

マウスのマラリア原虫感染抵抗性遺伝子座の解析

○大野民生・空閑雅子・曾田智大・丸川高弘
(名大院・医・支援センター・実験動物)

マウス系統間には極めて大きなネズミマラリア原虫感染抵抗性の差が存在しており、この差を規定する宿主遺伝子を同定しその機能を解明することは、マラリアの治療・予防戦略への寄与に繋がると期待される。

我々はネズミマラリア原虫 *Plasmodium yoelii* 17XL 感染に対して強い抵抗性を示す 129X1/SvJ 系統と極端な感受性を示す NC/Jic 系統の交配群を用いた連鎖解析とコンジェニックマッピングにより、感染初期(感染 5 日後)の原虫増殖に対して最も大きな抑制効果を持つ遺伝子座 *Pymr* (*Plasmodium yoelii* malaria resistance locus) が第 9 番染色体テロメア側の約 1.7Mb の領域内に存在する事を明らかにしている。今回は *Pymr* 以外の感染抵抗性遺伝子座を見出することを目的として、NC/Jic 系統の上記領域を 129X1/SvJ 系統に置換したコンジェニック系統(NC.129X1-*Pymr*)と 129X1 系統の交配群を用いた連鎖解析を行った。その結果、第 8 番染色体の中央部に原虫の排除に関する強力な遺伝子座の存在が判明した。また、第 1 番染色体のセントロメア側には原虫の増殖抑制に関与する遺伝子が存在する可能性が示された。

一方、上述のネズミマラリア原虫 *P. yoelii* とは別のネズミマラリア原虫 *P. chabaudi* や *P. berghei* 感染においても既に複数の感染抵抗性遺伝子座が報告されている。これらの報告と今回の我々の結果を比較しながら、マウスのマラリア原虫感染抵抗性遺伝子座について考察してみる。

1 型糖尿病修飾遺伝子座の解析

○横井伯英、田辺幸子、清野 進
(神戸大学大学院医学研究科細胞分子医学)

【目的】これまで我々は 1 型糖尿病モデル Komeda diabetes-prone (KDP) ラットの主要遺伝子として Cblb を同定し、2 つの主要遺伝子 (MHC と Cblb) による発症モデルを提唱した。この発症モデルを検証するため、KDP ラットと同一の MHC を有する TM ラットの遺伝的背景に KDP ラットの Cblb 遺伝子座を組み込んだコンジェニック系統 (TM.KDP-Cblb) を作出し、1 型糖尿病を再構成することに成功したが、コンジェニック系統の発症率が低いことから、発症を修飾する遺伝子の存在が示唆された。今回、KDP ラットとコンジェニック系統を用いた交配実験によって 1 型糖尿病修飾遺伝子座の解析を行った。

【方法】KDP ラットとコンジェニック系統を交配して F1 ラットを、さらに F1 同士を交配して F2 ラット (250 匹) を作出し、210 日齢まで糖尿病の発症の有無を観察した。さらに F2 のうち 90 日齢以内に発症した早期発症群 90 匹と非発症群 69 匹を用いて全ゲノムスキャンを行った。

【結果】F1 は KDP ラットと同様の発症率であった (累積発症率約 80%)。F2 の発症率は約 70%であり、全ゲノムスキャンの結果、複数の修飾遺伝子座が同定された。また、発症日齢特異的および性別特異的に作用する遺伝子座が存在することが示唆された。

【結語】2 つの主要遺伝子以外に 1 型糖尿病の発症を修飾する複数の遺伝子が存在することが示された。

LEXF/FXLE リコンビナント近交系を用いたキンドリング感受性座位の同定
○岡島涼子¹、庫本高志¹、Voigt Birger¹、外尾亮治²、笹征史³、芹川忠夫¹ (¹京大院・医・附属動物実験施設、²(財) 動物繁殖研究所、³渚病院)

実験動物において脳の特定位に一定の電気刺激を1日1回反復して与えると、始めは行動と脳波上にわずかなてんかん様反応を示していた動物が、次第に反応の増強を示し、最終的に全身けいれんを示すようになる。この現象をキンドリングと言う。いったんキンドリングが形成された動物は、その後の電気刺激ごとに全身けいれんを示すようになり、ヒトの複雑部分発作（側頭葉てんかん）のモデルとして有用だと考えられている。

これまで、アウトブレッッドラットからキンドリング易発性・抵抗性の系統が選抜育種されていることから、キンドリング感受性遺伝子座の存在が示唆されている。リコンビナント近交系（RI 系統）は、多因子疾患や量的形質に関与する遺伝子座位の解析に有用である。中でも LEXF/FXLE RI 系統は世界最大の 34 ラインからなり、357 個の SSLP マーカーおよび約 2 万個の一塩基多型による Strain Distribution Pattern が作成されている。そこで我々はこの RI 系統を用いてキンドリング感受性遺伝子座位の同定を試みた。

RI の親系統である LE/Stm (n=6) と F344/Stm (n=10)、および RI のうち 6 系統 (LEXF2B、6B、7B、11、FXLE13、16。n=3~7) を用い、深麻酔下で扁桃核に電極を埋め込んだ。手術の 2 週間後、後発射を誘発する電気刺激強度を測定し、その翌日より一定電流の刺激を与えて発作症状を観察した。発作症状の程度は Racine のキンドリング獲得分類に基づいて 5 段階（軽度なものより stage1~5）に分類した。QTL 解析には MapManager QTXb20 を用いた。

stage5 が初めて出現するまでの刺激回数には親系統間で差異が見られ (F344/Stm 平均 3.9 回、LE/Stm 平均 9.2 回、 $P<0.01$)、キンドリング形成過程に差があることが確認された。QTL 解析において、後発射を誘発する電流閾値、その時の後発射持続時間、および stage5 が初めて出現するまでの刺激回数について、それぞれ複数個の座位を検出した。

ダンボラットの形態解析と遺伝解析

○矢ヶ崎佳代子、庫本高志（京大院・医・附属動物実験施設）

ダンボラットは、耳介の形態異常を示す自然発症ミュータントで、2005年、米国のファンシーラットコロニーから当施設へ導入された。耳介の形態異常は、常染色体上の単一劣性遺伝子 *dumbo* (*dum*) により支配されている。本研究では、ダンボラットの体重測定、臓器重量の測定、耳介・頭蓋骨の形態解析、並びに、*dumbo* 遺伝子の染色体マッピングを行うことを目的とした。

【材料と方法】

表現型解析には、ダンボラット F7 世代 (*dum/dum* 雄 6 頭・雌 7 頭、*dum/+* 雄 8 頭・雌 3 頭)を用いて、生後 3 週齢から 14 週齢にわたって体重測定を行なった。臓器重量の測定、耳介・頭蓋骨の形態測定は、14 週齢時に行なった。遺伝解析には、(BN×*dumbo*)F1×*dumbo* 戻し交雑子 146 頭を使用した。

【結果と考察】

体重、臓器重量、頭蓋骨の形態については、*dum/dum* と *dum/+*間で有意な差異はなかった。一方、耳介長は *dum/dum* が *dum/+*に比べ有意に小さく、耳介幅は、*dum/dum* が *dum/+*に比べ有意に大きかった。

Dum 座位はラット第 14 染色体上の 79Mb～85Mb の位置にマッピングされた。ラットーマウスヒト比較地図から、*Dum* 座位のマウス相同領域は、第 5 染色体上の 35Mb～37Mb 領域と第 11 染色体上の 3Mb～4Mb 領域であった。一方、ヒト相同領域は第 4 染色体短腕テロメア領域であった。

ヒト第 4 染色体短腕テロメアの染色体欠失は、Wolf-Hirschhorn 症候群 (WHS)の原因として知られている。WHS は、頭蓋・顔面の奇形（耳介変形を含む）、精神遅滞、発育不全を主徴とする難病である。欠失の大きさはさまざまであることから、欠失部位に存在する遺伝子と WHS に見られる個々の病態との対応は明らかではない。ダンボラットの原因遺伝子を同定することは、WHS という難病の病態解明の糸口になると期待される。

ラット *Arp3*, *Abcg5*, *Srebf1* 遺伝子の機能多型ジェノタイプング

○中西 聡、芹川忠夫、庫本高志（京大院・医・動物実験施設）

遺伝子機能や疾患感受性に関与する遺伝子変異が複数のラット系統に存在する。これは「機能多型」と呼ばれているが、疾患感受性に関与する遺伝子変異の多型を強調して「病態に関連する多型」と呼ぶこともできよう。そして、我々は、この多型を考慮したラット系統の選択が重要であることを指摘した(庫本ら、第 96 回関西実験動物研究会)。今回、疾患モデルラットにおいて、以下の3つの遺伝子変異が新たに報告されたので、ラット近交系を対象として遺伝子変異の有無を調べた。

遺伝子・変異系統	アミノ酸変異など	関連疾患	文献
Actin-related protein 3 (<i>Arp3</i>)・BUF/Mna	Leu111Phe	蛋白尿症	Akiyama et al.,2007
ATP binding cassette half-transporter gene 5 (<i>Abcg5</i>)・SHR、SHRSP、WKY	Gly583Cys	フィステロール血症	Scoggan et al.,2003
Sterol regulatory element binding transcription factor 1 (<i>Srebf1</i>)・SHR	プロモーター領域の 1 塩基置換	脂肪肝	Pravenec et al.,2007

【材料と方法】

NBRP-Rat で保存されている 125 系統、市販の 17 系統を用いた。上記の遺伝子変異部位を増幅するためのプライマーを作製して、それぞれの塩基配列を調べた。多型が複数の系統に発見された場合には、市販の 11 のクローズドコロニー (Wistar 系、SD 系、Long-Evans 系) について、同様に調べた。

【結果とまとめ】

蛋白尿症に関与する *Arp3* の変異は、報告されていた BUF/Mna のみに検出された。フィステロール血症に関与する *Abcg5* の変異は、21 系統の SHR 亜系統すべてと WKY/NMna、WKY/NCrlCrlj に検出されたが、クローズドコロニーには検出されなかった。脂肪肝に関与する *Srebf1* 機能多型は、75 系統(53%)で検出され、クローズドコロニーにおける変異アレル頻度は 0～100%と様々であった。「病態に関連する多型」がラット系統に存在することが新たに明らかになった。NBRP-Rat では、これらの多型情報をHPから公開する予定である。

RT1領域解析のための SSLP マーカーセットの開発とゲノムプロファイル
○高木弓枝^{1,2}、庫本高志¹、鶴見東志子¹、中西聡¹、真下知士¹、増井則夫²、芹川忠夫¹

(¹京大院・医・附属動物実験施設、²日本エスエルシー(株)品質管理部)

ラット MHC である RT1 は第 20 染色体上 (p12) の約 4Mb にわたる領域に存在し、免疫応答関連遺伝子や疾患感受性遺伝子等の 200 以上の遺伝子を含み、遺伝解析が精力的に行われてきた領域である。近年、遺伝解析の新たなツールとして SNPs が用いられているが、RT1 領域内において informative SNPs は少なく、簡便で経済的な SSLP がなお遺伝解析の重要なツールであると考ええる。そこで我々は、新規に開発した 57 個の SSLP マーカーを含む 67 個の SSLP マーカーセットを RT1 領域内に設定し、67 ラット系統についてのゲノムプロファイルを作成した。これらのマーカーはおおよそ 50kb に 1 個の密度で、平均アレル数は 8.10 ± 3.49 、平均多型率は $71 \pm 23\%$ であり、多型性に富んだマイクロサテライトマーカーを RT1 領域全体にわたって高密度に収集することができた。さらに興味深いことに BN/SsNHsd 以外の全ての系統で PCR の増幅が見られないマーカーが存在し、系統間のゲノム配列やゲノム再構成の変動の高さが示唆された。また、系統樹を基に 11 個の SSLP マーカーハプロタイプを同定した。

簡便で精度の高い SSLP タイピングは血清学的タイピングに代わる新たな RT1 領域の遺伝解析およびその特徴づけに有用な手段であると考ええる。

Mouse Hepatitis Virus の遺伝子解析

○小谷祐子¹、田島 優¹、愛原勝巳¹、河崎愛子¹、薮内かおり¹、
河合澄子¹、高木康博¹、Benjamin Seery¹、塩谷恭子²、岡本 明¹、
鍵山壮一朗¹、黒澤 努¹

(¹ 大阪大学医学部附属動物実験施設、² 国立循環器病センター動物実験室)

【背景・目的】 Mouse Hepatitis Virus (MHV) はマウスに強い伝染力を持ち、繁殖率の低下や実験動物に影響を及ぼす事が知られている。近年、病原体による汚染事故が多発しており、塩基配列解析が株の同定法として用いられている。MHV は変異を起こす事や、*in vitro* において株間で組換えが起こる事が報告されており、当施設にて異なる株の同時感染により、遺伝子組換えが起こる事を本研究会にて報告した。

当施設では MHV による汚染事故発生から今日まで、RT-PCR 法にて MHV 検査を行っており、MHV 陽性と判定した検体については、塩基配列の解読と系統樹解析により株の同定を行ってきた。今回はこれまでの解析結果を報告する。

【方法】 解析には、当施設由来株 24 株、他施設由来株 48 株、GenBank 登録株 18 株を用いた。RNA の抽出は QIAGEN 社の RNeasy mini kit を用い、RT-PCR の温度条件とサイクル数は、Yamada らの方法に従った。得られた PCR 産物をダイレクトシーケンス法を用いて、N gene 1,368bp の塩基配列の解読を行い、系統樹解析には遺伝子解析ソフト CLASTAL W を用いた。

【結果・考察】 系統樹解析の結果、大きく分類すると 4 系統に分かれた。270bp～500bp で特徴的な塩基配列を示しており、この部位が MHV 株のクラスターの位置付けに大きく関係していることが示唆された。

MHV 感染が確認された SPF 施設では、飼育室単位で単独クラスターを形成したが、コンベンショナル施設では同一飼育室由来株でありながら、異なるクラスターに属する例が見られた。

放医研で維持されているマウス系統の遺伝学的モニタリングシステムのためのチャートの作成および胚凍結と組み合わせた今後の展開

○上野渉¹、海野あゆみ²、大久保喬司²、飯名瑞希²、新妻大介²、伊藤正人²、伊田大貴²、宮沢正光²、藤井功輔²、川原隼²、早尾辰雄¹、西川哲¹

(¹放射線医学総合研究所 基盤技術センター研究基盤技術部 実験動物開発・管理課、²(株)サイエンス・サービス)

放射線医学総合研究所(以下、放医研)では、1960 年以来維持していた近交マウスを 1971 年から SPF 化して微生物学的・遺伝学的モニタリングを行いながら現在、15 系統について維持・生産を行っている。微生物学的モニタリングについては放医研において行われているが、遺伝学的モニタリングについては年 1 回、(財)実験動物中央研究所 ICLAS モニタリングセンターに依頼し、行ってきた。

今後、マウス数系統の外部委託や放医研での胚凍結により系統同定を目的とした放医研独自のシステムを確立する必要性が生じたために、PCR 法による遺伝学的モニタリングシステムを確立すべく以下の点について検討した。

1) 従来、遺伝モニタリングの標準座位とされている 18 座位の近傍のマイクロサテライトマーカーによる、DNA 産物のサイズによる遺伝子型を判定し、さらに検査されていない染色体上のマイクロサテライトマーカーについてスタンダードチャートを作成した。2) 1) についてモニタリングの効率化を図るために複数のマイクロサテライトマーカーを組み合わせ PCR 法を行い、遺伝子型の判定の可否について検討した。

18 座位に相当するマイクロサテライトマーカーによるスタンダードチャートの作成は完了し、15 系統マウスの遺伝学的モニタリングシステムが確立した。さらに遺伝子改変マウス等特殊な系統についても容易に判定できるシステムの確立および胚凍結と組み合わせた今後の展開について述べる。

Establishment of DMN-induced liver cirrhosis model in NOD/SCID mouse for evaluation of the efficacy and safety of human mesenchymal stem cells

Byeong-Cheol KANG, Jeong-Whan CHE, Seung-Hyeok Seok, and Kook-Hyun LEE
College of Medicine, Seoul National University and Clinical Research Institute, Seoul
National University Hospital

Recently, many studies have suggested the potential of human mesenchymal stem cells (hMSC) to differentiate into a hepatocyte-like lineage. In this study, we tried to establish an animal model of DMN (Dimethylnitrosamine)-induced liver cirrhosis in NOD/SCID mouse for evaluation of the efficacy and safety of cell therapy such as human mesenchymal stem cells.

NOD/SCID mice were treated with DMN(1, 5, 10 mg/kg, i.p.) for 3 consecutive days/week for 5 weeks and sacrificed on the 3, 4, 5, 6 week after first DMN injection. In 10 mg/kg group, most mice were critically ill or died. In 5 mg/kg group, there were obvious clinical signs such as pale, abdominal distention, and piloerection. However, there was no difference between control group and 1 mg/kg group in clinical findings. Based on serum biochemistry for evaluation of the liver function, ALT, AST, ALP and total bilirubin in 5 mg/kg group were significantly increased and albumin was decreased compared with 1 mg/kg or control group. In histopathological findings in the liver, there were central venous necrosis, hemorrhage, and fibrillar septa formation in 5 mg/kg group at 4 week. The extracellular matrix(collagen), iron, glycogen deposition were confirmed by Masson Trichrome (MT), Prussian Blue (PB) and Periodic Acid Schiff (PAS) staining, respectively. Besides, we found degenerative changes of renal structure and splenomegaly in 5 mg/kg group.

In conclusion, we consider that treatment of DMN 5 mg/kg for 4 weeks to NOD/SCID mice can induce pertinent liver cirrhosis model and it can be useful to evaluate the efficacy and safety of cell therapy such as human mesenchymal stem cells.

Fe-NTA 誘発酸化ストレスモデルを用いた抗酸化作用の評価における投与方法の重要性について

○ 飛田康孝、岡本均、安場正子、松岡信男（株式会社ケー・エー・シー）

酸化ストレスが糖尿病や動脈硬化をはじめとするさまざまな疾患に関与しているという報告はこれまでに数多くなされており、抗酸化物質の日常的な摂取がこれら疾患の予防に有効であると考えられている。このため、これまでに様々な天然由来物質について抗酸化作用の探索が行なわれ、抗酸化作用を示す物質が数多く見出されている。

このような抗酸化物質については脂溶性や水溶性といった物性は勿論のこと、作用機序なども様々であることから、*in vivo*での抗酸化作用の評価には、評価物質の特性に合った投与方法の検討が必要である。

そこで我々は評価物質の特性と有効な投与方法の組み合わせについて調べるため、酸化ストレス誘発剤として鉄ニトリロ三酢酸（Fe-NTA）を用いたマウス酸化ストレスモデルにさまざまな抗酸化物質を混餌投与または単回強制経口投与し、血漿中過酸化脂質量をチオバルビツール酸反応物（TBARS）量として定量することで各物質の抗酸化作用を調べた。

現在までにカテキン抽出物、ビタミン E、プロブコール（高脂血症治療薬）の混餌投与および単回強制経口投与での評価を行った。この結果、カテキン抽出物では、1%の濃度で飼料に添加して 1 週間混餌投与（1000 mg/kg/day 相当）した場合よりも、500 mg/kg の用量で単回強制経口投与した場合の方が強い血漿中 TBARS 値上昇の抑制効果を示した。一方、ビタミン E やプロブコールでは、混餌投与の方が単回強制経口投与よりも強い血漿中 TBARS 値上昇の抑制効果を示した。

本発表では、さらに数種の抗酸化物のデータも含めて、物質の特性に合った適切な投与方法について考察する。

Kyoto Apc Delta ラットを用いた大腸腫瘍誘発試験

○ 吉見一人¹、真下知士¹、滝澤明子¹、加藤めぐみ²、平林真澄²、
芹川忠夫¹、庫本高志¹

(¹京大院・医・動物実験施設、²生理学研究所・行動代謝分子解析センター)

Kyoto Apc Delta (KAD) ラット (F344-*Apc*^{Kyo1588}/Kyo) は、エチルニトロソウレア誘発ラットミュータントアーカイブ (KURMA) の遺伝子変異スクリーニングと顕微授精により開発した系統で、家族性大腸腺腫症の原因遺伝子である *Apc* 遺伝子にナンセンス変異 (S2523X) を持つ。KAD ラット (ミュータントホモ型) は、大腸腫瘍を自然発症しない。そこで、KAD ラットの大腸腫瘍誘発試験を行った。また、大腸腫瘍の発生過程を、ヒト用の気管支内視鏡を用いて経時的にモニターすることを試みた。

【材料と方法】

大腸腫瘍の誘発試験には、KAD ラットと対照系統の F344/NSlc ラット、それぞれ雄 6 頭を用いた。5 週齢時にアゾキシメタン (AOM) を 20mg/kg 皮下投与した。1 週間後から、2%デキストラン硫酸 (DSS) を 1 週間飲水投与した。AOM 投与 8 週以降、肛門部から内視鏡 (オリンパス社 OTV-S7V) を挿入して大腸管腔内を観察し、腫瘍の位置と個数を記録した。AOM 投与 15 週後に安楽死処置して剖検した。

【結果と考察】

大腸腫瘍誘発試験において、KAD ラットで 100% (6/6 頭)、対照群で 83% (5/6 頭) に大腸腫瘍を検出した。剖検時の 1 頭当たりの腫瘍数は KAD ラットの方が有意に多く (9.5 ± 0.7 個 vs 1.3 ± 0.3 個、 $p < 0.001$)、腫瘍 1 個当たりの体積も KAD ラットの方が有意に大きかった (33.9 ± 9.4 mm³ vs 10.3 ± 5.6 mm³、 $p < 0.003$)。

KAD ラットの内視鏡による観察では、AOM 投与 8 週後において、すでに 1 頭当たり 3.3 ± 0.5 個の腫瘍を認め、11 週後で 5.8 ± 0.9 個、14 週後で 17.3 ± 1.8 個と、腫瘍数の増加とサイズの増大を経時的に観察することができた。

以上の結果から、KAD ラットは、大腸腫瘍の発症機構の解明、診断・治療・予防方法、抗癌剤の開発などに、有用なモデルラットになると期待される。

気道内への直接曝露による喘息モデル作成の確立

○今田竜一¹, 高橋義博¹, 山下祐介¹, 宇都宮慎治¹, 大坪靖治¹, 治田俊志², 久野彰文², 和泉博之¹, 中村隆広¹, 洲加本孝幸¹

(株式会社新日本科学安全性研究所¹), Translational Research 株式会社²)

【目的】喘息モデルの作製には、アレルゲンをカニューレ管を通して液体で投与方法と、エアゾールとして吸入させる方法が用いられている。しかしながら液体投与の場合は、呼吸困難とそれによる低酸素症の誘発、また、エアゾール吸入の場合はその多くが気管まで到達しない等の問題がある。今回我々は前述の問題点を排除するため、Penn-Century 社製の Intrapulmonary Aerosolizer をモルモット気管へ直接挿入しアレルゲンを肺へ曝露させ、喘息モデルの作製を試みたので報告する。

【方法】アレルゲンとして卵白アルブミン (ovalbumin, 以下 OVA) を用い、気道内感作用に OVA を 1 mg/mL, 気道内惹起用に 10 mg/mL を投与した。対照群には生理食塩液のみを投与した。動物は 5~6 週齢の雄性 Hartley モルモット (Slc:Hartley 日本エスエルシー株式会社) を使用し、感作は 1 日 1 回 7 日間連続で、惹起は最終感作後 12 日目にいずれも 100 μ L/body の容量で気道内へのエアゾールとして投与することによりおこなった。感作方法については、専用の投与補助器具及び保定器を用い喉頭蓋を露出させ、気管の入り口を目視にて確認し投与を実施した。検査項目としては、惹起直後から 60 分後まで、呼吸器系の異常について観察を行い、その後、肺、気管支および気道について、肉眼的および組織学的な観察を実施した。また、気管支肺胞洗浄液 (以下 BALF) を採集し、塗抹標本作製して光学顕微鏡下で BALF 中の細胞数を測定した。

【結果】OVA 感作群では、一般状態において呼吸器系の異常 (軽度あるいは重度の呼吸困難、チアノーゼ、運動障害等) が全例でみられた。剖検時の肉眼的観察では肺に赤色巣が 7 例でみられ、組織学的検査では気管支壁における炎症性的変化が 6 例でみられた。BALF 中の細胞数測定では、媒体対照群と比較し顆粒球およびリンパ球の有意な増加がみられた。また、能動感作時に、呼吸器系の障害と考えられる症状はみられなかった。

【結論】本研究における気道内感作および惹起にて用いた投与方法は、モルモットを用いた喘息モデルの作製方法として有用であり、なおかつ動物に対して負担が軽いものであると考えられた。

Infection with *Pneumocystis carinii* in rat

OKaori YABUUCHI, Masaru TAJIMA, Yuko KOTANI, Katsumi AIHARA, Aiko
KAWASAKI, Shiro KANEKO, Yasuhiro TAKAGI, Sumiko KAWAI, Akira
OKAMOTO, Soichiro KAGIYAMA, Benjamin Seery and Tsutomu KUROSAWA
(Institute of Experimental Animal Sciences, Osaka University Medical School, Japan)

For the last 20 years, *Pneumocystis* was recognized as organisms in the group of fungi. In the *Pneumocystis* infecting the rat, there are 2 species, *Pneumocystis carinii* (*P.c.*), and *Pneumocystis wakefieldae* (*P.w.*). These organisms were able to dwell and replicate in the lung of immunocompromised hosts and especially naive immunocompetent hosts (i.e. young mammals). *P.c.* is thought to be a specific pathogen for immunocompromised animals such as the nude rat. On *P.c.* infection, the eosinophilic alveolar exudate and foamy macrophage are evident. There are trophic forms and cystic forms in the life cycle stages.

The standard methods of detecting *Pneumocystis* are the combination of PCR and special stainings (i.e. Toluidine Blue O (TBO), Giemsa and Gomori-Grocott's methenamine silver nitrate (GMS)) of trophic forms or cystic forms. There is no single definitive method to detect both *P.c.* pathogenic power and presence in one specimen. There is a paucity of information in detecting *Pneumocystis* in rat.

In this report, we utilized the fluorescent immunochemistry (IM) to detect *P.c.* infection with commercially available antibody.

ラット ENU ミュータントアーカイブ：LGI1 標的遺伝子のスクリーニング
○石田紗恵子¹、真下知士¹、滝澤明子¹、国広弥生¹、青砥利裕²、上田正次²、池田昭夫³、高橋良輔³、芹川忠夫¹（¹京大院・医・動物実験施設、²フェニックスバイオ、³京大院・医・臨床神経学）

ラットは、マウスより体のサイズが大きく、生体試料の採取や実験処置が容易なため、医学、薬学、栄養学、行動学などの研究分野で広く利用されている。近年、我々は化学変異原 ENU（エチルニトロソウレア）を利用して、1）トランスポゾン Mu を用いた効率的なスクリーニング方法（MuT-POWER）と、2）顕微授精法（ICSI）による効果的な個体復元を組み合わせることにより、ラットではこれまで不可能であった標的遺伝子変異ラットを作製することに成功した（Mashimo *et al.* Nat Genet 2008）。これまでに、ENU 投与 F344/NSlc 雄ラットを同系統の雌ラットと交配して得た G1 ラットを 5,000 頭作製し、ゲノム DNA と凍結精子をラット ENU ミュータントアーカイブ（KURMA）として保存した。本研究では、この KURMA の有用性を調べるために、LGI1 (leucin-rich glioma inactivated 1) 遺伝子を標的としてスクリーニングを実施した。

ラット LGI1 (1,674 bps, 557 AA residues) の各エクソンを増幅するため、10 個のプライマーを合成した。LGI1 は、ヒト常染色体優性外側側頭葉てんかん（ADLTE）の原因遺伝子として発見され、これまで 20 家系以上で挿入、欠失、置換変異が報告されている。KURMA 5,000 において、MuT-POWER によりスクリーニングした結果、T1261G と T1406C の 2 つの点突然変異を検出した。前者は、ヒト ADLTE 患者で最も多く遺伝子変異が見つかっている第 8 エクソンに存在し、中性・非極性ロイシンから塩基性・極性アルギニンへのミスセンス変異であった。後者は同じ第 8 エクソンにおけるサイレンス変異であった。現在、T1261G（L385R）の変異を持つ LGI1 標的遺伝子変異ラットを作製するため、ICSI により凍結保存された該当精子の個体復元を行っている。

ラット ENU ミュータントアーカイブは、ヒト疾患の原因遺伝子を標的とした遺伝子変異ラットモデルを作製するための有用なツールである。

横紋筋肉腫モデルマウスに発症する悪液質関連遺伝子の解析

○鈴木 昇、齋藤 浩充

(三重大生命セ・動物機能ゲノミクス)

背景：悪液質 (cachexia、カヘキシー) は、癌や慢性疾患の経過中に起こる主として栄養失調に基づく病的な全身の衰弱状態である。これまで動物モデルを用いて、いくつかのサイトカインの過剰発現とカヘキシーの因果が報告されているが、ほとんどすべてが移植癌モデルであり、ヒト病態を忠実に反映するとは言えない。本研究では、ヒト病態により近い自家癌発症で、かつ、カヘキシーを呈するモデル動物を作製する。さらに、由来する腫瘍を材料として、腫瘍の遺伝子発現の観点からその病態の原因となる分子メカニズムの一端を明らかにする。

方法と結果：Cre/LoxP システムを応用して、任意の時期と臓器に活性型 K-Ras 遺伝子を強制発現できるマウスを作製し、大腿骨格筋に活性型 K-ras 遺伝子発現を誘導すると、p53^{+/+}と p53^{-/-}の遺伝背景においてのみ、遺伝子型が活性型 K-ras 遺伝子発現・p53^{-/-}の多形型横紋筋肉腫 (RMS) が発生する。RMS に罹患した動物は、約 2 週間で全例死亡するが、餌摂取量の減少と体重減少をともなう悪液質が主たる原因であると推察された。メチルコラントレンで誘導した RMS 担癌動物ではカヘキシーを認めないことから、活性型 K-ras 遺伝子発現・p53^{-/-}の特殊なタイプの腫瘍細胞がカヘキシーを誘発すると結論した。摘出した活性型 K-ras 遺伝子発現・p53^{-/-}RMS 腫瘍塊を材料として、造腫瘍能 (+) カヘキシー発症能 (+) 腫瘍株#3396 株、造腫瘍能 (+) カヘキシー発症能 (-) 腫瘍株#6091-3 株を樹立した。2 つの株を正常動物に移植し腫瘍を造らせた後、摘出し RNA を抽出、アジレント社のマイクロアレイを用いて、発現プロファイルを比較した。その結果、これまで報告されているカヘキシー関連サイトカインとは異なる分子種が、#3396 株特異的に複数検出された。

電位依存性 Ca^{2+} チャンネル $\alpha 1\text{A}$ 蛋白質ノックダウン及び脳の領域特異的ノックアウトマウスの解析

○齋藤 浩充、鈴木 昇

(三重大生命セ・動物機能ゲノミクス)

背景・方法 P/Q 型電位依存性 Ca^{2+} チャンネルは、脳に多く存在し、神経伝達物質の放出、神経細胞生存に関わっていると考えられている。P/Q 型電位依存性 Ca^{2+} チャンネルの分子的な実体は、チャンネルポアを形成する $\alpha 1$ サブユニットA蛋白質 (CACNA1A) である。これまでに、*Cacna1a* 遺伝子の自然発生変異体が、ヒト、マウス、ラットで報告されており、運動失調、癲癇、進行性の小脳変性などの多様な病態を示すことが明らかになっている。しかしながら、これらの変異体では機能の異常なチャンネル蛋白が発現しており、症状が正常機能の低下によるのか、異常機能によるのか不明である。そこで、我々は、全身で CACNA1A 蛋白質量が正常の 60%、50%、20%、10%、0% になった一連のノックダウンマウスを作製し、チャンネル機能低下の影響を解析した。加えて、20% にノックダウンした背景に、小脳プルキンエ細胞、大脳に特異的なノックアウトを導入し脳の領域と症状の関係を解析した。

結果・考察 蛋白質量が正常の 60%、50% の量に減少したマウスに異常は検出されなかった。20% に減少したマウスは、欠神発作、間代発作、運動失調、進行性小脳変性の症状を示したが正常と同様に生存可能であった。10% に減少したマウスは、欠神発作、より重度の運動失調に加え、発作性異常運動症を併発、0% になったノックアウトマウスでは症状がさらに悪化し、どちらも生後 3 週前後で致死であった。これらの結果から、欠神発作、間代発作、運動失調、進行性小脳変性、発作性異常運動症は、正常機能の低下のみで発症しうることで、それぞれの症状は蛋白質量の減少量に依存することが明らかとなった。20% へのノックダウンに加えて小脳プルキンエ細胞特異的なノックアウトは、発作性異常運動症の発症、運動失調の悪化が、大脳特異的なノックアウトは、多焦点性間代発作と発作性異常運動症の発症がみられた。この結果から、運動失調への小脳プルキンエ細胞の関与、癲癇発作への大脳の関与、発作性異常運動症への両方の関与が示唆された。

新に作製された一連のマウスは、P/Q 型 Ca^{2+} チャンネル及びそのシグナル経路の低下を原因とする神経疾患の解析に有用なモデル動物となると考える。

発癌モデルマウスの生体腫瘍に対する X 線 CT 装置による解析可能性の検討

○¹西 泰明、²齋藤 浩充、²鈴木 昇

(¹三重大生命セ・放射線化学、²三重大生命セ・動物機能ゲノミクス)

背景・方法：発癌モデル動物を用いて実験、解析することの利点の一つは、発癌前後の変化、発癌後の増殖といった時間軸にそった経時的変化を任意の時期に解析可能な点にある。その一方で、これまで解析には、実験動物を犠牲死させ観察することが不可欠であった。そのため、解析したいポイントを増やす場合、それにあわせて解析する実験個体数（群）を増やす必要があった。今回、肺腫瘍モデルを例として、実験動物用 3DX 線 CT 装置を用いた生体での腫瘍検出の可能性を検討することとした。

我々は、遺伝子改変により肺胞の細胞特異的に癌型 K-Ras 遺伝子を発現することで、ヒトの非小細胞癌様の肺腺腫を発症するモデルマウスを開発した。この肺腫瘍モデルは、従来の化学発癌モデルと異なり、原因遺伝子変異が明らかであり、化学物質投与による生理変化などが生じないため、よりヒトの発癌過程を再現したモデル動物として、肺癌の治療および予防法の開発に有用である。肺胞上皮細胞で癌型 K-Ras 遺伝子誘導後、6 ヶ月のマウスを 3DX 線 CT 装置及び肺同期ソフトを用いて撮影した。撮影後に摘出肺の組織切片を作製し、X 線 CT 撮影像と比較を行なった。

結果：従来の撮影方法では呼吸による変動が影響し、得られた像は不鮮明であり腫瘍の正確な同定は不可能であった。一方、呼吸同期ソフトを用いた撮影では、鮮明な撮影像が得られた。組織切片との比較から最小直径 0.3mm の腫瘍が CT 画像で確認可能であった。

この結果から、本方法を用いることで生体における同一個体の同一肺腫瘍の継続観察が可能であることが示された。3DX 線 CT 装置による解析は、腫瘍に対する薬理学的な効果や、腫瘍免疫の解析などにおいて、より明確で実験動物個体数の削減と、動物個体の苦痛の低減にもつながる有用な方法であると考ええる。

Helicobacter pylori 感染症におけるサイトカインの役割
○喜多正和、澤井直樹、塩見 聡、山本俊郎、今西二郎
(京府医大院医学研究科 免疫・微生物学)

【目的】 *Helicobacter pylori* (*H. pylori*) 感染により発症する胃炎の病態形成におけるサイトカインの役割を検討するため、サイトカイン遺伝子欠損マウスを用いて検討した。

【方法】 *H. pylori* CPY2052 株をヘリコバクター用 Aneropack System (80% N₂、15% CO₂、5% O₂) を用い、Hp 選択培地 (栄研化学) で 37 °C、5 日間培養した。コロニーをさらに 15%FBS 含有 brain-heart infusion (BHI) 液体培地で培養後、2 X 10⁸ CFU/ml に調製し、あらかじめ 4 時間絶食させた野生型 C57BL/6 マウスおよび IFN-gamma, TNF-alpha, IL-17 遺伝子欠損 (KO) マウスに胃ゾンデを用いて 0.2ml 経口投与した。感染 1、2、3、6、12 ヶ月後にマウスを安楽死させ、胃を摘出し、長軸にそって二分割後、一方を胃内定着菌数 (胃内コロニー数) の測定に、他方は病理組織学的評価 (炎症の程度) に用いた。組織は 10%ホルマリンで固定、パラフィンで包埋後、ヘマトキシリン・エオジン染色を行なった。炎症の程度は、鏡検にてシドニーシステムに従いスコア化を行い、評価を加えた。なお、コロニーの特異性は PCR 法にて確認した。

【結果】CPY2052 株を野生型および IFN-gammaKO, TNF-alphaKO, IL-17KO マウスに感染させ、経時的に胃粘膜の病理所見および胃内定着菌数を測定した結果、野生型マウスでは、感染 2 ヶ月後より胃粘膜および粘膜下組織に細胞浸潤をともなう炎症像が認められたが、IFN-gammaKO および IL-17KO マウスではほとんど炎症は認められなかった。幽門部および体部における浸潤細胞は主に好中球とリンパ球であったが、IL-17KO マウスにおいては有意な好中球浸潤の抑制が認められた。さらに、IL-17KO マウス胃における MPO 活性は有意に低下していた。一方、*H. pylori* 感染後の胃内菌数を測定した結果、IL-17KO マウスの胃内菌数は野生型マウスに比べ有意に減少していたが、IFN-gammaKO マウスでは有意に増加していた。

以上の結果、*H. pylori* 感染において、IFN-gamma および IL-17 は胃炎発症に重要な役割を果たしていることが示唆された。

セルロース欠乏飼料と喫煙曝露が C57BL/6 マウスの腸内環境と栄養状態に及ぼす影響

○ 西井康恵¹、久保薫²、友田恒一³、吉川雅則³、朝原崇⁴、野本康二⁴、木村弘³

(¹畿央大学・健康科学部、奈良医大・²動物実験施設・³第二内科、⁴ヤクルト中央研究所)

食物の摂取は動物の身体や生命の維持に不可欠であり、そのバランスは健康の維持に重要である。近年、食物繊維が消化器系のみならず呼吸器系や循環器系などの種々の疾患の発症と関連することが示唆されている。また、喫煙により体重が減少することが知られているが、その機序に不明な点が多い。今回、我々は C57BL/6 マウスを用いて、セルロース欠乏飼料と喫煙曝露の栄養状態や腸内環境の変化および酸化ストレスに対する相互作用を検討した。

【方法】 12 週齢雄性 C57BL/6 マウスを AIN-93G（以下、通常食とする）あるいはセルロース除去した AIN-93G（以下、セルロース欠乏食とする）で飼育した。喫煙曝露は 20 本のロングピースを 1 日 1 回、週 5 回（月曜日から金曜日）、16 週間に亘って行った。4 群（①通常食/ 非喫煙、②セルロース欠乏食/ 非喫煙、③通常食 / 喫煙、④ セルロース欠乏食/ 喫煙）を構成し、抗酸化ストレス活性、腸内環境の変化について比較検討した。抗酸化ストレス活性は Oxy 吸着テスト（Diarcon 社）を用いて血漿の抗酸化能から評価した。腸内環境は最終喫煙曝露 24 時間後の回盲部内容物から高速液体クロマトグラフィー法を用いて、有機酸（酢酸、プロピオン酸、酪酸、乳酸、吉草酸、コハク酸）の濃度と pH を測定して評価した。

【結果】 1) 通常食群、セルロース欠乏食群いずれも喫煙曝露により体重は有意に減少し、特に喫煙曝露開始 12 週間後からは通常食群に比してセルロース欠乏食群で更に有意な体重減少を認めた。2) 抗酸化ストレス活性は非喫煙群、喫煙群ともに通常食群に比してセルロース欠乏食群で有意に低下した。また、セルロース欠乏食群では喫煙群が非喫煙群に比して有意に低下した。3) 非喫煙群では通常食群に比してセルロース欠乏食群では回盲部内容物中のコハク酸および酢酸濃度が高値を示し、プロピオン酸濃度は低値を示した。喫煙群においては通常食群に比してセルロース欠乏食群ではコハク酸およびイソ吉草酸濃度が有意に高値を示し、酢酸濃度は有意な低値を認めた。

【結論】 食物繊維であるセルロースの摂取低下は腸内環境に変化をもたらし、喫煙曝露による体重減少や全身性炎症などの systemic effect を増悪させる可能性が示唆された。

欠神発作脳波自動判定システムにより抽出された pre-clinical 波の発作リズムの変動

○坪田裕司¹、都丸千夏²、飯島一憲³、大和田恭子²

(¹大阪河崎リハビリテーション大学リハビリテーション学部生理学、²群馬工業高等専門学校物質工学科、³東京大学工学部電子工学科)

我々は てんかん発作の解析を効率良く進めるために、脳波を入力信号として、Wavelet 変換による発作時脳波の特徴抽出と、3 層構造で中間層24個の人工ニューラルネットによる欠神発作自動判定システムを構築した。発作判定の精度は、24 時間のラット脳波に対するヒトの判定データとの一致率で 93%である。我々は、このシステムを用いて、慢性脳波データを解析し、発作のリズムを検討し、これまでに Wakayama Epileptic Rat (WER) ラットの発作発症頻度について、暗期に高く、明期には低い発作率で推移し、ラットの活動期に欠神発作も高くなることを報告してきた(96 回関西実験動物研究会他)。今回、臨床で pre-clinical 波と呼ばれる、単発の棘徐波について解析したところ、異なるリズムを示す症例を発見したので報告する。

材料には、欠神発作と強直発作を 1 個体が同時に示すてんかんモデル動物である WER ラットの脳波記録を用いた。この系統はキンドリングを必要とせず、両発作を自然発症し、てんかん発作以外に外見繁殖等の異常を示さない特徴がある。慢性脳波記録は、自由行動下でテレメトリー法 (500scan/s) により採取されたもので、上記ニューラルネットにより、1 秒間脳波における欠神発作あり、なしを判定した。各個体データにおいて 3 日間の各発作の持続時間を分析し、連続する通常の発作波と、前後に発作がなく 1 秒だけ出現する棘徐波を pre-clinical 波として、各出現頻度を解析した。

その結果、発作発症頻度について、連続波は、暗期に高く明期には低い発作率で推移するが、pre-clinical 波の時間推移において、8 個体は同じリズムで推移するが、3 個体は異なるピークを示すことを発見し、両発作波のリズムにおいて数時間から 12 時間の位相のズレを認めた。pre-clinical 波は、これまで臨床概念では発作に至らずに終わる病態の背景を示す波と考えられている。今後例数を増やした解析が必要だが、異なるリズムを示す例があることから、別の発症機序の存在が示唆された。

以上から、てんかん発作の自動解析システムにより、WER 系統の発作発現における新たな特徴が明らかとなった。今後強直発作の解析も進めていけば、てんかん発作の発症機序解明に新たな可能性をもたらす解析系となることが期待される。

dmy ラットのミエリン崩壊におけるグリア細胞の役割

○ 狗巻和男, 井澤武史, 山手丈至, 小谷猛夫, 桑村 充
(大阪府立大学・獣医病理学教室)

ミエリン形成は、種々の構成蛋白質・脂質の産生と輸送、接着分子の発現、ミエリン形成膜と軸索との高度な相互作用を必要とする複雑な機構によって制御されており、ミエリンの形成および維持機構には不明点も多い。*dmy* (demyelination) ラットは、後肢の運動失調を特徴とするミュータントで、そのミエリン崩壊はミエリン形成後期から成熟後に始まり、ミエリンの維持に異常があることが示唆されている。本研究は、*dmy* ラットの病理発生を明らかにする目的で、グリア細胞の動態に注目し解析した。

4, 6, 7, 8 週齢の *dmy* ホモ型および対照ラット (ヘテロあるいは野生型) の脊髄 (胸髄) について、抗 Iba-1 (ミクログリア/マクロファージ), NG2 (オリゴデンドロサイト前駆細胞) 抗体を用いた免疫組織化学を行い、グリア細胞の動態を解析した。また、PLP に対する RNA プローブを用いた *in situ* hybridization 法を行い、オリゴデンドロサイトの動態を調べた。さらに real-time PCR 法にて活性化グリアが発現するサイトカイン (TNF- α , IL-1 β , IL-6, IL-6R, AIF-1) の動態を調べた。

4 週齢では、*dmy* ラットと対照ラットの間にオリゴデンドロサイトの形態および数に差異は見られなかった。7 週齢 *dmy* ラットの腹索において、対照ラットと比べて有意なオリゴデンドロサイトの減数が確認された。さらにオリゴデンドロサイト前駆細胞は、背索ではどの週齢の *dmy* ラットと対照ラットの間にその形態および数に差異は見られなかったが、腹索では対照ラットと比べて、6, 7 週齢の *dmy* ラットで細胞数が増加し、8 週齢では細胞数が激減した。6, 7 週齢 *dmy* ラットにおいて、Iba-1 陽性の腫大した細胞質を有する活性化ミクログリアが多く観察された。TNF- α , IL-1 β , IL-6 の発現は、病変形成時期と一致して発現量の増加傾向を示した。

ミエリンの崩壊時期に一致してグリア細胞の動態・形態変化及びサイトカインの発現変化が認められ、グリア細胞が直接あるいは間接的に *dmy* ラットのミエリン崩壊に関与していることが示唆された。

小脳虫部欠損(CVD)ラットの小脳異形成の病理発生における *Unc5h3* と *Netrin1* の役割

○貝塚理恵, 井澤武史, 山手丈至, 小谷猛夫, 桑村 充

(大阪府立大学・獣医病理学教室)

小脳虫部欠損 (cerebellar vermis defect, CVD)ラットは, 小脳虫部の欠損および小脳異形成を特徴とする自然発症ミュータントである. その原因遺伝子は, 神経回路形成を司る軸索誘導因子 *Netrin1* の受容体遺伝子 *Unc5h3* であり, CVD ラットでは *Unc5h3* 発現は認められるものの, *Netrin-Unc5h3* シグナル伝達に必要な細胞内ドメインを欠くことが明らかとなっている.

本研究では, CVD ラットにおける小脳異形成の発症メカニズムを解明することを目的として, ①*in situ* hybridization 法を用い, 生後 8, 12, 20 日齢の CVD ラットの小脳発達期における *Unc5h3* および *Netrin1* の発現細胞の動態を調べた. また, ②Real-time PCR 法により *Unc5h3* と *Netrin1* の mRNA 発現を経時的に比較検討した. ③12 日齢の CVD ラット小脳に対し, 抗 Calbindin(プルキンエ細胞), 抗 GFAP(バークマングリア・アストロサイト), 抗 NGFR(外顆粒細胞), 抗 RECA-1 抗体(血管)を用いた二重免疫組織化学を行い, 相互関係を評価した.

①*In situ* hybridization 解析にて, *Unc5h3* と *Netrin1* の発現は内・外顆粒層および分子層を移動中の外顆粒細胞で認められた. ②Real-time PCR 解析では, 8 日齢のホモ型ラットの *Unc5h3* mRNA 発現量に有意な減少が認められたが, 他の日齢ではホモ型とヘテロ型ラット間に発現量の差はなかった. 一方, *Netrin1* mRNA 発現量は, 調べた各日齢においてホモ型とヘテロ型ラット間に明らかな差は認められなかった. ③免疫組織化学解析により, 外顆粒細胞が異常集簇した部位にしばしば血管が認められた. また, 同部位にプルキンエ細胞・バークマングリアの突起の走行異常・消失が見られた. CVD ラットでは, *Unc5h3* の機能異常により, 外顆粒細胞の移動が障害され, 小脳の層構築が異常となることが示唆された.

カニクイザルにおける視覚機能検査

○杉本潤一郎、杉本恭平、津田裕一、堀口浩資、久世 博
株式会社ボゾリサーチセンター

眼底部にタペタム領域を持つ夜行性動物とは異なり、ヒトの視覚は適度な明るさの中で視覚機能を発揮することが可能となる。角膜及び水晶体を通過した画像は上下が反転し、眼底部の一部、つまり視細胞の1つである錐体細胞が集中している黄斑部にフォーカスを合わせている。錐体細胞の応答は視神経を経由して直線的に脳幹の外側膝状体に接続、大脳皮質の視覚野領域へと接続している。視細胞は脳から発生した神経細胞であり、視細胞及び網膜色素上皮細胞の変性によって障害を受けた視細胞は再生することではなく、失明など視覚障害の大きな要因となっている。私達はヒトの視覚器及び視覚伝導路とほぼ同様の構造を持つカニクイザル (*Cynomolgus monkey*) を用いて網膜と視覚伝導路の両反応を記録し、網膜から大脳視覚野領域までの視覚機能検査を実施したので報告する。

5〜7才齢の雌性カニクイザル（ベトナム産）を用いて、散瞳剤点眼による散瞳後、塩酸ケタミン 50 mg/mL + キシラジン混合（3:1、0.2 mL/kg、i.m）の麻酔下で、角膜表面麻酔及び角膜保護剤を用いて LED 発光型コンタクト電極（有メイヨー）を片眼（左眼）に「+」電極として装着、脳波用皿電極の「-」電極を前頭部に装着し、網膜電位図（以下、ERG と略）及びフラッシュ光による視覚誘発電位（以下、F-VEP と略）の共通電極とした。また、F-VEP 電極として「+」電極を後頭部、接地電極を耳朶にそれぞれ設置した。完全な暗室状態とした飼育室で 20 分間以上の暗順応を行った後、杆体系応答〔Rod Response、Maximum Response、Oscillatory Potentials（以下、OP と略）〕を記録し、10 分間以上の明順応後、錐体系応答（Cone Response 及び 30Hz Flicker Response）及び F-VEP を誘発電位装置（MEB-9102、日本光電工業㈱）にて記録した。

次に視覚障害を引き起こすとされるメタノールを 1000 及び 1500 mg/kg (500 mg/mL 濃度液を 2 又は 3 mL/kg) の用量で、4 例/群の雌性カニクイザルに 1 日 1 回、反復経口投与し、投与後 3 時間、投与 2、3、4 及び 5 日の ERG 及び F-VEP を記録した。

ERG において、両群とも投与後 3 時間から初期変化が認められ、明らかな視覚機能障害を示唆する変化（潜時延長及び電位減少）が 1000 mg/kg で投与 4 日、1500 mg/kg で投与 3 日から認められた。また、F-VEP においても視覚機能障害を示唆する変化（b 波潜時の延長及び a-b 波電位の減少）が認められたが、ERG と同時期ではなく、1000 mg/kg で投与 5 日、1500 mg/kg で投与 4 日に認められた。しかし、双眼倒像鏡オメガ 200（Heine Optotechnik）を用いた眼科学検査で正常な眼底像が確認され、HE 染色による病理組織学検査では網膜、視神経、脳幹及び大脳視覚野領域に変化は認められなかった。

視細胞応答に変化がみられた網膜組織及び視覚伝導路の変化を病理組織学検査で捉えることはできず、生前検査が有用な評価データとなった。

カニクイザルを用いたホルター心電図による薬剤誘発性 QT 延長および不整脈の評価

○ 和田聰¹, 熊野篤¹, 大鷲壮一¹, 谷川常博¹, 小倉宏之¹, 深澤清久¹,
大竹誠司¹, 安東賢太郎¹, 飯田晶敏²

(¹株式会社三菱化学安全科学研究所鹿島研究所, ²大阪分室)

サルを用いた安全性試験における心電図は、一般的に動物をモンキーチェアに保定して記録される。しかし、この方法では拘束に伴う心拍数上昇が避け難く、記録時間が短いために不整脈の見落としが懸念される。今回、ホルター心電計を用いることによりこれらの問題点を解決できるものと考え、心拍数および QTc を指標にその有用性を保定式検査と比較検討した。カニクイザル 4 匹に、QT 延長作用を有する dl-Sotalol, Moxifloxacin を単回経口投与し、保定式検査では投与前、投与後 1, 2, 4, 24 時間に、ホルター検査では投与後 24 時間の連続記録を行った。得られた心電図から、投与後の心拍数および QTc (Bazett) を算出した。また、ホルター検査については、致死性の不整脈である Torsades de pointes が発生する前に増大すると考えられている short time variability (STV) 及び long time variability (LTV) を連続する 30 心拍の QT 間隔から算出した。

保定式検査における心拍数が 180~240/分に対し、ホルター検査では心電計装着後約 2 時間で心拍数は 110~130/分に低下し、夜間にはさらに 90~100/分となった。保定式とホルター検査のいずれにおいても、両薬剤で投与による用量依存性の QTc の延長が認められた。心拍数の低下作用を有する dl-Sotalol 投与による延長は両検査とも最大 20%であり、記録法の違いによる差はほとんど認められなかった。一方、Moxifloxacin 投与による延長は、保定式検査で最大 8%にとどまったのに対し、ホルター検査では 15%であった。また、STV 及び LTV は、Moxifloxacin に比べ dl-Sotalol 投与により、より顕著に増大することが確認された。なお、Moxifloxacin による QTc 間隔延長、ならびに STV および LTV 増大は、保定式の検査を実施しなかった投与後約 12~16 時間（夜間）にそれらのピークが認められた。ホルター心電計により、より安静時に近い状態で心電図を連続的に記録することができた。このことにより、薬物投与による QT 延長をより高感度に検出できることが確認され、保定式検査では困難な夜間の心電図の異常を検出することが可能であった。これらの結果から、安全性試験における心電図の評価には、ホルター検査が極めて有用であると結論した。

Tlk あるいは *qc* 遺伝子を有するラット胎児の形態学的な特徴

○ 勝亦芳裕¹、小川順子¹、浅野裕三¹、庫本高志²、芹川忠夫²

(¹株ボゾリサーチセンター、²京大院・医・附属動物実験施設)

Tlk (Tail anomaly Lethal Kyoto) をヘテロで、あるいは *qc* (queue courte) 遺伝子をホモで有するラットは主に尾の異常を示す。今回、これら遺伝子を導入したラットである IS-*Tlk* (IS/T) と F344/NSlc-*qc*+/+ (F/*qc*+) の雌雄ラット 12 組を交配し、妊娠 20 日に摘出された胎児の形態学的な特徴を、親ラットである IS/Kyo (IS) と F344/NSlc (F) の胎児のそれと比較した。妊娠個体については妊娠期間中、一般状態を観察し、体重及び摂餌量を測定した。胎児については外表観察後、ブアン固定による胎児標本及びアリザリン・レッド S 及びアルシアンブルーによる二重染色透明骨格標本について内臓及び骨格観察を行った。その結果、妊娠期間中、いずれの動物にも一般状態に異常はなかったが、それぞれの親ラットとの比較において体重は IS/T 群では低値、F/*qc*+/+ 群では高値で推移し、摂餌量は IS/T 及び F/*qc*+/+ 両群ともに低値で推移した。交配成績では、全例が交尾し、妊娠率は F 及び F/*qc*+/+ 両群とも 91.7% であったが、IS/T 群の妊娠率 (58.3%) は IS 群 (100%) の約 6 割で、その差は有意であった。排卵及び着床に関し IS/T 群では IS 群よりも低く、妊娠黄体数でその差は有意となった。F 群と F/*qc*+/+ 群間では妊娠黄体数、着床数及び着床率に関し差はなかった。胎生期発育に関し IS/T 群では IS 群に比べ、いずれのパラメータも低値を示し、その差は生存児数及び体重において有意であった。F 群と F/*qc*+/+ 群ではいずれのパラメータにも差はなかった。外表、内臓及び骨格の形態に関し IS/T 群及び F/*qc*+/+ 群で短尾及び屈曲尾を有する胎児の発現率が親ラット胎児よりも高かった。心室中隔欠損及び腰椎体癒合・過剰肋骨は IS 群で多発したが、その他の群では増加しなかった。

以上のように、IS 群で心室中隔欠損及び骨格異常を有する胎児数が増加したことは、興味深い所見であった。

日本白色種ウサギの胎児にみられた雄起因の生殖器奇形

○ 山本大¹，谷栄之介¹，佐藤順子²，小松原芳樹¹，佐々木淳¹，

宮崎智成¹，星野信人¹，松浦郁夫¹，飯田晶敏³

(¹株式会社三菱化学安全科学研究所鹿島研究所，²静岡分室，³大阪分室)

日本白色種ウサギ（KBL:JW）を用いた胚・胎児発生に関する複数の試験において，対照群を含む胎児に停留精巣や卵巣低形成などの生殖器の異常が観察された．当研究所では，妊娠雌の作出にあたり複数の種雄の混合精液を用いた人工授精を行っている．異常胎児を有する母体の人口受精には共通して特定の種雄の精液を含む混合精液が使われていたことから，上記の生殖器の異常はその種雄に起因したものである可能性が示唆された．

本実験では，上記試験に使用したそれぞれの種雄（11 例）の単独精液を用いて同系統の無処置雌（各 3～7 例）に人工授精を行い，得られた胎児の生殖器について肉眼及び病理組織学的検査から，生殖器の奇形発現と種雄との関連について検討した．また，性決定の指標となる遺伝子領域（SRY : sex-determining region Y）の有無を各胎児肝臓由来のゲノムを用いて PCR 法にて検索した．

その結果，特定の種雄 1 例と人工授精した雌 6 例中 5 例の胎児でのみ，以下の生殖器の異常が認められた．肉眼的には停留精巣が 2 腹 2 例に，精巣低形成が 1 腹 2 例に，卵巣低形成が 2 腹 2 例で観察された．また，組織学的には精巣，精巣上体，卵巣あるいは子宮の低形成が確認された．なお，PCR の結果，生殖器の異常を示した例も含め，いずれの胎児も遺伝的性と表現型としての性は一致した．

胚・胎児発生に関する複数の試験で認められた胎児の生殖器の異常は，1 匹の種雄に起因することが明らかとなった．ただし，その奇形発現は遺伝的性の支配障害によるものではないことが示唆された．種雄起因の奇形は極めて稀であり，今後はその発現機序についてさらに詳細な検討を行う予定である．

老齡カニクイザルの神経原線維変化と老人斑

○中村紳一郎¹、木村展之³、西村正樹²、鳥居隆三¹、寺尾恵治³

滋賀医科大学¹動物生命科学研究センター、²分子神経科学研究センター

³独立行政法人医薬基盤研霊長類医科学研究センター

神経原線維変化（NFT）は生化学的にリン酸化タウタンパク（ τ ）から構成される嗜銀性病変で、アルツハイマー病（AD）だけでなく、他の神経変性疾患でも出現する。クマやヒツジなどでは神経細胞やグリア細胞に τ の陽性像が認められるが、この変化には明らかな嗜銀性が見られない。さらにADに関連する別の病変、老人斑（SP）に巻き込まれる τ の陽性像も認められない。我々は6例の老齡カニクイザル（22, 23, 24, 29, 36歳および年齢不明）脳を用いて、NFTを検出するためにガリアス（嗜銀）染色、 τ に対するPHF- τ （AT-8）および τ -2に対する免疫染色を行った。SPを検出するためにamyloid β protein（A β ）に対するBC05（for A β 42）およびBA27（for A β 40）に対する免疫染色を行った。NFTはガリアス染色、AT-8と τ -2の免疫染色で、36歳および年齢不明2例の、前頭および側頭葉の新皮質に検出された。これら染色のうち、AT-8が最も多くのNFTを検出した。他の4例にNFTは見られなかった。SPはBC05とBA27で、5例のサル（22, 24, 29, 36歳および不明）の、前頭および側頭葉新皮質に検出され、特に36歳および年齢不明の同部位は高密度であった。これら2例のSP高密度なエリアでは一部のSP内の神経突起はAT8-と τ -2陽性だった。NFTならび τ 陽性のSP内神経突起が見られた領域は老人斑が密発する領域と一致していた。さらに τ 陽性像はガリアス染色で、明確な嗜銀性を示すNFTであることが確認できた。カニクイザルのNFTはヒトのそれと一致した性質を持っていた。またA β の強い沈着の延長線上に形成されるという、形成過程においてもADの病態を反映していることが推察された。

体外受精を用いたマウス計画生産への取り組み

○大竹 聡、矢野 英樹、人見 修司、近藤 麻衣、藤川 卓也

(株)オリエンタルバイオサービス 南山城研究所)

【目的】

2006 年に改正動物愛護法が施行され、「使用動物数の削減」等の配慮規定が設けられたことから、マウスの飼育や実験に携わる者の責任は大きくなりつつある。一方、遺伝子組換えマウスを用いた動物実験のニーズは高まっており、少数のマウスから多数の実験用マウスを準備するため、長い繁殖期間と労力が必要となっている。しかしながら、実験の性質上、日齢の揃った多数の産仔を求められる場合には、自然交配で対応することは困難である。弊社では、これまで培ってきた体外受精技術を応用し、少数のマウスから同一日齢のマウスを計画生産することを試み、良好な結果が得られたので、その詳細について報告する。

【材料および方法】

マウス体外受精は常法に従い、C57BL6/J 雌マウスに PMSG および hCG を投与して過剰排卵誘起処置を施し、遺伝子組換えマウスである成熟雄 1 匹を用いて体外受精を実施した。なお、体外受精に使用する雌数は予定作出マウス数に応じて必要最低限の匹数としている。

体外受精の翌日に 2 細胞期胚への発生を確認した受精卵を回収し、予め準備しておいた仮腹へ移植した。これらの仮腹はビニール・アイソレーター内で、産仔を出産、哺育させた。

【結果および考察】

C57BL6/J 系統をバックグラウンドとする各区の体外受精結果から、体外受精率 72.4-83.7%、胚移植後の産仔発生率 27.3-34.5%と、安定した成績が得られた。また、予定作出数である 400 匹に対して 419 匹(実験区①)、500 匹に対して 518 匹(実験区②)、60 匹に対して 71 匹(実験区③)をそれぞれ作出した。

上記の結果から、自然交配では困難であった同一日齢のマウスを計画的かつ短期間に作出することが可能となった。今後は、体外受精法を用いた効率的なマウス作出技術を駆使して、必要匹数を迅速に対応できる体制作りを進めていければと考えている。

胚移植由来ネフローゼマウス（ICGN マウス）産仔の病態解析

○内尾こずえ¹、澤田京子¹、國枝孝典¹、眞鍋昇²

（¹医薬基盤研・生物資源部、²東大院・農学生命科学）

近年、発生工学的手法が発展し、マウスは凍結胚保存、凍結胚の融解・移植を経て生体を安定的に得る技術が確立されている。しかしながら体外受精、胚培養および胚移植が産仔の phenotype に影響を及ぼすことが示唆されている。本研究ではネフローゼモデルマウス（ICGN マウス）を用いて、体外受精および胚移植が腎疾患に及ぼす影響を精査した。

体外受精により作製した ICGN マウス 2 細胞期胚をガラス化法（EFS 法）にて凍結保存した。融解した胚を偽妊娠雌性 ICR マウスおよび ICGN マウス卵管に移植を行い、産仔を得た。ICR マウスから生まれた産仔を RG 群、ICGN マウスから生まれた産仔を GG 群、自然交配から得られた産仔を G 群とした。産仔は 12 週齢にて供試し、血清生化学解析（アルブミン、BUN、クレアチニン、トリグリセライド、総コレステロール値）、病理組織化学解析、Real Time PCR 法による遺伝子発現解析を行った。

血清生化学解析の結果、GG 群および G 群に比べ RG 群は BUN・クレアチニンが高く、トリグリセライド値が低いことが分かった。また病理組織化学解析の結果より RG 群は糸球体および間質線維化が顕著であった。さらに Real Time PCR 法により G 群に比べ、RG 群および GG 群の I 型コラーゲン、TGF- β 、TNF- α mRNA 産生が亢進していた。これらの結果から、胚操作および母胎環境が産仔の腎病変進行に大きな影響を与えることが示唆された。

メンスの観察からよむカニクイザル雌性周期の回転状況

および生殖器の形態的特徴

佐藤 順子, 大竹 誠司, 佐々木 豊, 飯田 晶敏, 土谷 稔

三菱化学安全科学研究所 鹿島研究所

カニクイザルはサル類を代表する実験動物として広く用いられている。他の実験動物と違い、サル類の雌の性周期は人と類似しており、サル類を用いることは毒性試験における生殖器毒性を人に外挿する場合には非常に重要となる。サル類の性周期を把握するには、観察期間中におけるメンスの有無の観察が重要な手がかりとなる。今回我々は、年齢および観察期間別によるメンスの発現状況を集計し、その結果と生殖器の組織形態学的な特徴との相関を検討したので報告する。

2才8ヶ月までの動物でメンスが観察された動物は1例もいなかった。組織学的には生殖器は未成熟の像を示した。2才9ヶ月から3才までの動物では規則正しくメンスが観察された動物もいたが、少数例であり、おおくはメンスが1回は観察されたものの、それからの観察がない状態であった。このような動物の生殖器は組織学的には、卵胞期初期の像であり、卵巣には黄体も認められないものが多かった。3才以上の動物ではおおむね定期的にメンスが観察されたが、時折その間隔が大きくひらき不定期になる個体もいた。定期的にメンスが観察される動物の卵巣では複数の旧世代黄体が観察された。子宮筋層の厚さも増していた。また最終メンスからの日数と性周期別の形態像もおおむね一致し、このような動物はメンスからの日数で性周期を推測することができた。不規則なメンスの発現しかない動物では卵巣での旧世代黄体の数もわずかで、子宮の大きさも小さめであった。3才以上の動物にもメンスの見られない動物はいるが、卵巣を観察してみると古い黄体が存在していることもあった。

メンスの観察は性周期の把握に有効であるが、あくまでも人の目で観察するものであるので、出血の量や動物の行動などにより見落とされる場合もないとは限らない。組織学的に裏づけをとることでより確実に判断できるものと考えられる。

カニクイザル連続微量投与による卵巣刺激法の検討

○岩谷千鶴、山崎樹里、岡原純子、土屋英明、鳥居隆三
(滋賀医科大学・動物生命科学研究センター)

【目的】我々は、カニクイザル計画的室内繁殖を実施するため発生工学的手法を導入しており、その手法として、効率的に受精胚が得られる顕微授精を行っている。従来、性腺刺激ホルモンの9日間連日筋肉内投与によって必要となる成熟未受精卵子(MII 卵子)を採取していたが、対象動物に与えるストレスの軽減を考慮し、第96回本研究会において、ジャケット式プログラブルインフュージョンポンプ(PIP)を用いた微量連続投与の検討を発表した。今回、ジャケット着用とトレーニングを必要とせず、動物への負担をより少なくすることを目的に、小型の埋込み式マイクロインフュージョンポンプ(iPRECIO™)を用いた微量連続投与により、卵胞発育を促し MII 卵子の採取が可能か否かの検討を行った。

【方法】成熟メスカニクイザルに GnRH (0.9mg/head) を皮下投与し、約2週間後、麻酔下で腹腔鏡により卵巣の休止状態を確認した。その後、あらかじめ9日間微量連続投与ができるようにプログラムした 44×22×10mm サイズの iPRECIO™ をカニクイザル背部皮下に埋設した。性腺刺激ホルモンは、ゴナピュール(25IU/kg)を使用した。また比較の為、従来法として同薬物を9日間連日筋肉内投与した。その後、各々10日目に hCG(400IU/kg) を筋肉内投与し40時間後に発育卵胞より採卵を行い、採取した卵子を顕微鏡下で成熟ステージごとに分類し、MII 卵子への成熟率を比較した。

【結果および考察】iPRECIO™を使用したカニクイザル36頭から採取した各ステージの平均卵子数は、MII 卵子:13、MI 卵子:7、GV 卵子:8、DG 卵子:4であり、MII 卵子の平均成熟率は41% (13/32) であった。一方、比較の為にを行った従来のゴナピュール筋肉内投与個体の6頭では、同じく MII 卵子の平均成熟率は42% (13/30) であり、両者に差は認められなかった。以上の結果から、iPRECIO™による投与法は、従来法のような対象動物へ与える毎日の保定、注射針刺入による痛みやストレスも軽減され、さらに、ジャケット式 PIP より小型でジャケット着用が不要のため、動物福祉の観点からも有用であると考えられる。今後さらに、安定した iPRECIO™による卵巣刺激法の確立のため、性腺刺激ホルモンの投与量および投与期間についてより詳細に検討を行う予定である。

クライオトップを用いたカニクイザル顕微授精胚の凍結保存
および凍結胚由来産子の獲得

○山崎樹里、岡原純子、岩谷千鶴、土屋英明、鳥居隆三
(滋賀医科大学 動物生命科学研究センター)

【目的】当センターでは微生物学的及び遺伝学的統御を行ったカニクイザルを計画的に室内で人工繁殖することを目的とし、卵巣刺激による採卵と顕微授精-胚移植(ICSI-ET)法を実施している。しかし胚移植適期のレシピエント個体が常に見いだせるとは限らず、レシピエント個体が見つかるまで受精胚を凍結保存する技術が不可欠である。現在までにストローや凍結チップを用いた緩慢凍結法やガラス化法を試みたが、いずれも融解後の生存率が悪く、移植後着床には至らなかった。今回、クライオトップを用いたカニクイザル ICSI 胚の凍結保存法を検討し胚移植を試みた結果、妊娠、出産に成功したので報告する。

【方法】卵巣刺激により採取した第二減数分裂中期(MII)の卵子を用いて ICSI を行った。その後、4~8 細胞期(初期胚)あるいは胚盤胞期まで培養し、クライオトップを用いて胚の凍結を行った。融解後、形態的な観察により胚の生存確認を行い、生存胚を排卵 0~7 日目のレシピエント個体の卵管内に移植した。移植から約 30 日後に妊娠診断を行った。

【結果】凍結・融解後の生存率は初期胚で 21/23 (91.3%)、胚盤胞期胚では 17/23 (73.9%)であった。また融解後の移植結果では、胚盤胞期胚の移植では妊娠は確認できなかった(0/17;0%)が、初期胚の移植で 3 頭(3/17; 17.6%)に妊娠が確認された。なお妊娠個体中 2 頭においては出産が確認され、他 1 頭は妊娠後期に前置胎盤による流産が確認された。

【考察】今回クライオトップを用いた ICSI 胚の凍結により、初期胚および胚盤胞期胚いずれにおいても融解後に高い生存率を確認した。またカニクイザルの ICSI による凍結胚移植においては世界で初めて産子を得るに至った。今後、初期胚ではレシピエント個体の厳選等より効率の良い凍結胚由来個体の産出を、また胚盤胞期胚では妊娠効率の向上を目指し、さらに凍結胚からの ES 細胞樹立についても検討を行う予定である。

NBRP-Rat の「過去」「現在」「未来」

○芹川忠夫、真下知士、Voigt Birger、滝澤明子、岡島涼子、前泊直樹、中西聡、山崎賢一、庫本高志（京大院・医・附属動物実験施設）

ナショナルバイオリソースプロジェクト「ラット」(NBRP-Rat) は、世界最高水準のラットリソース拠点を整備することを目標として、2002 年 7 月に始まった。京都大学大学院医学研究科附属動物実験施設を中核機関として、これまでサブ機関の北海道大学創成科学共同研究機構、徳島大学ヘルスバイオサイエンス研究部、東京医科大学動物実験センター、実験動物中央研究所、理化学研究所バイオリソースセンター、島根大学医学部、動物繁殖研究所、日精バイリス株式会社、自治医科大学分子病態治療研究センター、自然科学研究機構生理学研究所、麻布大学獣医学部とともに、ラットリソースの体系的な収集・保存・提供事業を行ってきた。ラットリソースの利用価値を高めるために、体重、行動、血液、尿、解剖など 109 項目の特性検査と、357 遺伝マーカーを用いたゲノム検査からなる「ラットフェノームプロジェクト」を実施し、ラット胚・精子の超低温保存技術の標準化を目的として DVD プロトコール作製を行った。

2007 年 4 月からは第 2 期 NBRP-Rat として、中核的拠点整備事業に加え、ゲノム情報等整備 (H20) および基盤技術整備事業 (H19-H20) を実施している。また、ラット研究者の情報交換の場としてラットリソースリサーチ研究会を開催している。これまでに、近交系、ミュータント、トランスジェニックなど 530 系統を超えるラット系統を収集し、ENU ミュータントアーカイブも保存した。リソースの提供依頼は年々増加傾向にあり、国内外 119 機関、計 597 件を超えた。

2008 年は日本でも鼠年にあたり、NBRP-Rat に関連する 3 編の論文が Nature Genetics 5 月号 ‘Year of the rat’ に掲載された。これに合わせて刷新したホームページでは、ラット系統樹、リコンビナント近交系、BAC クローン、機能多型情報なども閲覧することができる。今後もラットリソースセンターの設立を目指し、我が国独自のラットリソース研究を支援していく。

医薬基盤研究所 実験動物研究資源バンクの活動紹介

○松田潤一郎、小浦美奈子、野口洋子、中村和臣、鈴木治

((独) 医薬基盤研究所・実験動物開発研究室)

独立行政法人医薬基盤研究所（基盤研）は、厚生労働省傘下では初めての研究開発に特化した研究機関として、創薬支援を掲げ、2005 年春、大阪府茨木市彩都に創設され、現在 4 年目を迎えている。私たちは、基盤研の生物資源部門のうち、実験小動物を担当しており、新たな疾患モデル動物の開発を行うとともに、有用な実験動物の収集、保存、系統維持、供給を行うことを目的としている。動物種としては、マウスが中心であるが、スナネズミ、マストミス、ハムスター等のユニークな齧歯類も系統維持している（マウス以外については別途紹介する）。私たちは、2006 年 11 月に実験動物研究資源バンクを正式に立ち上げ、①マウス系統の有償分譲、②凍結胚・凍結精子の保護預かりサービス、③保護預かりのためのサポートサービス（凍結胚からの生体作出など）、④有用マウス資源の収集・保存、⑤情報発信を開始した。当バンクでは、国立予防衛生研究所時代から引き継がれてきた自然発症の貴重な疾患モデルである、EL てんかんマウスや ICGN ネフローゼマウスなどを始め、遺伝子改変モデルとして、ライソゾーム病など多くの難病や、心疾患、生活習慣病、免疫疾患のモデルなど、有用なモデルマウスを保存、供給している。今回、これらの貴重なモデルマウスの利用を推進し、疾患研究、創薬研究への貢献を目指す当バンクの活動紹介を行いたい。

URL: <http://animal.nibio.go.jp/>

医薬基盤研究所で系統維持している各種齧歯類（スナネズミ、マストミス、シリアンハムスター）の特性

○ 小浦美奈子¹、金井孝夫²、中村和臣¹、野口洋子¹、鈴木 治¹、松田潤一郎¹

（¹（独）医薬基盤研究所 実験動物開発研究室 ²東京女子医科大学 実験動物中央施設）

独立行政法人医薬基盤研究所（基盤研）実験動物開発研究室では、疾患・創薬研究に有用な疾患モデル動物などの実験小動物の開発や、系統維持、保存、供給などを行っている。マウス以外の齧歯類についても、それぞれの特徴を生かしてさまざまな疾患研究に用いられていることから、貴重な研究資源と考え、次の3種9系統について系統維持と特性解析を行っている。

①スナネズミ（Mongolian gerbil, *Meriones unguiculatus*）：脳梗塞、てんかん、寄生虫や細菌感染などの研究に用いられており、当研究室では、毛色変異（MGB、黒色；MGW、白色）、てんかん抵抗性（MGR）を示す3系統を維持している。

②マストミス（*Mastomys*, *Praomys coucha*）：ラッサ熱の病原体（ラッサウイルス）の自然宿主である。実験動物としてのマストミスは、感染症、腫瘍、脂質代謝異常、毒性学などの研究に用いられており、多様な遺伝的変異が見られ、遺伝資源として貴重と考えられ、5系統を維持している。肝臓や腎臓に病変を示す個体が多く認められている。

③シリアンハムスター（Syrian (golden) hamster, *Mesocricetus auratus*）：妊娠期間が約15日と短いなどの繁殖学的特性を示し、毒性試験、発がん試験などにも用いられている。当研究室では、白色系統 HAW を維持している。また、卵巣凍結保存法の開発を行い成功した。

以上、基盤研で維持している各種齧歯類について紹介したい。

URL: <http://animal.nibio.go.jp/>

Phodopus属ハムスターの実験動物化ーモデル動物候補としての突然変異収集ー

○和田あづみ¹、大川 清¹、都築政起²

(¹ 東京慈恵会医科大学・実験動物研究施設、² 広島大学・大学院生物圏科学)

*Phodopus*属ハムスターとはユーラシア大陸北東部周辺に原産する掌・蹠が毛で覆われた小型齧歯目である。このハムスターは、1968年に国立遺伝学研究所へ導入されたと報告されているが、近交系確立や疾患モデル開発などの報告はなく、稀に動物実験に用いられる場合でも「狭義の実験動物」であるとは定義上みなしがたいままに使用されてきた。しかし、この*Phodopus*属ハムスターは1990年代に愛玩動物として流行し、日本に大量導入された。新たに導入された遺伝子プールは、既に人工的環境に馴化して良好な繁殖を行う個体群として選抜を経ており、その上、疾患モデルに流用可能な被毛色突然変異遺伝子キャリアが多く含まれていた。この新たな日本導入個体群*Phodopus*属ハムスターは、さらなる疾患モデル候補となりうる新規突然変異体の発見も期待できる優れた育種素材であると考えられ、我々はこの愛玩用*Phodopus*属ハムスターに対し「狭義の実験動物」としての基盤を整備している。

今発表においては、1994年以来、我々が収集した*Phodopus*属ハムスターの被毛色突然変異について紹介する。

1994年6月に、我々の研究室に最初に導入した*P. campbelli*は、赤眼と白地に橙色斑が入る被毛をもつ変異体であった。我々は、この導入雌雄を起源に2001年12月に近交系PMIを確立した。PMI系統を確立する過程で、導入個体のもっていた被毛色は、ホモ個体が致死でヘテロ個体が白斑被毛を示す不完全優性遺伝子と、赤眼と橙色被毛の表現型を示す劣性遺伝子の相互作用によって生じる事が判明した。

その後、市販*P. campbelli*から1995年に赤眼白色被毛、1998年に黒眼黒褐色被毛、2002年に黒眼淡色被毛ならびに有艶被毛、2003年には黒眼灰色被毛、2006年には黒眼黄色被毛を示す変異体を導入した。なお、2000年には育成中のPMI系統から長毛突然変異が分離した。また、*P. sungorus*からは、1999年に黒眼黄色被毛、2002年に黒眼白色被毛、黒眼淡色被毛、そして別の黒眼と茶色を帯びた淡色被毛を示す変異体を導入している。これらは、現在、PMI系統をレシピエントに用いたコンジェニック系統あるいは新規近交系として、遺伝子の保存を行いつつ、分子遺伝学的解析を遂行中である。

ようそたま
「養鼠玉のかけはし」にみる日本人とネズミ

○庫本高志（京都大・医・動物実験施設）

「養鼠玉のかけはし」は、安永4年（1775年）に大阪で発行されたネズミ飼育書の第一号である。

明和年間（1764～71）に愛玩用ネズミの飼育が上方から流行し始め、当時すでに、斑（まだら）、熊斑、鹿斑などの coat pattern 変異、玉子色、薄紫色、藤色などの coat color 変異が見つかった。

作者は不明であるが、ネズミの愛好家で、珍しいネズミを多数飼育していた。同じ趣味をもつ仲間達とサークルを作り、情報交換していたようで、自分のもつノウハウを仲間達と共有するためにこの本を出版した。子供でもわかるようにと、挿絵を効果的に用い、そこには狂歌が添えられている。愛玩ネズミの紹介、ネズミの飼育法、繁殖法から鳥家（ケージ）の作製法まで詳しく述べられている。作者は、飼い方を覚え上達すれば、自ら珍しいネズミを手に入れることができると読者を励まし、この本をそのような宝（玉）を手に入れるための“かけはし”として書いた。

思うに、われわれ日本人には、珍しいネズミを作り出すという熱意、そして、ネズミに対する暖かいまなざしが、江戸時代から脈々と受け継がれているようである。



- 翻刻に際しては、大阪学院大学准教授野口隆氏に多くのご協力をいただきました。
- 「養鼠玉のかけはし」（上下巻）は国立国会図書館の電子展示会「描かれた動物・植物江戸時代の博物誌」にて、電子資料として展示されています（<http://www.ndl.go.jp/nature/thum/004.html>）。

WHHL, WHHLMI ウサギ開発の歴史

○塩見 雅志, 山田 悟士, 小林 努, 平山 信恵, 伊藤 隆
(神戸大学 医学部 附属動物実験施設)

【ミュータントウサギの発見】1973年, 給餌方法がウサギの血清生化学値に及ぼす影響を検討する実験で, 神戸大学の渡辺嘉雄助教授は高脂血症を示す1匹のオス日本白色種ウサギを発見した. このウサギが WHHL ウサギの起源である.

【WHHL ウサギの開発】当時, 日本では高脂血症の重要性は認識されていなかった. 渡辺は, このミュータントウサギの高脂血症が劣性遺伝することを確認し, HLR (Hyperlipidemic Rabbit) と命名し, 複数のラインを設定して系統開発を開始した. 1979年に系統として確立し, WHL (Watanabe hyperlipidemic) ウサギと改名された. しかし, 国際誌である *Atherosclerosis* に投稿したところ, 編集者から **Watanabe heritable hyperlipidemic** とするべきであるとの指摘を受け, WHHL ウサギとなった. 当時の WHHL ウサギは, 血清コレステロール値, 中性脂肪値ともに300-600 mg/dl で, 大動脈に動脈硬化が発症し, 指関節に黄色腫が発症した. 動脈硬化を専門とする国際誌に掲載されたことを契機として, 国内外から分与の依頼が相次ぎ, 脂質代謝や動脈硬化に関する研究, 脂質低下剤等の開発に広く用いられた. Goldstein と Brown は WHHL ウサギを用いた研究でヒトのリポタンパク代謝経路を解明し, 1985年にノーベル賞を受賞した. また, 全世界で3000万人以上が服用しているスタチン(脂質低下剤)の開発(ノーベル賞候補)にも WHHL ウサギは大きく貢献した.

【WHHLMI ウサギの開発】WHHL ウサギは冠動脈の動脈硬化病変の発生が比較的軽度で, 心筋梗塞を発症しなかった. そこで, 1980年から冠動脈に動脈硬化が発症するラインを開発するために選抜交配を実施し, 1985年に冠動脈疾患が好発する WHHL ウサギ(仮称 WHHLCA)を確立した. しかし, WHHLCA においても心筋梗塞の発症率は低率であった. 1993年, 選抜交配の指標に動脈硬化病変へのマクロファージの浸潤を加えて系統開発を継続し, 1999年に心筋梗塞を自然発症する WHHLMI (myocardial infarction-prone WHHL) ウサギを開発した. WHHLMI ウサギの血清コレステロール値は700-1200 mg/dl に上昇し, ヒトの冠動脈病変に類似した重度の冠動脈病変が認められる. さらに, 一部の WHHLMI ウサギは内蔵脂肪の蓄積とインスリン抵抗性を示し, メタボリックシンドロームに類似した所見を示す.

【今後の発展性】現在ヒトの心血管疾患で最も注目されているのが急性冠症候群である. したがって, 冠動脈病変が破裂して閉塞性血栓を生ずる WHHLMI ウサギを開発することが次の目標である. 急性冠症候群のモデル動物を開発することによって, 世界の死因の第一位である心血管疾患の克服に貢献できると期待している.

実験動物学と「動物実験学」

西川 哲

独立行政法人 放射線医学総合研究所 基盤技術センター
研究基盤技術部 実験動物開発・管理課

今回の第100回記念大会では演題として会員の研究発表、維持会員のパネル展示の他に会員の自由発表—会員の自由な発想による発表。分野は問いません、とあります。そこで演者は標記について発表させていただきます。

演者が知る限りわが国で“実験動物学”と云う表題で成書として初めて刊行されたのは田嶋嘉雄編「実験動物学」、総論、各論、技術編の3部作：朝倉書店（1970年）であると思われる。それ以前には、奥木実著「実験動物」南山堂（1968年）、安藤洪次・田嶋嘉雄編の「動物実験法」（1956年）、小山良修著「動物実験手技」協同医書（1955年）等とさかのぼっても実験動物学とした成書は見あたらない。勿論、「動物実験学」とした書については改めて述べるまでもない。

実験動物学について猪貴義著「実験動物」養賢堂（1972年）は30年以上も前に畜産学の体系を基に分類学、育種学、繁殖学、栄養学、衛生学、管理学の6分野からの構成を提唱しており、実際にこの分類を基に実験動物学は進展して来たように考えられる。

ここで考える「動物実験学」は動物実験法をその1分野に含み、さらに法律学、政治学、歴史学、倫理学、宗教学等の分野をも包括する幅広いものであり「一般社会」との広範な接点を持つことを志向している。

発表時には「実験動物学」を構成する分野を挙げ、それぞれの分野と実験動物・動物実験の関わりを述べ会員諸兄弟のご意見、ご批判等を仰ぎたいと思います。

人にやさしく 菌にきびしく スーパー次亜水

○熊藤健太（清水実験材料株式会社）

動物実験をする上で、実験動物の微生物感染を防止することは非常に重要である。実験動物の微生物感染を防止するには飼育室・実験室等の清掃・消毒及び実験器具の消毒・除菌が肝心である。

スーパー次亜水は 1)強力な除菌効果、2)低コスト、3)安全性の高さ、4)環境への優しさ、5)消臭効果という 5 つの大きな特徴を持つ次世代の除菌水である。

スーパー次亜水とは次亜塩素酸ナトリウムの pH を弱酸性に調整したもので、これにより、次亜塩素酸ナトリウムの約 80 倍という強力な除菌効果を得ることに成功した。それに伴い薬品を低濃度で使うことが出来るようになったので、ランニングコストの低減を可能にした。さらにスーパー次亜水は高い分解性と低い残留性を兼ね備えている為、人体と環境のどちらに対する安全性も高い。これらの特徴を生かし、専用の噴霧器にてミクロの霧を空間中に噴霧することにより、空間消臭・空間除菌も可能である。実例としてはサル飼育施設等の消臭に抜群の効果を発揮しており、施設の汚物臭・動物臭の問題という面からもより良い実験環境作りの一助となることが出来た。

我々は、先生方にスーパー次亜水をご使用頂き、強力・安全・簡便な消毒・除菌・消臭を実現しつつ実験動物の感染事故を防止すること、またコスト削減という面からお役に立つことを目標としている。先生方の実験を陰ながらサポートさせて頂けることを願っております。

実験動物用器材のガンマ線滅菌について

○ 長嶋 和浩 （日本照射サービス(株)）

実験動物用飼料の放射線（ガンマ線・電子線）滅菌は、1960年代から長年研究・評価され、その安全性と有用性が証明されている。現在使用されている実験動物用飼料の主な滅菌線量は、SPF 動物用で30kGy、無菌動物用で50kGyである。その他、目的に応じて、6kGy、10kGy、15kGyなどの照射飼料もある。

多くの実験動物用器材にも、この放射線滅菌が適用されている。従来多用されてきたエチレンオキシドガス滅菌は、その発ガン性や急性・慢性毒性、作業者への暴露規制（安全確保）、環境への排出規制、および残留ガスや副生成物であるエチレンクロルヒドリンの毒性などの問題点が指摘され、さらに残留ガスによるアレルギーの発症などもあり、昨今、滅菌法の切り替え相談・検討が増えている。また、実験施設に設置されているオートクレーブ（高圧蒸気）滅菌器が使用されるケースも多いが、滅菌対象物に耐熱・耐水性が要求され、滅菌後の乾燥工程や滅菌時の臭気発生なども含め、ハンドリングの手軽さから放射線滅菌に切り替えるお客様も多い。

本ポスター発表では、弊社で実施している実験動物用飼料や器材の放射線滅菌について、その概要、照射実績および滅菌線量の設定方法について解説する。

株式会社 ビオスタ会社概要

高橋尚士((株)ビオスタ)

株式会社ビオスタは、神戸ポートアイランドの医療産業都市内に研究拠点を置き、アレルギー分野を中心としたお客様の研究・開発をお手伝いしております。

当社の主な事業内容は次のようです。

- 1) 動物実験用のアトピー性皮膚炎モデルマウス誘発試薬の製造および販売
- 2) ダニアレルゲンをはじめとした各種アレルゲンの製造および販売
- 3) アレルギー関連の分析および動物実験の代行業務
- 4) バイオ関連商品、日用雑貨品、農園芸用商品の企画開発・研究コンサルティング

当社は、近年、コナヒョウヒダニを原料とするアトピー性皮膚炎誘発試薬を開発し、多くの動物実験等にて比較検討を重ねその方法論を確立しました。そして、製品名を「ビオスタAD」として、販売を開始したところ、ご利用頂いた研究者から、アトピー性皮膚炎モデルマウスが作製し易いとの評価を頂いております。

その後、ダニアレルゲンを自社の実験室内に持ち込むことに抵抗がある研究機関や、動物実験施設をお持ちでない食品や化粧品メーカーの研究者向けに、当社はそのモデルマウスの作製サービスおよびそれらを実験系とする薬効薬理実験の受託を始めました。

その実験施設は、同じく神戸医療産業都市内に在る株式会社オリエンタルバイオサービス 神戸BMラボラトリーのレンタルラボを利用しています。同施設は、「個別換気ケージシステム」を導入しており、この飼育方式は一般のオープンケージと異なり、個々の閉鎖型ケージが換氣的に独立しているために当実験に適しております。また、同施設の実験室を一定期間借り切って、ビデオ撮影による長時間の搔破行動の観察もお受け致します。さらに、アレルギー関連項目の血液検査や病理標本作製および診断も承ります。

アトピー性皮膚炎誘発試薬「ビオスタAD」は、NC/Nga マウスの背部および耳介部に6回(3週間)塗布誘発することで、搔破行動を伴いアトピー性皮膚炎に類似した症状を起こします。また、誘発終了後も皮膚炎症状、搔破行動は維持し、医薬品等の薬効評価に使用しやすい研究用試薬です。本日は、当研究会の場をお借りして、「ビオスタAD」について広くご紹介申し上げます。

癌研究のためのマウスおよびラットモデルの有用性

○橋本貴生、多賀谷奈美、畑和也、若林利明

(株式会社サンプラネット支援サービス本部BMR部)

癌研究に用いる動物には、ApcMin マウスなどの自然発症動物、p53 KO や rasH2 マウス等の遺伝子改変動物、発癌物質を用いた化学発癌モデルおよび担癌モデルなど、これまでに多くのモデルが作製されてきた。しかしながら、何れをとってもヒトの癌を忠実に再現したモデルは開発されていない。このため、研究目的により使用する動物を選択する必要がある。

我々は、担癌モデルおよび化学発癌モデルの検討を行っており、実験動物としてラットおよびマウスを使用している。

本研究会では、マウスを用いた化学発癌による大腸癌モデル、ヌードラットを用いたヒト担癌モデルについて報告する。

特に、ヌードラットをレシピエントに用いることで、マウスとは異なる表現形を明らかにし、ヒトに近い薬効と毒性を示すモデルとして有用である可能性を見出した。

【試験概要】

ヌードラット (F344/NJcl-*rnu/rnu*, 日本クレア株式会社) の皮下にヒト大腸癌細胞 WiDr 細胞およびヒト胃癌細胞 MKN-74 細胞を移植し、腫瘍を形成させた後に大腸癌の標準治療薬である 5-FU (5-FU 注 250 協和) を尾静脈内に隔週投与した。投与開始直後から有意な腫瘍増大遅延効果を確認し、さらに休薬後の腫瘍増大も確認した。

ヌードマウス (CAnN.Cg-*Foxn1^{nu}*/CrJ, 日本チャールス・リバー株式会社, 神奈川) に同細胞を移植し、同薬剤を投与した場合とは明らかに薬効が異なり、よりヒトに近い結果が得られることを見出した。

この他にもサンプラネット支援サービス本部 BMR 部では、薬効薬理試験に研鑽を重ねた研究員や技術員が多く在籍し、各種薬効薬理試験を実施することが可能です。

今回ご紹介させて頂いた他にもいろいろな試験を実施することが可能であり、お客様の要望にもお応えしておりますので、是非お問い合わせを下さい。

組換え BAC テクノロジーを利用した『セミ・ノックアウトラット』の開発

○塩田 明、上田 正次

(株式会社フェニックスバイオ 宇都宮事業所)

ラットゲノムの BAC ライブラリー、およびファージの相同組換え機構を応用した組換え BAC テクノロジーが開発されたおかげで、200 kb ものラットゲノム DNA 配列を含む BAC クローンにトランスジーンを挿入し、BAC トランスジェニックラットを作出できるようになりました。コアプロモーターのみでなく、BAC ゲノムクロンのエンハンサー、snRNA、インシュレーターなどの遺伝子発現を制御する機能的エレメントを全て利用するため、BAC トランスジェニックラットでは、ノックインマウスに匹敵するトランスジーンが発現制御が可能になりました。コンベンショナルトランスジェニックの手法では困難であった組織特異性を要求するモデルラットの作出が、いまや BAC トランスジェニックによって短期間に実現するようになりました。

株式会社フェニックスバイオは、ノックインマウスのように正確な組織特異性の特徴から、BAC トランスジェニックラットを「セミノックインラット」と呼び、ラットモデル開発をサポートしております。本大会では、名古屋大学医学研究科准教授の近藤峰生先生と共同で開発した、ロドプシン遺伝子ドミナント・ネガティブ変異体を網膜組織に特異的に発現させた網膜色素変性症モデルラットの開発を紹介します。

我々は、ロドプシン遺伝子をコードするラット BAC クローンに、極めて病状の進行が早い優性遺伝子変異である [P347L] ロドプシン変異を導入した組換え BAC クローンを構築し、そのセミノックインラットを作出しました。網膜電位の解析の結果、このラットは生後 3 ヶ月から既に杆体細胞の光受容体の活性が低下しており、11 ヶ月でほぼ完全に消失していることが明らかになりました。

この結果から、セミノックインラットで強力なドミナント・ネガティブ変異体を組織特異的発現させることにより、あたかもノックアウトラットのような表現型を示す、『セミノックアウトラット』を作出できることが示唆されました。

カニクイザルを用いた骨代謝試験の紹介
—OVXモデルと骨折モデルを中心として—

○ 関 あずさ、高島 俊行

(ハムリー株式会社 国際事業部)

カニクイザルの骨代謝はリモデリングでヒトと同じ骨代謝回転を示すことが知られているが、動物の活用、データの蓄積等が進んでいない。今回、高回転型骨粗鬆症モデルとしての卵巣摘出 (OVX) モデルを中心に、大腿骨骨折治癒試験の結果を示し、カニクイザルを用いた骨代謝試験の利点・活用性について報告する。

野生由来で推定 16 歳以上の動物を用いた。OVX モデル試験では、Sham 群 3 頭、OVX 群 3 頭を用いた。また、1 頭の自然閉経動物の測定値も報告する。検査は L4 ~L6 の腰椎骨密度を DXA 法 (DPX- α Luna 社) で約 4 ヶ月ごとに測定し、64 週後に骨を摘出し、pQCT 法 (XCT Research SA+ ストラテック社) で骨密度測定、MZ-500D で骨強度測定を行った。また、血清・尿の骨パラメータ値も測定した。骨折治癒試験は 17 頭に大腿骨骨折モデルを施し、11 頭に PTH (0.75 μ g/kg, 7.5 μ g/kg) を週 2 回投与し、2~4 週毎に治癒過程を X 線像で確認しながら 26 週終了後に骨を摘出し、骨強度測定および組織学的検査を行った。

OVX モデル試験：骨密度 (BMD (g/cm^2)) は、64 週後の腰椎は OVX 前を 1 とした時 (以下数字は Sham 群、OVX 群の順)、1.051 に対して 0.962 と減少していた。大腿骨頸部の BMD は、Total は 920.1 に対して 731.1、海綿骨は 569.9 に対して 258.9 と減少を認め、皮質骨は 1064.6 に対して 1079.5 であった。また、自然閉経個体は OVX モデル動物と同じ傾向を示した。その他の第 5 腰椎椎体、脛骨・橈骨・大腿骨の骨幹端部における BMD も測定し比較した。強度試験では、腰椎椎体部海綿骨の圧縮試験で破断エネルギー ($10^{-3}\text{N}\cdot\text{m}$) は 10181.66 に対して、7256.79 と減少していた。OVX により BMD 骨強度の減少を認め、自然閉経個体も骨密度は低下しており、骨粗鬆症モデルの試験において OVX モデルの活用とともに、どの部位の骨を測定すればよいかの知見を得たので報告する。

骨折治癒試験：24 週目の X 線像で肉眼的に骨折線が消失してきており、モデル作製後 6-7 ヶ月で評価を行うことが必要であった。骨強度では特記すべき差を認めなかったが、カルス部分の骨の形成・成熟度は PTH 投与で顕著に認めた。骨単位で起こっている変化はラットでは観察出来ないため、カニクイザルを使用する必要性が確認出来た。

クラウン系ミニブタの特徴

○金剛仙太郎¹、岩永健裕¹、土井淳¹ 新村由佳里² 鳥取潤一¹

(¹ジャパンファーム クラウン研究所 ²ジャパンファーム 品質保証部)

クラウン系ミニブタ

クラウン系ミニブタは1978年からクローズドコロニーとして系統造成されている。平均体重は、6ヶ月齢で15kg、8ヶ月齢で20kg、12ヶ月齢30kgである。クラウン研究所の開所に伴い、本格的な生産が開始したが、生産頭数は毎年増加しており、開所から7年目の本年度は年間1100頭のミニブタを生産する。クラウン系ミニブタでは生まれた子豚は全て個体識別され、成長段階に応じて体重測定等の個体管理を実施している。また、健康管理記録も個体別に行なっている。2007年には子豚を母豚から無菌的に摘出し、SPF (Specific Pathogen Free) 化にも着手した。

SLA解析

ブタの主要組織適合性抗原複合体Major Histocompatibility Complex(MHC)であるSwine Leukocyte Antigen (SLA)は、免疫応答に重要な役割を果たす細胞表面抗原として知られている。クラウン系ミニブタでは2003年よりSLA遺伝子解析をおこなっている。解析方法にはclass I 領域のSLA-1,-2,-3遺伝子座、およびclass II 領域のDRB1遺伝子座については、アレル特異的に増幅の有無を確認するPCR-SSP法、class II 領域のDQB1遺伝子座については、DQB1遺伝子特異的に増幅し得られたPCR産物を、制限酵素による切断の有無で判定するPCR-RFLP法を用いている。その結果、SLA-DNAタイピング法を用いて4通りのハプロタイプを確認している。Hp-16.16はclass I 領域がSLA-1*0401、SLA-2*w09an02、SLA-3*06an03、class II 領域がDRB1*w11ac21、DQB1*0601というハプロタイプである。また、Hp-17.17は、16.16と相対するタイプで、class I 領域はSLA-1 ND(Not Determined)、SLA-2*06an03、SLA-3*03an02、class II 領域はDRB1*0801、DQB1*0501というハプロタイプである。さらに、hp-16.16とhp-17.17の交差ハプロタイプとなるhp-16.17および17.16も確認されている。

C1タイプ、C2タイプの生産と供給

クラウン系ミニブタでは、Hp-16.16をC1タイプと称し、また、Hp-16.16をC2タイプと称して商品化して供給している。C1タイプまたは、C2タイプをホモに持つ個体の生産は、C1タイプ同士、C2タイプ同士の両親を交配して生産する。SLA typeの掛け合わせから子豚のSLA typeは予測できるが、C1タイプ、C2タイプの注文があった場合は、供給前にSLAの解析を行い、各タイプをホモに持つ個体であるかを確認している。C1タイプ、C2タイプは2006年から本格的に供給を開始し、高付加価値ミニブタの主力ラインナップとして系統造成している。

系統学的特徴

クラウン系ミニブタはゲッチングン系とオーミニ系を掛け合わせたF1を起源とし、そのF1をランドレースと大ヨークシャーのF1に交雑して作出されたが、遺伝的な距離は肉用豚とは離れ、ゲッチングンミニブタと最も近い関係となっている。また、ゲッチングン系、オーミニ系、ピットマンムア系などと比較して、集団の遺伝的バラツキが小さい。