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62年度研究報告書

昭和 63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3年目の報告であります。

モデル動物の開発は、自然発生の異常形質の発見、特性の分析、遺伝的背景 の均一化など、極めて長い年月を必要としております。しかし、最近では分子 生物学の発展により、従来の実験動物技術と組合せた発生工学的手法を用いて、 積極的にモデル動物を作出する研究も行われるようになりました。

本研究班は、従来技術によるモデル動物の開発、改良、特性の分析を行うと 共に、新しい技術によるモデル動物の開発技術の研究も行いました。その結果、 新しい手法による筋ジストロフィー症モデル動物を作出する可能性が示唆され ております。これら、昭和62年度の班員各位の研究成果をここにまとめました。

今後とも、私どもは筋ジストロフィー症研究をすすめるため、より良いモデ ル動物の開発改良に努力いたしますので、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 ィー協会の方々に心から感謝いたします。

昭和63年3月

野村達次

筋ジストロフィー症モデル動物の開発に関する研究	総括概要(3年間)	間)	•••••	•••••	••••••	• 1
		野	村	達	次	
筋ジストロフィー症に関する文献調査 (1987) …	•••••				••••	- 5
		野	村	達	次	
神経原性病変とミトコンドリア電子伝達系の異常・		•••••				• 13
		埜	中	征	哉	
	研究協力者	大	滝	悦	生	
		古	賀	靖	敏	
遺伝子導入によるヒト疾患モデルの作成	••••••	•••••			•••••	· 27
		勝	木	元	也	
筋ジストロフィー(C57BL/6-dy)マウスの計画4		×1. –				
	E座への体外文棛	伝の	応用	•••	•••••	• 35
	E産への体外受精	医の横	の応用 山	… 峯	······	• 35
	E産への体外受精 研究協力者	法の横日	の応用 山 置	… 峯 恭	介 司	• 35
	正産への体外受精研究協力者	法横日塩	NC用 山 置 野	… 峯 恭 博	介 司 子	· 35
	正産への体外受精研究協力者	法横日塩長	NCH 山置野 い	: 峯 恭 博 孝	介 司 子 徳	• 35
	E 産 への 体外 交 稍 研究協力者	法横日塩長遠	NC山置野川藤 谷藤	·· 峯 恭 博 孝 幸	介司 子 徳 夫	• 35
<i>mdx</i> マウスのDMD遺伝子について	正産への体外受精研究協力者	法横日塩長遠	NC山 置野川 藤	峯 恭 博 孝 幸	介司 子 徳 夫	· 35 · 39
mdx マウスのDMD遺伝子について	王産への体外受精 研究協力者	法横日塩長遠 高	応山置野川藤 松	峯 恭 博 孝 幸	介司子徳夫 研	· 35 · 39
<i>mdx</i> マウスのDMD遺伝子について	E産への体外受精 研究協力者 研究協力者	法 横 日 塩 長 遠 … 高 塚	応山置野川藤 松田	峯 恭 博 孝 幸 裕	介司子徳夫 研三	· 35 · 39
<i>mdx</i> マウスのDMD遺伝子について	E座への体外受精 研究協力者 研究協力者 と再生	法 横 日 塩 長 遠 … 高 塚	应山置野川藤 松田	·· 峯 恭 博 孝 幸 ·· · · 裕	介司子徳夫 研三	· 35 · 39 · 47
mdx マウスのDMD遺伝子について 筋ジストロフィーマウス (mdx) 骨格筋線維の壊死	E 座 への 体外 受 稍 研究協力者 研究協力者 と再生	法 借 垖 塩 良 遠 一 高 塚 … 菊	应山置野川藤 松田 池	峯恭博孝幸 裕 建	介司子徳夫 研三 機	· 35 · 39 · 47
mdx マウスのDMD遺伝子について 筋ジストロフィーマウス (mdx) 骨格筋線維の壊死	E 産 への体外受 補 研究協力者 研究協力者 と再生 研究協力者 研究協力者	法横日塩長遠 高塚 菊守	应山置野川藤 松田 池屋	峯恭博孝幸 裕 建弘	介司子徳夫 研三 機美	· 35 · 39 · 47

目

次

富田 武 研究協力者 山 崎 一 斗 榊原朱実 向山昌邦 池 建 機 菊 三 池 輝 久 研究協力者 鳴 神 浩 吉 岡 毅 ミエリン形成異常ウズラについて ……………………………………………………………………………… 91 水谷 詙 研究協力者 布 谷 鉄 夫 C 57 B L/6-dy 生産方法の改良 - ビニールアイソタータを用いた卵巣移植の試み ………… 99 斉藤宗雄

研究協力者 江 袋 進

日置恭司

筋ジストロフィー症モデル動物の開発に関する研究 総括概要(3年間)

1. 3年間の研究班の研究目標とその成果

本研究班は神経疾患ならびに筋ジストロフィ ー症モデル動物の①維持・生産、②開発・改良、 ③新しい胚操作技術によるモデル動物の開発を 分担研究目標とした。

① モデル動物の維持・生産

研究目標

筋ジストロフィー症(筋ジス)研究に汎用される、筋ジスマウスC57BL/6-dy系、C57
BL/10-mdx系、筋ジスハムスター、BIO-14.6系、UM-X7.1系ならびに筋ジスニワトリNH-412系、NH-413系を維持・生産し、
班員あるいは一般研究者に配布する、と共に維持・生産方式を改良することを目標とした。

研究成果

(1) 筋ジスマウスC57BL/6-dy:1969年 より維持し、1983年SPF化を計った。今期 (昭和60~62年)は、実験用またはタネ動 物を合計約300匹供給した。維持生産方式の 改良は、SPF生産の合理化を計るため、卵巣 移植手術用アイソレータを製作し、滅菌方法、 移植技術等に工夫を加え、アイソレータ内無菌 的卵巣移植技術を確立した。また、発症前 dy ホモマウスを得るための体外受精技術の開発は 前期(昭和57~59年)の育成率(体外受精 卵を移植し産仔まで育成した率)が30%であ ったものが、技術的改良を加え、今期の育成率 は50%以上となり実用化できる見通しがたっ た。

*(財)実験動物中央研究所

主任研究者 野村 達次*

(2) 筋ジスマウスC57BL/10-mdx:1983 年イギリスから導入して以来、ビニールアイソ レータで維持し、研究班員にタネ動物を供給し ている。導入以来、60機関に約500匹のタ ネ動物を供給した。

(3) 筋ジスハムスター;1982年よりBIO-14.6 系、UM-X7.1 系を維持し、 育種学的改 良を加えている。BIO-14.6 系の筋ジス遺伝子 my を省きコントロール系の育成を試みたが、 世代と共に指標とする舌白班の発現にパラツキ がみられ育成が困難となった。そこで、 my 因 子を他の系統に導入する、新しい筋ジス系の育 成を試み、現在N3に達している。

(4) 筋ジスニワトリ; NH-413系 ならびに
 コントロールのNH-412系 を維持し、受精卵
 を研究班員に供給している。供給数は年間約
 10,000個である。なお、これらNH-413、
 NH-412は、筋ジス遺伝子 am以外の遺伝的背景も異なる。そこで、 am 因子をファイオミ種のGsN/2 系および白色レグホン種のWL-GM
 系に導入し、GsN/2-am系とWL-GH-am系
 を育成した。

② モデル動物の開発・改良

研究目標

既存の実験動物マウス、ラット、ウズラ等の 中から、新しいミュータント形質の探索、それ らの成因の解明ならびに筋ジスモデル動物につ いては形質の比較検討を行い、モデル動物とし ての評価を行うことを目標とした。

-1-

研究成果

(1) GAD(gracile axonal dystrophy) マウス;前期 CBA/Nga と RFM/Nga の交配実験F2 で発見された後肢麻痺マウス (hind limb paralyses-hlp)は、病理 組織学的検索の結果、延髄の薄束核およびそれ に続く骨髄の背索にある薄束に限局する変性病 変に起因する軸索ジストロフィー(gracil axonal dystrophy)であることが明か となった。そこでhlpマウスを改めて、GAD マウスと命名した。さらに、このマウスの病因 の解明のためC 57BL/10-mdx と組合せた複 合異常マウスの育成に着手し、N3 に達した。

(2) SRK(shaking rat kawasaki) ラット;無菌ウイスターコロニーで発見された 後肢麻痺ラットである。遺伝様式は常染色体劣 性遺伝しホモ型は生後2週齢頃から発症し、生 後3~4週齢で死亡する。病理学的検索では末 梢神経・筋肉系に発育・分化の遅れが見られる 以外異常のないことが明らかにされた。中枢神 経の形態学的検索により主病変が神経細胞の位 置異常であることが明かとなった。従って、こ のラットは筋ジストロフィーのモデルとはなり 難いが、中枢神経系の研究に有用であると思わ れる。

(3) 糖原病 II 型ウズラ;前期発見された糖原 病 II 型モデルウズラである。RW系を維持し以 下の育種学的改良を加えた。RW系は有色卵を 産卵するので、検卵容易な白色卵系へ、RW因 子を導入し RWE 系を育成した。さらに、胚操 作実験を容易とするためアルビノ形質を RWE 系に導入し RWA 系を育成した。

また、ミエリン形成異常ウズラが発見されて おり、この形質の遺伝様式は、常染色体劣性遺 伝し、ホモ型は若齢時死亡率が高く受精率も低 いことが明かとなっている。

(4) C 57BL/6-dy 及び C 57BL/10-mdx マウスの骨格筋の組織学的検討;前述の体外受 精技術により発症前の若齢 dy ホモマウスが得 られたことから、詳細な検索が可能となった。

dy、mdxマウス共に生後7~10日齢頃ま で筋線維の発育と分化は正常であったが、それ 以後に筋線維の壊死がはじまった。壊死は両者 とも全ての筋に活発にみられ、症状の少ない mdxマウスに強かった。壊死に続く再生線維は mdxに多く、dyマウスは散在性であった。筋 線維の大小不同、結合織の増生は dyマウスに 著明であったがmdxマウスでは、間質結合織の 増生はなかった。mdxマウスでは生後2~3日 以後壊死線維は減少し、再生線維で置換されて いた。両者の血管病変を検討したが、明かな差 は認められなかった。

研究目標

発展の著しいバイオテクノロジーと従来の実 験動物技術とを組合せた、新しい胚操作技術を 用いて、ヒト筋ジストロフィー症の疾患モデル 動物を開発・育成することを目標とする。

研究成果

(1) 遺伝子導入マウスの作出;遺伝子 DNA 導入技術確認のために、免疫関連遺伝子 IL-2の DNA をマウス受精卵に注入し遺伝子導入 マウスの作出を試みた。その結果、得られた遺 伝子導入マウスの中には行動異常を示すものが 出現し、これらの解析の結果、マウス個体で発 現し小脳欠損を示し、この遺伝子 DNA 導入技 術は、ほぼ確立されたものと考えられる。

(2) DMD 遺伝子の解析; ヒト DMD 変異遺伝子の一部が明かとなったので、 DMD 遺伝子

の2個所に相当する遺伝子を化学合成し、これ をプロープとしてmdxマウスの検索を行った。 mdxマウスではDMDmRNAの発現は正常マウ スに比べ10分の1程度で染色体遺伝子パター ンは検索を行った限りでは正常との間に変化を 認めることはなかった。mdxでは、DMD遺伝 子の軽度の異常が存在することが示唆された。

(3) キメラマウスによる筋ジストロフィー症 の解析:集合法によりC57BL/6-mdxとC3H/ He ならびに BALB んのキメラマウスを作出し、 組織学的検索ならびに筋力測定による症状を検 討した。組織学的にはC3H/He 系 に特異的に 反応する抗体で筋組織等を検索した結果、筋組 織は複雑にまざりあいキメラ状を呈することが 明らかとなった。筋力測定においてはキメラ個 体は正常個体に近い筋力を有することが明かと なった。

なお、新しい試みとして、ラットにおけるセ ロトニンミオパチーの筋崩壊機序の検討を行っ た。1つの簡便な動物実験系となる可能性があ る。

当該研究における未解決の問題点とその解 決の見通し

モデル動物の維持・生産;現在、維持生産されているモデル動物の、遺伝的微生物的統御は充分とは言えない。筋ジスハムスターやニワトリはコンペンショナルで、適切なコントロール系も育成されていない。引き続きこれらの改良が必要である。

② モデル動物の開発改良;前述の様にGAD マウス、SRKラット、糖原病Ⅱ型ウズラミエ リン形成異常ウズラ等が発見され、病因の解明 がなされた。しかし、モデル動物としての評価 の検討は不十分で、さらに研究を続ける必要が ある。

③ 新しい胚操作技術によるモデル動物の開発:ヒト遺伝子 DNA を注入した遺伝子導入マウスの作出は、導入技術が確認され、ヒトDMDのDNA も得られるものと思われることから、目標とする DMDのモデルマウスは胚操作により比較的早く作出されるものと期待される。

今後当該分野の研究の進め方についての意見

① モデル動物の維持・生産:筋ジストロフィー症の研究において、これらモデル動物の維持生産は不可欠である。このための経費と労力はかなりなものが必要である。一方、凍結保存技術の最近の進歩は著しいものがあり早急にとりいれるべきと考える。

② モデル動物の開発・改良;自然発症の異常動物からのモデル動物の開発は今後とも期待される分野である。常時フィールドを監視しモデルとして可能性のある異常動物を抽出・検索するシステムが国家レベルで確立されることが望まれる。

③ 新しい胚操作技術によるモデル動物の開発;ヒト筋ジストロフィー症のモデル動物の開発において、現在、最も積極的に実施すべき分野である。このためには、DNAをクローニングし解析するグループ、DNAを注入し遺伝子導入マウスを作出・育成するグループ、育成された遺伝子導入マウスを評価・検索するグループが表裏一体となって研究する必要がある。

4. 当該分野に対する国外の研究状況の概要

 モデル動物の維持・生産;1つの研究グ ループで、このように多種多様な筋ジスモデル 動物を維持しているところは、国外にない。

-3-

② モデル動物の開発・改良;アメリカの Jackson 研究所では、毎月、維持・生産コ ロニーで発見される異常動物の"市"が開かれ、 研究者は、興味のあるものを選び研究・検索し、 世界的に有用な多くのモデル動物を育成してい る。我国には、このようなシステムはない。

③ 新しい胚操作技術によるモデル動物の開発; DNA の個体レベルでの発現についての遺伝子導入動物の研究は、世界的に行われている。

しかし、この技術でモデル動物を開発し医学研 究に応用しようとするグループは国外にはない。

モデル動物の開発・研究は、基本的に対照と する病気の研究を支援するものと考える。従っ て、本研究班の継続に当たっては、筋ジス研究 者(患者を理解している医者)の監視・指導の 下に運営されるべきであると思う。

筋ジストロフィー症に関する文献調査(1987)

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」 から、海外における筋ジストロフィーに関する

関する動物実験」について、 MEDLINE に 入力された文献調査をおこなった。それらの中 ならびに「筋ジストロフィーとその近縁疾患に 文献(1987年分)を以下に紹介する。

MICE

Ariyasu, R.G., Ellisman, M.H.: The distribution of (NA+ +K+) ATPase is continuous along the axolemma of unensheathed axons from spinal roots of "dystrophic' mice. J. Neurocytol., 16(2), 239-48, 1987.

Kuhn, D.E., Logan, D.M.: Fiber-specific cholesterol changes in murine dystrophy. Biochim. Biophys. acta, 921(1), 13-24, 1987.

Moschella, M.C., Ontell, M.: Transient and chronic neonatal denervation of murine muscle: A procedure to modify the phenotypic expression of muscular dystrophy. J. Neurosci., 7(7), 2145-52, 1987.

Carnwath, J.W., Shotton, D.M.: Muscular dystrophy in the mdx mouse: Histopathology of the soleus and extensor digitorum longus muscles. J. Neurol. Sci., 80(1), 39-54, 1987.

Jackson, M.J., Edwards, R.H.: Development of changes in cation content of muscles from the 129 REJ dystrophic mosue. Comp. Biochem. Physiol (A), 87(2), 349-54, 1987.

Rabbani, N., Moses, L., Anandaraj, M.P.: Calcium-activated neutral protease and its endogenous inhibitor in tissues of dystrophic and normal mice. Biochem. Med. Metab. Biol., 37(3), 282-6, 1987.

Sugita, H., Nonaka, I.: Animal models utilized in research on muscular diseases in Japan. Prog. Clin. Biol. Res., 229, 271-86, 1987.

*(財)実験動物中央研究所

- 5 -

Heilig, R., Lemaire, C., Mandel, J.L., Dandolo, L., Amar, L., Avner, P.: Localization of the region homologous to the Duchenne muscular dystrophy locus on the mouse X chromosome. Nature, 328(6126), 168-70, 1987.

Brockdorff, N., Cross, G.S., Cavanna, J.S., Fisher, E.M., Lyon, M.F., Davies, K.E., Brown, S.D.: Nature, 328(6126), 166-8, 1987.

Kominami, E/. Kunio, I., Katunuma, N.: Activation of the intramyofibral autophagic-lysosomal system in muscular dystrophy. Am. J. Pathol., 127(3), 461-6, 1987.

Tremblay, J.P., Gregoire, L., Sasseville, R., Belhumeur, C.: Repeated stimulation of the dystrophic mouse neuromuscular junctions. Muscle Nerve, 10(4), 303-11, 1987.

Entrikin, R.K., Abresch, R.T., Sharman, R.B., Larson, D.B., Levine, N.A.: Contractile and EMG studies of murine myotonia (MTO) and muscular dystrophy (dy/dy). Muscle Nerve, 10(4), 293-8, 1987.

Kunkel, L.M., Monaco, A.P., Bertelson, C.J., Colletti, C.A.: Molecular genetics of Duchenne muscular dystrophy. Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol., 51(Pt. 1), 349-51, 1986.

Davis, H.L.: Sciatic nerve protein composition in normal and dystrophic C57BL/6J mice. Neurosci. Lett., 75(1), 95-100, 1987.

Clow, D.W., Boegman, R.J.: Effect of denervation on adenine nucleotides in skeletal muscle from normal and dystrophic mice. Exp. Neurol., 96(2), 334-43, 1987.

Lucas-Heron, B., Loirat, M.J., Ollivier, B., Leoty, C.: Calcium-related defects in cardiac and skeletal muscles of dystrophic mice. Comp. Biochem. Physiol. (B), 86(2), 295-301, 1987.

Kirkeby, S., Moe, D.: Esterase in normal and dystrophic muscle. Cell Mol. Biol., 33(1), 101-9, 1987.

Gopalan, P., Dufresne, M.J., Warner, A.H.: Thiol protease and cathepsin D activities in selected tissues and cultured cells from normal and dystrophic mice. Can. J. Physiol. Pharmacol., 65(2), 124-9, 1987.

Torres, L.F., Duchen, L.W.: The mutant mdx: Inherited myopathy in the mouse. Morphological studies of nerves, muscles and end-plates. Brain, 110(Pt. 2), 269-99, 1987.

Thakur, M., Sebag, M., Srivastava, U.: Biochemical changes in progressive muscular dystrophy. XII. Cyclic nucleotides in lymphoid and nonlymphoid organs of dystrophic mice. Biochem. Cell Biol., 64(12), 1339-48, 1986.

Avner, P., Amar, L., Arnaud, D., Hanauer, A., Cambrou, J.: Detailed ordering of markers localizing to the XQ26-XQter region of the human X chromosome by the use of an interspecific mus spretus mouse cross. Proc. Natl. Acad. Sci., USA, 84(6), 1629-33, 1987.

Milner, T.E., Hoffer, J.A.: Long-term peripheral nerve and muscle recordings from normal and dystrophic mice. J. Neurosci. Methods, 19(1), 37-45, 1987.

Vilmann, H., Kirkeby, S.: Histomorphometry of masticatory muscles in the muscular dystrophic mouse. Acta Anat. (Basel), 127(4), 303-7, 1986.

Kelly, S.S., Morgan, G.P., Smith, J.W.: The origin of (+)-tubocurarine in dystrophic mice. Br. J. Pharmacol., 89(1), 47-53, 1986.

Gopalan, P., Dufresne, M.J., Warner, A.H.: Evidence for a defective thiol protease inhibitor in skeletal muscle of mice with hereditary muscular dystrophy. Biochem. Cell Biol., 64(10), 1010-9, 1986.

Senni. M.I., Eusebi, F., Coletta, M., Sommi, M., Poiana, G., Molinaro, M., Cossu, G.: A muscle cell line from dystrophic mice expressing an altered phenotype in vitro. Differentiation, 32(2), 181-4, 1986.

Dangain, J., Pette, D., Vrbova, G.: Developmental changes in succinate dehydrogenase activity in muscle fibers from normal and dystrophic mice. Exp. Neurol., 95(1), 224-34, 1987.

Karpati, G., Carpenter, S.: Small-caliber skeletal muscle fibers do not suffer deleterious consequences of dystrophic gene 'expression. Am. J. Med. Genet., 25(4), 653-8, 1986. Peterson, E.R., Masurovsky, E.B., Spiro, A.J., Crain, S.M.: Duchenne dystrophic muscle develops lesions in long-term coculture with mouse spinal cord. Muscle Nerve, 9(9), 787-808, 1986.

Desautels, M., Dulos, R.A.: Unchanged nonshivering thermogenic capacity of dystrophic mice. Metabolism, 35(12), 1106-9, 1986.

Dangain, J., Vrbova, G.: Response of normal and dystrophic muscles to increased functional demand. Exp. Neurol., 94(3), 796-801, 1986.

Meiri, H., Weiss, Y., Lallkin, A., Collins, I.: Distribution and possible abnormality in antigenic composition of sodium channels in peripheral axons of dystrophic mice. Brain Res., 384(2), 355-61, 1986.

Rabinowitz, J.L., Cossu, G.: Alterations of lipid composition in a dystrophic muscle cell line. Biochim. Biophys. Acta, 879(3), 394-8, 1986.

Liang, R.C.: Studies on mitochondria from dystrophic skeletal muscle of mice. Biochem. Med. Metab. Biol., 36(2), 172-8, 1986.

Ovalle, W.K., Dow, P.R.: Alterations in muscle spindle morphology in advanced stages of murine muscular dystrophy. Anat. Rec., 216(2), 111-26, 1986.

Yang-Feng, T.L., Degennard, L.J., Francke, U.: Genes for synapsin I, a neuronal phosphoprotein, map to conserved regions of human and murine X chromosomes. Proc. Natl. Acad. Sci., USA, 83(22), 8679-83, 1986.

Cossu, G., Senni, N.I., Eusebi, F., Giacomoni, D., Molinaro, M.: Effect of phorbol esters and liposome-delivered phospholipids on the differentiation program of normal and dystrophic satellite cells. Dev. Biol., 118(1), 182-9, 1986.

Hargroder, G.T., Talmadge, R.J., Silverman, H.: Age-related changes in oxidative capacity of the gastrocnemius muscle in normal and dystrophyic (dy2J/dy2J) mice. Exp. Neurol., 94(2), 400-15, 1986.

RATS

Lotz, B.P., Engel, A.G.: Are hypercontracted muscle fibers artifacts and do they cause rupture of the plasma membrane? Neurology, 37(9), 1466-75, 1987.

Yoshimura, T., Schotland, D.L.: Freeze fracture analysis of muscle plasma membrane in bupivacaine HCl-induced degeneration and regeneration. J. Neuropathol. Exp. Neurol., 46(5), 522-32, 1987.

Askanas, V., Martinuzzi, A., Engel, W.K., Kobayashi, T., Stern, L.Z., Hsu, J.D.: Accumulation of CK-MM is impaired in innervated and contracting cultured muscle fibers of Duchanne muscular dystrophy patients. Life Sci., 41(8), 927-33, 1987.

Martonosi, A., Dux, L., Taylor, K.A., Ting-Beall, H.P., Varga, S., Csermely, P., Mullner, N., Papp, S., Jona, I.: Structure of CA2+-ATPase in sarcoplasmic reticulum. Soc. Gen. Physiol. Ser., 41, 257-86, 1987.

Baker, J.H., Margolis, R.N.: Calcium-activated protease activity in tenotomized muscle. Muscle Nerve, 10(1), 34-40, 1987.

Sperelakis, N., Clouva-Molyvdas, P., Forbes, M.S., alleva, F.R., Balazs, T.: 6-mercaptopurine treatment affects the membrane potentials of rat skeletal muscle fibers. Toxicol. Ind. Health, 2(2), 81-97, 1986.

Infante, J.P.: De novo SN-glycerol-3-phosphorylcholine synthetase activity in lung and muscle and its subcellular location. Mol. Cell Biochem., 71(2), 135-7, 1986.

HAMSTERS

Burbach, J.A.: Ultrastructure of cardiocyte degeneration and myocardial calcification in the dystrophic hamster. Am. J. Anat., 179(3), 291-307, 1987.

Burbach, J.A., Schlenker, E.H., Johnson, J.L.: Morphometry, histochemistry, and contractility of dystrophic hamster diaphragm. Am. J. Physiol., 253(2, Pt. 2), R275-84, 1987. Shen, D.G., Araki, M., Higuchi, I., Matsumoto, K., Tamai, M. Liu, K.T., Sugita, H.: The effect of DDB on dystrophic hamsters: An invivo and in vitro study. Muscle Nerve, 10(5), 391-6, 1987.

Howlett, S.E., Gordon, T.: Calcium channels in normal and dystrophic hamster cardiac muscle. (3H) nitrendipine binding studies. Biochem. Pharmacol., 36(16), 2653-9, 1987.

Klamut, H.J., Kotarba, J.A., Strickland, K.P.: Calmodulin levels in developing muscle tissues and primary cultures of normal and dystrophic (UM-X7.1) hamsters. Muscle Nerve, 10(1), 69-76, 1987.

Watson-Wright, W.M., Wilkinson, M.: Beta-adrenergic ((3H) cgp-12177) receptors are elevated in slices of soleus muscle from CHE 147 dystrophic hamsters. Life Sci., 40(12), 1171-7, 1987.

Bhattacharya, S.K., Crawford, A.J., Pate, J.W.: Electrocardiographic, biochemical, and morphologic abnormalities in dystrophic hamsters with cardiomyopathy. Muscle Nerve, 10(2), 168-76, 1987.

Mardini, I.A., Schlenker, E.H., Burbach, J.A.: Effects of dystrophy and age on hamster tracheal smooth muscle function. Respir. Physiol., 66(2), 157-70, 1986.

Crawford, A.J., Bhattacharya, S.K.: Excessive intracellular zinc accumulation in cardiac and skeletal muscles of dystrophic hamsters. Exp. Neurol., 95(2), 265-76, 1987.

Elbrink, H. Hunter, E.G.: Glucose oxidation in white adipose tissue from BIO 14.6 dystrophic hamsters. Can. J. Physiol. Pharmacol., 64(10), 1321-4, 1986.

Karpati, G., Carpenter, S.: Small-caliber skeletal muscle fibers do not suffer deleterious consequences of dystrophic gene expression. Am. J. Med. Genet., 25(4), 653-8, 1986.

Hulsebos, T., Wieringa, B., Hochstenbach, R., Smeets, D., Schepens, J., Oerlemans, F., Zimmer, J., Ropers, H.H.: Toward early diagnosis of myotonic dystrophy: Construction and characterization of a somatic cell hybrid with a single human der (19) chromosome. Cytogenet. Cell Genet., 43(1-2), 47-56, 1986. Desautels, M., Dulos, R.A., Yuen, H.M.: Effects of fasting and food restriction on brown adipose tissue composition in normal and dystrophic hamsters. Can. J. Physiol. Pharmacol., 64(7), 970-5, 1986.

Klamut, H.J., Lin, C.H., Strickland, K.P.: Normal and dystrophic hamster myoblast and fibroblast growth in culture. Muscle Nerve, 9(7), 597-605, 1986.

CHICKENS

Maeda, Y., Hayashi, K., Mizutani, M., Hashiguchi, T.: Fractional rates of muscle protein synthesis and degradation in chickens with genetic muscular dystrophy. Poult. Sci., 66(4), 757-9, 1987.

Sugita, H., Nonaka, I.: Animal models utilized in research on muscular diseases in Japan. Prog. Clin. Biol. Res., 229, 271-86, 1987.

Hironaka, T., Ikari, Y.: Dystrophic symptoms prevented by phenobarbital in avian muscular dystrophy. Neurosci. Res., 4(4), 337-41, 1987.

Obinata, T., Shinbo, K.: Slow-type C-protein in dystrophic chicken fast pectoralis muscle. Muscle Nerve, 10(4), 351-8, 1987.

Kunkel, L.M., Monaco, A.P., Bertelson, C.J., Colletti, C.A.: Molecular genetics of Duchenne muscular dystrophy. Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol., 51(Pt. 1), 349-51, 1986.

Narayama, P.A., Brey, W.W., Kulkarni, M.V., Misra, L.K.: In vivo proton spin-lattice relaxation times of normal and dystrophic muscles. Magn. Reson. Med., 4(2), 153-61, 1987.

Barnard, E.a., Barnard, P.J., Jarvis, J.C., Lai, J.: Low frequency chronic electrical stimulation of normal and dystrophic chicken muscle. J. Physiol. (Lond), 376, 377-409, 1986.

Ashmore, C.R., Summers, P.J., Lee, Y.B.: Proteolytic enzyme activities and onset of muscular dystrophy in the chick. Exp. Neurol., 94(3), 585-97, 1986.

Howlett, S.E., Hoekman, T.B.: Electrophysiologic differences between normal and dystrophic avian muscle. Exp. Neurol., 94(2), 416-25, 1986.

Walter, R.J., Hyun, J.: Increased viability and differentiation of normal and dystrophic striated muscle in vitro. In Vitro Cell Dev. Biol., 22(9), 535-41, 1986.

Cauwenbergs, P., Butler, J., Cosmos, E.: Impaired muscle-nerve interaction (motility) characterizes the brachial region of dystrophic embryos. Exp. Neurol., 94(1), 41-53, 1986.

OTHERS

Jamison, J.M., Baird, J.D., Smith-Maxie, L.L., Hulland, T.J.: A congenital form of myotonia with dystrophic changes in a Quarterhorse. Equine Vet. J., 19(4), 353-8, 1987.

Goedegebuure, S.A.: Spontaneous primary myopathies in domestic mammals: A review. Vet. Q., 9(2), 155-71, 1987.

Elbrink, J., Malhotra, S.K., Hunter, E.G.: Duchenne muscular dystrophy: Assessment of experimental data from animals in relation to the human diseases. Med. Hypotheses, 23(2), 131-6, 1987.

Richards, R.B., Passmore, I.K., Bretag, A.H., Kakulas, B.A., Mcquarde, N.C.: Ovine congenital progressive muscular dystrophy: Clinical syndrome and distribution of lesions. Aust. Vet. J., 63(12), 396-401, 1986.

Valentine, B.A., Cooper, B.J., Cummings, J.f., Delahunta, A.: Progressive muscular dystrophy in a golden retriever dog: Light microscope and ultrastructural features at 4 and 8 months. Acta Neuropathol. (Berl), 71(3-4), 301-10, 1986.

Gopalakrishnakone, P.: Muscular dystrophy in white pekin ducks. Am. J. Pathol., 125(1), 218-9, 1986. 神経原性病変とミトコンドリア電子伝達系の異常

<はじめに>

乳児脊髄性筋萎縮症 infantile spinal muscular atrophy の重症型に分類され るWerdnig-Hoffmann 病は、神経原性疾患 の中で代表的疾患として知られている。その臨 床像は、生後3ヵ月以内に筋緊張低下、哺乳力 低下で発症しさらに筋力低下を伴い1歳未満で 多くは死亡する予後不良の疾患である。病理学 的には脊髄前角細胞の変性、脱落がみられ骨格 筋は、群萎縮と呼ばれる著名な神経原性萎縮所 見を示す(図1)。

最近、我々は、Werdnig-Hoffmann 病 の生検骨格筋で脂肪滴を選択的に染色する oil red 0 染色で筋線維細胞内に著明な脂肪滴を 認め(図2)またミトコンドリア電子伝達系酵 素のうちの complex № (cytochrome c oxidase)染色にて群萎縮に一致して染色性 の低下(図3)を認めた症例を経験した。1986 年、Kelleyら¹⁾は、Werdnig-Hoffmann 病で尿中に異常な量のアジビン酸、セパシン酸 等のジカルボン酸を認めミトコンドリア内の脂 肪酸代謝系路の異常を合併した症例を報告した。 これらより我々は、神経原性疾患とミトコンド リア機能異常との間には関連があるのではない かと考えその関連性を明確にするためWerdnig-Hoffmann 病の生検骨格筋そして除神経操作 を加えたラットの生検骨格筋について生化学的 病理学的検討を行ったので報告する。

<対象・方法>

対象は、Werdnig-Hoffmann病3例(症 例1. 3カ月男児、症例2. 6歳男児、症例3. 27生日女児)の生検骨格筋について筋病理検 索、ミトコンドリア電子伝達系酵素を測定した。

またラットでは SPF-Wistar 系、雄、体 重180~200g、18匹を用いてエーテル麻酔 下で右股関節のレベルで坐骨神経を1cm切除し、 左側を対照とした。切除後1週、2週、3週後 にエーテル麻酔下にて左右の赤筋主体のヒラメ筋 (SOL)、白筋主体の長指伸筋(EDL)を起始 部から終始部まで摘出した。それぞれ重量測定 したのち筋病理用とミトコンドリア分離用の2 つに分けた。

筋病理では生検筋をコルク片の上に筋線維の 方向が垂直になるようにトラガカントゴムで固 定し、液体窒素中で冷却したイソペンタン中で 急速凍結固定した²⁾。なおラットではヒラメ筋 の左右を並置し(side by side)、同時に 固定した。長指伸筋も同様に固定した。凍結し た標本は、厚さ10 μ で連続凍結切片を作製し、 Haematoxytin and eosin(HE),modified Gomori trichrome, NADH-TR, SDH, cytochrome c oxidase(cco) の各染色を行った²⁾。

生化学では Bookelman らの方法³⁾ に従っ て生検節よりミトコンドリアを分離し NADHcytochrome c reductase(NCCR),

*国立精神神経センター 神経研究所 微細構造部

succinate-cytochrome c reductase (SCCR)は、Macklerの方法⁴⁾、 ccoは、 Orii の方法⁵⁾に従って分光光度計(日立320 形)を用いて測定した。なおNCCR 測定では ロテノン感受性をも検索した。蛋白測定は、 Lowry らの方法⁶⁾に従った。対照側と除神経 側の比較検討は、Student's t testsを 用いた。

<結 . 果>

(1) Werdnig-Hoffmann病の3例について cco活性を測定した。症例1、症例2は、 コントロールに対して22%、15%と低下を示したが症例3の27生日女児では低下は認めなかった(表1)。cco染色についても同様に症例1、症例2では対照と比較して染色性の低下が認められた。

			activity { nmoles/min/mg protein		
case 1	3m	M	60.2 (22%)		
case 2	6 y	M	40.0 (15%)		
case 3	27d	F	212.6 (79%)		
control			270.7 ± 133.0		

表 1. Werdnig-Hoffmann 病 3 例の CCO 活性

(2) ラットについて (N=18)

筋重量については除神経1週後では対照側と 比較してSOL, EDLともに有意差は認めなか った。2週、3週後は明らかな有意差(P=0) を認めた。ミトコンドリア分離に用いた筋の湿 重量あたりの蛋白濃度については、対照側と比 較してSOL, EDLともに1週、2週、3週す べて有意差は得られなかった。

生化学的検索ではNCCR は、すべてロテノン感受性を示し、除神経後第2週の SOL にお

いてのみ対照と比較して有意に低かった (P< 0.005)。 SCCRでは SOL, EDL ともに 1、 2、3週すべて有意差は認められなかった。

cco活性値ではSOL, EDL ともに1、2、
3週すべてが対照と比較して有意に低かった
(P<0.05)(表2)。除神経後、第1週の対

表 2. 除神経後 の cco 活性(経時的変化)



照側EDLのCCO活性値は、 2289.4±548.0 nmoles/min/mg protein であり除神経 側EDLのCCO活性値は、1133.7±546.8 nmoles/min/mg protein で、対照に比 較して低値であった(P<0.005)。同じく第1 週の対照側SOLのCCO活性値は、2326.5± 1058.9 nmoles/min/mg protein で、 除神経側は、1435.5±760.5 nmoles/min/ mg proteinであり有意に低かった(P< 0.05)。除神経後、第2週のEDLでは対照側、 除神経側、それぞれ2326.5 + 1058.9 nmoles/ min/mg protein、1203.4±506.5 nmoles/ min/mg proteinであり除神経側が有意に 低かった(P<0.05)。同様に第2週の SOL では対照側、除神経側、それぞれ2832.9+ 1072.4 nmoles/min/mg protein 、 863.5±491.7 nmoles/min/mg protein であり除神経側が有意に低かった(P<0.005)。 第3週のEDLでも2320.6±896.4 nmoles/ min/mg protein 、1089.3±549.8 nmoles/min/mg protein であり除神経 側が有意に低かった(P<0.05)。第3週のSOL も同様で2928.0±837.8 nmoles/min/mg protein 、1054.4±664.9 nmoles/min/ mg protein で除神経側が有意に低かった (P<0.05)。

筋病理では除神経後第1週より対照側に比較 してSOL, EDLともに筋線維萎縮が認められ CCO 染色にて除神経側が軽度ではあるが染色 性の低下が認められた(図4)。第2週でも SOL, EDLともに対照側に比較して染色性の 低下が著明であった(図5)。第3週にても SOL, EDLともに対照側に比較して染色性の 低下が著明であった(図6、図7)。なお図4、 5、6は、ヒラメ筋であり図7は、長指伸筋を 示す。またNADH-TR, SDH染色では SOL, EDL ともに1週、2週、3週すべて対照側に 比較して染色性の低下は認められなかった。

<考察>

Werdnig-Hoffmann病(W-H病)は、 病理学的には脊髄前角細胞の変性と脱落を主病 変とする考えが一般に知られているが前根が一 次病変で前角が二次的に障害されたとする意見 もある⁷⁾。またこれは、新生児ラットの腰部神 経叢を絹糸で結紮し1~2ヵ月後、長指伸筋お よびヒラメ筋にてW-H病の筋病理所見である large group atrophy を認めたことによ り前角細胞のみならずそれ以下の末梢神経の障 害でも W-H病と同じ病理像を認めることが証 明された⁸⁾。

今回、我々は、W-H病3例について cco 活性を測定したが症例1(3ヵ月男児)および 症例2(6歳男児)では、それぞれ正常コント ロール値の22%、15%の活性を示したにす ぎなかった。症例3(27生日女児)は、79 %であり低下は認められず症例を増やして検討 すれば加齢と病態進行度と CCO 活性について 関連性が認められると思われる。症例2は、長 期にわたり人工呼吸器を使用され筋病理学的に はW-H病の病像で筋線維内に著明な脂肪滴を 認めた例で尿中ジカルボン酸は、測定していな いが(筋カルニチンは測定予定)ミトコンドリ ア機能に何らかの障害があると考えられる。一 方、同例では CCO 活性は、著明な低下を認め たが同じ電子伝達系酵素であるNCCR, SCCR については対照と比較して低下は認められなか った。また同じくNADHおよびSDH染色につ いてもそれらの染色性の低下は認められなかっ た。最近、我々は、筋原性疾患として代表的な 福山型筋ジストロフィーにても cco 活性が正 常対照との活性比が15%、22%と著明に低 下していた2例を経験した。おそらく神経原性 疾患のみならず筋原性疾患の中の重症例には cco 活性が低下している症例が隠れていると 思われる。

また我々は、成熟ラットを用いて坐骨神経切除して神経原性病変(筋線維萎縮)を示した EDL, SOLについて cco 活性が低下するこ とを証明した。Kriegler ら⁹⁾は、ラット腓 腹筋を用いて持続的運動負荷または下肢固定を 行うことによりミトコンドリア呼吸能は変動す ると報告している。また Nemeth ら¹⁰⁾は、モ

ルモットを用いて除神経を行った2週後よりヒ ラメ筋で CCO 活性が対照に比較して低下した と報告している。以上より除神経病態がミトコ ンドリア電子伝達系酵素 cco 活性に対して何 らかの影響を与えるのは事実と考えられる。今 回、我々の実験結果からは他のミトコドリア電 子伝達系酵素NCCR, SCCR については除神 経後2週間めのSOLのNCCRが有意に低下し たのみで他はすべて有意差は得られなかった。 一方 Nemeth $ら^{10}$ は、モルモットでは CCO 活性同様にSDH活性も対照と比較して低下が みられたといい、また Joffe 6^{11} は、ラット を用いて除神経された腓腹筋、前胫骨筋、腓骨 筋等を4週後に同時に CCO 活性測定したとこ ろ cco 活性は、対照と比較して低下は明らか でなかったと報告している。Nemeth らは、モ ルモットの腓腹筋を用い、Joffe らは、我々 と同じ Wistar 系ラットを用いたが赤筋と白 筋を分けることなく同時に一緒に活性測定した ためか明らかな原因はわからないが我々と同一 の結果は得られなかった。我々の組織化学標本 は除神経側と対照側の筋を並置し、連続凍結切 片標本を作製し染色を行ったので全く同一の条 件下で比較できたが3週までのNADH, SDH 染色は、 cco 染色の結果と異なり対照と比較 して染色性の低下は認められなかった。NCCR, SCCR, NADH 染色、SDH 染色については経 過観察期間をさらに延長して検討する必要性が あると思われるが SOL, EDL については除神 経側の筋線維萎縮がさらに進行した場合は同一 検体で組織化学用とミトコンドリア分離用の二 つに分けて採取するのは量的に困難かと思われ る。ラットよりも大型の動物を対象として長期 にわたって実験するのが望ましいと考える。

SOLのcco 染色についてみると除神経後第

1週(図4)では除神経側の染色性の低下は軽 度だが第2週(図5)、第3週(図6)は、著 明になってくる。一方それぞれの対照と除神経 側の活性比をみると表2より60%、30%、 35%であり除神経側の cco 活性が正常対照 値の30~35%に低下すると染色性も低下す るようだ。またヒトの筋では CCO 活性低下を 示した19例について実際の活性値とその染色 性について検討したところ対照との活性比が 30%以下に低下した症例は、その染色性も対 照と比較して低下を認めた。ラットもヒトも対 照との cco 活性比が30%ほどに低下すると その染色性も低下すると考えられる。これより cco 染色の結果のみからでは活性低下の判定 には不十分であり酵素活性とともに判断すべき と思われる。また同じく表2よりSOLでは対 照側 cco 活性をみると第1週より第2週、第 3週の方がやや高値を示しているがKriegler の意見に従って考えるとこれはおそらく除神経 側の麻痺のため対照側に負荷が増加し、狭いゲ ージの中のため速筋主体の EDLより遅筋主体 のSOLのミトコンドリア機能が高められて cco 活性が高くなったのではないかと推測し た。以上のことより筋のミトコンドリア電子伝 達系酵素、 cco 活性は、二次的要因により変 動すると思われる。またミトコンドリア関連酵 素は、筋肉の活動自身により二次的酵素誘導を うける¹²⁾という意見もあり除神経状態が長期に 続く場合 cco 活性は、影響をうけやすく、神 経は、 cco 活性の調節因子の一つであると考 えた。

<枯 語>

(1) Werdnig-Hoffmann 病の中にはミ
 トコンドリア電子伝達系酵素 cytochrome

c oxidase(cco)活性が低下を示す例があ ることがわかった。

(2) ラット除神経筋で CCO 活性の低下を認 めた。

(3) cco 活性は、二次的要因により影響を うけやすく神経は、 cco 活性の調節因子の一 つであると考えた。

<文 献>

- 1) Kelley RI, Sladky JT : Dicar- 8) 埜中征哉, Chou SM : Werdnigboxylic aciduria in an infant with spinal muscular atrophy Ann Neurol 20: 734-736, 1986.
- 2) 埜中征哉 : 臨床のための筋病理入門, 筋 病理組織標本の作り方。P13-P21, 日 本医事新報社, 1987。
- 3) Bookelman H, J.M.F. Trijbels. R.C.A. Sengers et al : Measurement of Cytochromes in Human Skeletal Muscle Mitochondria, Isolated from Fresh and Frozen Stored Muscle Specimens. Biochem Med 19: 366-373, 1978.
- 4) Mackler B : Microsomal DPNH-Cytochrome c Reductase. Methods in enzymology, 10, 551-553, 1967.
- 5) Orii Y, Okuyuki K : Studies on cytochrome a, J.Biochem. 58, 6, 561-568, 1965.
- 6) Lowry OH, Rosebrough NJ, Farr

AL et al : Protein measurement with the folin phenol reagent, J Biol chem, 192. 265-275, 1951.

7) Chou SM, 埜中征哉 : Werdnig-Hoffmann 病ーその病理発生を中心とし τ-.

小児神経学の進歩, 6, 88-103, 1977.

- Hoffmann 病罹患筋の組織化学的検討-実験動物との対比を中心として一臨床神経 学, 18, 8, 491-498
- 9) Kriegler DA, Tate CA, Wood JM et al : Populations of rat skeltal muscle mitochondria after exercise and immobilization. J Appl Physiol, 48:23-28, 1980.
- 10) Nemeth PM, Mayer D, Kark RAP: Effects of denervation and simple disuse on rates of oxidation and on activities of four mitochondrial enzymes in type 1 muscle.

J Neurochem, 35, 1351-1360. 1980.

11) Joffe M, Bschons, Savage N et al : Biochemical functioning of mitochondria in normal and denervated mammalian skeletal muscle.

Muscle Nerve, 4, 514-519, 1981.

12) 古賀靖敏, 埜中征哉 : ミトコンドリア・

電子伝達系の異常一臨床面 Mecical Way, 4, 8, 60-66, 1987.



図 1. Werdnig-Hoffmann 病の 典型的群萎縮像 HE染色



図 2. 症例 2 の oil red O 染色 筋線維内に著明な脂肪滴を認める。



図 3. 症例 2 の cytochrome c oxidase(cco) 染色 群萎縮に一致して染色性の低下を認める。



図4. ラット CCO 染色 ヒラメ筋 除神経後1週 左:対照側 右:除神経側 除神経側に筋線維萎縮が認められ軽度の染色性の低下がみられる。



図 5. ラット CCO 染色 ヒラメ筋 除神経後 2 週 除神経側の染色性の低下を認める。



図 6. ラット CCO 染色 ヒラメ筋 除神経後 3週 除神経側の染色性の著明な低下を認める。



図 7. ラット CCO 染色 長指伸筋 除神経後 3週 除神経側の染色性の低下を認める。 昭和62年度厚生省研究報告書, 27-33, 1988

遺伝子導入によるヒト疾患モデルの作成

勝木元也*

(1) 要 約

*国のKUNKELらのグループによって、ヒトデ ュシエンヌ型筋ジストロフィー症(DMD)の遺伝 子が単離され、最近構造が報告された。このDMD 遺伝子を導入したトランスジェニックマウスを作成 すれば、遺伝子の機能が分かる可能性がある。 そこでDMDcDNAを*国のATCCからとりよせ、 現在トランスジェニックマウスを作成する準備 を始めた。今年度の報告には間に合わないので、 今回は他の遺伝子を導入して得られたトランス ジェニックマウスについて報告し、マウス受精 卵への遺伝子導入法が疾患モデルを作成するの に有効であることを述べる。

マウス受精卵にヒトインターロイキン2(hIL 2)遺伝子DNAを導入し、トランスジェニッ クマウスを作成した。得られた総計9匹のhIL 2遺伝子導入マウスは、生後2週間目に、これ らの子孫を含めて、すべて運動失調を示した。 その原因は、ヒトIL2が小脳で発現し、未だ 不明の機構によってリンパ球細胞が小脳へ浸潤 し、激しい細胞構築の破壊をひきおこすからで あると考えられた。この症状は導入遺伝子と100 %相関していた。

得られた9匹のマウスは、すべて染色体の異 なる場所の一箇所に、異なる数の導入遺伝子を 組み込んでいた。

(2) 研究の目的と方法

ヒトの染色体 DNA の全塩基配列の決定が具体的な実行目標として米国で始められようとし * 東海大学医学部 DNA 生物学教授

ている。そのためには、いかに速く、正確に、 而も整理された形で結果を得るかの工夫が必要 であることは述べるまでもない。この工夫こそ が、新しいバイオテクノロジーそのものを生み 出す可能性を秘めている。しかし、たとえヒト の染色体 DNA の全塩基配列の決定が成功し、 整理された形で結果を眺めることが出来たとし ても、塩基配列だけからそれらの持つ生物機能 を予測することは不可能である。 DNA の生体 での機能は、それを測定する系があって初めて 知ることが出来るからである。さまざまの遺伝 子や染色体の断片が単離され、培養系の真核細 胞へと導入され、遺伝子産物の同定や細胞の増 殖や分化に与える影響が調べられて来た。しか し、これまでに用いられた細胞はとうてい正常 とは言えず、むしろ培養の容易さによって用い られて来た面もあった。

新しいバイオテクノロジーの進歩によって、 哺乳動物胚を用いた発生工学または胚工学と呼 ばれる分野が開かれた。胚細胞や受精卵は細胞 の一種であるが、培養系の真核細胞と異なり個 体にまで発生できる潜在的能力(全能性)を持 っている。したがって、受精卵にDNAを導入 した後、個体発生を起こさせることが出来れば、 全能性を持たない細胞に対する操作とは次元の 異なる意義があると考えられる。そこで、本研 究では、哺乳動物の一種であり、実験動物とし て最もよく使われているマウスの受精卵を対象 としてヒトインターロイキン2(hIL2)遺伝 子DNAを導入することを試みた(1,2)。 マウス受精卵に導入した遺伝子 DNA は、ヒ トのゲノムから単離した hIL2 遺伝子(gIL2) と、マウスメタロチオネインI プロモーターの 下流に hIL2の構造遺伝子部分を連結したもの

(MTgIL2)とである(図1A)。

導入遺伝子は、マウスの尾の一部を切断し、 DNA を抽出した後、導入 DNA をプロープと してサザン法によってその有無を解析した。



図1, 導入遺伝子ヒトインターロイキン2(IL2)の構造A)。 ヒトゲノムIL2DNA(gIL2)およびgIL2のプロモーター部分を マウスメタロチオネインI(MT)に変換したもの(MTgIL2)。

トランスジェニックマウスのサザン法による解析結果(B)。

(3) 研究成果

 ヒトインターロイキン2(hIL2) 遺伝子 DNA 導入マウス

マウス受精卵への遺伝子導入によって得られ たgIL2導入マウスは、2匹。またMTgIL2 導入マウスは7匹であった(図1B:サザン法 による)。これらすべてのトランスジェニック マウスは、染色体の一ヵ所に多コピーの導入遺 伝子を一定方向に組込んでいた。したがって、 なかには524や692のように1,000キロベース 以上の外来遺伝子が染色体の一部となったトラ ンスジェニックマウスも含まれていた。

2) 導入遺伝子の発現

得られた総計 9匹の hIL2 遺伝子導入 マウス は、生後2週間目に、これらの子孫を含めて、 すべて運動失調を示した。また、運動失調を示 すマウスは、すべてhIL2遺伝子導入マウスで あった。そこで、運動を司どる中枢神経系であ る小脳を中心に調べた結果、正常に比べて明ら かに小脳が特異的に小さいことが認められた (図2:a;対照、b, c, d:遺伝子導入マ ウス)。組織学的な検討の結果、すべてのhIL 2遺伝子導入マウスで、生後2週間目にリンパ 球細胞の小脳への浸潤が認められ、激しい細胞 構築の破壊が認められた(図3;遺伝子導入マ ウス小脳)。これらの破壊に先だって、生後4 日目hIL2遺伝子導入マウスの小脳の周囲のク モ膜下腔にリンパ球細胞の集族が認められ、日 が経つにつれて数を増すとともに、小脳への浸 潤が認められた。この現象は極めて一定に繰り 返され、hIL2遺伝子導入マウス特有のもので あった。

その原因は、ヒト IL2 が小脳で発現し、未 だ不明の機構によってリンパ球細胞が小脳へ浸 潤し、激しい細胞構築の破壊をひきおこすから であると考えられた。この症状は導入遺伝子と 100%相関していた。そこで遺伝子の発現の確 認には、hIL2遺伝子導入マウスでは、優勢に 運動失調が認められることを標識とした。

3) 導入遺伝子の子孫への伝達の安定性

得られた9匹のhIL2遺伝子導入マウスの内 4匹のMTgIL2導入オスマウスはこう丸での IL2の発現のため、こう丸の発育不全をきた し子孫を取ることができなかった。しかし、残 りの5匹のメスマウスは、導入遺伝子を安定に メンデルの法則にしたがって子孫へと伝達し、 とくに524や692のように巨大で且つ繰り返し 構造を持つ導入遺伝子も、極めて安定に子孫へ と伝わることが証明された。また、遺伝子導入 マウス同士の交配によって得られた導入遺伝子 をホモ型にもつマウスでも、導入遺伝子は安定 に保たれていることが認められた。

さらに、前にも述べた通り、導入遺伝子の発 現は安定に子孫へと伝達されており、自然界に 存在しないヒト遺伝子あるいはヒト染色体の一 部を自身の染色体の一部にヒト遺伝子として組 み込んだマウスの系統が作成されたといえる。

このような、既知の構造である導入ヒト遺伝 子を持つマウスは、遺伝子や染色体の子孫への 伝達の安定性から考え、導入遺伝子の発現によ る疾患モデルとなり得る可能性が示唆された。

(4) 考察

マウス受精卵にヒトインターロイキン2(hIL 2)遺伝子DNAを導入し、得られたトランスジ ェニックマウスを解析した結果、総計9匹の hIL2遺伝子導入マウスは、生後2週間目に、 これらの子孫を含めて、すべて運動失調を示し た。その原因は、ヒト IL 2 が小脳で発現し、 リンパ球細胞が小脳へ浸潤し、激しい細胞構築 の破壊をひきおこすからであると考えられた。 この症状は、1種の自己免疫疾患と考えられる。 また、この症状は、導入遺伝子が認められるマ ウスでは必ず発現し、症状の認められるマウス は、必ず導入遺伝子を組み込んでいた。

得られた9匹のマウスは、すべて染色体の異 なる場所の一箇所に、異なる数の導入遺伝子を 組み込んでいた。このマウスの導入遺伝子の子 孫への伝達の安定性と、導入遺伝子の発現の安 定性とを調べた結果、非常に安定であることか ら、種を越えて、世代を越えて、外来遺伝子が 染色体上に安定化し、発現し得ることが見いだ され、疾患モデル作成の方法が示唆された。

(5) 文 献

- 1)勝木元也:発生工学実験マニュアル1-219,講談社サイエンティフィク(1987)
- 2)勝木元也 : トランスジェニックマウスに おける導入遺伝子の発現
 生化学 59, 265-278 (1987)



a :対照(C57BL/6) b,d:gIL2DNA導入マウス。
 c : MTgIL2DNA導入マウス。小脳の大きさが、トランス
 ジェニックマウスで著しく小さいことが認められる。



図 3. トランスジェニックマウスの小脳のクモ膜下腔に 認められるリンパ球の集族と、小脳へのリンパ球 細胞の浸潤(生後12日目)。

筋ジストロフィー(C57BL/6-dy)マウスの 計画生産への体外受精法の応用

愤山峯介*

研究協力者 日置恭司; 塩野博子* 長谷川孝徳; 遠藤幸夫*

はじめに

ヒトの進行性筋ジストロフィー症のモデル動動として使用される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。このような筋ジストロフィーを発症したホモ(dy/dy)マウスは、メス、オスとも交尾行動をとることができないために繁殖不能である。このため、ホモマウスを得るには、dy遺伝子をヘテロ(+/dy)で持つメスとオスを交配する方法がとられる。

しかし、ホモ個体でも生殖細胞である卵子と 精子は正常なことから、我々は体外受精によっ て受精卵を作り、これをレシピエントメスに移 植してホモ個体を得るための検討を進めてきた¹⁾²⁾ 今年度はさらに、微生物学的にきれいな*dy/dy* マウスを生産することを目的に、帝王切開の手 技を組み合せ、検討を行なった。

材料および方法

動物と飼育条件

体外受精のための精子を得るには、筋ジスト ロフィーを発症したC57BL/6-dy/dyマウスの 4ヶ月齢のオスを、卵子を得るには、C57BL/ 6-+/? マウスの4ヶ月齢のメスを使用した。 また、胚移植を行なうためのレシピエントメス と、帝王切開した摘出仔を里子するための里親 には、Jcl:MCH(ICR)マウスを用いた。

* (財)実験動物中央研究所

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±2℃、湿 度60~70%とした。ケージはポリプロピレ ン製で、床敷はカンナクズとした。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。なお、里親マウスについ ては、SPF条件下でオスと交配して妊娠を確 認したものをビニールアイソレーターに収容し、 SPF条件で飼育した。

体外受精

卵子はメスに5IUの PMSG(Pregnant mare serum gonadotropin)とhCG (human chorionic gonadotropin)
を腹腔内注射し、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、卵管膨大部に貯留している未受精卵を実 体顕微鏡下で採取した。

精子はオスを殺処分し、精巣上体尾部から採取した。これをTYHメディウム³⁾に懸濁し、1時間、37℃、5%炭酸ガス条件下でインキュベ ーションしてから媒精に供した。

媒精は卵子を含むTYHメディウムに、精子 懸濁液を添加して行ない、その6時間後に第2 極体放出と雌雄前核形成の有無をもって受精を 判定した。さらにその状態で24時間培養して 2細胞期への発生を調べた。 2 細胞期胚の移植

2細胞期へと発生した胚は、精管結紮オスと の交配で偽妊娠を誘起したレシピエントメスの 卵管に常法により移植した⁴⁾。移植胚数は片側 あたり5~8個で、合計10~16個とした。

帝王切開と里子

胚移植によって妊娠が成立したレシピエント メスは妊娠20日目(膣栓確認日を第1日とす) る)に帝王切開して胎仔を摘出し、 SPF 条件 下の里親に哺育させた。操作の手順は以下の通 りとした。すなわち、妊娠したレシピエントメ スを頸椎脱臼法によって殺処分し、ヨードチン キ槽に10秒間浸して全身を消毒した。つぎに 腹部を切開して、眼科用コッヘルを用いて子宮 頸管部と卵管との接合部をしっかりはさみ、 子宮を 取り出した。直ちに手術用アイソレーターの 薬液トラッ プに浸し、10秒間放置した。これをアイソレータ -内に入れ、眼科用ハサミと ピンセットを用い て子宮および羊膜を切開し、胎仔を摘出した。 臍帯をピンセットでつまんで止血してから切断 し、ガーゼで胎仔を摩擦して蘇生させた。完全 に蘇生させた胎仔は、あらかじめ準備しておい た里親のアイソレーターに移し、哺育させた。

結果および考察

体外受精成績

筋ジストロフィーを発症したC57BL/6-dy/ dy の精子とC57BL/6-+/? の未受精卵の組 み合せで行なった体外受精とその後の発生成績 は表1に示すとうりである。1回の体外受精に 必要とする精子は、1匹のオスから得られるも ので十分であり、15匹以上のメスから採取し た卵子に媒精することができた。C57BL/6-+/? メスからは平均19.8 個の未受精卵を採 取できた。体外受精卵の2細胞期胚への発生成 績は、23.6%(64/271)~91.9%(260/ 283)と実験群によりバラツキがみられた。こ れは媒精に使用した精子の運動性と奇形率の差 によるものと考えられ、筋ジストロフィー症の 病状の程度なども影響していると考えられた。

胚の移植成績

2細胞期胚を偽妊娠1日目のレシピエントメ スの卵管へ移植した成績は表1に示すとうりで ある。帝王切開によって得られた胎仔の値は、 22.9%(55/240)~46.4%(98/211)で、 全体の平均は34.8%(179/515)であった。 この値は、正常なC57BL/6マウスの2細胞期

使用動物数						レシピエント数		
実験私	メス	オス	検査卵数	2細胞期(%)	移植	妊娠成立/使用	摘出仔数(%)	
. 1	15	1	271	64(23.6)	64	3/4	26(40.6)	
2	14	. 1	283	260(91.9)	240	13/15	55(229)	
3	13	· 1	279	252 (90.3)	211	13/14	98(46.4)	
合計	42	3	833	576 (69.1)	515	29 / 33	179(34.8)	

表 1. C57BL/6-dy マウスの体外受精成績と移植による胎仔への発生成績

実験Ma	摘出仔数	里仔数	里親数	離乳仔数(%)	+/dy(Q:8)	dy∕dy (♀:\$)
1	26	25	4	23(92.0)	13(9: 4)	10(3: 7)
2	55	54	10	51 (94.4)	36(19:17)	15(4:11)
3	98	95	14	87(91.6)	55 (34:21)	32(16:16)
合計	179	174	28	161(92.5)	104(62:42)	57(23:34)

表2. 帝王切開により摘出した胎仔の里仔での生育成績

胚の移植成績約70%と比べると低いものであ る。この原因については今後さらに検討し、改 善しなければならない点と考えられる。

帝王切開成績

帝王切開の成績は表2に示すとうりであるが、 97.2%(174/179)のものが蘇生して里親に 哺育させることができた。帝王切開時において、 全個体とも外表的な異常はまったく認められな かった。

離乳成績と得られた仔の性比

帝王切開により摘出した仔を SPF 条件下の 里親に哺育させた際の離乳成績は表 2 に示すと うりである。すなわち、 91.6% (87/95)~ 94.4% (51/54)で、全体では92.5%(161/ 174)と非常に高い値であった。これは生産の 場における C57BL/6マウスの成績をも上回る ものであるが、これは里親として用いたJcl: MCH(ICR) メスが温順で哺育のうまいことに よるものと考えられる。

離乳されたホモ(dy/dy)ならびにヘテロ(+/ dy)とその性比は表2に示すとうりである。こ れらのホモ個体は、生後約2週齡で筋ジストロ フィーを発症し、ヘテロ同士の交配で得られた ものと同様の症状を呈した。また、体外受精や 帝王切開等によって生じたと考えられる異常は まったく観察されなかった。

また、今回使用した C57BL/6-dy/dy ならび に C57BL/6-+/?の個体は、 MHV (mouse hepatitis virus)に汚染された = n = -で生産されたものであるが、里親と離乳された ホモならびにヘテロの個体を、当研究所の微生 物モニタリングセンターで検査した結果、MHV に感染している個体はまったく検出されなかった。

以上のことから、体外受精と帝王切開の2つ の技術を組み合せ、運用することにより、繁殖 障害を伴う筋ジストロフィーC57BL/6-dy/dy マウスを微生物学的にきれいな状態で量産でき ると考えられる。

文 献

- 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/6dy/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, 1985。
- 2) 横山峯介,小島博子: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。厚生省神経疾 患研究委託費「筋ジストロフィー症動物の

年度研究報告書。25-29.1987。

- 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 I. 精巣上 体精子による受精成績、家畜繁殖誌, 16, 147 - 151, 1971.
- 開発・供給に関する研究」野村班。昭和61 4)勝木元也編 : 発生工学実験マニュアル・ トランスジェニックマウスの作り方。講談 社サイエンティフィック。東京, 1987.
mdxマウスのDMD遺伝子について

≪はじめに≫

近年遺伝子工学的手法を用いて、ヒトDuch enne型筋ジストロフィー症(DMD)遺伝子の 一部が明かとされつつある¹⁻⁵。一方、mdxマ ウスは、症状は軽く、病理組織学的にも筋線維 の崩壊、再生像が異なっているなどヒト DMD との差異が指摘されているが⁶⁻⁸、変異遺伝子 の染色体上での他の遺伝子特にOTC 遺伝子と の位置関係は、マウス染色体とヒト染色体の基 本的違いは別としてヒト DMD遺伝子の場合と 極めて類似しており⁹⁻¹⁰、筋ジストロフィー症 モデル動物としての有用性が考えられる。

そこで今回は、 mdx マウス(C57BL/10 ScSn-mdx)ともう1つのモデルマウスとして 知られる dy マウス(C57BL/6J-dy/dy)の DMD遺伝子の発現について、報告された DMD cDNAの一部を合成し Northernblot およ び Southernblot による解析を行った。

≪実験動物および方法≫

mdx マウスおよび体外受精法によって作出さ れた dy マウスの生後3日目から28日目 のも のを用いた。対照として C57BL/10Se Snマウ ス(B10)を用いた。なお、実験動物は全て実 験動物中央研究所より供給された。

各々のマウスから大腿部および背部の骨格筋、 心臓、小腸、肝臓、腎臓、胸腺を取り出し、液 体窒素で凍結した後 -70℃で保存し実験に用 いた。

各組織からのRNAの抽出はGTC/CsTFA * 慶応義塾大学医学部生理学教室 高松 研^{*} 研究協力者 塚田裕三*

法を用いた。液体窒素下で組織を粉砕し、組織 重量の20倍量の5.5M Guanidinium thiocyanate 溶液に溶解させた。18ゲー ジの注射針を通した後、不溶物を5000×g、 20分遠心して除き、CsTFA溶液に重層して 25000rpm、24時間遠心し、 沈査を洗浄後 エタノール沈澱し、全RNA分画とした。poly (A)RNA はオリゴdTカラムにより精製した。

RNAはGlyoxal変性後、1.0%アガロー スゲルにて泳動した。泳動後、ゲルをアルカリ 処理し、20×SSCを用いてフィルター(MSI ナイロンフィルター)に転写した。フィルター をprehybridization buffer(50% formamide, 5×SSPE, 5×Denhardt, 0.1% SDS, 100ug/ml Salm on sperm DNA)で処理した後、 hybridization buffer(50% formamide, 5×SSC, 2 × Denhardt, 0.1% SDS, 100ug/ml Salmon sperm DNA) Probe DNA を 加え40℃で16時間処理した。フィルターを 洗浄後、-70℃で10日間フルオログラフィ -を行った。

Dot blotはBio Dot(Bio Rad) を 用い、Zeta probe membrane に RNA を吸着させ、上記と同様に hybridization を行った。

DNA の抽出は、胸線組織から行った。組織 を液体窒素中で破壊した後、SDS-proteinasek 溶液に溶解した。37°C、6時間処理し た後、フェノール抽出を行い、エタノール沈澱 により精製した。各制限酵素で消化した後、 0.7%アガロースゲルで泳動した。泳動後、ゲ ルは酸・アルカリ処理し、リン酸 buffer を 用いてフィルターに転写した。フィルターは熱 処理後、 prehybridization buffer (50% formamide, 10×Denhardt, 1 % SDS, 10% dextran sulfate, 50mM Tris, 1M NaCl, 100ug/ml salmon

а

CANERCATGANATGUETCATGETTTTATTGECATTTTGATGTTTTTGATGGECANAAGTG -144 Sciensätargineartisierrittisttismiataisissuettesiarroirriatis IIGNAMA-MAGTOTI-TAGATTONOGTGATAAGOTGACAGAGTGAAACATOTTAAGGOT -64 HEMMATCAGTATTANIGATTACATGATGAGTTGATANATGAGTATCAGAAGAAT TEMMEGGCAAGTAGAAGTTATAATTATTGIGIAGATTCACAGTCCTIGTATIGAATTAC -24 tennarchostrachistlachattactistrilasicaccalistrottocactistatoc TCALCTITISCICICATECTEGAGECATAGACCGAGAMMAGCTGAGMAGTICAGAMAC 37 teactification and a second a second and a second and a second a s TECMEATECCAUCAGATCAGETCAGECCETGUTGGAACAGATGGTGAATGUTAATTACA CE-AGITGATITAGATAATCTTCTTAGGGATTTGATAAACACATAGGTTCATATTTAICA 187 TCANETT GATTTAAATAATCTICTTAGGGATTTGATAAGCACATAGGTTCATATTTAICA SCIEMITATATCAGACAAGCACTIGITAMATACAAATTTAMATTAMAAGGTGTTIGTAT 217 ethalicatatcasacaustacticteciatacuattauattauscaustciatac STITITIATTATTCTTTTTTTATGCTAAGGAAATTATTAGGAGAAATTCAACTTTGAGT 277 settettaci-ttc--tciticaticitationalitationaliticatiticati AGGHTG FRAMMATTAGTIC IGGTTAMATATATATATATATAGAGAGATA-ATT TITMTGCAMATCTG-CT-AGAATTTATCCAMATAATTTAAGMATAAGGT-TAACAGAA 301 HIMITTTAGTANGTTTAIGMANTCACAGCTITACTGMGAMATTACTTGTGGAAGTA 422 ATTERNACATTANCAGTCAAGTATA

sperm DNA) で処理し、NaCl を除いた hybridization bufferとprobe DNA を加え、hybridization を行った。フィル ターは洗浄後 -70℃で7日間フルオログラフ ィーを行った。

probe DNAはKunkel らの報告に従い^{3,4}) 図 1 に示した 2 カ所を合成した。合成は A B I の DNA 合成機を用い、既報に従って精製した。

1 C.								•		•							
ALAU	CCA		ACT	LCC	•••	AGA		AGG	ATC	CAC	AAG	ACT	TCA	TÇC	CCI	CAA	cN
T L	41	x	Ĺ.		ĸ	٤	ĸ	C	\$	T	ĸ	۷			L	N	N
τu	ģ.	x	ι	•	X,	£	ĸ	G	s	T	×	۷	N		L	N	N
ACAU	сċ		ACT	CCC	***		ww	نانان	ATC	TAC		AC1	TCA	TCO	CCI	GAA	cv
					•	•		•			-						
***	1000	ACT	CCC	uut	111	CC	(international state)	CAA	TAA	TGT	TGA	TT	ACT	GN	TA	пüü	
NK		Ľ	ĸ	¥	L	- 4	14	N	N		2	Ľ					2
N K		L		۷.	Ľ	4	L	N	_ N	<u> </u>	0	L		N.			
ANCA	CCC	AC1	CCL	CC1	CTI	ΑŲ	UGAN	~~~	TAA	TCT	TU	m	TAG	CN	TA:	ACC	
	·																
	•	•															
GACA	rcu	AGA	100	~	10	ιŅ	wci	uni,		100				~~~		~~``	ĩ
U L		5				· 5		-						- 2	- ;	- 1	ĩ
υι			<u>.</u>														
GALA		667	14	~~~		1.0	MU.	<u>LAL</u>	101			-		~~~	_		
					•												
tecc	1001	CM		tat	-	GN	uu	TAT	CAT	ccc	TCC	AT	icc/	uc	w	CCA	LCA
W U	٧	ĸ	н	¥	R	ĸ	F	1	н		G	L	U	U	T		5
	ÿ			Ŷ		. R	17	i		Ä	G	L	ō	ò	т	н	s
tocc	CCT	CAA	, in	TGT	GAT	GA	μic	TAT	CAT	ccc	TCC	AT	ruù	٠cċ	•••	ccu	(CA
			_	-	•												
		٠				•		•		٠							٠
AAGA	TTC	CCT	CAC	cto	CUI	rcco	GACA	ATC		TCO	TN	111	ATC	CAC	LCC	TTN	TG
K 1	L	L	s	¥.	¥	ĸ	Q	\$	т			Y		Q	¥	N	۷
x i	Ē	Ē	ŝ	v	Ŷ	Ē	ō	. s	Ť		Ň	Ŷ	È	ō	v	N	۲
						_								~~~~		***	

図1: 合成 DNA プローブ
 a: ブローブ1 b: プローブ2
 下線部分を作成した

probe の標識は合成 DNA をアニールした後、 T4DNA Ligase により連結させた。その後、 Nick Translation KitまたはRandam Priming Kit(Amersham)により*a*-32P dCTP(6000Ci/mmol)を用いた。

≪結 果≫ 1. ノーザンブロット

ATTENATANTANGTANGTAN

生後3日目から7日目まで、および14日目 から28日目までのB10マウス、mdx マウス、 dy マウスおよび Balb/c マウスの筋肉から得 た全RNAをもちいた Northan Blot を行 った。図2Aにprobe 1を用いた結果を、B にprobe 2を用いた結果を示した。いずれの 場合にもB10マウスでは14から16Kbの位 置にDMDmRNAが確認された。一方、mdx



図2: mdxおよび dy マウス骨格筋の Northern Blot a:ブローブ1 lane 1-3; B10, lane 4,5; mdx, lane 5; dy b:プローブ2 lane 1,2; B10, lane 3,4; mdx, lane 5,6; dy, lane 7,8; BalbC

マウスではこれに対応したmRNAを認めるこ とはできなかった。dyマウスでは、B10マウ スと同様の位置にmRNAの存在を認め、むし ろ全RNA中に占めるDMDmRNAの量はB10 より多い傾向がみられた。

同様のサンプルを用いたRNAのDot Blot の結果を図3A, Bに示した。いずれの場合に もB10マウス、dyマウスではDMDmRNAの 存在が認められた。一方mdxマウスでも、弱い ながら反応が認められ正常B10マウスの10か ら20分の1量のDMDmRNAが存在している ことが示唆された。また臓器別では心筋に少量 のmRNAが存在していた。小腸には痕跡程度 の反応が認められたが、これより更に弱いなが ら肝臓にも反応が認められたことからバックグ ラウンドの反応である可能性も考えられる。

また、probe 1の反応性は probe 2に較 べ強い傾向が認められた。

2. サザーンブロット

DMD cDNA 合成 プローブを用いたサザ ーンブロット の結果を図4に示した。B10 る、 Q、mdx、 dyの胸線 DNAをStuI 消化 し、probe 1を用いた結果では、図4 aに示 したごとく DNA 断片の大きさはいずれも同じ であったが、B10 Qにると較べて強い反応が 認められ、この DNA 配列がX染色体に位置し

-41 -



図3: mdxおよびdyマウス骨格筋mRNAのDot Blot a: ブローブ1 b: ブローブ2



図4: mdx マウスの Southern Blot a, b: ブローブ1 lane 1; B10, lane 2; mdx, lane 3; B10 lane 4; B10 lane 5,6; dy c, d: ブローブ2 lane 1; B10, lane 2; mdx

-43 -

ていることが示唆された。また他の制限酵素に よる消化によっても、B10とmdx との間に変 化は認められなかった(図4b)。さらにprobe 2を用いた結果でも図4c, dに示したごとくB 10とmdxとの間に差異は認めらえなかった。

≪考 察≫

DMD 患者由来の培養細胞を用いて行った Kunkel らの一連の研究によって、DMD 遺 伝子の本体が明かとされつつある¹⁻⁵。DM Dc DNA についてもサイズが14Kb であること が示され、その塩基配列の一部が報告された³⁻⁵ また同時にマウスDMD cDNA についても報告 され、両者の構造は極めてよく保存されている ことが示されている。そこで、マウスDMDc DNA に対応する一部分の合成DNA を作成し、 DMD モデル動物であるmdx マウスおよび dy マウスについて DMD 遺伝子の検討を行った。

前述したごとく、mdx マウスは症状および病 理組織像はDMDとは異なっているが⁶⁻⁸、変異 遺伝子の染色体上での位置関係が極めて類似し ている^{9,10}。また、BMD(Becker型筋ジスト ロフィー症)とDMDとは同一遺伝子上の疾患 であり、変異の程度に差があるとする報告もあ り、mdx マウスとBMDの関係も注目されてい る。

一方、Hoffmann らは大腸菌を用いて作成 した Trp E との融合蛋白を用いて、ヒツジま たはヤギでボリクローナル抗体を作成した¹¹。 この抗体を用いたイムノブロットから分子量 400Kdの筋小胞体 Triad分画中にある膜蛋 白(dystrophin)であると推定している¹²。 そして mdx マウスの骨格筋と心筋についても 解析を行い、mdx マウスではこの蛋白の発現が 認められないと報告した。今回我々が行ったノ ザーンブロットおよびドットブロットの結果か ら、mdx マウスではDMDmRNAの発現は無い か、あっても正常の10から20分の1と極め て少ないことが示された。さらに、サザーンブ ロットの結果から、少なくとも用いたプローブ によって検出できる範囲には遺伝子の大きな欠 失は認められなかった。これらのことから、 mdx マウスでは染色体遺伝子上の転写調節領域 に障害があってmRNAの発現が低くdystrophin蛋白の存在が認められない可能性、さら に dystrophin遺伝子の exon 部分にも欠失 があり異常mRNA が少量発現しているために ノザーンブロットでは検出されずドットブロッ トでのみ少量のmRNA が検出された可能性な どが考えられる。今後は、mdx マウス遺伝子上 のdystrophin発現調節領域の解析を行って いかなくてはならない。

≪文 献≫

- Monaco, A.P. et al., Nature, 316, 842-845, 1985.
- Kunkel, L.M. et al., Nature, 322, 73-77, 1986.
- Monoco, A.P. et al., Nature, 323, 646-650, 1986.
- Koening, M. et al., Cell, 50, 509-517, 1987.
- Hoffman, E.P. et al., Science, 238, 347-350, 1987.
- Bulfield, G. et al., Proc.
 Natl. Acad. Sci. USA, 81, 1189-1192, 1984.
- 7) Tanabe, Y. et al., Acta Neuro-

path., 69, 91-95, 1986.

- Bridges, L.A., J.Neurol.
 Sci., 72, 147-157, 1986.
- Heilig, R. et al., Nature, 328, 168-170, 1987.
- 10) Brockdorff, N. et al.,

Nature, 328, 166-168, 1987.

- Hoffman, E.P. et al., Cell, 51, 919-928, 1987.
- 12) Hoffman, E.P. et al., Nature, 330, 754-758, 1987.

筋ジストロフィーマウス(mdx) 骨格筋線維の壊死と再生

1984年、Bulfield 等¹⁾によって発見 されたX染色体性劣性遺伝の形式を取る筋ジス トロフィーマウス(mdx)は、ヒトのDuchenne 型または Becker 型筋ジストロフィー症のモ デル動物として注目されている。mdxマウスは、 従来研究されて来た常染色体性劣性遺伝を示す、 いわゆる dy マウス (C57BL/6J dy/dy)の 臨床経過と異なり、体重の減少や、筋力低下は 認められず、見掛け上は正常と変わらない。

しかし、mdx マウス骨格筋線維の壊死と、それに続く再生は誕生後比較的早期よりみられる ことが報告されている¹⁻⁴)。本報告はmdxマウ ス骨格筋の組織病変の形態計測および単離筋線 維を中心に、本ミュータントにみられる筋線維 の再生を検討した。

材料および方法

SPFのmdx マウス(C57BL/10ScSn-mdx) と対照正常マウス(C57BL/10ScSn)を用い、 それぞれの前脛骨筋(m.tibialis anteriol: TA 筋と略)とヒラメ筋(m.soleus:SL筋と 略)を採取した。mdx マウスは生後20,30, 40,50,60,90日、対照マウスは生後20, 60日目でいずれも10%緩衝ホルマリン溶液 で心臓より灌流固定され、腱付きのままで筋を 固定し、射皮後そのままの状態に同液に2日間 以上浸した。採取された筋は重量測定後、筋腹 の横断H-E染色標本においてKontron MOP-

*国立精神神経センター神経研究所、モデル動物開発部

**財団法人実験動物中央研究所

菊池建機*

研究協力者 守屋弘美*, 松崎哲也**

videoplan 画像解析装置を用いて病理学的 解析と形態計測が行なわれた。測定された項目 は筋横断面積(um)とその度数分布、筋線維当 りの中心核の出現率である。常染色体劣性遺伝 に従う dy マウス(C57BL/6J-dy/dy) は 生後 30,60日目で検討した。骨格筋線維の collagenase 酵素消化による単離はKopriwa & Moss(1971)法⁶⁾によった。この場 合も採取時の筋の収縮を最小限とするためCarnoy 固定液で心臓より灌流固定した。

結 果

1. 体 重

mdx マウスの体重の変化は生後正常に推移す るが、 50日齢でやや減少する。対照マウ スの体重は20日と60日齢で測定したが、 mdx マウスとほぼ同様の変化を示す。両日 齢の dy マウス は著しく成長が抑えられて お り、60日齢では約½程度にとどまる(図-1)。

2. 筋比体重值

mdx マウスのTA筋およびSL筋を測定した。
 TA筋は生後60日まで増加するが、SL筋は
 40日と早い時期に値は横這いになる。

3. 筋線維横断面積の経時的変化と度数分布 骨格筋線維横断面積の平均値の経時的推移は 成長とともに増加するが、TA筋は60日、



図 2. mdx マウスの前座有筋(m.tibialis anteriol) およびヒラメ筋(M. soleus)における筋線維横断面積 (um)の経時的変化

SL筋は50日でやや減少する傾向がある(図 -2)。 生後60日でmdx, dy, 対照マウスの 各筋の線維横断面積の度数分布を比較したのが、 図-3である。筋ジストロフィー筋を構成する 筋線維面積の分布は広く、大小不同が著しい。 dy マウスでは萎縮した小型の筋線維が多数み られる。

4. 中心核の出現率

筋ジストロフィー筋を構成する筋線維の中心 核は20日以後みられるようになる。 dy マウ スでも同様の傾向があるが、その後の増加は mdx マウスに及ばない。mdx マウスのTA筋線 維の中心核は60日までに大部分の線維でみら れるようになるが、SL筋では40日でほぼ横 這いになる(図-4)。

5. 病理組織学的所見

mdx マウス筋組織は生後20日まで大きな異 常はみられないが、この日齢の前後から小さな 壊死巣が散見される。変性壊死の病変は20-30日にかけて急激に顕著となる。筋線維は群 をなして過収縮や硝子様変性を示し、線維周辺 の間質は著しく広がる。崩壊線維の清掃反応は すばやく、線維内へのマクロファージの浸潤と、 引き続く再生筋管の形成が起こっている(図-5, A)。

筋の縦断切片所見によると、線維の変性、壊 死は線維のある特定の部分に限局する、いわゆ る segmental necrosisによる。この変 化は、隣接する筋線維の、同じ水準でほぼ同時 に進行する傾向がある。過収縮によって部分的 に肥大した線維は隣接する線維を押しつぶすよ うにみえる。長大な筋線維は多くの部位で壊死 に陥り、その部分が再生すると中心核を残す。

- 48 -





- 49 --



図 4. mdx, dy, 正常マウス(B10)の前脛 骨筋(m.tibialis anteriol) およびヒラメ筋(m.soleus)にお ける筋線維中心核の出現率の経時的 変化。

生後90日では、大部分の線維は再生部分を持 ち鎖状配列が頻繁に見られるようになるが、そ れらの線維も以前と同様に壊死に陥いる(図-5, B)。再生筋線維は同様に群をなす場合が多 く、先に再生を終了した線維との協調性も極め てよい。さらに、筋線維の束で構成される筋束 (muscle fascicle)は正常な結合織で包 まれ、顕著なfibrosis や脂肪組織の増生は みられない(図-6, A, B)。

6. 単離筋線維にみられる形態異常

単離された対照マウス筋線維の核は主に線維 周辺にみられる。筋線維核(myonuclei)と 衛星細胞(satellite cell)とを区別する ことは困難である(図-7, A)。 組織標本で観 察された過収縮部は単離線維でも頻繁に認めら れる(図-7, B,D)。単一筋線維には、胞体内 に鎖状に配列する多数の中心核がみられ、しば しば複数の列になっている。このような鎖状配 列は途中で途絶え、正常の分布に戻り、再鎖状 配列に移行する部分が見られる。多数の中心核 が鎖状配列している部分と、正常に分布してい る部分では収縮の度合いに差がある(図-7,C)。 単離された筋線維は途中で複数の細い筋線維に 分枝する。また一度親線維から分枝した線維が 再び親線維に合流する場合もある(図-7,E)。 連続した組織切片で観察すると、単離筋線維で 得られた結果と同様に、親線維から分枝する筋 線維が見られる(図-8,A,B,C,D)。

考 察

mdx マウスの成長は対照マウスと特に差はみ られない。Dangain & Vrbova(1984) は成長にともなう前脛骨筋の収縮の力学的特性 を調べ、mdxマウスのtwitch tension や maximum tetanus tension は若い時 期(2-4週)では低下するが、その後回復し 成獣では対照マウスと変わらなくなることを報 告した。逆に、half relaxation time は生後 2-3週齡では正常であるが、3-4週 で一時的に長くなり、以後再び正常に戻る²⁾。 mdxマウスの筋組織変化は、Dangain & Vrbova(1984)², Tanabe et al

- 50 --

(1986)³⁾, Bridge(1986)⁵⁾等によって解 析されている。これらの報告は、先の収縮性の 結果とよく一致している。half relaxation timeが長くなる時期は筋の壊死および再生が 激しく起こっている時期であり、大部分の線維 は未熟な状態にあったことを裏付けている。我 々が得た結果も前脛骨筋は20-60日、ヒラ メ筋は20-40日目までをこの特定の時期と することができる。両筋を比較すると、ヒラメ 筋の崩壊する時期は前脛骨筋よりも早い。

従来の dy マウス骨格筋は、比較的正常な形 態を有する小型の筋線維を多数含み、隣接する 線維間での壊死、再生の同調性は悪く、全体と して筋の再生反応に乏しい。 mdx マウス骨格筋 の変性壊死は、生後の特定の時期に激しく起こ り、隣接する線維のほぼ同じ水準で同時に起こ るため、同調性がよく、続く再生反応も優れて いる。この線維の壊死再生は一度再生した筋線 維にも再び起こる。筋線維の周辺の間質に fibrosis や脂肪組織の増生が見られないの は、この再生反応に優れる点と関連があると思 われる。

文 献

- Bulfield, G., Siller, W.G., Wight, P.A.L. and Moore, K.J. (1984) : X chromosomelinked muscular dystrophy(mdx) in the mouse. Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 81, 1189-1192.
- Dangain, J. and Vrbova, G. (1984); Muscle development in mdx mutant mice. Muscle Nerve, 7, 700-704.

- 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) 埜中征哉(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。昭和60年度厚生省研究報告書, 11-31。
- 5) Bridges, L.R.(1986) : The association of cardiac muscle necrosis and inflamation with the degenerative and persistent myopathy of MDX mice. J. Neurol. Sci., 72, 147-157.
- 6) Kopriwa, B.M. and Moss, F.P.
 (1971) : A radioautographic technique for whole mounts of muscle fibers. J. Histochem.
 Cytochem., 19, 51-55.



図 5. mdx マウスの 生後 30日(A)及び 90日(B)における前脛骨筋にみられる 変性壊死所見。 矢頭印:再生線維中心核の鎖状配列 X277



図 6. mdx マウスの生後 6 0日におけるヒラメ筋(A)及び前脛骨筋(B)にみられる 再生線維と筋束の構築 X 277



図 7. 生後 4 7日の正常(A)、mdx(B-E)前脛骨筋より単離された筋線維にみら れる形態異常。A 図における矢頭印は過収縮部分、E 図における 1 2,3 は親線維から分枝した細い線維を示す。 Bar=100um







図 8. mdx マウスのヒラメ筋にみられる筋線維の分枝。矢印の一本の筋線維A)が 標本の位置を変えるにしたがい二本になる(B-D)。 Bar = 100um

筋ジストロフィー症研究のためのGAD・ MDX 複合マウス系統の育成

> 富田武* 研究協力者 山崎一斗, 榊原朱美* 向山昌邦,**菊地健機***

I. 赭 宫

ヒトにおいて数多くの神経系及び筋系に異常 をきたす遺伝性の難病が知られているが、進行 性筋ジストロフィー症もその1つである。筋ジ ストロフィー症とは、中枢神経系や末梢神経系 の異常を伴わずに骨格筋の進行性の変性・崩壊 を示す一連の遺伝性の疾患群であると定義され る。なかでも Duchenne 型筋ジストロフィー 症(Duchenne muscular dystrophy) は著名な伴性劣性疾患である。頻度は筋ジスト ロフィー症の70%を占める程高く、また症状 も早期に発症し、進行が早く、予後不良であり 最も重篤である。しかしながら、この遺伝性疾 患に関する病因も治療法も判明していない。故 に病因解析と根本的な治療法の確立のために、 よく似た病態を示す多くの疾患モデル動物の育 成が望まれている。

筋ジストロフィー症を示すマウスの突然変異 には、dystrophia muscularis(dy) と myodystrophy(myd)があり、いずれも 常染色体性劣性遺伝様式をとる。しかしこれら のマウスについては、脊髄前根及び後根にミエ リン形成不全などの神経病理学的所見が報告さ れ、これらの疾患の初期変化が神経系の欠損に 起因する可能性も示唆されている。

muscular dystrophy (mdx) がある (Bulfield et al. 1984)。 mdx では神 経系の異常は認められておらず、また伴性劣性 遺伝様式をとるためDuchenne 型筋ジストロ フィー症のモデル動物として期待されている。 また Duchenne 型筋ジストロフィー症とmdx で共通に欠損しているタンパク質dystrophin も見い出された(Hoffman et al. 1987)。 しかし伴性劣性遺伝様式をとるヒトの進行性筋 ジストロフィー症は他にも知られており、 Duchenne 型筋ジストロフィー症とmdxの遺 伝的な相当性は明らかでない (Avene et al. 1987, Brockdorff et al. 1987, Heiling et al 1987), atc. mdx kiv ては生後3~4週齡で膨大な筋線維壊死が生じ 運動障害も認められるが、続いて量的にも構造 的にもほぼ完全な筋線維再生が起こり、壊死線 維を補うことが可能である。その後はごく軽い 壊死と再生がくりかえされ、進行性の筋萎縮を 示さない点がDuchenne 型筋ジストロフィー 症と大きく異なる(Dangain and Vrbova, 1984)。 したがってmdxは Duchenne 型筋 ジストロフィー症のモデル動物として用いる場 合には注意を要するが、筋の壊死・再生の機構 を研究するには非常に興味深いミュータントで

さらに最近発見された突然変異にX-linked あるといえる。

名古屋大学農学部家畜育種学教室

** 国立精神・神経センター、神経研究所疾病研究第四部

*** 国立精神・神経センター、神経研究所モデル動物開発部

-63 -

tcgracile axonal dystrophy (gad)は、1984年に名古屋大学農学部に おいて CBA/Nga系統と RFM/Nga系統より出 現した神経異常を示すミュータントで、この形 質は常染色体性劣性遺伝様式をとる。異常個体 は生後約80日齢より後肢を引きずり始め、振 戦及び後肢筋萎縮を示す。病理形態学的には延 髄薄核(gracile nucleus)及び脊髄薄束 (gracile fascicules) に限局した軸索 ジストロフィー (axonal dystrophy)を 主徴とする変性所見が認められている。軸索ジ ストロフィーはヒトの2つの遺伝病、すなわち Infantile neuroaxonal dystrophy とHallervorden-Spatz 病、 さらにビタ ミンE欠乏症と老化などにおいても観察されて いる。故にその病態モデルとしての検索が進め られている。またマウスにおいて薄核及び薄束 は後肢からの上向性の感覚神経路に相当する。 したがって gadにみられる後肢の引きずりと筋 萎縮はこの神経路の異常に起因する廃用性萎縮 (disuse atrophy)であると考えられ、そ の病態生理の解明にも有用であろうと予想され 3(Yamazaki et al. 1988).

以上に述べた 2つの突然変異遺伝子 gad と mdx を同時に持つ個体(以下GAD・MDX 複合 マウスと呼ぶ)を育成することにより、筋線維 変性及び再生に対する廃用(disuse)の影響 など、新しい知見が得られる可能性がある。本 研究では gad 遺伝子座と緊密に連鎖するPhosphoglucomutase-1(Pgm-1)を遺伝的マ ーカーとして、その電気泳動により gad個体を 識別し、さらに筋ジストロフィー症でみられる 血漿 Creatine kinase(CK) 活性値の上 昇を指標にして、その測定によりmdx個体を識 別して、GAD・MDX複合マウスの育成を試みた。 Ⅱ.材料及び方法

1. マウス

本研究には以下に示す4系統のマウスを使用 した。

(1) C57BL/10-mdx系統(B10-mdx系統)

1987年1月に実験動物中央研究所より導入し、当研究室において兄妹交配により維持されている。実験には導入後2世代以降のマウスを用いた。

(2) Gad/Nga (Gad 系統)

1984年1月に名古屋大学農学部において、 CBA/NgaとRFM/NgaのF2世代に生じた自 然突然変異個体(雌2匹、雄1匹)をもとに当 研究室において兄妹交配により維持されている。

(3) DBA/2系統(D2系統)

1985年6月に東北歯科大学より導入し、 当研究室において兄妹交配により維持している。

(4) C57BL/10系統(B10系統)

1987年4月に国立遺伝学研究所より導入 し、当研究室において兄妹交配により維持して いる。実験には導入後2世代以降のマウスを用 いた。

2. 飼育方法

木製あるいはプラスチック製ケージで飼育し、 単材としてワラ及びチップを使用した。飼料は 市販の固形飼料と成鶏用粒餌を与え、水は自由 摂取とした。室内の光・温度・湿度は調整しな かったが、冬期には温風ヒーターによる暖房で 室温の著しい低下を防いだ。

3. 実験方法

(1) 血漿 CK 活性值測定

mdxにおいてCKを代表とする筋肉由来酵素 の血漿活性値の上昇が報告されている。そこで CKをMDX マウスの指標酵素として用いるこ とにした。マウス眼下静脈叢よりヘバリン付き ヘマトクリット管にて採血し、1.400g で冷却 遠心して得た血漿をサンプルとした。凝血・溶 血が肉眼で認められた血液は使用しなかった。 測定は CPK-Test Wako(Oliver変法) (和光純薬工業株式会社)により行った。B10, D2, B10-mdx 系 3系統及び(B10-mdx×D2) F1個体の中から、60~90日齢のマウスにつ いて測定した。これらの値よりMDXマウス(mdx/ mdx 及びmdx/Y)の選抜基準値を決定した。 Gad系統について異常個体(gad/gad)及び同 腹正常個体(gad/+又は+/+)の中から、60 ~90日齢のものと120日齢以上のものにつ いてそれぞれ測定した。これにより、GADマ ウス(gad/gad)での血漿CK活性値の上昇の 有無を調べた。

(2) Pgm-1 電気泳動

gad遺伝子座とPgm-1遺伝子座は、マウス 第5染色体上で 3.0 ± 0.1 %の近距離で連鎖し ている(Yamazaki *et al.* 1987)。 したが ってPgm-1を gad の遺伝的マーカーとして用 いた。Pgm-1遺伝子型の判定にはセルロースア セテート膜を使ったTitan II電気泳動法(Herena laboratories, U.S.A.)を用いた。マ ウス眼下静脈叢よりヘバリン付きヘマトクリッ ト管にて採血し、 1,400g で冷却遠心して得た 赤血球をサンブルとした。泳動条件、発色方法 等は、 Nomura *et al.* (1984)に従った。

(3) 交配方法

交配方法をFig.1 に示した。B10-mdx,Gad 両系統は $Pgm-1^a/Pgm-1^a$ で固定されている。 そこでB10-mdxを $Pgm-1^b/Pgm-1^b$ で固定さ れているD2 と交配した(Mating I,I)。 その backcross 世代(以下N2世代と略す) から $Pgm-1^b/Pgm-1^b$ かつmdx/Y である個体 を選抜することにより、Pgm-1e~gadの遺伝 的マーカーとして用いることが可能になる。選 抜したマウス ($Pgm-1^b/Pgm-1^b$ かつmdx/Y) を Gad と交配する(Mating II, N)。 その N₂ 世代から $Pgm-1^a/Pgm-1^a$ すなわちgad/gadかつmdx/Y個体を選抜し、GAD・MDX 複合 マウスとする。

(4) 組織学的観察

血漿CK活性値の上昇を指標として選抜した マウスがMDXマウスであることの確認のため、 筋の組織学的観察を行った。使用したマウスは B10, B10-mdx,系統の雄個体、Gad系統の 正常及び異常雄個体、(B10-mdx×D2)F₁× D2のN₂世代で活性値の上昇が顕著に認められ た雄個体及び正常と判定された雄個体である。 これらのマウスから前頸骨筋を採取し、ブアン 液で固定し、パラプラストで包埋後、8 μ 厚の 切片を作製した。ヘマトキシリン・エオシン染 色後、光学顕微鏡で観察した。

□.秸果

(1) 血漿CK活性値

B10, D2, B10-mdx 系統及び(B10-mdx × D2) F₁ 個体についての血漿 CK 活性値の測定 結果を Table 1に示した。MDXマウス(B10mdx 系統及び F₁の雄個体)では、B10, D2系 統及び F₁の雌個体に対して活性値が有意に高 かった。また Gad 系統についての血漿 CK活 性値の測定結果を Table 2に示した。GAD マウス (gad/gad)では生後約 120 日齢で病 理学的異常が認められる。しかし GAD マウス と同腹正常マウス (+/-)の間には、日齢(iなわち病状)に関係なく有意差はみられなかっ た。このことは GAD マウスで血漿 CK 活性値 の上昇がないことを示唆している。

以上の結果より、血漿CK活性値の上昇を指



Strain	5au*	Genotype	No. of	Mean age	CK activity in plasma(mU/ml)			
	Jex	mdx locus	mice examined	(days)	Mean <u>+</u> S.E.M.	Range		
DBA/2(D2)	м	+/Y	15	67.7	163.3 <u>+</u> 28.4	46.7 - 432.3		
	F	+/+	9	69.8	183.2 <u>+</u> 38.0	36.0 - 341.2		
C57BL/10(B10)	м	+/Y	11	65.5	130.8 <u>+</u> 33.7	53.0 - 180.1		
	F	+/+	13	62.5	171.8 <u>+</u> 28.6	42.4 - 326.3		
B10- <u>mdx</u>	M	<u>mdx</u> /Y	10	67.3	6670.2 <u>+</u> 2695.6	1780.8 - 29497.1		
	P	<u>mdx</u> / <u>mdx</u>	10	79.4	2647.9 <u>+</u> 1239.1	572.1 - 11885.6		
1 ^(B10-<u>mdx</u> x D2)	м	mdx/Y	12	60.8	3579.1 <u>+</u> 618.6	1379.5 - 7755.7		
	P ·	+/ <u>mdx</u>	9	66.7	60.3 <u>+</u> 9.1	23.3 - 108.1		

Table 1. Plasma creatine kinase(CK) activity.

* M, males; F, females. Y, Y-chromosome.

	Genotype	No. of	Mean age	CK activity in plasma(mU/ml)				
Sex	of gad locus [*]	mice examined	of mice (days)	Mean <u>+</u> S.E.M.	Range			
male	gad/gad	5	65.0	80.1 <u>+</u> 13.7	44.5 - 127.1			
		6	163.5	145.9 <u>+</u> 49.6	50.9 - 362.4			
	+/-	7	67.9	99.0 <u>+</u> 40.4	38.1 - 254.3			
ú		4	202.0	96.4 <u>+</u> 20.8	50.8 - 137.7			
female	gad/gad	4	66.3	96.5 <u>+</u> 30.1	50.9 - 178.0			
		1	133.0	284.0				
	+/-	5	64.6	95.4 <u>+</u> 15.5	59.3 - 152.6			
		4	133.0	165.3 <u>+</u> 75.7	80.5 - 392.0			

Table 2. Plasma creatine kinase(CK) activity in GAD mice.

* +/-, +/+ or +/gad.

標とした MDX マウスの選抜が可能であること また文献参考値においてもそれが認められる。 が判明した。しかし血漿CK活性値は動物の生 理状態(ストレス、運動負荷等)により変動し に選抜するため、その選抜基準値を1000mV/ やすく、 Table 1, Table 2 においても、 mlとした。

したがって mdx/Y及び mdx/mdx 個体を確実

(2) 組織学的観察

B10-mdx 系統では、B10 系統に見られなか った筋線維の大小不同、貪食反応を伴う壊死筋 線維群、中心核線維群が認められた。また(B10mdx × D2) $F_1 × D2 \circ N_2$ 世代から血漿CK活性 値の上昇を指標として選抜されたマウスでは、 B10-mdx 系統とよく似た筋線維組織像を示し、 mdx/Y個体であることが確認された(Fig. 2 ~4)。

(3) 交 配

 $(B10-mdx \times D2)F_1 \times D2 oN_2$ 世代雄個体 における $P_{gm}-1$ 遺伝子型分離比及び血漿CK 活性の選抜基準値での分離比をTable 3に示 した。ともに1:1分離比とは有意差はなかっ た。しかし血漿CK活性の選抜基準値が高めに 決定してあるため、normal グループにmdx/



Y個体が含まれている可能性はある。また、各 交配での繁殖成績(2月6日現在)を Table 4 に示した。Mating Ⅲで litter size が 小さくなっている。これは GAD マウス雌個体

Table 4. Breeding data of the matings to produce GAD, MDX mice

Mating No.	No.	No.	littor sizo*	No.	weaned progeny	
	delivering	progeny	IILLEI SIZE	weaned	female	male
Mating I	7	71	10.1 <u>+</u> 0.5	64	28	36
Mating II	9	76	8.4 <u>+</u> 0.7	76	42	34
Mating III	7	30	4.3 <u>+</u> 0.6	24	14	10.
Mating IV	5	43	8.6 <u>+</u> 0.2	31	18	39

Mean <u>+</u> S.E.M.

ではlitter size が有意に小さくなるとの 報告(Yamazaki *et al.* 1988)とよく一致し ている。

№.考 察

GAD・MDX 複合マウスの育成は今回報告し た方法で可能であると考えられる。しかし実験 動物として利用するには、今後このマウスを維 持じていく必要がある。維持に関して問題とな るのは、第1にGAD・MDX 複合マウスの繁殖 力である。B10-mdx 系統の繁殖力は正常とほ ぼ変わらないが、 Gad 系統においては異常個 体は生後約80日齢までしか繁殖できず、さら に異常雌個体は litter size が小さい。故 にGAD・MDX 複合マウスの繁殖力が正常より 劣ることは十分考えられる。第2に両形質の遺 伝子型判定である。 gad 形質については Pgm-電気泳動により gad/+と+/+ の識別は可能で ある。しかし mdx 形質については Table 1 に示される様に血漿CK活性値の上昇を指標と した方法では mdx/+ と+/+ の識別は不可能で ある。以上の2点から考えて mdx locus は mdx/mdx及びmdx/Yで固定し、gad locus は繁殖期間、litter size 等考慮して、 gad/gad と gad/+ をうまく組合わせて維持す るのが適切であると考えられる。

Fig. 1の Mating Nより雄雌各 4 種類の 遺伝子型を持つ個体が分離してくる。雄につい ては4種の識別は可能であるが、 gad/gad, mdx/Y個体 (GAD·MDX複合マウス) は病理 形態学的検査に供試するため、 gad/+, mdx/ Y個体を選抜して維持に用いる。雌については *mdx*/+と+/+の識別が不可能なため、 gad/ +, mdx/+個体を選抜できない。そこでMating □より育成した雌、 gad/+, mdx/+ 個体を維 持に用いる。(gad/+, mdx/+個体)×(gad/ +, mdx/Y個体)の交配より gad 遺伝子型は gad/gad 個体、 gad/+個体、 +/+ 個体が分 離する。したがって、 gad/+ 雄個体と gad/+ 雌個体又は gad/gad 雄個体と gad/+雌個体を 選抜する。また mdx 遺伝子型は mdx/mdx 個体、 mdx/+個体、mdx/Y個体、+/Y個体が分離 する。そこでmdx/mdx 個体とmdx/Y 個体を

選抜して、mdx locusの固定は完了する。後 は gad locus と Pgm-1 locusのrecombinantに注意しながら、先に述べた維持方法に 従う。

育成したGAD・MDX 複合マウスの動物モデ ルとしての有用性を検討してみた。

筋ジストロフィー症を示すマウス及びハムス ター個体に、除神経 (denervation)、後肢 の不動化(immobilization)、腱切断 (tenotomy)、及び脊髄切断(cordtomy) 等の処置を施した実験は何例かある。 dy マウ ス 及び筋ジストロフィー症パムスターに坐骨神 経の切断処置(除神経に相当する)を施すと、 後肢に生じるはずの筋変性が阻止される(Evelyn and Johnstone, 1983) (Karpati et al. 1982)。mdxマウスに関しても 同様の実験があり、この場合さらに神経の再支 配(renervation)の完成とともに、筋ジス トロフィー症に特徴的な病理像が観察されるよ うになったと報告された(中村ら、1985)。筋 線維の壊死は、構造的かつ生化学的に一定のレ ベルの成長段階に達した筋線維に限って生じる と考えられている。また筋線維の成熟には、正 常な筋の収縮活動と、興奮伝導以外の神経支配 の2つが必要であることが知られている。 Karpati らは、先に述べた除神経処置が筋か

らこれらの必要因子を欠如させるため、処置を 受けた動物は筋ジストロフィー症の病態を免れ ることができたと解釈している。さらに、除神 経処理による筋線維壊死の阻止が、筋の収縮活 動の欠如、神経支配の欠如、あるいはその両方 の欠如のどれに起因するものかを調べるため、 *dy* マウスの後肢を不動化する実験が試みられ ている(Loermans and Wirtz, 1983)

- 69 -

(Wirtz et al. 1986)。 不動化処置とは、 dy マウスの後肢をプラスチック製のギプスで 固定したもので、筋の収縮活動のみを欠如させ ると考えられる。この実験においても、不動化 による筋線維の萎縮は生じるが筋線維壊死は阻 止された。これによりLoermansと Wirtz は dy マウスの病態は筋原性のものであるとし、 さらに機械的、特に収縮性の活動が筋線維膜に 障害を与える重要な因子であると述べている。

不動化及び腱切断等の筋の収縮活動を欠如さ せる処置により筋肉に萎縮が生じる。一般的に これを廃用性萎縮(disuse atrophy)とみ なしている。特に不動化による萎縮は、廃用性 萎縮のモデルとして整形外科領域やリハビリテ ーション医学において、また神経・筋の相互作 用の研究においてよく用いられる(助川、1983)。 しかしFournier et al. ()はギプスで の不動化は完全に筋の収縮活動を欠如させられ ないため、必ずしも廃用性のモデルとはならず、 むしろ脊髄切断処置の方が良いモデルであろう と述べている。脊髄切断処置は末梢での神経支 配は残すが、中枢との與奮伝達路を断つもので ある。 dy マウスに脊髄切断処置を施した報告 によると、除神経、不動化処置と同様に筋線維 壊死が阻止されている()。しかし脊 髄切断処置による筋萎縮が、人為的に運動性及 び感覚性の神経路を全て遮断することに起因し ているのに対し、GADマウスにみられる筋萎 縮は、遺伝的に下肢の感覚神経路のみが遮断さ れることに起因する廃用性萎縮であると考えら れる。故に脊髄切断処置を受けた dy マウスと、 本研究で育成するGAD・MDX 複合マウスの病 態の比較に興味が持たれる。さらに gadマウス の廃用性萎縮と、不動化、腱切断処置による人 為的な廃用性萎縮の比較を、病理形態学的、生

化学的に進めていく必要性があると思われる。

以上に述べてきたことより、GAD・MDX 複 合マウスは筋の壊死、さらに再生に対する廃用 の影響を調べるのに良いモデルであろうと考え られる。

V. 要 約

mdx はヒト進行性筋ジストロフィー症と良く 似た症状を示すが、活発な筋線維再生能力をも つミュータントである。また gadは後肢からの 上向性感覚神経路の異常による後肢の廃用性萎 縮を示すミュータントである。筋線維の変性・ 再生に対する廃用の影響などの新たな知見を得 るため、この2つの遺伝子を同時に持つ個体 GAD・MDX 複合マウスの育成を試みた。

1. gad遺伝子座に緊密に連鎖するPgm-1を マーカーとした GAD 個体の識別及び血漿 CK 活性値の上昇を指標にした MDX 個体の識別は、 ともに可能であった。したがって以下に述べる 方法で GAD・MDX 複合マウスは育成できるこ とが示唆された。まず B10-mdx 系統と D2系 統の交配の N₂ 世代から $Pgm-1^b/Pgm-1^b, mdx/$ Y 個体を選抜する。さらに選抜個体 とGad 系統 の交配の N₂ 世代から $Pgm-1^a/Pgm-1^a$ (すなわ ち gad/gad) mdx/Y 個体を選抜し、 GAD・ MDX 複合マウスとする。

2. 上記の計画交配中に育成したマウスを用い て GAD・MDX 複合マウスを維持していくこと が可能であると考えられる。

3. 遺伝的に下肢の感覚神経路のみを遮断した ことによる廃用性萎縮が、筋の変性・再生に与 える影響を調べるのに良いモデルとなるであろ

-70 -

うと思われる。

VL 謝辞

本研究は名古屋大学農学部畜産学科の卒業論 文のテーマとして行ったものであり、この研究 を遂行するにあたり、終始懇篤なる御指導を賜 わった富田武教授に対し深く感謝の意を表しま す。また本研究に有益かつ適切なる御助言をく ださった若杉昇助教授、並河鷹夫博士、川本芳 博士に深く感謝いたします。実験を進めるにあ たり、多くの御指導をいただいた山崎一斗先輩 に深く感謝いたします。さらに動物の飼育に関 し多大な御苦労をおかけした成田志織技官に心 から御礼を申しあげます。また貴重な動物を分 与してくださった実験動物中央研究所の斉藤宗 雄氏に厚く御礼を申しあげます。

- M. References
- Bulfield, G., Siller, W.G., Wight, P.A.L., and Moore, K.J. (1984) X chromosomelinked muscular dystrophy (mdx) in the mouse. Proc. Natl.Acad.Sci.USA. 81, 1189-1192.
- Chemnitz, G., Schmidt, E., Koller, P.U., and Busch, E.W. (1979) Kreatinkinase. Dtsch. med.Wschr. 104, 257-260.
- 3) Dangain, J., and Vrbova, G. (1984) Muscle development in MDX mutant mice. Muscle Nerve 7, 700-704.

- 4) Fournier, M., Roy, R.R., Perham, H., Simard, C.P., and Edgerton, V.R. (1983) Is limb immobilization a model of muscle disuse? Exp.Neurol. 80, 147-156.
- 5) Harrison, S.D.Jr., Burdeshaw, J.A., Crosby, R.G., Cusic, A.M., and Denine, E.P. (1978) Hematology and clinical chemistry reference values for C57BL/6 X DBA/2 F, mice. Cancer Res. 38, 2636-2639.
- 6) Hoffman, E.P., Kundson, C.M., Campbell, K.P., and Kunkel, L.M. (1987) Subcellular fractionation of dystrophin to the triads of skeletal muscle. Nature 330 24/31, 754-758.
- 7) Jaros, E., and Johnstone, D. (1983) Effect of denervation upon muscle fibre number in normal and dystrophic (dy/dy) mice. J.Physiol. 343, 104-105.
- Karpati, G., Carpenter, S., and Prescott, S. (1982) Prevention of skeletal muscle fiber necrosis in hamster dystrophy. Muscle Nerve 5, 369-372.

-71 -

- 9) Karpati, G., Armani, M., Carpenter, S., and prescott, S. (1983) Reinnervation is followed by necrosis in previously denervated skeletal muscles of dystrophic hamsters. Exp.Neurol. 82, 358-365.
- 10) Lane, P.W., Beamer, T.C., and 15) Myers, D.D. (1976) Myodystrophy, a new myopathy on chromosome 8 of the mouse. J.Hered.
 67, 135-138.
- 11) Loermans, H., and Wirtz, P. (1983) Inhivition of the expression of pathology in dystrophic mouse leg muscles by immobilization. Br.J.exp. Path. 64, 225-230.
- 12) 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, 1079-1084.
- 13) 中村晴臣,高田邦安,加藤信介,本田誠四郎(1986) mdxマウス骨格筋に対する神経切断の影響。厚生省神経疾患研究委託費筋シ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60年度研究報告書,39-43。

- 14) Nomura, T., Esaki, K., and Tomita, T. (1984)
 II: Qualitative characters in genetic monitoring. In, ICLAS Mannual for Genetic Monitoring of Inbred Mice.
 23-110, University of Tokyo Press, Tokyo.
 - Okada, E., Mizuhira, V., and Nakamura, H. (1977) Abnormally combined myelinated and unmyelinated nerves in dystrophic mice. J.Neurol.Sci. 33, 243-249.
- 16) Rayburn, H.B., and Peterson, A.C. (1978) Naked axons in myodystrophic mice. Brain Res. 146, 380-384.
- 17)助川卓行(1983) 廃用性筋萎縮の病態
 単一筋線維と微細構造の変化について、
 J.Jpn.Orthop.Ass, 57(8), 779-787.
- 18) Tanabe, Y., Esaki, K., and Nomura, T. (1986) Skeletal muscle pathology in X chromosomelinked muscular dystrophy (*mdx*) mouse. Acta Neuropathol. 69, 91-95.
- 19) Wirtz, P., Loermans, H., and Wallinga, W. (1986) Long term functional improvement

-72-

of dystrophic mouse leg muscles upon early immobilization. Br.J.exp.Path. 67, 201-208.

20) Yamazaki, k., Sakakibara, A., Tōmita, T., Mukoyama, M., and Kikuchi, T. (1987) Location of gracile axonal dystrophy (gad) on chromosome 5 of the mouse. Jpn.J.Genet. 62, 479-484.

21) Yamazaki, K., Wakasugi, N.,

Tomita, T., Kikuchi, T., Mukoyama, M., and Ando. K. (1988a) Gracile axonal dystrophy (GAD), a new neurological mutant in the mouse. Proc.Soc.Exp.Biol.Med. in press.

22) Yamazaki, K., Wakasugi, N., Sakakibara, A., and Tomita, T. (1988b) Reduced fertility in gracile axonal dystrophy (gad) mice. Exp.Anim. in press.

-73-



Fig.2 Cross-section of anterior tibial muscles of a B10 male mouse at 217 days after birth (HE-staining, $8 \text{ m}\mathcal{A}$ section, 100X)



Fig.3 Cross-section of anterior tibial muscles of a B10-mdx male mouse at 257 days after birth (HE-staining, 8 m∦ section, 100X)



Fig.4 Cross-section of anterior tibial muscles of a mdx/mdx male mouse from backcross generation, (B10-mdx X D2)F₁ X D2 at 257 days after birth (HE-staining, 8 m section, 100X) 昭和62年度厚生省研究報告書, 79-90, 1988

筋ジストロフィー症動物モデルとしての セロトニンミオパチー

三池輝久*

研究協力者 鳴神 浩, 吉岡 毅*

Duchenne 型進行性筋ジストロフィー症 (以下DMDと略)の筋病理の特徴は壊死線維 と再生筋線維が混在することである。preclinical stageにおいてはこの所見が最も顕 著に認められ、本症初期の筋病理はこの現象に 尽きるといっても過言ではないように思われる。 しかもpreclinical stageにおいては壊 死、再生筋線維のほとんどが共に10~50本 程度のグループをなして存在するのが特徴であ る¹⁾これらの特徴から本症の原因病理として、 血管系の障害が大きく関っていることが示唆さ れると考えた著者らは、preclinical stage の3症例(8ヶ月、10ヶ月、14ヶ 月)の筋組織中血管を電子顕微鏡的に観察し、 1) 血管内皮細胞の変化、特に水腫様膨化、2) 血小板付着、凝集による血管腔閉塞などの所見 を認め(図1)、これらの変化は血流障害を引 き起すに十分なものと思われた²⁾さらに2万倍 写真を用いた画像解析装置によるmorphometricな検討で、同年齢の対照群に比し統計学的 にきわめて低い危険率(P<0.0001)で、DMD の血管内皮細胞面積、血管面積、血管周囲細胞 面積が増大していることが確かめられた²⁾この ような著しい血管変化は、それが一次的にせよ



図 1. DMD: 8ヶ月男児。著しく膨化して水腫状を呈する筋組織内毛細 血管内皮細胞(E)。 血管腔はほとんど閉塞状態を示す。

* 熊本大学医学部小児発達学

二次的にせよ、DMDの筋の成熟、再生に大い 関与していると考えられる。1977年、Munsat らは、ラットに誘導された実験的セロトニンミ オパチーにおいて、type I, IIa選択的な障害 および活発な再生現象とともに血管内皮細胞の 変性を観察している。この血管内皮細胞の変性 には、肥厚化、水腫様膨化、辺縁層の増殖、ミ トコンドリアの溶解が認められたという³⁾

私達がpreclinical stageのDMDで 観察した血管内皮細胞変性と、Munsat らが ラットの実験的セロトニンミオパチーに見いだ した血管内皮細胞変性との間の類似性は、DMD の原因病理に血管性の変化が大きく関与する可 能性を示唆すると同時に、ラットに誘導される セロトニンミオパチーがDMDの動物モデルた り得ることを示すものと考えられる。

今回私達は、1) ラットに誘導されるセロトニ ンミオパチーが DMD の 適切な動物 モデルたり 得るか否か、2) その筋崩壊のパターン、および 3) 筋ジストロフィー症の発生病因における血管 性因子の役割について検討する目的で以下の実 験を行った。

〔研究方法〕

実験動物はすべてウィスター系雄性ラットを 用いた。一部28週令、体重400gのラットを 用いた他はすべて4週令、100~150gの動物 を使用した。セロトニンは、 serotonincreatinin complex(Sigma No.H-7752, Mol.wt. 387.4)を1N塩酸に溶 解した後、NaOH溶液でPH7.4 に調製した。 投与量は serotonin-creatinin complex としての量を示す(serotonin の力価 は、serotonin-creatinin complex 量の約45%である)。セロトニンはすべて腹 腔内に投与した。

(1) セロトニン投与量と筋障害の程度との関係を知る目的で、28週令、400gのラットに、50mg/Kg、100mg/Kg、200mg/Kgのセロトニンを投与し5日目に生検を行い、ヒラメ筋(以下 soleus)、長趾伸筋(以下 EDL)を採取した。

(2) 筋障害の分布を知るために、4週令、
 100~150gのラットにセロトニン100mg/Kg
 を投与し12時間後に生検、 soleus と EDL
 の他5種の骨格筋を採取した。

(3) セロトニンミオバチーの時間的経過を観察するために、4週令、100~150gのラットに75mg/Kgのセロトニンを投与し、投与後6時間、12時間、1日、2日、5日、7日、30日にそれぞれ生検を行い、soleusとEDLを採取した。

(4) セロトニンの慢性的投与による筋障害を
 検討する目的で、4週令の動物に4週毎にセロトニン75mg/Kgを投与し、投与後4週と8週に soleus と EDL を採取した。

採取した生検筋は夫々二分し、光顕的および 電顕的観察を行った。光顕用として、クリオス タットで凍結切片を作製し($10\mu m$)、 H-E、 ATPase、アクリジンオレンジ、 Gomoritrichrome を含めた一連の組織化学的染色 を行い検討した。電顕的には型通り固定、抱埋 後、超薄切片を作製しウラニール、鉛の二重染 色を行った後、日立H-300 にて観察した。

〔結 果〕

(1) セロトニン投与量と筋障害の程度

筋障害はセロトニン投与量に比例して増強していた(図2)。 50mg/Kgを投与したラットでは、soleus は軽度ながら massive に障

- 80 -



図 2. セロトニン投与後 5日目の soleus : 数字は投与量を示すが 筋病変は dose dependent に増強している。



図 3. セロトニン投与後 5 日目の EDL : 50 mg/Kg では全く筋病変は認めない。 100~200mg/Kg で出現する筋病変は soleus に比して軽度である。



図 4. 筋病変の分布: セロトニン75mg/Kg投与後12時間のsoleus(S), EDL(E), 上腕三頭筋(T), 上腕二頭筋(B)。(S)と(T)のみに変化が見られる。

	NECROSI	S EDEMA	0. F.*1	R G.*2	C.I.*3
6 hours (n = 5)	+++	++	++	_	+
control (n = 2)	-	_	_	-	—
1 2 hours (n = 5)	++	+	++		+
control (n = 2)	-			—	-
1 day (n = 5)	++	+++	+		++
control (n = 2)	-	_	-	-	—
2 days $(n = 5)$	+	+++	+	++	+++
control (n = 2)	• ••••	. —			-
5 days (n = 5)		connective	_	+++	_
control (n = 2)			_	_	_
7 days (n = 5)		connective		++	_
control (n = 2)	·		∎ <u> </u>		
14 days $(n = 3)$	· · · · ·			++	<u> </u>
control (n = 2)	—	_	_	· _	
30 days (n = 2)	<u> </u>			angulated	
control (n = 2)	—		_		

*1 Opaque fiber *2 Regeneration *3 Cell infiltration
書され、100mg/Kgあるいは200mg/Kgを投 与された動物では、筋障害の程度も範囲も50 mg/Kgに比較してdose-dependentに著し くなっている。壊死に陥った筋線維はグループ を形成し、 phagocytosisと細胞浸潤にみ まわれている。その周囲を正常の筋線維が取り 囲んでいるように見える。筋障害は soleus に選択的につよく、EDLは50mg/Kg投与動物 では全く障害されていない。100mg/Kg 以上 の投与量ではじめて soleus と同じような所 見が認められるものの、その程度と広がりは soleus に比較して軽度である(図3)。

(2) 筋障害の分布

セロトニン腹腔内投与後12時間に、soleus と EDL の他上腕二頭筋、上腕三頭筋、腓腹筋 等を生検採取した。筋病変は専ら soleus に 強く、上腕三頭筋に軽度の変化を認めるものの EDL を含む他の骨格筋にはなんらの変化も認 めなかった(図4)。

(3) セロトニンミオパチーの時間的経過(表) セロトニン75mg/Kgを4週令のラットに腹腔 内投与し、投与後6時間、12時間、1日、2 日、5日、7日、14日、30日にそれぞれ生 検しsoleusとEDLを採取した。75mg/Kg の投与量は、適当な筋障害を惹起できる量とし て、(1)の実験から50mg/Kgと100mg/Kgの中 間の量という意味で採択したものである。

投与後6時間にはすでに筋線維の壊死と間質 の浮腫および細胞浸潤が認められ、これらは2 日目まで持続する。この時期にはまたopaque fiberも認められ6時間から12時間に顕著 であるが2日目には殆ど見られなくなる。筋線 維の壊死と間質の浮腫は6時間から2日目に著 明となる。細胞浸潤は6時間後より次第に増強 し2日目に最も強くなる。筋の再生現象は2日

目にははじまっており、5日目に最も盛んとな り以後14日目までは持続してみとめられるが 30日目には消失している。セロトニン投与後 5~7日に2~3の標本で、軽度の結合織の増 加がめとめられた。30日後にはきわめて少数 の angulated fiber がみられるものの、 筋線維のセロトニンによる障害からの回復はほ ぼ完全といってよい。

図5は、セロトニン75mg/Kg投与後6時間、 12時間、1日、2日に生検採取したsoleus のH-E染色標本である。壊死に陥った筋線維 が一群を形成しているのがわかる。細胞浸潤と 間質の浮腫が認められ、これらの所見はセロト ニン投与後2日目に最も著しかった。

筋の再生現象はセロトニン投与後2日目から 見られるようになり14日目まで持続して認め られた。ATPase 染色では Type IIc 反応を 伴う活発な再生現象が認められ、これら再生線 維もまたグループ形成している(図6)。 acridine orange 染色でも同様の所見を

セロトニン投与後30日には、この再生現象 は完了し筋組織はほぼ正常に復するが、H-E 染色および Gomori trichrome 染色で少 数の中心核を持つ線維とangulated fiber が認められた(図7、但し図は H-E 染色標本 のみ示す)。

(4) セロトニン反復投与(4週毎75mg/Kg) による筋障害は単独投与によるそれと異なると ころはなかった。

(5) 電顕所見

確認した。

セロトニン投与後12時間と24時間(1日) の soleus に筋組織内血管の変化が認められ た(図8)。血管基底膜の肥厚と血管内皮細胞 の水腫様膨化が認められそのために血管内腔は

- 85 -



図 5. セロトニン75mg/Kg投与後: 6時間(6), 12時間(12), 24時間(24), 48時間(48)のsoleus。



図 6. セロトニン 75 mg/Kg投与後 5 日目のsoleus : タイプ 2 C 反応を伴う再生現象が 著明。ATPase 染色;上から pH 4.2, 4.6, routin。



図 7. セロトニン投与後 30日目のsoleus : 少数の angulated fiber が見られる。



図8. セロトニン投与後24時間のsoleus : 血管内皮細胞(E)の水腫 様膨化が著しくヒトDMDと同様の変化(図1)が見られる。

著しく狭隘化している。

〔考察〕

DMD preclinical stage において私 達が観察した筋組織内小血管の内皮細胞を中心 とした著しい変化は、本症において微小循環障 害が何らかの形で関与していることを示唆して いると考えられる。一方、 Munsat らの報告 したセロトニンミオパチーにおける血管内皮細 胞の変化は、 DMD preclinical stage で私達が見いだした所見と酷似している。 Munsatらはセロトニンミオパチーのpathogenesisは第一義的には ischemic なもの である故をもって、 DMD の動物モデルとはな り得ないと結論している³⁾のであるが、私達は この故にこそ、 DMDのpathogenesisにお ける血管因子の役割を再認識すべきであると考 える。

今回の実験によるセロトニンミオパチーの筋 病理の特徴は、壊死に陥った筋線維と再生筋線 維が混在し、しかもそれらがグループをなして 存在するという、DMDの初期の筋病理ときわ めて類似性の高いものである。更に筋組織内血 管の内皮細胞の水腫様膨化とそれに伴う血管内 腔の狭小化も、DMD preclinical stage の血管病変とよく一致する。セロトニンミオパ チーが、セロトニンの筋に対する直接的な作用 によって引き起こされるものなのか、あるいは 血管性因子を介するものなのかは不明であるが、 上述した筋組織像の特徴や血管の変化は、詳細 は不明ながらなんらかの形で血管を介するもの のように思われる。

セロトニンが DMD の pathogenesis に 関与している可能性はその血管作用による機能 的な虚血あるいは血小板による セロトニンの取 り込みの障害 $(^{4)5}$ セロトニンを含むbiogenic amine の代謝障害 $^{6)}$ 等々によって示唆されて きたが、何れも血管性因子を介するものである。 またDMDで plasminogen およびplasminogen inhibitor の異常があるという、 DMD の血管内凝固に対する線溶系の関与を示 唆する報告 $^{7)}$ もある。更に、血管内皮細胞にも 筋細胞同様に多くの収縮蛋白が認められ、それ らはミオシンやアクチン線維に類似していると いう報告 $^{8)}$ もある。このようにDMD の発生病 因論における血管因子の関係は今後追求すべ き課題であると同時に、実験的セロトニンミオ パチーはその好個の動物モデルであると考える。

- T.Miike : Maturational defect of regenerating muscle fibers in cases with Duchenne and congenital muscular dystrophies. Muscle & Nerve 6:545-552, 1983
- 2) T.Miike, S.Sugino, T.Taku and K.Yoshioka : Vascular endotherial cell injury and platelet embolism in Duchenne muscular dystrophy at the preclinical stage. J.Neurological Scienses 82: 67-80, 1987
- T.Munsat, P.Hudgson and
 M.Johnson : Experimental serotonin myopathy. Neurology

— 89 —

27:772-782, 1977

- 4) D.Murphy, J.Mendel and
 W.Engel : Serotonin and platelet function in Duchenne
 muscular dystrophy. Arch.
 Neurol. 28:239-242, 1973
- 5) R.Arora, R.Kuncl, J.Morgan, L.Cohen and H.Meltzer: Serotonin uptake in blood platelets of Duchenne muscular dystrophy patients. Muscle & Nerve 10:359-362, 1987
- 6) M.Yu, T.Wright, W.Dettbarn and W.Olson : Pargylineinduced myopathy with histochemical characteristics of Duchenne muscular dystrophy. Neurology 24:237-244, 1974

- 7) I.Shomura, N.Nagao and Y.Sawada : Plasma fibrinolysis in patients with progressive muscular dystrophy. Kumamoto Medical Journal 36:55-61, 1983
- 8) D.Drenckhahn and J.Wagner: Stress fibers in the splenic sinus endotherium in situ: molecullar structure, relationship to the extracellular matrix, and contractility. J. of Cell Biology 102:1739-1747, 1986

ミエリン形成異常ウズラについて

当研究所で維持しているWE 系において全身 の振戦を特徴とするミュータントの雌が出現し た。本報告はこのミュータントの臨床症状、病 理組織学的検索、遺伝的分析および繁殖成績に 関する結果である。

1. 臨床症状

本ミュータントはふ化時より種々の外的刺激 により足の指を曲げながら振戦を示し、ひどい 個体では起立不能(図1)となる。振戦の程度 には個体差が存在し、軽症の個体ではわずかに

水 谷 誠" 研究協力者 布 谷 鉄 夫*

激しい個体では足の指の曲がりもひどい傾向が ある。そして、これらの異常は一生を通じて治 ゆしない。

2. 病理組織学的検索

1.5 カ月齢の異常ウズラの中枢神経系を組織 学的ならびに電顕的に検索した。

脊髄パラフィン切片の抗MBP 抗体を用いた PAP 法ならびに視神経、脊髄のエポン厚切り 標本トルイジンブルー染色で髄鞘の明らかな減 少を認めた。視神経の電顕的検索では、有髄線 頭部および頸部が振戦するのみである。振戦の 維は単位面積当り15~30%程度対照に比べ少



図2. 正常ウズラの視神経

* (財)日本生物科学研究所



図3. 異常ウズラの視神経



図4. 異常ウズラの視神経。 ミエリンラメラの厚さは軸索の 太さに関係なく不均一で、裸の線維も存在する。



図 5. 異常ウズラ視神経。 異常に延長した 髄鞘と崩壊した髄鞘を示す。



図 6. オリゴデンドロサイト細胞質内にみられる 脂肪滴状物。



図 7. 核染色質の凝集。 核周囲腔ならびに細胞内小器官 の拡張した変性性オリゴデンドロサイト。

なく、小径の軸索に無髄のものが多かった(図 2,3)。しかし、中には比較的太い線維で髄 鞘のみられないものも存在し、軸索の直径に対 するミエリンラメラの厚さは不均一であった (図4)。形成されているラメラの多くには Major dense line が存在し compaction に異常はなかったが、ラメラ形成の緩い もの、髄鞘の異常な延長、髄鞘内空 形成、軸 索周囲腔の拡張、髄鞘の顆粒状あるいは塊状崩 壊などさまざまな異常を示す髄鞘が存在した (図5)。変異体のグリア細胞数に大きな変動 はみられなかったが、オリゴデンドロサイトと 思われる細胞に核染色質の凝集や核膜の不規則 な陥凹、核周囲腔の拡張などを伴った変性性の ものを認めた。また、ゴルジ嚢および粗面小胞 体の拡張や脂肪滴状物をもったオリゴデンドロ サイトも頻繁に観察された(図6,7)。

小脳の組織学的検索は未検索であるが、上述 の所見ならびに末梢神経系には著変を認めない ことからこのウズラには中枢性のミエリン形成 異常の存在することが示唆された。

3. 遺伝的分析

WE系において出現した振戦を示す雌と正常 の雄とを交配し47羽の F_1 を得た。 この47 羽はすべて正常であった。そこで、 $F_1 \times F_1$ お よび $F_1 \times$ 振戦雌親の交配を行い、 後代におけ る振戦個体の出現頻度を初生雛において観察し た。結果は表1に示したごとく、 $F_1 \times F_1$ の交 配からは434羽の雛が得られ、正常個体と振 戦個体はそれぞれ329, 105で3:1の比に 適合した。一方、 $F_1 \times$ 振戦雌親のもどし交配か らは38羽の雛が得られ正常個体と振戦個体は それぞれ17,21で1:1の比に適合した。

表 1. ミエリン形成異常 ウズラの遺伝子分析

3	t I	3	-	F
雄		雌	正常	異常
正常	×	異常	47	0
\mathbf{F}_{1}	×	\mathbf{F}_{1}	329	105
\mathbf{F}_{1}	×	異常	17	21

これらの交配における振戦個体の出現頻度は、 このミュータントが常染色体性の劣性遺伝子に より支配されていることを示している。

4. 繁殖成績

ミエリン形成異常系(Shv系)、糖原病 I型 系(RW系)および8種の正常系の繁殖成績を 表2に示した。表からも明らかなようにShv 系はミエリン形成異常形質以外の形質に関して は無選抜であるにもかかわらず、糖原病 I型形 質あるいは白卵産卵形質以外の形質に関して無

表 2. ミエリン形成異常 ウズラ (Shv 系)およびその他の系統の繁殖成績

						Ť	< 1	铳	名			
_			Shv	RW	WE	PSN	AMRP	PNN	SBPN	SBPP	TKP	CWE
受	精	率	24.5	48.0	82.2	33.0	70.3	27.7	24.9	42.0	40.5	15.3
ል	化	率	43.5	42.7	77.1	393	53.5	50.0	67.4	44.5	37.1	36.3
育 (0~	成 - 3 週	率 齢)	19.8	84.1	91.0	39.7	5 3.7	49.7	62.8	70.8	61.4	41.6

選抜の RW系あるいはWE系に比較し受精率お よび育成率が極端に低い。また、この Shv 系 の繁殖成績は、約20年間血液型、血清アイソ ザイムおよび羽装などについて選抜を加えてき たPSN, AMRP, PNN, SBPN, SBPP, TKP および CWE の各系統のそれらより悪い。特に 3週齡までの育成率の低いことは Shv 系の特 徴である。

Shv 系の繁殖成績の悪いことはこの系統の 維持の際重要な問題である。今後、 Shv 系の 維持にはF₁(正常×異常)雄に異常ウズラの雌 を交配し、受精率をあげるとともに異常ウズラ の育成率を良くする方法を検索する予定である。

ウズラにおいて行動異常を示すミュータント には以下の4報告がある。

a. congenital loco :外的刺激によ り頭および頸部を背側にまげ頭を振戦する発作 をおこし、時にはバランスをくずして回転する。 発作は休息時にはみられない。ほとんどの個体 はふ化後1週間以内に死亡するが、少数のもの は成鳥となる。常染色体性の劣性遺伝子により 支配されている(Sittmann, 1965)。

 b. star gazing :外的刺激により頭を 背につけ星をみあげるような姿勢の発作をおこ
 す。繁殖力は正常である。常染色体性の劣性遺 伝子により支配されている (Savage and Collins, 1972)。

 c. wry neck : 頭部を腹側にまげ、前に 転倒する発作をおこす。ふ化後4日以内にほと んどの個体が死亡する。常染色体性の2つの劣 性遺伝子により支配されている(Savage and Collins, 1971)。

d. 暗色羽神経異常:暗色羽とともに神経異 常を併発する。主な症状は振戦であるが、その 程度には個体差が存在する。組織学的には小脳 に異常がみられる。常染色体性の劣性遺伝子に より支配されている(河原、1980)。 今回報告した Shv 系 は上述のいずれのミュ ータントとも異なり、鳥類においては最初のミ エリン形成異常を示すミュータントであり、疾 患モデルとして有望と考えられる。

対 対

- Sittmann, K, W., Richards, C.P., and Abplanalp, H., Congenital loco in a third species of domestic fowl. Can. J. Genet. Cytol. 7: 636-640, 1965.
- Savage, T. F., and Collins,
 W. M., Inheritance of star gazing in Japanese quail.
 J. Hered. 63: 87-90, 1972.
- Savage, T. F., and Collins,
 W. M., Wry neck, an abnormality of Japanese quail.
 Poultry Sci. 50, 1627, 1971.
- 4)河原孝忠: 家禽類,特にウズラにおける
 神経異常突然変異. 実験動物.29:
 93-98, 1980.



図1. ミエリン形成異常ウズラ、足の指が曲がっている。起立不能。

C57BL/6-dy 生産方法の改良 -ビニールアイソレータを用いた卵巣移植の試み-

斉藤宗雄*

研究協力者 江袋 進, 日置恭司*

筋ジストロフィー(以下筋ジスと略)研究に おいて、モデル動物の開発・改良は極めて重要 である。私どもは、この班に参加して以来、筋 ジスマウス C57BL/6-dy (以下 B6-dyと略)、 C57BL/10-mdx、筋ジスハムスターBIO-14.6、UM-X7.1 の維持と生産を行っている。 これらの維持状況を昭和61年度には詳しく報 告した。今年度は筋ジスマウスB6-dy の生産 方式合理化の一環として、ビニールアイソレー タ(以下アイソレータと略)内の卵巣移植につ いて検討したのでその成績を報告する。

目 的

B6-dy マウスはメス・オス共に劣性ホモ (dy/dy)で発症し、発症個体は繁殖不能であ る。通常、繁殖はヘテロ(+/dy)間交配により 行なわれ、次世代はホモと同腹のメス・オス (遺伝的に+/+ または+/dy)を無作為に交 配し子どもにホモが出現するペアを選ぶもので、 B6-dy マウスの繁殖には多くの労力が必要で ある。江崎らは、1970年代維持・生産の合 理化のために B6-dy の卵巣をC57BL/6-Aw (以下 B6-Aw と略)に移植することにより B6-dy の卵巣を持つメス親を作出し、このマ ウスに C57BL/6(以下B6と略)オスを交配 し、効率的にヘテロマウスを得る技術を確立し た。

その後、B6-dy マウスは微生物的清浄化が * (財)実験動物中央研究所 行われ、SPFの動物がアイソレータ内で生産 され供給されるようになった。しかし、アイソ レータはスペースが狭く、無菌的手術も困難で、 前述の卵巣移植を利用するのが極めて難しくな っている現状である。卵巣移植がアイソレータ の中で行えれば、SPFの B6-dy の生産は極 めて合理化されるものと期待される。

私どもは、従来の無菌動物の作出経験を基に、 アイソレータならびに無菌手術操作に改良を加 え、無菌的卵巣移植技術の確立を目的とし本研 究を行った。

方 法

検討した卵巣移植手術は、ドナーの卵巣をア イソレータ外で無菌的に摘出し、アイソレータ 内に搬入し、レシピエントの卵巣と交換手術す るものである。移植手術の確認は、手術メスマ ウスを、異なる毛色のオスと交配し得られる子 の毛色から推定するものである。なお、手術に あたって予めレシピエントの系統は SPF 化さ れていなければならない。

① 卵巣移植用アイソレータ

基本としたアイソレータは、日本クレア製M 10型である。すなわち、間口115cm奥行50 cm高さ50cmのビニール本体に、直径25cmの 給気・排気用円盤型フィルターを各1個、直径 30cmの物品搬入用ステリールロックを1個、 ネオプレン製手袋を1双取り付けたものである。 このアイソレータに、卵巣移植用として以下の 改良を加えた。

手袋:既存手袋の先端に外科用ラテックス手 袋を取付け、また、ステリルロック側に1双追 加し2双とした。これら手袋の取付は、従来法 に準じ手袋リングを使い接合部に接着剤を詰め テープで固定した。

観察窓:アイソレータ本体は透明であるがフ ィルムのゆがみで内部の手術操作が行いにくい ために、硬質ブラスチック板を手袋側に接着剤 で貼り付けし、テープで固定し観察窓とした。

薬液トラップ:卵巣を無菌的かつ迅速にアイ ソレータ内へ搬入するために、ビニール本体の 右側に無菌動物手術用アイソレータに用いられ る薬液トラップを取り付けた。薬液はマイクロ カット50倍液を用いた。

実体顕微鏡の取付:卵巣移植手術は約40倍 の実体顕微鏡下で行われる。アイソレータへの 実体顕微鏡の取付は、従来、無菌動物の胸腺摘 出手術の場合、顕微鏡本体を外に置きビニール フィルムに対物レンズが接するよう取付けられ る。この卵巣移植実験においては、顕微鏡の機 能を重視し、腐食性の少ない滅菌法もあること から、顕微鏡本体をアイソレータ内に置き、ビ ニール本体を接眼部の鏡筒で通し、接眼レンズ を外に出すようにした。使用した顕微鏡はオリ ンパス実体顕微鏡 206418型である。

光源用電源:顕微鏡用光源はアイソレータに 置き、電源はビニール本体消毒薬噴霧ロ用ゴム 栓の中央に電気コードを通し接着剤で止めた。

以上の改良を加えた卵巣移植用アイソレータ を写真1に示す。

② アイソレータの滅菌

実体顕微鏡が内部に設置されているため、ア イソレータの滅菌に通常用いられる過酢酸は腐 食性が強いため使うことはできず、ビニール本 体の滅菌にはエチレンオキサイドガスを用いた。 滅菌に当たって、ハサミ、ピンセット等の手術 用具は予め高圧滅菌し、顕微鏡や光源は出来る だけ解体した。アルコール、ネンブタール等の 試薬は無菌的なものを選んだ。滅菌は、ビニー ル本体を凹ませてから20%エチレンオキサイ ドガスを噴き込み、膨らんだところで止め、ア イソレータ手袋を使って内部を攪拌し、そのま ま8時間以上放置した。

滅菌効果の確認は、滅菌ガス噴き込んで8時 間放置後換気を始め、24時間換気し滅菌ガス が充分排除されてから、実体顕微鏡、アイソレ ータ内壁、手術用具等の表面を綿球でふきとり、 無菌検査用培地で37℃14日間培養した。

なお、その他のアイソレータの滅菌は、従来 の無菌飼育技術によった。

③ 動 物

本実験(昭和62年9月から12月)に用い たドナーとなるB6-dy は、当研究所コンベン ショナル飼育室で繁殖された6週齢16匹を、 レシピエントのB6-Aw はSPF 飼育室で繁殖 された8週齢メス16匹を用いた。移植後の交 配実験にはSPFのB6オス14匹を用いた。

④ 卵巢移植手技

卵巣の摘出は、B6-dy を脊髄切断により殺 処分後、希ヨードチンキ薬液層に浸し全身を消 毒、解剖台上に背位に保定、腹部をハサミで切 開し、子宮と共に切除・摘出した。アイソレー タへは、摘出した卵巣付き子宮を滅菌試験管に 入れ薬液トラップに浸積し搬入した。 つぎに、予め搬入してあるレシピエントの B6-Awの体重を測定、これを基に10%ネン ブタールip投与麻酔し、実体顕微鏡下に腹位 に置き、背部皮膚(片側)を切開、卵巣を周囲 の脂肪組織と共に引き出し、卵胞を切開、レシ ピエントの卵巣を摘除した。

試験管に入った卵巣付き子宮を取り出し、実体顕微鏡下で卵巣のみとし、前述のB6-Awの 卵巣を外した位置にはめ、脂肪層で包み体内に 戻した。

対する側も同様に手術し、縫合クレンメで皮 膚を止めた。術後ケージに1匹づつ収容しアイ ソレータ外部からライト照射で保温し蘇生を計 った。 術者は、アイソレータ外操作に1名、アイソ レータ内操作に1名の2名で行い、全操作は1 匹当たり10分程を要した。

移植の確認は、卵巣移植したメスマウスを飼 育用アイツレータに移し、術後2週目にB6オ スと交配した。生まれてくる仔の毛色が、野生 色の場合遺伝子がAaとなり残置B6-Awの 卵巣仔と推定し、黒色の場合遺伝子がaaとな りB6-dyの卵巣仔と推定した。清浄度につい ては育成された動物について実験動物の微生物 モニタリングを行った。

以上のビニールアイソレータを用いた卵巣移 植技術の概要を図1に示した。



図1. ビニールアイソレータを用いた卵巣移植技術

結果と考察

9月から12月までにかけて行われた卵巣移 植成績を表1に示す。

卵巣移植手術は5回16匹について行い、蘇 生し交配できたのは14匹で成功率87.5%で あった。

交配実験は14匹について行い12月末日ま でに出産したのは6匹で出産率42.8%であっ た。総産仔数は36匹で平均産仔数は6匹であ った。産仔のなかで黒色毛(aa)は19匹、野

移植日	交配日	出産日	産仔数	黒毛色+/dy(%)	野生毛色+/+
9/17日	10/5日	10/15日	6匹	5匹(83.3)	1匹
"	"	11/6	7	3 (428)	4
"	"	11/16	5	2 (40.0)	3
"	"	11/20	9	4 (44.4)	5
10/29	10/6	12/10	7	5 (71.4)	2
"	"	12/26	2	0	0
"	"	妊娠			
"	"	<u> </u>			
11/12	10/30				
"	"				
12/1	12/23	ー 観察中			
"	"			. *	
12/10	12/28				
"	//				
合計 14匹	14匹	6匹	36匹	19匹(52.8)	15 匹
1986年conv 成績	22匹	56匹	225匹	124匹(55.1)	47匹
		,			(1987)

表1. アイソレータ内卵巣移植の成績 - dy^{ov}C57BL/6-Aw×C57BL/6の繁殖成績から-

生色種は(Aa)15匹で、総産仔数に対する黒色 毛の出現率は 52.8%であった。

これらの成績を昨年度試みたアイソレータ外 (コンベンショナル)の成績と比べると黒色毛 の出現率は55%で、差が見られなかった。

卵巣移植前後の、微生物検査成績を表2に示 した。ドナーとなる B6-dy の 微生物 グレード はコンベンショナルで Pasteurella pneumotropika, Pseudomonas aeru - このアイソレータを用いて卵巣移植を行った結 ginosa, 寄生虫の Giardia muris, Svhacia spp 等が検出されている。卵巣移 植後の アイソ レータ内の B6-dy コーニーでは、 これらが全てフリーとなりSPFが維持されて いた。

また、技術の確認のために行った無菌 IQI 系への卵巣移植手術では、アイソレータの無菌 検査ならびに手術動物でも無菌が維持されていた。

ま ٤ め

SPF の筋ジスマウス B6-dy 生産の合理化 のためにアイソレータ内の卵巣移植手術につい て検討した。

実体顕微鏡を取り付けた卵巣移植用アイソレ ータを試作し、その滅菌、消毒法を検討した。 果、微生物的清浄度の高い手術が行われ、術後 動物の交配実験では、効率よくヘテロマウスを 得ることが出来た。これらの成績は、従来のア イソレータ外で行われた成績とほぼ同等であった。

このようなことから、この技術は SPF 筋ジ スマウス生産に有効に応用できるものと期待さ れる。

表 2.	アイソレータ内卵巣移植マウスの微生物検査成績
表 2.	アイソレータ内卵巣移植マウスの微生物検査成績

	動 物 微 生 物	ドナー(conv) C57BL/6-dy	卵巣移植(SPF) dy ^{ov} C57BL/6-Aw	卵巣移植(GF) dy ^{ov} IQI
培養	Bordetella bronchiseptica Corynebacteriun kutscheri Escherichia coli Ol15 a,c Pasteurella pneumotropica Pseudomonas aeruginosa Salmonella spp Staphylococcus aureus Streptococcus pneumoniae Mycoplasma pulmonis			無菌検査 全例(一) 無菌維持
血清反応	Corynebacteriun kutscheri Salmonella typhimurium Tyzzer's organism Mycoplasma pulmonis Ectromelia virus Mouse adenovirus Mouse hepatitis virus Sendai virus			
鏡検	Giardia muris Spironucleus muris Syhacia spp	+ +	_ _ _	



写真 1. 卵巣移植用アイソレータ

昭和62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	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ー1ー1	0423-41-2711
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
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 4-4-1	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
監事	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
公募班員	三池 輝久	熊本大学医学部小児科 〒862 熊本市本荘1-1-1	096-63-1111