物開発部

** 同、疾病研究第四部

*** 名古屋大学農学部家畜育種学教室

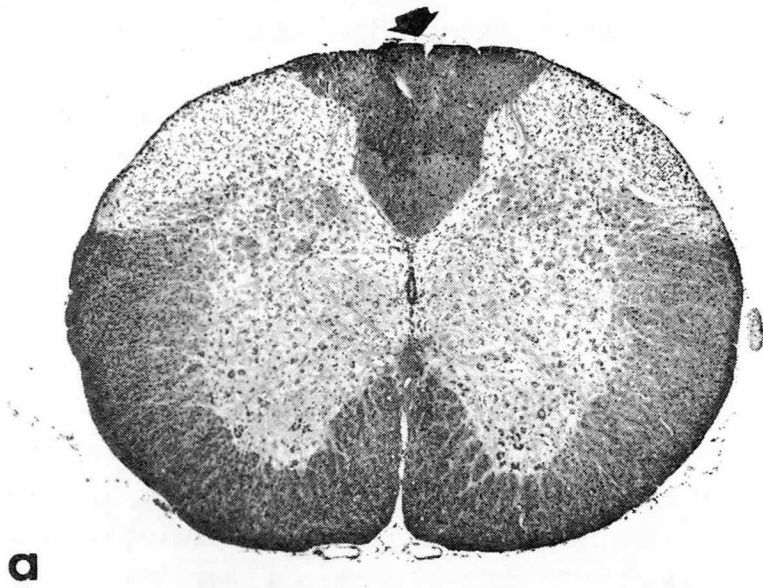


図 - a 対照正常マウスの頸髄。背索を矢印で示す。Krüver-Barrera 染色 X 60

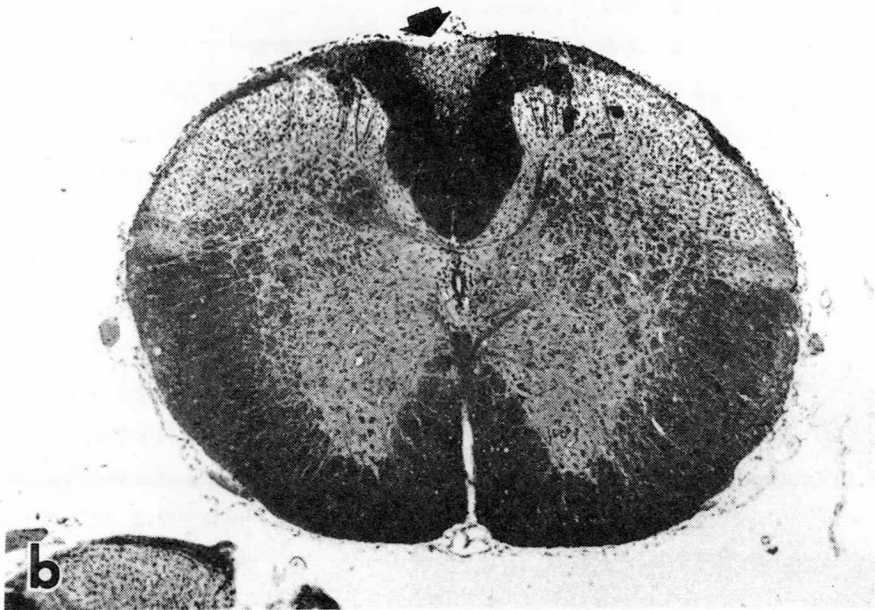


図 - b GADマウスの頸髄。背索の背側(矢印)約 $\frac{1}{2}$ の薄束(fasciculus gracilis)部の染色性が悪く、変性所見あり。Krüver-Barrera 染色 X 60

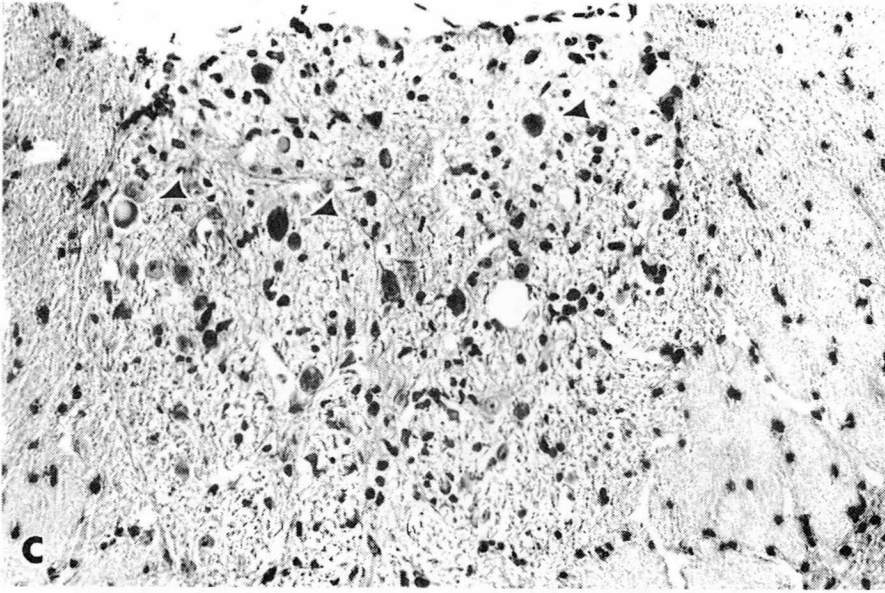


図 - c GAD マウスの延髄、薄束核。グリア細胞増生、神経線維の消失および局部的腫大を認める。大型のスフェロイド小体(矢頭印)が散在する。Bodian 染色 X 1,050

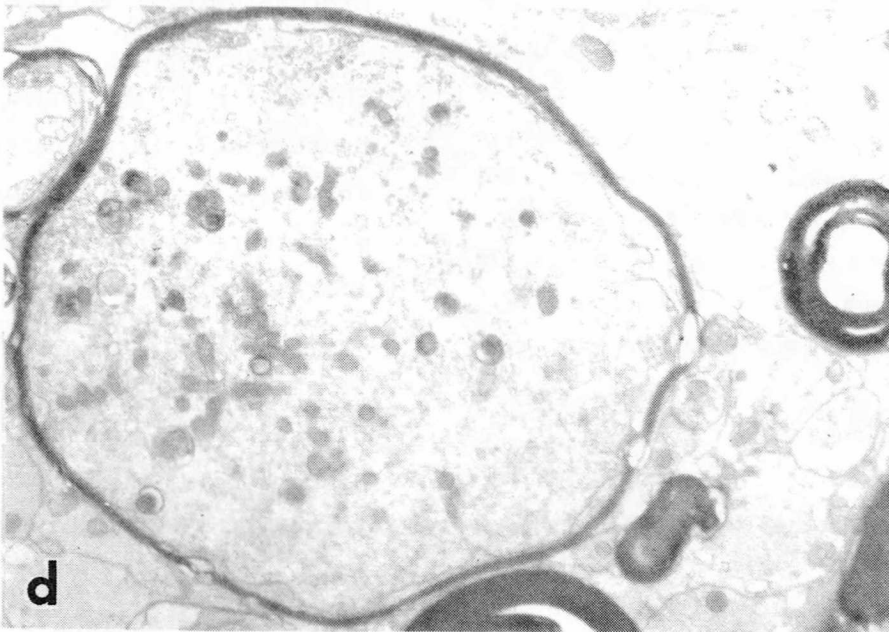


図 - d 延髄、薄束核に見られる腫大した有髄神経線維とその形質小器官の微細構造 X 11,200

路に異常はない。変性の程度は延髄の薄束核に最も強く、次いで頸髄、胸髄、腰髄の薄束の順である。この部位では有髄神経線維が消失し、グリア細胞の増生がある(図-c)。軸索形質の変性腫張した球状構造物は、いわゆるスフェロイド小体(spheroid body)に類似し、薄束核に最も頻繁に出現するが、薄束の各部位にも散見する(図-c、矢頭印)。

球状構造物は、電子顕微鏡で観察すると、菲薄化した髓鞘を有する有髄神経線維や無髄神経線維の軸索が異常に腫大しており、内部には種々の軸索形質小器官、すなわち糸粒体、神経細線維、変性した模様構造物等を多数含んでいる(図-d)。

延髄薄束核は第一次知覚神経の中継核で、続く脊髄の薄束は上行性の知覚神経路であるため、GADマウスの示す後肢の引きずりや、微細な振戦はこの部位の障害によるものと推察される。

このような神経軸索の腫大は、いわゆる軸索ジストロフィー(axonal dystrophy)の一般的な病理所見として知られている。²⁾ ヒトのHallervorden-Spatz病、infantile neuroaxonal dystrophy等はこの典型である。^{3,4)} かかる病変は、薬物中毒や実験的ビタミンE欠乏症などでも延髄や、脊髄の同じ部位に、同様に出現することが報告されている。²⁾ また最近この神経系の軸索腫大部に神経ペプチド(コレシストキニン)が証明され神経伝達物質の軸索流との関連で注目され、⁶⁾ さらにその出現頻度がヒトを含めた広範な動物種において、加齢(aging)と深く結びついていることが指摘されている。^{7,8)} GADマウスは生後約80日齢迄は殆ど臨床的異常を示さず、ある時期に突然障害を示す。この点で、生後極めて早期より先天的異常を示す他の疾患モデルマウスに比

べ、ヒトに見られる成人発症の変性神経疾患に類似する面が多い。

引用文献

- 1) 富田 武, 菊池建機, 埜中征哉, 若杉 昇, 山崎一斗 : 後肢麻痺マウス *hlp* の病態と遺伝について, 昭和60年度厚生省研究報告書(野村班), 63, 1986
- 2) Lampert, P. and A. Pentschew : An electron microscopic study of spheroid and convoluted bodies in dystrophic terminal axons. *Acta Neuropathol.*, 4:158, 1964
- 3) Davis, R. L. and D. M. Robertson : Textbook of neuropathology. Williams & Wilkins, 1985
- 4) Shiraki, H : Some unusual neuropathologic features in Guam cases in comparison with those in Japanese. with special reference to Hallervorden-Spatz disease-like lesions. *Proc. of the 5th Internat. congress of Neuropathol.*, Zürich, 201, 1965
- 5) Matsuda, T. et al : Dystrophic axons in the nucleus gracilis of normal rat containing

- cholecystokinin-like immunoreactivity. Acta Neuropathol. 65:224, 1985
- 6) Fujisawa, K : An unique type of axonal alteration (so-called axonal dystrophy) as seen in Goll's nucleus of 277 cases of controls. A contribution to the pathology of aging process. Acta Neuro-pathol., 8:255,1967
- 7) Fujisawa, K. and H. shiraki : Study of axonal dystrophy. 1.Pathology of the neuropil of the gracile and the cuneate nuclei in aging and old rats: A stereological study. Neuropathol. Appl. Neurobiol., 4:1, 1978

糖原病Ⅱ型系(RWE系)と正常系(AWE)との交配からのF₁に出現した翼の挙上不能個体

水 谷 誠

研究協力者 布 谷 鉄 夫

前年度は白色卵殻卵を産卵し、バンド羽装、Yellow羽装、Dilution羽装および野生型羽装の分離している糖原病Ⅱ型の系統RWE系を確立した。¹⁾しかし、上述の4種の羽装はいずれも胚において黒色の色素が沈着する。これは胚を実験に使用する際の障害になると思われる。そこで、今年度は黒色色素の沈着しないアルビノ形質をRWE系に導入することを計画し、AWE系(アルビノで白卵を産卵する系統、図1)の雄とRWE系の雌を交配した。その結果F₁において筋肉に糖原の蓄積はみられないが、糖原病Ⅱ型の主徴である翼の挙上不能となる個体が出現した。本報告はこのF₁における翼の挙上不能個体の出現頻度および翼の挙上不能、可能両個体の組織学的な検索結果である。

I. AWE系とRWE系のF₁における翼の挙上不能個体の出現頻度

AWE(雄)×RWE(雌)の交配から得られた子の

翼の挙上状態の調査結果を表1に示した。表からも明らかのように挙上不能個体と挙上可能個体は19:20と1:1の分離比を示した。しかし、挙上不能個体は雄6雌13と雌に多発し、挙上可能個体は雄15雌5となった。すなわち、挙上不能個体の出現には性差が観察された。また、雄における挙上不能の発症週齢は雌のそれより高齢の傾向を示した。アルビノ形質は性染色体性の劣性遺伝子により支配されている。このためAWF(雄)×RWE(雌)の交配からの雌はすべてアルビノとなり、アルビノに翼の挙上不能個体が多発した。図2に翼の挙上不能の雌(アルビノ)および雄を示した。

昭和58年度の本報告書において筆者らは糖原病Ⅱ型形質が常染色体性の単一劣性遺伝子により支配されていることを報告した。²⁾その時遺伝子分析に用いた系統は、糖原病Ⅱ型系としてRW系を、正常系としてMWE系を用いた。そして、RW(雄)×MWE(雌)およびMWE(雄)×RW

表1. AWE(♂)×RWE(♀)の交配から得られた子の翼の挙上状態

調査年月日	挙上不能		中 間		挙上可能	
	♂	♀	♂	♀	♂	♀
9. 18. '86	3	12	3	1	14	5
11. 11. '86	5	13	1	0	15	5
1. 9. '87	6	13	0	0	15	5

.....
(財)日本生物科学研究所

雌の両交配から得られた56個体の翼はいずれも挙上可能であった。今回の交配においてF₁の雌(アルビノ)に翼の挙上不能個体が多数出現したことは以下の3点が考えられる。

1. 糖原病Ⅱ型形質は常染色体性の男性遺伝子には支配されていない。

2. 糖原の蓄積と翼の挙上不能状態は異なる遺伝子により支配されている。

3. 糖原病Ⅱ型遺伝子とともに未知の因子が存在すると糖原の蓄積がなくて翼の挙上不能状態のみが発現する。そして、今回用いたAWE系の雄はこの未知の因子を保有していた。

AWE系の標識遺伝子の1つであるアルビノ形質もこの未知の因子である可能性が考えられる。すなわち、AWE系のアルビノ形質を支配する遺伝子は色素細胞においてメラニン合成のkey enzymeであるチロシナーゼをゴルジ・ER・リソゾーム系からメラニン合成部位への移送を

抑制する。このためメラニンが合成されずアルビノとなることが報告されている。³⁾ この移送の抑制が糖原病Ⅱ型の原因酵素である酸性マルターゼにおいてもおこっていると仮定すれば、糖原病Ⅱ型遺伝子がヘテロで酸性マルターゼの合成量が少いことに加えて移送に若干の抑制がおこったためリソゾーム内の酸性マルターゼ活性が低下し、糖原病Ⅱ型の主徴である翼の挙上不能状態のみが発現したとも考えられる。また、昭和56年度の報告書に記載したごとく、これまで糖原病Ⅱ型ウズラが出現したことのないAWE系の酸性マルターゼ活性値は正常系のAMRP系あるいは糖原病Ⅱ型形質に関して固定前(選抜前)のRW系のそれらより低い傾向がみられた(図3)。⁴⁾ このことは酸性マルターゼのリソゾームへの移送が若干抑制されているためとも考えられる。

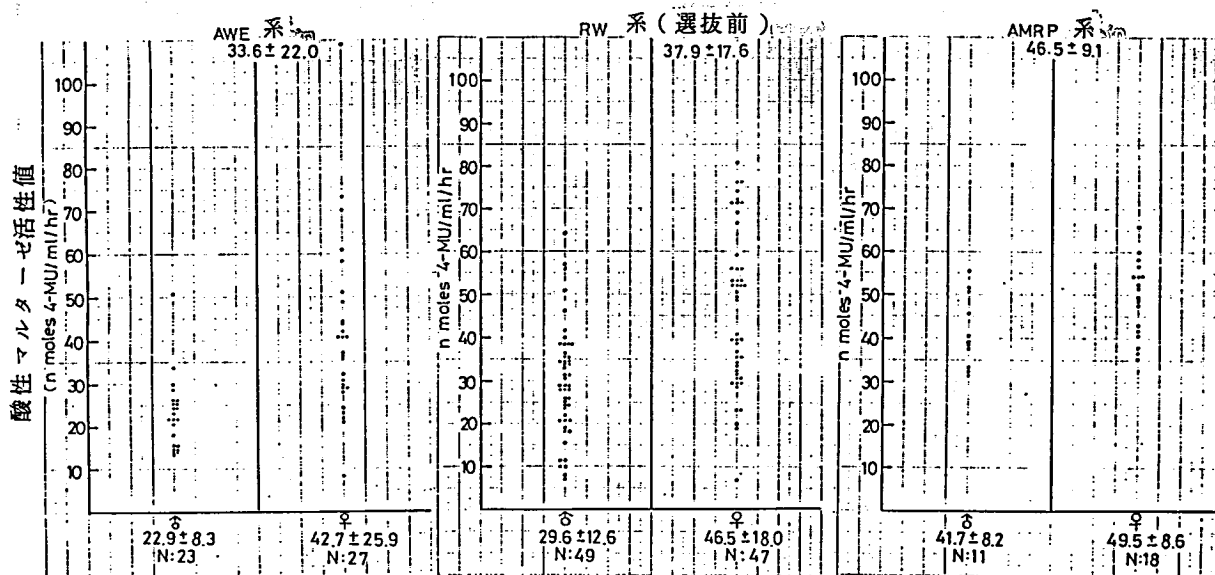


図3. AWE系、AMRP系および糖原病Ⅱ型形質に関して選抜前のRW系の血清中酸性マルターゼ活性値

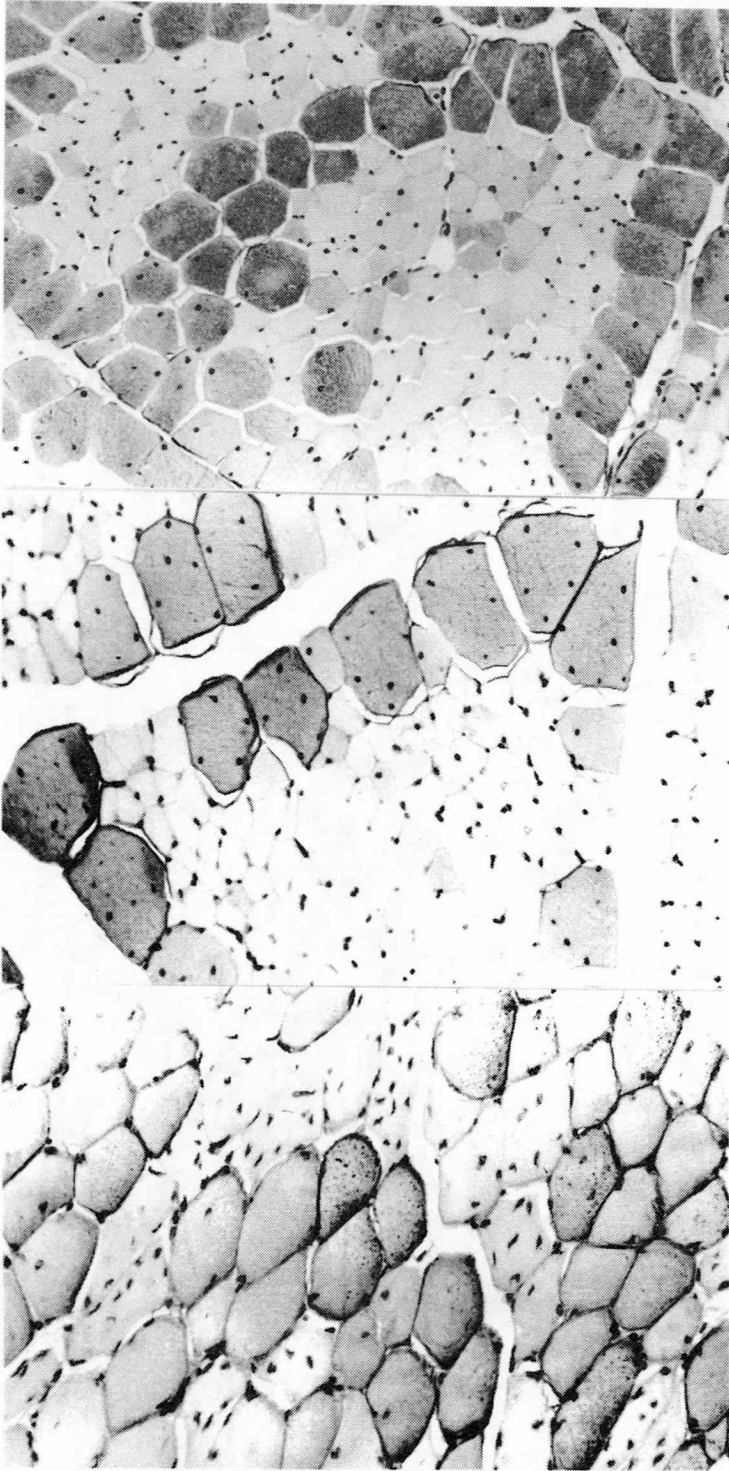


図4. F₁において出現した翼の挙上不能個体と正常個体の胸筋（PAS染色）

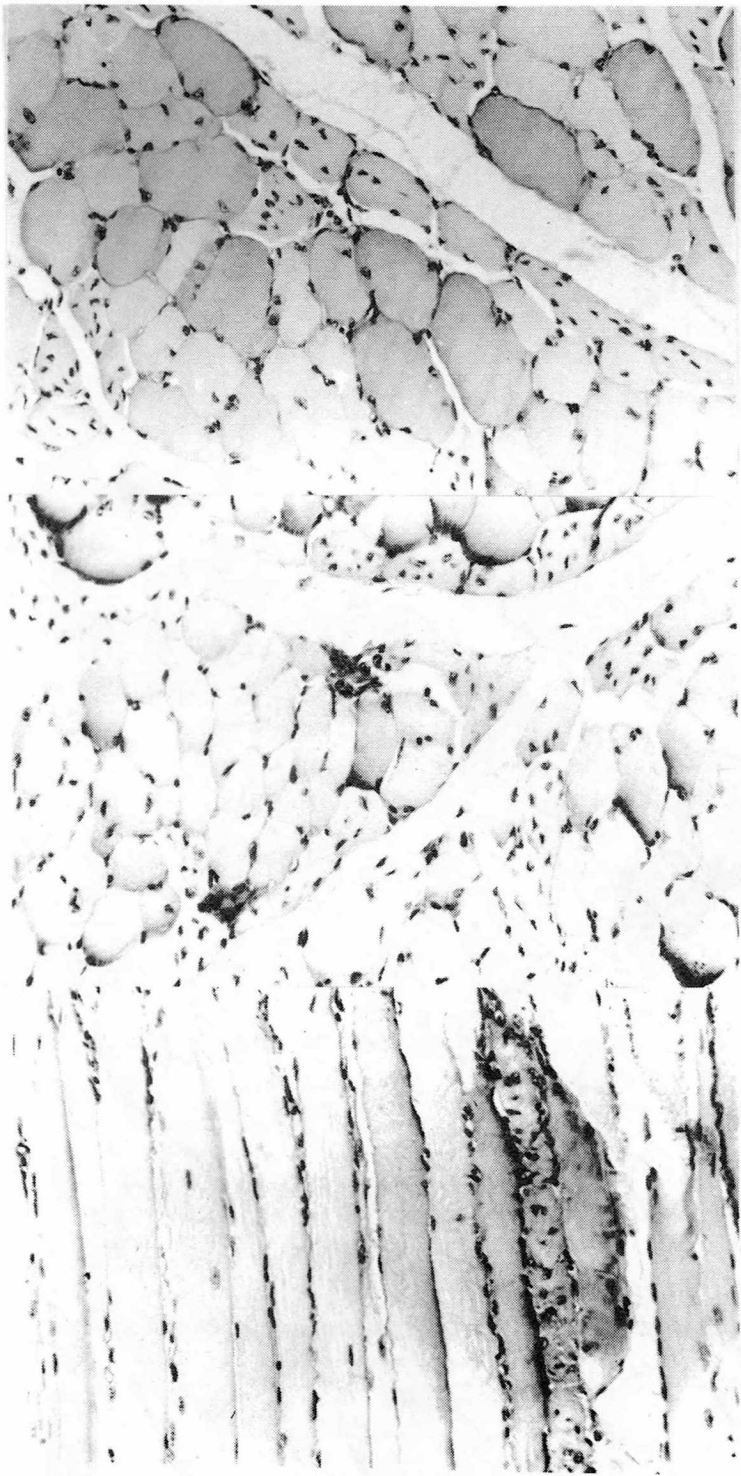


表2. 正常個体および翼の挙上不能個体における単位面積あたりの筋線維数とそれらの平均直径

Case No.	筋線維数/単位面積 (864 μm^2)	平均直径 (μm)
1288-1 (正常)	230	15.8 \pm 6.8
1288-2 (")	169	17.1 \pm 9.6
1288-5 (#7408)	54	
1288-6 (#7229)	64	24.2 \pm 4.0

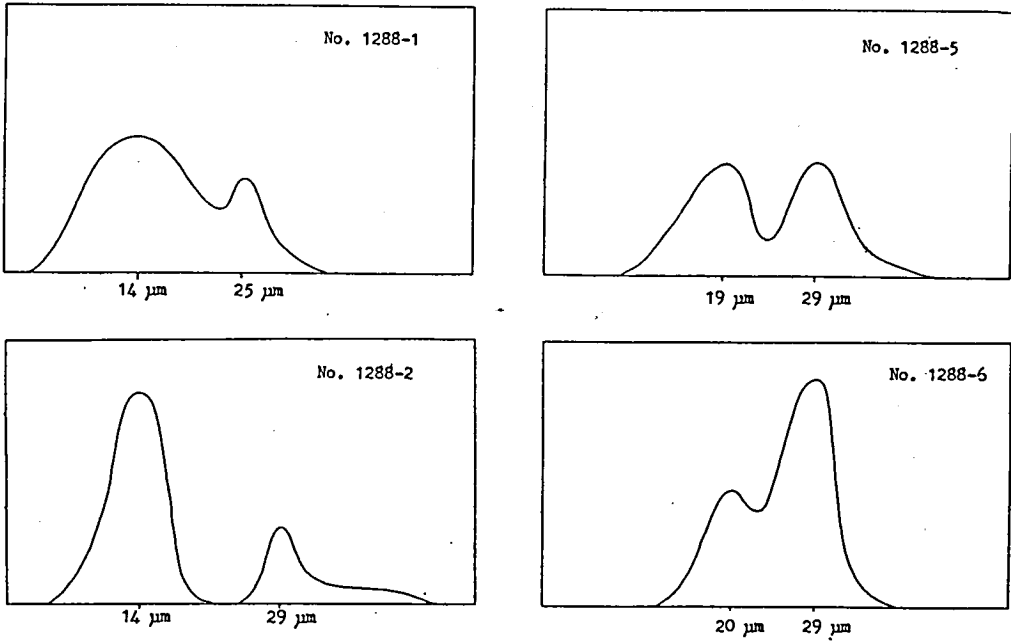


図5. 筋線維の直径と筋線維数の関係

II. F₁において出現した翼の挙上不能個体の病理組織学的検索

翼の挙上不能個体(アルビノ)2例(#7408, 7229)と対応する日齢の正常ウズラの浅胸筋を検索した。PAS反応で糖原の蓄積程度を調べたが異常は認められず、糖原病とは思われなかった。しかし、正常ウズラでは一筋線維束の周辺がPASに濃染する大型の筋線維から成り、中心部がPASに反応しない小型の筋線維で構

成されているのに対し(図4; 1, 2)、挙上不能ウズラの筋線維束ではそのような規則性はみられず筋線維はいずれも大型でPASに淡染し、横断面が円形化を示す肥大性線維と中心性の多核線維とが混在した(図4; 3, 4)。また、挙上不能ウズラでは細胞反応を伴った筋線維の壊死が散在性に認められた(図4; 5, 6)。

単位面積あたりの筋線維数とそれらの線維の平均直径を計測した結果、異常ウズラでは線維

数が正常ウズラの $\frac{1}{3}$ ~ $\frac{1}{4}$ で、平均直径は正常ウズラのそれの約1.5倍であった(表2)。また、筋線維の直径を横軸に、それぞれの個数を縦軸にとって両者の関係をヒストグラムで示すと、図5に示したように正常ウズラでは $14\mu\text{m}$ にピークを持つ2峰性のパターンを示したのに対し、挙上不能ウズラでは $19\mu\text{m}$ と $29\mu\text{m}$ あるいは $29\mu\text{m}$ にピークを持つ2峰性のパターンが得られた。

以上の所見はニワトリでみられている筋ジストロフィーのそれらに類似する点が多い。

今後、 F_1 において翼の挙上不能個体が出現した原因を解明するため以下の4項目について検索する予定である。

1. 正常系としては、AWE, AMRPおよびMWE系を、糖原病Ⅱ型系としてはRW系およびRWE系を用い、正常系と糖原病Ⅱ型系の種々の交配を行い、 F_1 における翼の挙上不能個体の出現頻度を調査するとともに、胸筋の糖原の蓄積の有無を検索し、未知の因子の存否を検索する。

2. AWE系を酸性マルターゼ活性値に関して高・低2方向に選抜し、それぞれの系統とRW系あるいはRWE系との交配を行い、 F_1 における翼の挙上不能個体の出現頻度を調査する。

3. RW系を酸性マルターゼ活性値に関して高・低2方向に選抜し、翼の挙上状態との関連を検索する。

4. 糖原病Ⅱ型系(RW, RWE)およびAWE×RWEから得られた F_1 においてみられた翼の挙上不能の原因を探索するとともに翼の挙上不能が糖原病Ⅱ型の主徴であるか否かを検索する。

文 献

- 1) 水谷 誠 : 糖原病Ⅱ型ウズラの改良、筋ジストロフィー症モデル動物の開発に関する研究。昭和60年度研究報告書。77-87。1986。
- 2) 水谷 誠 : 糖原病Ⅱ型ウズラの遺伝子分析。筋ジ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) 山本博章, 伊藤一男, 石黒誠一, 竹内栄, 竹内拓司 : 白色ウズラ色素細胞の培養。日本遺伝学会第57回大会講演要旨。
- 4) 水谷 誠 : 糖原病Ⅱ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。



図1 AWE系の雌雄



図2 AWE(♂)×RWE(♀)の交配からのF₁において出現した翼の挙上不能個体(上:♀、下:♂)

(財)実中研における、最近の筋ジストロフィー症モデル動物の維持と繁殖状況

齊藤宗雄

研究協力者 田中亨, 日置恭司

ヒト筋ジストロフィー症研究には、筋ジストロフィーマウスを始め、各種のモデル動物が使われている。

当実験動物中央研究所は、筋ジストロフィー症研究班に参画して以来、1969年には筋ジストロフィーマウス=C57BL/6-*dy*、1982年には筋ジストロフィーハムスター、1983年には筋ジストロフィーマウス=C57BL/10-*mdx*を導入し、これらを維持・繁殖し、研究班員に配布する業務を行っている。これらモデル動物は、実験動物技術の向上に伴ない、遺伝的、微生物的改良が加えられている。

ここでは、当研究所で維持・繁殖している筋ジストロフィー症モデル動物の現状を紹介し、研究者各位の参考に供したい。

1. 筋ジストロフィー症マウス: C57BL/6-*dy*

経 過

C57BL/6-*dy*マウスは、野村・江崎らにより1969年米国のJackson Labから導入されたものである。当時江崎らは卵巣移植技術等の繁殖方法を検討し、月産100匹程の繁殖コロニーを確立し、繁殖した筋ジストロフィーマウスを研究班に配布した。この業務は、1976年研究所の川崎市移転に伴ない齊藤らが担当することになった。1980年からは筋ジストロフィー研究の発展と、このモデル動物普及のために、一般への配布を
* (財)実験動物中央研究所

始めた。ほとんどの場合を一にして、微生物的にコンベンショナル(以下Convと略)であった。筋ジストロフィーマウスをSPF(Specific Pathogen free)レベルとする、いわゆる微生物的清浄化に着手した。これは、次のような手順で行なわれた。

まず、オスヘテロ(+/*dy*)とメス正常(+/+又は+/*dy*)の交配で妊娠したメスの出産直前に、無菌的帝王切開手術により胎仔を摘出し、SPFの里親マウスに里仔し育成する。育成されたメス・オスを無作為に交配し、仔に歩行異常(*dy/dy*)が生まれて来るペアを+/*dy*のペアとして継代するものである。このような、清浄化には、長期間を要したが、1983年からは、SPFのC57BL/6-*dy*が一般に配布されるようになった。

以下に、C57BL/6-*dy*の飼育・繁殖の現状を紹介する。

飼育・繁殖方法

C57BL/6-*dy*の系統維持はビニールアイソレータで、繁殖はSPF動物室で行なわれている。(写真1)

系統維持: ビニールアイソレータは、外寸120cm×60cm×50cm高の日本クレア製No.10型を用いた。飼育ケージはマウス用PPケージ(175×245×125mm日本クレア製)を用い、床敷には電気カンナクズを用いた。飼料は7線

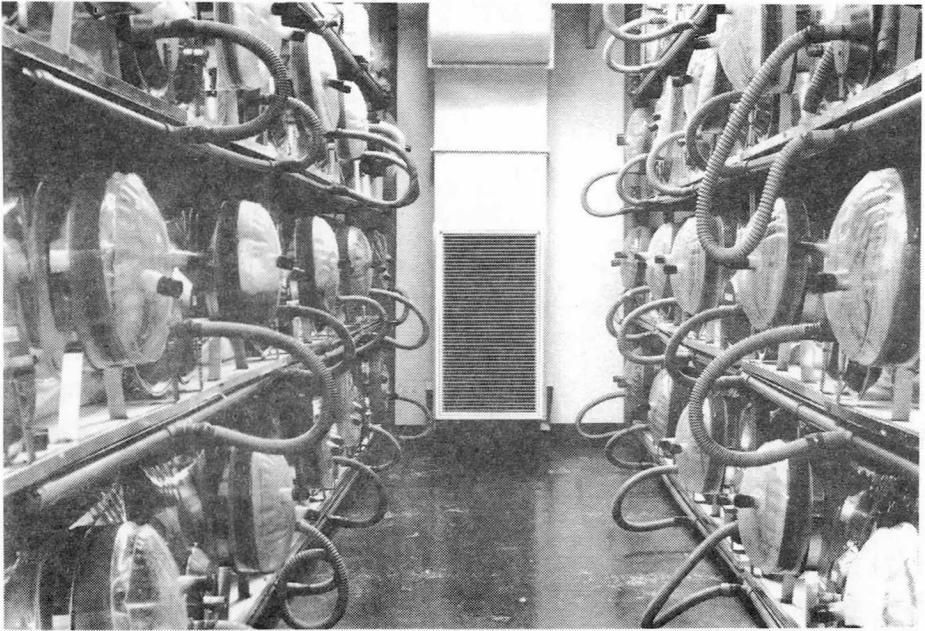


写真 1. ビニールアイソレータ飼育室

3 Mrad 照射滅菌済固型飼料（日本クリア製 CA-1）を給餌バスケットで、水は水道水を給水瓶で自由に与えた。これら飼育資材は全て（飼料は省く）アイソレータ専用滅菌缶に収容し、高圧蒸気滅菌してから搬入した。飼育操作は、従来行なわれている無菌動物飼育手技である。

世代交代は、ヘテロのメス・オス間の交配から生まれる同腹の正常仔（+/?）メス 1：オス 1 のペアで交配し、仔に歩行異常を示す個体が 1 匹でも出現すれば、そのペアを +/dy のペアとして次の世代とした。

繁殖： SPF 動物室の飼育方法は、従来の SPF 動物飼育方法に準じて行った。飼育ケージはマウス PP ケージを用い、床敷には電気コンナグズを用いた。飼料は γ 線 3 Mrad 照射滅菌済 CA-1 を給餌バスケットで、水は水道水を給水瓶で自由給与した。また、これら飼育資材は高圧蒸気滅菌してから用いた。なお、飼育者

の動物室へはいる時は必ず滅菌した無菌作業衣を着用した。シャワー浴は行なわなかった。動物室の環境は、温度 $23 \pm 2^\circ\text{C}$ 、湿度 50~60%、換気は新鮮外気を 2/3 導入した 15 回/時とした、照明時間は、1 2 時間明 1 2 時間暗に調節した。

繁殖方法は、コロニーをヘテロ確認群と繁殖群とに別け、ヘテロ確認群は、系統維持群から導入されるメス・オス（+/?）を無作為に 1：1 のペアとし、仔に歩行異常が出現するか否かで、+/dy のペアを選び、+/dy のメス・オスを繁殖群に移すものである。繁殖群は導入される +/dy メス・オスを用いて、いわゆる妊娠分離法による繁殖を行った。それは、オスのケージに複数のメスを同居させておき、腹部が膨らんだ妊娠メスを個別ケージに移し、出産・哺育させ、哺育仔は約 3 週齢で離乳し、メス親は再び元のオスと同居させる方法である。この方法は、メスのオスとの同居を計画的・定期的に行

なうことにより、出生日のある程度揃った動物を得ることが可能である。(図1)

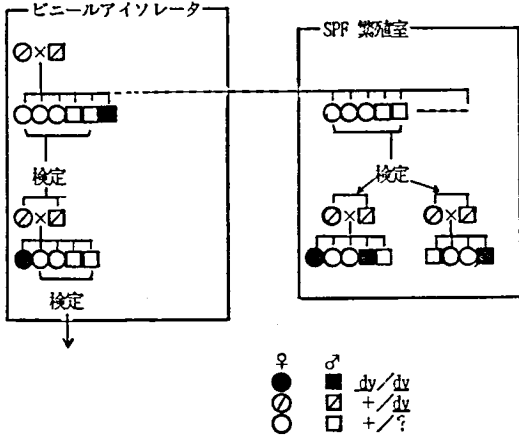


図1. C57BL/6-dy マウスの維持・生産方式

繁殖成績

C57BL/6-dyの繁殖性について、1980年当時のConvの成績と最近のSPFの成績を比較した。交配は、各々メス・オスヘテロのものである。

出産率はConv 86.8%、SPF 81.0%、平均産仔数はConv 7.2匹、SPF 6.6匹、離乳率(総dy離乳数/総産仔数×100)はConv 20.6%、SPF 17.1%で、生産指数(メス1匹から1回の交配で得られる仔数)はConv 1.3、SPF 0.9で、SPFはConvより低値であった。(表1)

一般的に清浄度の高いSPFは、低いConvに比べ繁殖性が良好であると言われている。C57-BL/6-dyの今回の成績は逆の値を示していた。これは、SPF動物室へのヒトの出入は、Conv

表1. C57BL/6-dy マウスの繁殖成績

	♀親数	出産率	平均産仔数	離乳率*	生産指数**
	匹	%	匹	%	
コンベンショナル	133	86.8	7.2	20.6	1.3
SPF	79	81.0	6.6	17.1	0.9

* 総離乳dy仔/総産仔数×100

** " / 延交配回数×100

動物室に比べ嚴重であり、dyマウス繁殖作業の極めて重要な、動物の観察作業が総体的に減り、このことが、繁殖成績に影響していると考えられる。今後、さらに検討すべき問題である。

品質検査 (モニタリング)

微生物: C57BL/6-dyの系統維持・繁殖コロニーは、当研究所微生物モニタリングセンターにおいて、血清反応8項目、培養6項目、鏡検3項目の微生物検査が定期的に行なわれて

いる。最近(1986.9)の検査では、系統維持コロニーは全項目陰性であった。しかしながら、繁殖コロニーでは、培養で*Pseudomonas aeruginosa*が検出された。

ちなみに、1980年当時(Conv)の微生物検査では Mouse adeno virus, *Pseudomonas aeruginosa*, *Giardia muris*, *Syphacia spp*らが検出されていた。(表2)

遺伝: C57BL/6-dyの系統維持コロニーは、当研究所遺伝的モニタリングセンターにお

表2. C57BL/6-dy マウス微生物検査成績

検査項目	Conv (1980)	SPF	
		アイソレータ室	生産室内
血清反応	<i>Corynebacterium Kutscheri</i>	-	-
	<i>Salmonella typhimurium</i>	-	-
	Tyzzler's organism	-	-
	<i>Mycoplasma pulmonis</i>	-	-
	Ectromelia virus	-	-
	Mouse adenovirus	+	-
	Mouse hepatitis virus	-	-
	Sendai virus	-	-
培養	<i>Escherichia coli</i>	-	-
	<i>Pasteurella pneumotropica</i>	-	-
	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	+	+
	<i>Salmonella spp</i>	-	-
	<i>Staphylococcus aureus</i>	-	-
	<i>Mycoplasma pulmonis</i>	-	-
鏡検	<i>Giardia muris</i>	+	-
	<i>Spironucleus muris</i>	-	-
	<i>Syphacia spp</i>	+	-

(実中研モニタリングセンター、微生物検査部 1986. 9)

いて、11染色体上の19 Locus の遺伝生化学的検査を定期的に行っている。最近(1986.9)の検査では、全項目ホモ型で、かつ、遺伝的背景となるC57BL/6と一致していた。従って、C57BL/6-dyは遺伝的に信頼がおけるものと思われる。(表3)

供給実績

最近のC57BL/6-dyの使用状況を知るために、当研究所における過去6ヶ年間の動物生産数ならびに供給数を調べた。動物生産数は、1981年515匹、1982年695匹、1983年785匹、1984年392匹、1985年493匹、そして1986年は140匹であった。(表4)供給数は1981年395匹、1982年408匹、1983年602匹、1984年314匹、1985年

表3. C57BL/6-dy マウスの遺伝的モニタリング成績

染色体番号及びLOCUS	C57BL/6	C57BL/6-dy
Idh-1	a	a
1 Pep-3	a	a
Akp-1	a	a
2 Hc	1	1
3 Car-2	a	a
4 Mup-1	b	b
Gpd-1	a	a
5 Pgm-1	a	a
6 Ldr-1	a	a
7 Gpi-1	b	b
Hbb	a	s
8 Es-1	a	a
Es-2	b	b
9 Thy-1	b	b
Mod-1	b	b
Trf	b	b
11 Es-3	a	a
17 H-2k	b	b
H-2D	b	b

(実中研モニタリングセンター遺伝検査部 1986. 3)

表4. C57BL/6-dy マウスの生産・供給状況

年 度	生産数	供給数
1981	515	395
1982	695	408
1983	785	602
1984	392	314
1985	493	109
1986	140	83

109匹、そして1986年は83匹であった。生産数は前年の供給実績を参考にして決められているが、生産・供給数共に1983年をピークに下降している。特に1985・1986年の供給数の低下は著しい。

これは、近年の筋ジストロフィー症研究は遺伝子DNAレベルでの研究が行なわれるようになってきていること、また、当研究所横山らの卵巣移植、体外授精技術は、発生当初からdy/dyと予測されるマウスを育成することが可能で、従来方式により繁殖されるdy/dyマウスの必要性が減少したためと思われる。

今後の方向

C57BL/6-dyは、筋ジストロフィー症研究に古くから使われているモデル動物である。常染色体上劣性遺伝子“dy”がホモ型で発現しホモ型は2~3週齢頃より歩行異常を示し、特別な飼育を行わない限り8~9週齢で死亡する。ホモ型では繁殖不能である。従って継代あるいは繁殖は、ヘテロのメス・オス間の交配により得られる仔マウスの中から、臨床的に歩行異常を示す個体を抽出するものである。抽出された異常マウスを筋ジスマウスとして実験に使用している現状である。

横山らによって研究されている卵巣移植・体外授精技術による筋ジスマウスの繁殖方法は、出産するすべての仔をホモ型とすることが可能

で、C57BL/6-dyの発症前ならびに初期の研究、あるいは、これらを用いた研究も可能となる。

私共は、今後、このような技術をC57BL/6-dyの系統維持・繁殖に応用したいと考えている。

2. 筋ジストロフィー症ハムスター

経 過

筋ジストロフィー症シリアンハムスターは、1962年Dr Humburgerらによって育成された、心筋に異常を起こすモデル動物である。

当研究班では、筋ジストロフィーハムスター-BIO14.6系、ならびにコントロールハムスター-BIOF₁B系を米国のBIO Research Consultants Inc.から輸入し、研究班員に配布する業務を1982年から1984年に行っていた。輸入できるハムスターはオスのみであったが、輸入総数は約1000匹に達した。

1982年、送られて来たBIO14.6系オスの中に2匹のメスを発見した。私共はこのメスと他のBIO14.6系オスとを基に筋ジストロフィーハムスター-MYH(BIO14.6)系の維持を始めた。一方、1982年杉田博士のはからいにより、カナダのDr Jasminから筋ジストロフィーシリアンハムスター-UM-X7.1系を導入した。

1983年、私共は、これら2つの筋ジスマスター系統の繁殖能力を検討し、出産・供給の見通しをたてた。

ここでは、MYH(BIO14.6)系UM-X7.1系の飼育・繁殖の現状を紹介する。

飼育・繁殖方法

飼育には、小動物用飼育室をあて、温度 23 ± 2℃、湿度 50 ~ 60%、換気は全新鮮外気で1時間に15回行った。照明時間は12時間明12時間暗に統御した。飼育ケージは、ラット用クリンケージ(265×425×150mm 日本クレア製)を用い、床敷には電気カンナクズを用いた。飼料は、γ線3 Mrad照射滅菌した固型飼料CA-1を給餌バスケットで、水は水道水を給水瓶で自由に与えた。特に、筋ジスハムスターにおいては、Wet-tail発症を防止するために、飲水中にフラジオマイシン2mg/l溶かして与えた。飼育資材は洗滌後、薬液噴霧消毒し、乾燥してから用いた。飼育室へのヒトの出入に当っては下足の交換を行ったが、着衣の交換は行なわなかった。微生物的にはコンベンショナルレベルの飼育である。

繁殖は、3ヶ月齢以上に達したメス1:オス1のペアとし、そのまま妊娠・出産・哺育させる方法をとった。哺育仔は3週齢で離乳した。

繁殖成績

筋ジスMYH(BIO14.6)系、UM-X7.1系の繁殖成績を正常のN:Syrian系と比較した。

出産率はMYH41.6%、UM-X7.1 37.7%であるのに対しN:Syrianは91.5%で、約30%高い値を示している。平均産仔数はMYH6.2匹、UM-X7.1 6.4匹、N:Syrian

5.9匹で差が小さかった。離乳率はMYH61.9%、UM-X7.1 73.3%であるのに対し、N:Syrianは55.7%に過ぎなかった。これらの成績を生産指数でみると、正常のN:Syrianは3.0であったが、筋ジスのMYHは1.6、UM-X7.1は1.8と約2/3の値であった。これは、出産率が低いことが影響しているものと思われる。(表5)

品質検査

微生物：維持・育成中のMYHならびにN:Syrian系については、当研究所微生物モニタリングセンターにおいて、血清反応4項目、培養8項目、検鏡2項目の微生物検査を定期的に行っている。最近(1986.9)の成績ではMYHならびにN:Syrian共に鏡検で*Spiro-nucleus muris*が検出されたが、他の項目ではすべて陰性であった。飼育室ならびに飼育方法はConvであるが、清浄度は比較的高く保たれている。

遺伝的モニタリングについては、現在、ハムスターについての方法が確立していないので、行なわなかった。(表6)

今後の方向

現在、当研究所で維持している筋ジスハムスターには、実験動物学的にみて次のような問題が残されている。その第1は、微生物的にConv

表5. 筋ジストロフィーハムスターの繁殖成績 (1985.1~12)

	交配♀数	出産率	平均産仔数	離乳率	生産指数
	匹	%	匹	%	
MYH(BIO14.6)	408	41.6	6.2	61.9	1.6
UM-X7.1	392	37.7	6.4	73.3	1.7
N:Syrian	59	91.5	5.9	55.7	3.0

表6. 筋ジストロフィーハムスターの微生物検査成績

		MYH (BIO14.6)	Control
血清反応	Sendai virus	—	—
	LCM virus	—	—
	Tyzzler's organism	—	—
	<i>Salmonella typhimurium</i>	—	—
培養	<i>Pasteurella multocida</i>	—	—
	<i>Pasteurella pneumotropica</i>	—	—
	<i>Bordetella bronchiseptica</i>	—	—
	<i>Streptococcus pneumoniae</i>	—	—
	<i>Salmonella spp</i>	—	—
	<i>Yersinia pseudotuberculosis</i>	—	—
鏡検	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	—	—
	dermatophytes	—	—
鏡検	<i>Spirochaeta muris</i>	+	+
	all ectoparasites	—	—

(実中研モニタリングセンター 微生物検査部 1986. 9)

レベルで、継代繁殖に常時フラジオマイシンを飲ませなければならないことである。その第2は、遺伝的に適切なコントロール系がないことである。従来使われているBIO F₁ B系はBIO 87.20系とBIO 1.5系間のF₁動物である。私共は、現在、筋ジス遺伝子 my を既存の系統に導入し、新しい筋ジス系統を作ると共に、既存の筋ジス系統をコントロール系として使うことを考え、新しい筋ジス系統の育成を試みている。

3. 筋ジストロフィー症マウス C57BL/10- mdx

経 過

C57BL/10- mdx は、Grahame Bulfieldらにより育成されたX染色体上の mdx 因子により、筋ジストロフィー症となるモデル動物である。当研究所は、1983年11月 Agricultural Research Council's Poultry Research

Center U.KよりC57BL/10- mdx ♀5♂5を導入した。以後、無菌動物用ビニールアイソレータ内で維持している。1983年からは研究班員に限りタネ動物の配布を行っている。

飼育・繁殖方法

C57BL/10- mdx のビニールアイソレータ内での飼育は、前述のC57BL/6- dy 系統維持に準じて行った。繁殖は、 mdx のオス(y/x^{mdx})メス(x^{mdx}/x^{mdx})共に繁殖が可能であるので通常の系統維持に準じて行った。すなわち、兄妹間ペアによる常時同居交配である。

繁殖成績

維持・継代中のC57BL/10- mdx (以下 mdx と略す)の繁殖成績を、同様な方法で維持しているC57BL/10(以下B10と略す)の成績と比較した。(表7)

平均出産回数は mdx 4.1回であるのに対し

表7. C57BL/10-*mdx* マウスの繁殖成績 (1984.1~85.1)

	♀親数	平均出産回数	平均産仔数	離乳率
	匹	回	匹	%
C57BL/10- <i>mdx</i>	6	4.1	5.6	85.0
C57BL/10	6	4.0	6.3	94.7

B10 4.0回で差がみられなかった。平均産仔数は *mdx* 5.6匹であるのに対し B10は 6.3 匹とやゝ多い値であった。離乳率は *mdx* 85.0 % であるのに対し B10は 94.7 %と、やゝ高い値であった。生産指数(メス1匹から生涯に得られる仔数)でみると *mdx* 19.5、B10 21.3で B10がやゝ高いものの差は小さかった。このように、*mdx*の繁殖性は比較的良好的なものである。

品質検査

微生物：アイソレータで系統維持している *mdx* ならびに B10 については、当研究所微生物モニタリングセンターにおいて、血清反応8項目、培養6項目、鏡検3項目の微生物検査が定期的に行なわれている。最近(1986.11)の成績をみると、B10では *Pseudomonas aeruginosa* が陽性で、*mdx* ではそのほか *Pasteurella pneumotropica* が陽性であった。このように、微生物的清浄度は比較的高く維持されているが、*P. aeruginosa* *P. pneumotropica*

表8. C57BL/10-*mdx* マウス微生物検査成績

検査項目	C57BL/10	C57BL/10- <i>mdx</i>	
血清反応	<i>Corynebacterium Kutscheri</i>	-	-
	<i>Salmonella typhimurium</i>	-	-
	Tyzzler's organism	-	-
	<i>Mycoplasma pulmonis</i>	-	-
	Ectromelia virus	-	-
	Mouse adenovirus	-	-
	Mouse hepatitis virus	-	-
Sendai virus	-	-	
培養	<i>Escherichia coli</i> 0115	-	-
	<i>Pasteurella pneumotropica</i>	-	+
	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	+	+
	<i>Salmonella spp</i>	-	-
	<i>Staphylococcus aureus</i>	-	-
鏡検	<i>Mycoplasma pulmonis</i>	-	-
	<i>Giardia muris</i>	-	-
	<i>Spironucleus muris</i>	-	-
	<i>Syphacia spp</i>	-	-

(実中研モニタリングセンター 微生物検査部 1986.11)

が陽性であるので、施設への導入に当って留意されたい。(表8)

遺伝: *mdx* ならびに B10 については、当研究所遺伝的モニタリングセンターにおいて、11染色体上の19 Locus の遺伝生化学的検査を定期的に行っている。最近(1986.3)の成績では、*mdx*, B10 共に全 Locus ホモ型で、かつ、*mdx*, B10 は一致していた。(表9)

表9. C57BL/10-*mdx* マウスの遺伝的モニタリング成績

染色体番号及びLOCUS	C57BL/10	C57BL/10- <i>mdx</i>
Idh-1	a	a
1 Pep-3	a	a
Akp-1	a	a
2 Hc	l	l
3 Car-2	a	a
4 Mup-1	b	b
Gpd-1	a	a
5 Pgm-1	a	a
6 Ldr-1	a	a
7 Gpi-1	b	b
Hbb	a	s
8 Es-1	a	a
Es-2	b	b
9 Thy-1	b	b
Mod-1	b	b
Trf	b	b
11 Es-3	a	a
17 H-2k	b	b
H-2D	b	b

(実中研モニタリングセンター遺伝検査部 1986.3)

供給実績

1984年以後、研究班員への*mdx* マウス系統分与を行っている。分与数は、1984年140匹(12件)、1985年224匹(23件)、1986年26匹(4件)で合計390匹(39件)であった。(表10) 今後多くなるものと予想される。

表10. C57BL/10-*mdx* マウスの供給実績

年度	C57BL/10- <i>mdx</i>		C57BL/10	
	匹数	件数	匹数	件数
1984	140	12	2	1
1985	224	23	49	10
1986	(26)	(4)	(32)	(4)
計	390	39	83	15

今後の方向

このように*mdx* マウスは C57BL/6-*dy* に比べ繁殖が容易であることから、扱い易い筋ジストロフィーモデル動物である。実験動物学的にみると、次のような改良点があげられる。その1は、微生物的清浄度をより高いものとする、その2は、実験用*mdx* マウス繁殖コロニーを確立し供給すること。その3は、遺伝的背景となる B10 系へ定期的な戻し交配を行うことなどである。

今後、これらの点を検討し改良する予定である。

まとめ

以上、当研究所における筋ジストロフィー症モデル動物の維持、繁殖、供給の現状をまとめた。

現在、C57BL/6-*dy* は SPF 化され清浄なマウスが維持・供給されている。筋ジストロフィーは MYH (BIO 14.6) と UM-X 7.1 の2つの系統が維持されている。C57BL/10-*mdx* はビニールアイソレータ内で系統維持され、研究班員に限りタネ動物を配布している。

今後、C57BL/6-*dy* は卵巣移植・体外授精技術での繁殖を図り、筋ジストロフィーは微生物的清浄化とコントロール系の育成を行う。そして、C57BL/10-*mdx* は供試用繁殖コロニーの確立を図るなどを行う予定である。

最後に、ヒト筋ジストロフィー症の研究は、近年遺伝子DNAを対象とするようになり、これに関連して、受精卵にDNAを注入してマウスとして育成する「Trans genic mouse : トランスジェニックマウス」の研究が行なわ

れるようになった。このような筋ジストロフィーの研究には、各種系統のいろいろな繁殖段階のマウスが必要となる。私共は、今後、このような研究の支援も行っていきたいと考えている。

昭和61年度第5班(野村班)名簿

区分	氏名	所属機関名 所在地	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
班員	勝木元也	東海大学医学部細胞生物学教室 〒213 伊勢原市望星台	0463-93-1211
	高松研	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
	横山峯介	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
	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 山梨県北巨摩郡小淵沢町上笹尾	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