

個別換気ケージ飼育法における微生物モニタリングの状況

○藤本祐次郎、池田民代、鈴木英之、片桐 稔

(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)

弊社神戸BMラボラトリー(以下、神戸ラボ)は、2004年8月に稼動し、2年間が経過した。その間、設立の目的である受託飼育およびレンタル実験室のサービスは、関西の研究機関をはじめ全国の研究者にご利用頂いてきた。特に、神戸ポートアイランド内では再生医療分野の研究が盛んなため移植実験を目的とした利用者が多く、細胞等を移植したスキッドマウスやヌードラットを長期間飼育する依頼は少なくない。また、全国的にウイルスベクターを投与する実験が増加傾向にあり、飼育室に併設したP2A実験室の利用頻度は上昇してきている。これらの移植実験や投与実験に使用する動物を飼育する場合は、ケージ毎にバリアー化が可能な個別換気ケージ飼育法が、オープンケージよりも適していると考えられる。

半面、個別換気ケージの場合、微生物モニタリング用のサンプリングに課題が残る。すなわち、すべてのケージ内が独立した環境であると考え、個々のケージ内をモニタリングする場合には膨大な数のサンプル(検査個体)が発生してしまう。そこで、弊社では現在、サンプル数をできるだけ少なくし、適切なスクリーニングが実施できる方法を検討している。

神戸ラボでは過去2年間、精力的な微生物モニタリングを実施したので、この度、現在の飼育手順と共に、それら幾つかのデータをご紹介したい。

Helicobacter pylori に対する漢方薬の抗菌効果

喜多正和、塩見聡史、今西二郎

(京都府立医大大学院医学研究科・感染免疫病態制御学)

〔目的〕 *Helicobacter pylori*(以下 *H.pylori*)は胃十二指腸疾患の原因菌であり、除菌療法により治療することが可能になってきた。しかし、その反面、抗生物質に対する耐性菌の出現が問題となっている。本研究では、*H.pylori* に対して漢方薬の成分である生薬が抗菌活性を有するかどうかを検討した。

〔材料と方法〕 18 種類の生薬を用いて、*H.pylori* (薬剤感受性菌および耐性菌) に対する *in vitro* 抗菌活性を Broth Microdilution Methods を用いて測定した。また、*in vivo* における生薬の抗菌活性を検討するため、マウスに *H.pylori* を感染させ生薬投与群と非投与群の胃内菌数を測定し、PCR 法にて菌の同定を行なった。

〔結果および考察〕 18 種類の生薬の *H.pylori* に対する抗菌活性を *in vitro* で検討した結果、黄連、甘草、丁子が強い抗菌活性を示した (MIC: 1mg/ml)。また、これらの生薬は抗生物質耐性菌に対しても同様の抗菌活性を示した。耐性菌の誘導実験の結果、clarithromycin に対してはいずれの菌株も耐性を獲得したが生薬に対する耐性菌は出現しなかった。さらに、マウスに黄連、甘草、丁子、茵陳蒿、大黄を経口投与した結果、胃内菌数は黄連、甘草、丁子、茵陳蒿投与群で非投与群に比較して有意に低値であった。以上の結果、黄連、甘草、丁子などの生薬は抗生物質感受性菌および耐性菌に対して抗菌活性を示し、かつ生薬に対する耐性菌が誘導されないことより、*H.pylori* 除菌治療に有効である可能性が示唆された。

Fast PCR 法と従来の PCR 法との比較

—PCR の感度と必要時間の検討—

○小沢康彦², 田島優¹, 愛原勝巳¹, 太田晶子¹, 黒澤努¹

(¹大阪大学大学院医学系研究科実験動物医学教室、²三協ラボサービス㈱)

はじめに

当施設では、*P.pneumotropica*(以下 *P.p*)検査には約 2 時間の PCR を 1 回実施し、MHV 検査のための nested RT-PCR には約 2 時間半の PCR を 2 回実施している。

従って、従来の PCR 法は結果を得るのに半日から 1 日を必要としている。

現在、短時間で PCR 可能な装置と Taq が市販されているが、それを使用すれば、より短時間で検査結果が得られるとされているので検討した。

Fast PCR 法と従来法の測定感度を検討するため、培養菌液の希釈列から DNA を抽出した陽性 DNA の PCR 結果を比較した。

Fast PCR 法と従来法とで、PCR に要する時間を比較した。

材料と方法

Fast PCR は、Applied Biosystems 9800 Fast Thermal Cycler および GeneAmp Fast PCR Master Mix (2X)を使用した。*P.p* (菌株 : ATCC 35149) は、BHIB の液体培地で培養した。菌液は培地を用いて 10 倍希釈列を作成し、希釈液を PBS と QDW で各 1 回洗浄し、1%トライトンを用いて 100℃10 分煮沸し、DNA を抽出した。MHV では、MHV に感染したマウスの糞便より RNeasy Mini Kit を用いて抽出した RNA から cDNA を合成し、QDW で 10 倍希釈列を作成した。*P.p* には 3 種類、MHV には 1 種類 (2 組) のプライマーを使用した。

また、各方法の PCR に要する時間を計測した。

結果とまとめ

P.p については、1 つのプライマーで従来法より感度が低下した。2 つのプライマーでは従来法と同様の感度が得られた。MHV については、1stPCR 従来法・2ndPCR Fast PCR 法の組合せにおいて従来法と同様の感度が得られた。

PCR の時間は *P.p* では約 3 分の 1 に、MHV では 2 回の PCR 合計で約 8 分の 1 に短縮できた。

従って、Fast PCR の装置とその方法は、プライマーの設定によっては、従来法と同様の感度が得られるだけでなく、検査系の時間短縮に用いることが可能であると考えられた。

コンベンショナルマウスから検出される MHV N 蛋白遺伝子塩基配列の多様性

○ 小谷祐子¹⁾、太田晶子¹⁾、小沢康彦¹⁾、愛原勝巳¹⁾、河合澄子¹⁾、
鍵山壮一朗¹⁾、田島 優¹⁾、黒澤 努¹⁾

(大阪大学医学部附属動物実験施設¹⁾、三協ラボサービス(株)²⁾)

背景

最近、多くの施設で Mouse hepatitis virus(MHV)による汚染事故が報告されている。汚染事故を防止するには病原体の侵入ルートを明らかにする必要があるが、これまでにはルートが明らかになることは希であった。我々は当施設で MHV 汚染事故を経験した際、その N 蛋白遺伝子の塩基配列を解読することによってウイルスの由来を明らかにしたことを昨年の本研究会で報告した。その後、由来を明らかに出来なかった 1 室の汚染源を解明するため、汚染源となった可能性のあるコンベンショナル動物から糞便等を入手し、その塩基配列を解読した。

材料と方法

コンベンショナル動物から、大腸あるいは糞便を検査用材料として入手した。抽出した RNA から cDNA を合成し、2 つのプライマー、6P544 (5'-CACCTTTGCACTTATAAGCG-3') と 7NB (5'-CGGGATCCGACATAGGATTTCATTCTC-3')を用いて得られた PCR 産物の塩基配列解読を行った。系統樹解析は neighbor-joining による解析ソフト CLUSTALW 用いて行い、系統樹作成には Tree View を用いた。

結果と考察

コンベンショナル動物 21 匹から 1 例ずつ MHV N 蛋白遺伝子の塩基配列が解読された。これらの例中 3 例は昨年の汚染事故で汚染源が不明であった飼育室由来の N 蛋白遺伝子の塩基配列と類似していた。また、21 例は、10 クラスターを形成した。それぞれのクラスターは約 20 塩基の違いが認められた。また、同じ飼育室内から異なるクラスターに属する塩基配列を示す例も認められた。

汚染源の由来を推定することが出来た。各クラスターを形成したサンプルは、異なる飼育室から得られており、多様な塩基配列を示した。同じ飼育室に異なる塩基配列を示す例が複数あることから株間の組み換え頻度はあまり高くないことを示しているかもしれない。

老齢雌ラットにおける膣インピーダンス値と膣スメア像の相関

○市橋優，西村友成，西田敦之，新比恵啓志，北村和之

(田辺製薬株式会社 安全性研究所)

膣インピーダンス法は膣粘膜上皮の角質層の形成に伴うインピーダンス(交流電気抵抗)値の増加(3.0k Ω 以上)を指標として，雌ラットおよび雌マウスの交配適期を判定する簡便な方法として利用されている．今回，文献的に生殖機能の低下を示す月齢に達した老齢ラットを用い，膣インピーダンス値と膣スメア像の相関について検討したので報告する．

膣インピーダンス値の測定には膣インピーダンス・チェッカー(室町機械(株))を用いた．動物は無処置の13ヶ月齢(8匹)および19ヶ月齢(4匹)のCr1:CD(SD)系ラットを用い，膣インピーダンス値を14日間毎日1回(13時～15時)測定し，膣スメア像による性周期と比較検討した．

その結果，

- 1) 正常な性周期が観察された13ヶ月齢の1例では，発情前期に膣インピーダンス値が3.0k Ω 以上で交配適期と判定され，それ以外のステージではおよそ1.0k Ω 以下であり，正常な生殖機能を持った動物と同様の推移を示した．
- 2) 発情前期から発情期への推移が観察され，その後連続発情を示した動物では，発情前期においても膣インピーダンス値は1.5k Ω 前後を示し，その変動幅は小さかった．
- 3) 連続発情を示した動物では，測定期間を通じ膣インピーダンス値が1.0k Ω 前後を示し正常の休止期と比較してわずかに高い値で推移した．
- 4) 持続的な休止期を示した13ヶ月齢の動物の膣インピーダンス値は0.8k Ω 前後，19ヶ月齢の動物では0.5k Ω 前後であった．

膣インピーダンス法ではほぼ5日周期を示すF344系ラット，さらには不規則な性周期を示す種々の系統のラットにおいても，膣インピーダンスの低値から高値への変動をみることでより交配適期の判定にできることが報告されている⁽¹⁾．今回の検討において，加齢に伴う異常な性周期を示す動物では，膣インピーダンスの低値から高値への変動がないか，あるいは小さかったことから，膣粘膜上皮において十分に角質層が形成されていない可能性が考えられた．また，膣スメア像で連続的に角化細胞がみられる連続発情ラットでは，持続的な休止期を示した動物より膣インピーダンスが高値を示したことから，持続的に薄い角質層が存在すると思われた．以上のことから，膣インピーダンス値は膣スメア像と非常によく相関し，膣粘膜上皮の状態を的確に反映したものであると考えられた．

(1) 古藤正男ら：膣インピーダンス法によるF344系ラットの交配適期判定．

実験動物技術，22(2)，82-85，1987．

ウサギにおける妊娠前のジャケット装着ストレスによる毒性パラメータの影響

○ 浅野 裕三, 松岡 哲也, 佐野 絵麻, 溝口 靖基, 芹沢 光太郎, 石倉 寿一, 鎌田 亮, 遠藤 貴子 (ボゾリサーチセンター・函南研究所)

被験物質を経皮投与する場合、塗布部位の保護及び被験物質の経口摂取を防ぐ為に保護ジャケット（以下、JK）を用いるが、JK による拘束が動物の一般状態に影響し、試験結果の評価を困難にすることを経験している。我々は、先にウサギを用いた生殖発生毒性試験モデルにおける JK の拘束効果を知るために実験を行い、JK 装着を妊娠 0 日（以下、GD 0）から開始した群では GD 6 から開始した群よりも、影響が少ないことを報告した（J. Toxicol. Sci., 31, 83-86, 2006）。今回は、同じモデルを用い、GD - 9 から JK を装着させた場合の影響を検討した。

Kbl:NZW ウサギ（6 ないし 10 月齢）の 40 匹を無処置群（N 群）と JK の装着時期を GD - 9 から GD 19 まで継続する群（JK 群）に分けて、GD - 9 から GD 28 の間、一般状態の観察、体重・摂餌量の測定及びに GD 28 の子宮内観察による胎児への影響を調べた。その結果、JK 装着による拘束の影響として、妊娠率に異常は見られなかったが、JK 装着後、妊娠前の 9 日間にわたり、体重増加量及び摂餌量が共に低値を示し、その差は有意となった。JK 装着日の体重に回復する日数は GD 0 から JK 装着させた群に比べ、有意に延長した。妊娠子宮内観察では妊娠黄体数に統計的な有意差は無かったが、減少傾向が認められた（N 群：10.2±1.8、JK 群：9.3±1.7）。胎児観察結果では JK 装着による影響は明らかでなかった。

ウサギを用いた生殖発生毒性試験では投薬期間（GD 6～18）中における被験物質の影響と識別し難い所見の発現は極力避けることが必要であるが、GD - 9 からの JK 装着では受胎能に軽微な影響を及ぼすこと及び体重の回復が妊娠中期となることが明らかとなった。この結果、GD - 9、すなわち交配前からの JK 装着は生殖試験では採用しがたいと判断した。

根尖病巣のマウスモデル作成と病態解析

喜多正和¹⁾、大迫文重²⁾、山本俊郎²⁾、金村成智²⁾、今西二郎¹⁾

(¹京都府立医科大学大学院動物実験センター、²歯科口腔科学)

【目的】根尖病巣の病態形成においてサイトカインの関与が報告されているが、まだ不明な点が多い。今回我々は、根尖病巣マウスモデルを作成し、 μ CTを応用した3次元的评价方法を確立した。また、サイトカイン KO マウスを用いて病態形成におけるサイトカインの関与を検討した。

【方法】正常 C57BL/6 マウスとインターフェロン- γ (以下 IFN- γ) および腫瘍壊死因子- α (以下 TNF- α) KO マウス第 1 臼歯の歯冠を削除、*Prevotella intermedia* (ATCC25611) および *Porphyromonas gingivalis* (ATCC33277) を髓腔内に注入、感染群を作製した。なお、歯冠を削除していないものをコントロール群とした。感染 21 日後に下顎骨を摘出し、 μ CT 撮影を行った。そして、3D 画像解析ソフトを用いて 3 次元画像構築後、補間抽出を用いて歯根部分と病巣部を抽出、再度 3 次元画像を構築した。さらに、a: 根尖病巣の体積と b: 歯根部分の体積を計測、骨吸収比率 (ratio of bone resorption: RBR $RBR=(a/a+b)*100$) で数値化、感染群とコントロール群で比較検討を行った。

【結果および考察】感染群のマウスでは明らかな根尖病巣が形成され、コントロール群と比較して RBR が有意に増加した。一方、IFN- γ KO マウスおよび TNF- α KO マウスにおいては RBR の差を認めなかったが、IL-17KO マウスのみ有意差を認めた。以上の結果、マウス根尖病巣における骨吸収には、IL-17 が重要な役割を果たしていることが示唆された。また、 μ CT を応用した 3 次元的评价方法は非常に有用であった。

ENU ミュータジェネシスによるラットリソース:新規てんかんモデルの開発

○ 真下知士¹、徳田智子¹、柳原克彦²、平林真澄³、中西聡¹、庫本高志¹、
芹川忠夫¹

(¹京大院・医・動物実験施設、²京大院・医・先端融合、³生理研)

てんかん発症機構の解明や新規てんかん薬の開発は、てんかん治療の確立に向けた重要な課題である。近年、患者家系の遺伝学的解析から複数のてんかん原因遺伝子が報告されている。ラットは、脳波解析や行動観察、長期薬物投与による慢性実験等に適当なサイズであり、遺伝要因と環境要因を厳格にコントロールして実験を行うことができるため、古くからてんかん研究に貢献してきた。しかし、ES 細胞が未だ確立されていないため、マウスのように人為的に標的遺伝子を破壊した遺伝子改変動物を作製することができない。そこで我々は、gene-driven ENU ミュータジェネシス法を利用して、標的とするヒトてんかん原因遺伝子に変異を持つ遺伝子改変ラットモデルの開発プロジェクトを開始した。

40mg/kg の ENU を雄ラット F344/NSIc に 2 回 (9、10 週齢時) 腹腔内投与し、雌ラットと交配することで G1 ラット雄 1600 匹を作製した。多数 G1 ラットの中から標的遺伝子に点突然変異を有する個体を効率的に検出する方法として、トランスポゾン Mu と DNA プーリング法を組み合わせた新規 DNA スクリーニング法 (MuT-POWER, 特許出願中:特願 2006-003855)を開発した。今回、その成果として、ヒト全般てんかん熱性痙攣プラス(GEFS+)の原因遺伝子の一つであるナトリウムチャネル(SCN1A)遺伝子に点突然変異を有する個体を 2 例検出したので紹介する。これまでに報告されているてんかん患者の遺伝子変異型は、1塩基置換によるイオンチャネル機能の部分的欠失あるいは異常に起因することが多い。本プロジェクトにより作製されるモデルラットは、てんかん原因遺伝子の機能をより深く理解するためだけでなく、創薬・試験研究への応用も期待される。

ENU により得られた全ての G1 ラット 1,600 匹の精子は、凍結精子バンクとして保存されている。MuT-POWER と顕微授精法とを組み合わせることで、てんかんモデルだけでなく、様々な遺伝子改変ラットモデルを効果的に作製することが可能である。

*Phodopus*属ハムスターに発見された優性白色被毛突然変異

○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総合医科学研究センター実験動物研究施設、²広島大学大学院生物圏科学)

*Phodopus*属とはユーラシア大陸の北寄りに原産する掌 蹠が毛で覆われた小型ハムスターであり、分類されている3種；*P. sungorus*、*P. campbelli* および*P. roborovskii* は愛玩用に普及している。すなわち、人工的環境への順化が進みつつ、突然変異体の発見 収集が愛好家達によって精力的に行われている。この点に着目した我々は、*Phodopus*属ハムスターの実験動物化を目的として、1994年6月に入手した*P. campbelli*と考えられる雌雄から、2001年12月に近交系PMIを確立した。PMI系統は現在近交34世代目が繁殖中であるが、我々はこの系統の有用性を充実させるために、各種突然変異遺伝子の導入を行っている。

*P. campbelli*と別種とされている*P. sungorus*に、白色被毛と黒色の目をもつ毛色突然変異が存在する。我々は2002年8月にこの変異体を導入してPMIハムスターと交配し、その子世代に出現した同様の形質をもつ個体をPMI系統に継続的に戻し交配し、コンジェニック系統の育成を行った。その過程で産子の表現型分離比を解析したところ、この変異体は常染色体性単一優性遺伝子支配である事が判明した。また、この原因遺伝子はホモ接合体が胎生致死している事が示唆された。

一方、我々は、常染色体性単一劣性遺伝子によって制御されている、通常固体より被毛の長い*Phodopus*ハムスター変異体を維持している。この長毛変異体と上述の黒目白色被毛変異体と交配することによって得られた交雑第一世代の黒目白色被毛の個体を、長毛変異体と戻し交配すると、非長毛かつ非黒目白色被毛個体、長毛かつ非黒目白色被毛個体および非長毛かつ黒目白色被毛個体が4 : 47 : 41に分離し、長毛で黒目白色被毛個体は出現しない。

すなわち、長毛原因遺伝子と黒目白色被毛原因遺伝子の両者が同一染色体の近い位置に存在している事が示唆された。現在、これらの情報に基づいたさらなる解析を進行中である。

モルモットにおける壊血病の再来

○中井伸子、勝田義弘、小林忍、河口千晴、名和孝二
(日本新薬㈱ 安全性研究部 動物管理課)

モルモットはヒトと同様、体内でビタミンCを合成できないことから、飼料中のビタミンCが欠乏することにより壊血病を発症することが古くから知られている。従って現在はモルモット用飼料には充分量のビタミンCが添加されているため、実験用モルモットにおいては、本症は過去の疾患であるとの認識が一般的である。

本年7月末、当施設のモルモット飼育室1室において、微生物モニタリング用の無処置のおとり動物に歩行不全等の異常が発見された。その後、他のモット飼育室においても、おとり動物だけではなく実験用動物の一部にも歩行不全、体重減少を中心とした異常が発見された。これらの動物は微生物モニタリング検査では異常はなく、剖検では後肢を中心にした皮下出血が認められた。血液学的検査においては網状赤血球数の増加が認められたが白血球数の上昇はなかった。また、血漿中のビタミンC濃度は検出限界以下であった。更に一部のおとり動物6匹に飲水中に混入しビタミンCを投与した結果、体重減少の激しかった1匹を除き、5匹は体重の増加等順調な回復が認められたことから、本症は壊血病であるとの最終診断を下した。なお、壊血病の原因と考えられる飼料のビタミンC不足については、潜伏期間を考慮すると、発症した時点では給餌飼料は消費済みであったため証明できなかった。

今回、本研究会で症例報告することにより、本症に関する知識と情報を共有し、過去の疾病と考えていたモルモットにおける壊血病の存在を再認識するとともに、他施設との情報交換を行うことにより、ビタミンC不足を招いた要因分析と再発防止策の検討に役立てたい。

母体 5/6 腎臓摘出時のラット胎児腎臓の発達に関する研究

八木久仁子、北野陽子、三野将城、○岡田利也
(大阪府立大学大学院実験動物学教室)

胎児の老廃物は主として胎盤を通じて母体の腎臓によって排泄されている。一方、妊娠後期には胎児の腎臓は濾過機能を有している。妊娠母体が腎臓機能低下に陥った場合、胎児の成長が抑制されると同時に胎児腎臓の発達が刺激されることが考えられる。本研究では母体 5/6 腎臓摘出時の胎児腎臓における組織形態計測学的変化、細胞増殖活性、アポトーシスならびに細胞増殖因子の局在を調べ、母体腎臓機能低下による胎児腎臓の発達への影響を明らかにすることを目的とした。

Wistar 系ラットを用い、妊娠5日目に左側腎臓を 2/3 摘出し、妊娠 12 日目に右側腎臓を摘出した。妊娠 22 日目に胎児を取り出し、摘出胎児とした。対照胎児として、偽手術母体より得られた胎児を用いた。母体血液、胎生 22 日齢胎児の血液ならびに羊水中の尿素窒素およびクレアチニン濃度を測定した。胎生 22 日齢胎児腎臓における腎小体数、腎小体総体積、近位尿細管長および近位尿細管総体積を組織形態計測法によって求めた。さらに、腎小体／近位尿細管総体積比を算出した。酵素抗体法により、PCNA、TGF- β 、TGF- β receptor I (TGF- β RI)、TGF- β RI、EGF、EGFR、および VEGF とその receptor (Flk-1) の局在を調べた。また、胎生 16 日齢胎児腎臓における TUNEL 陽性細胞および bcl-2 陽性細胞の局在を調べた。

尿素窒素濃度は妊娠5日目以降の母体血液ならびに妊娠 22 日目の胎児血液および羊水中において、クレアチニン濃度は妊娠 14 日目以降の母体血液ならびに妊娠 22 日目の胎児血液中において摘出群の方が対照群に比べて有意に高かった。胎生 22 日齢摘出胎児の腎小体／近位尿細管総体積比は対照胎児に比べて有意に小さかった。髓質集合管における TUNEL 陽性細胞は摘出胎児において対照胎児に比べて多く認められた。髓質集合管における TGF- β RI 陽性細胞の反応は摘出胎児で対照胎児より強かった。胎生 16 日齢胎児では TUNEL 陽性細胞が対照胎児に比べて多く認められたが、bcl-2 の反応は弱かった。

腎小体の成熟とともに尿細管部分が形成されることから、母体腎臓機能低下によって胎児腎臓の発達が促進されることが考えられた。また、母体腎臓機能の低下によって胎生 16 日齢胎児腎臓におけるアポトーシスの増加し、bcl-2 の発現が減少することがわかった。

アトラクチン欠損ミュータント *mv* ラットの病理発生：

ミクログリア関連サイトカインの動態

○井澤武史，桑村 充，山手丈至，小谷猛夫（大阪府立大大学院・獣医病理）

【目的】 *mv* (myelin vacuolation) ラットは中枢神経系のミエリン形成異常を特徴とするミュータントで，その病態は膜蛋白アトラクチン (*Atrn*) の欠損による．*mv* ラットの脊髄では，病態の進行に伴ってアストロサイトとミクログリアの活性化が認められる．特にミクログリア活性化はミエリン病変の主座する白質よりも灰白質に強く，その役割が注目される．今回 *mv* ラットの脊髄における各種サイトカインの発現を検索するとともに，*Atrn* mRNA の発現細胞を調べ，ミクログリアの病態への関わりを検討した．

【材料・方法】 4, 6 週齢の *mv* および対照ラットの脊髄から RNA を抽出し，半定量およびリアルタイム RT-PCR 法により，iNOS, TNF- α , IL-1 β , IL-6, TGF- β 1 の mRNA 発現を検索した．また，10 週齢の *mv* および対照ラットの脊髄を採材し，Western blot 法により iNOS 蛋白の発現を調べた．*Atrn* mRNA を認識する RNA プローブを作製し，in situ hybridization 法により *Atrn* 発現細胞を検討した．

【結果・考察】 4, 6 週齢の *mv* ラットにおいて，TGF- β 1 mRNA 発現量の増加が認められた．白質においては，TNF- α および IL-1 β の mRNA 発現量の減少がみられた．in situ hybridization 法により，対照ラットの脊髄灰白質・白質において *Atrn* 陽性細胞が観察され，形態的にはグリア細胞と考えられた．6, 10 週齢の *mv* ラットにおいて，iNOS 発現量の上昇が認められた．iNOS 発現の上昇は，活性化ミクログリアの出現時期と一致することから，ミクログリア活性化と関連する変化と考えられた．

水頭症ミュータントマウス *hhy* の上衣細胞の形態

○名部美琴¹, 桑村充¹, 山手丈至¹, 小谷猛夫¹, 森展子²

(大阪府立大学大学院, ¹獣医病理, ²理・生物遺伝子科学分野)

【目的】*hhy* (hemorrhagic hydrocephalus) マウスは、水頭症、脳内出血および大脳白質における異所性灰白質を特徴とするミュータントマウスである。*hhy* マウスは交通性水頭症を特徴とし、その原因遺伝子は 12 染色体上に存在し、近傍に既存の水頭症関連遺伝子はないことから、水頭症の新規モデル動物であることが明らかとなっている。これまで成体の *hhy* マウスの病態解析を行い、上記のような 3 つの異なる病変が明らかとなったが、それらの病変の相互関係や病理発生には不明点が多い。本研究は *hhy* マウスの病理発生を明らかにする目的で、上衣細胞の形態に注目し検討した。

【材料と方法】免疫組織化学：2, 15 週齢の *hhy* 発症マウスおよび同腹の非発症マウスの大脳のメタカン固定パラフィン切片を作製し、抗 CD24 抗体、F4/80 抗体を用いた免疫組織化学を行い、それぞれ上衣細胞、ミクログリア/マクロファージの形態および動態を評価した。走査型電子顕微鏡観察 (SEM)：脳室上衣細胞の形態を評価する目的で、2, 8 週齢の *hhy* マウスおよび対照マウスの脳の大脳皮質を剥離して脳室を露出し、2%グルタルアルデヒド固定、1%オスミウム後固定し、臨界点乾燥、白金パラジウム蒸着を行い観察した。

光学顕微鏡 (光顕) および透過型電子顕微鏡観察 (TEM)：2, 8 週齢の *hhy* マウスの脳を 2%グルタルアルデヒド固定、1%オスミウム後固定し、エポン包埋した。厚切り切片を作製し、トルイジンブルー染色を行い、光学顕微鏡観察を行った。さらに、超薄切片を作製し、酢酸ウラン・硝酸鉛で二重染色し、電子顕微鏡観察を行った。

【結果】光顕所見：*hhy* マウスでは、側脳室を内張りする上衣細胞は扁平化あるいは消失し、側脳室周囲の白質に水腫が認められた。さらに、*hhy* マウスの側脳室内では、しばしばマクロファージの浸潤が認められた。SEM：*hhy* マウスでは、側脳室の一部の上衣細胞は脱落し、側脳室内ではしばしばマクロファージの浸潤が認められた。軽症例の *hhy* マウスでは、側脳室を内張りする一部の上衣細胞に残存する線毛が認められたが、重症例のマウスでは、上衣細胞の線毛は消失していた。TEM：TEM 観察においても、*hhy* マウスでは、上衣細胞の扁平化あるいは脱落が観察され、さらに脳室周囲のミエリン変性が認められた。免疫組織化学：*hhy* マウスでは、側脳室周囲の白質にアストロサイトの増生および F4/80 陽性の活性化ミクログリアが認められ、これらは軽症例に比べて重症例で顕著であった。*hhy* マウスの側脳室内では、しばしばマクロファージの浸潤が認められた。

【考察】*hhy* の病理発生において上衣細胞の機能異常が生じ、脳脊髄液が脳実質に流入して水腫およびグリア細胞の病変を引き起こす可能性が示唆された。

『ラット胚・精子の超低温保存と個体復元技術マニュアル(DVD 版)』の作製

滝澤明子¹、Birger Voigt¹、日置恭司²、江藤智生²、平林真澄³、柏崎直巳⁴、

庫本高志¹、芹川忠夫¹

(¹京都大院・医・附属動物実験施設、²(財)実験動物中央研究所、³自然科学研究機構 生理学研究所、⁴麻布大院・動物繁殖)

ナショナルバイオリソースプロジェクト「ラット」(NBRP-Rat)では、ラットという生物資源を有効に利用できるようにするため、ラット系統の『収集・保存・提供』の事業を行っている。これまで300を超える系統の寄託と293件の提供を行ってきたがそのほとんどが生体による寄託・提供であり、超低温保存胚・精子による寄託提供はまれである。これはガラス化保存胚または凍結精子を用いて個体復元させる技術を持っている研究機関が非常に限られていること、また研究機関ごとに保存手法が異なるためである。

しかし、今後リソースの迅速な寄託・提供を行うためにはガラス化保存胚・凍結精子による系統の「収集、保存、提供」が望まれる。このため NBRP-Rat では国内で有数のラット胚・精子操作に関する技術を持つ研究機関と協力し、超低温保存技術と個体復元技術の標準化に取り組み、この標準化したプロトコールのマニュアル DVD を作製した。

本マニュアル DVD の主なコンテンツは、①2 細胞期胚のガラス化保存法(担当機関:実中研)、②桑実胚のガラス化保存法(担当機関:京大)、③顕微授精(担当機関:生理研)、④精巢上体精子の凍結保存(担当機関:麻布大)、⑤胚移植・人工授精からなっている。それぞれのコンテンツは一般の DVD プレイヤーでも再生が可能なムービーで収録されており、顕微鏡下での操作も習得しやすいようになっている。また PC で閲覧が可能な PDF 形式の詳細なプロトコールも含まれており、このプロトコールを確認しながら実際の作業を行えるようになっている。

本マニュアル DVD を活用していただき、各研究機関でラット胚・精子の超低温保存技術と個体復元技術が確立され、NBRP-Rat と各研究機関との間でのラットリソースの効率的なやりとりが可能となり、それらリソースを用いた研究活動が迅速に実施されることを期待している。

カニクイザル卵子の体外成熟培養

○ 山崎樹里、岩谷千鶴、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】未受精卵子の体外成熟培養(IVM)法の確立は、体細胞核移植胚の作成による移植医療研究、体外受精・顕微授精等の発生工学的研究の推進に必須な課題の一つである。我々はホルモン投与によって発育誘起を施したカニクイザルの卵巣から腹腔内視鏡を用いて未受精卵子を採取しているが、採取された卵子には成熟卵子(MII)の他に未成熟卵子(MI, GV)が含まれている。MI, GV 卵子は体外操作に供することが出来ないため、これらを体外培養によって MII 卵子へ成熟させなければならない。そこで今回我々は IVM における支持細胞として卵胞上皮細胞、卵丘細胞および卵管上皮細胞を用いて未成熟卵子、特に GV 卵子について培養条件の検討を試みた。

【方法】カニクイザルに卵巣刺激処理を施し、腹腔鏡下で卵子を採取した。採取した卵子はヒアルロニダーゼ処理により裸化し顕微鏡下で発育ステージごとに分類した。GV 卵子は細胞培養用ペトリディッシュに接着させた 1. 卵胞上皮細胞、2. 卵丘細胞および 3. 卵管上皮細胞上に静置し、定期的な観察を 72 時間実施した。培養液には 10%FCS-TCM199 を用いた。

【結果および考察】1. では 45 個中 3 個(17.7%)が、2. では 10 個中 1 個(10.0%)、3. では 20 個中 7 個(35.0%)が MII 卵子へ成熟し、卵管上皮細胞が卵子の成熟を促す作用が高い可能性が示された。内視鏡による卵巣観察をホルモン投与中に導入することによって高効率に成熟卵子を採取することが可能となっている。しかし、貴重なカニクイザル卵子をより有効に利用するため、支持細胞の他に、培養液へ添加するグロースファクター等も含め未成熟卵子の IVM の効率化を進めることは今後とも重要である。

口腔スワブを用いた Amp-FTA 法による遺伝子改変動物のジェノタイピング

○中西 聡、庫本高志、鶴見東志子、真下知士、芹川忠夫

(京大院・医・動物実験施設)

マウス・ラットの口腔スワブ法を用いた Amp-FTA 法を紹介する。Amp-FTA 法は、FTA®カード上に塗布した血液を PCR テンプレートとして用いる。Ampdirect®Plus バッファーを用いることで、テンプレートの処理が一切不要となる。血液は、マウス・ラットの尾端を切断することにより得ている。尾の切断は、動物にとって侵襲的である。また、麻酔下で行うことが推奨されている。

そこで、非侵襲的なサンプリング法として、口腔スワブ法を検討した。口腔スワブ法により採取された口腔粘膜細胞を用いて、Amp-FTA 法を行った。

【材料と方法】

自家開発した BAC トランスジェニックマウス(4~8週齢)を用いた。トランスジェーンを BAC ベクター特異的なプライマーにより検出した。マウスを保定し、滅菌綿棒(先端径 2mm)を用いて口腔粘膜細胞を採取した。同一個体の尾端から血液を採取し、対照サンプルとした。口腔スワブ、血液を FTA カード上に塗布し、乾燥させた。FTA カードを耳パンチ(径 1.5mm)で打ち抜き、PCR テンプレートとした。PCR は 15 μ l の反応液中で行い、35 サイクルとした。

【結果と考察】

滅菌綿棒をあらかじめ滅菌水で湿らせることにより、口腔スワブ法を確実に実施できた。麻酔も必要なく、血液採取に比べ簡便であった。

口腔スワブ法によっても、目的の PCR 産物が得られた。バンドの濃さは、血液を用いた場合よりも薄かった。しかし、PCR サイクルを5回追加することにより、改善できた。従って、スワブ法により採取したマウスの口腔粘膜細胞からもジェノタイピングが行えることが明らかとなった。

動物愛護管理法が改正され、実験動物に苦痛を与えない実験方法が求められている。Amp-FTA 法は、簡便・迅速で、人や環境に優しいだけではない。口腔スワブ法を組み合わせることにより、動物福祉を考慮したジェノタイピング法になった。

慢性腎不全モデルマウス ICGN/Oa の PCR 法を用いたゲノムタイピングと表現型での分類の比較

○ 河合澄子¹、加藤貴史²、田島 優¹、黒澤 努¹

(¹大阪大学大学院医学系研究科実験動物医学、²大阪大学大学院医学系研究科分子再生医学)

【目的】自然発症型慢性腎不全マウス (ICGN/Oa) は、単一の劣性遺伝子を原因とし、ホモ固体(nep/nep)では慢性腎不全を発症する。この系統維持は、ホモ♂とヘテロ♀を組み合わせで次世代を得ている。ホモ固体は、表現型として尿中に ICGN/ Oa マウス特異タンパクを有することで定義している。その確定には SDS-PAGE 法、もしくは色比法を用い尿中タンパク濃度を測定している。尿は 24 時間尿が最適であることは以前報告したが、匹数が多くなると困難になるため簡便法としてスポット尿を採用している。最近、我々はこのマウスの腎不全の原因遺伝子が第 15 染色体の Exon18 上にある *Tensin2* であることを明らかにした。そこで、この遺伝子を検出するプライマーを用いて PCR 法によるゲノムタイピングを試み、従来用いていた表現型により確定する遺伝子型と一致するかどうかを検討した。

【材料と方法】PCR 法は、ヘテロ♂とヘテロ♀から生まれたマウスから採取した口腔粘膜より抽出した DNA から、プライマー *tensin2-F3*, *tensin2-R2* を用いて行った。コントロールのホモとワイルドの DNA は、各々近交系統として維持されたマウスより抽出したものをを用いた。表現型の尿中タンパク濃度は、比色法 ALB-S (デンカ生研) と SDS-PAGE 法により、同じマウスからスポット尿を 4 週齢以降 2 回以上採取して行い、PCR 法の結果と比較した。

【結果】PCR 法の結果、ヘテロでは 80bp 前後に 2 本のバンドが検出された。ホモ固体ではヘテロで見られた 80bp 以下のバンドと同じ位置に 1 本、ワイルド固体ではヘテロで見られた 80bp 以上のバンドと同じ位置に 1 本検出された。また同じマウスからのスポット尿による表現型の測定結果は、PCR 法による遺伝子型の結果と一致した。

【考察】PCR 法の 2 本のバンドは、理論上ワイルド固体の DNA である 83 塩基と、*Tensin2* の一部を欠損しているホモ固体の DNA である 75 塩基であると考えられる。これまでの尿中タンパク濃度で見る表現型判定では、ヘテロとワイルドの区別が不可能であった。しかし、今回の PCR 法を用いることによって遺伝子の有無を確認することができ、すべての遺伝子型を確定することができるようになった。またスポット尿では見落とすことのある表現型での系統維持を誤ることなく継続できる方法が開発できたものとする。

1 型糖尿病の発症を修飾する遺伝子の解析：KDP ラットと TM.KDP-Cblb コンジェニック系統を用いた交配実験による検討

○横井伯英、藤原結花、林 千尋、清野 進
(神戸大学大学院医学系研究科細胞分子医学)

【目的】我々は 1 型糖尿病の動物モデルである Komeda diabetes-prone (KDP) ラットの解析に基づいて、MHC と Cblb の 2 つの主要遺伝子による発症モデルを提唱している (Yokoi, N., Exp. Anim. 54:111-115, 2005)。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。そこで今回、発症を修飾する遺伝子について遺伝学的解析を行った。

【方法】TM.KDP-Cblb コンジェニック系統と KDP ラットを交配して F1 ラットを、さらに F1 ラット同士を交配して F2 ラットを作出し、コンジェニック系統、KDP ラット、F1 および F2 ラットの 4 系統について糖尿病の発症を観察した。

【結果】KDP ラットは糖尿病発症開始日齢が早く、210 日齢において全個体が糖尿病を発症した (累積発症率 100%)。一方、コンジェニック系統は発症開始日齢が遅く、発症率が低かった (同約 25%)。F1 ラットは KDP ラットと同様に発症開始日齢が早く、発症率が高かった (同約 80%)。F2 ラットは KDP ラットと同様に発症開始日齢が早い個体から発症しない個体までばらつきがあった (同約 70%)。

【結語】1 型糖尿病の発症を修飾する遺伝子として、KDP ラットの遺伝的背景に優性 (あるいは偽優性) の遺伝様式で作用する遺伝子が存在することが示唆された。

難聴と平衡感覚障害を示す *mawaru* マウスにおける原因遺伝子の同定

徳田雄祐¹、山根知恵美²、柴田直哉¹、石下聡¹、芹川忠夫²、○北田一博¹

(¹北大・創成機構・実験生物、²京大院・医・動物実験施設)

[緒言] 京大院・医・動物実験施設で維持されていた ICR コロニー中に、旋回運動を呈するミュータントが見出された。家系分析により、その異常表現型は常染色体劣性の遺伝様式に従って伝達されることが明らかとなった。ミュータントマウスにおける異常行動は、個体により旋回運動を呈するものから軽度な斜頸を示すものまで、ばらつきが見られる。ホモ個体は、異常行動に加え、音に対する驚愕反応を示さず、**swimming test** においても正常な泳ぎができないことから、内耳障害の可能性が示唆されている。ホモ個体間の繁殖成績は極めて悪く、現在、ホモ個体とヘテロ個体間の兄妹交配により維持され、F15 世代に達している。今回、このミュータントマウスの難聴・平衡感覚障害モデルとしての有用性を高める目的で、原因遺伝子を同定したので報告する。

[方法と結果] ミュータントマウスを野生由来近交系マウス MSM と交配して 181 匹の F2 個体を作成し、行動異常の有無を判定した。さらに、全ゲノム領域に散在するマイクロサテライトマーカーを用いて連鎖解析したところ、異常表現型は第 1 2 染色体上のマーカー D12Mit59 と完全に一致して分離することが示された。そこで、この原因遺伝子を *mawaru* (*mw*) と命名した。このマーカーは、甲状腺腫大を伴う症候群性難聴であるペンドレッド症候群と前庭水管拡大を伴う感音性難聴(DFNB4)の原因遺伝子として同定された *solute carrier family 26, member 4* (*Slc26a4*) 遺伝子の内部に存在する。ミュータントにおける *Slc26a4* 遺伝子の配列を決定したところ、第 14 エクソンに G418W のアミノ酸置換を伴う G から T への塩基置換が生じていた。このアミノ酸残基の近傍はゼブラフィッシュからヒトまで広い脊椎動物種で保存されているとともに、ヨーロッパにおけるペンドレッド症候群の主要な変異型はこの領域内の T416P のアミノ酸置換であることが知られている。また、*Slc26a4* 遺伝子の null 型ノックアウトマウスが作出されており、その表現型は *mawaru* マウスのものに酷似する。以上の結果から、*mawaru* マウスの原因遺伝子は *Slc26a4* 遺伝子であり、ペンドレッド症候群、特に欧米で高い頻度で見られるタイプのよいモデルになり得ると結論付けた。

[考察] 正常な *Slc26a4* 遺伝子産物は、Cl⁻イオントランスポーターや I⁻イオントランスポーターの活性を持つとする報告例があるものの、その詳細な機能は依然不明である。一次構造が保存されている領域は重要な機能を担っていることが推測され、今後、ミュータント型の遺伝子産物がイオントランスポーター活性を欠いているか否かの検索が望まれる。また、今回作出された F2 世代においても、行動異常のばらつきが見られた。このばらつきを支配する修飾遺伝子の探索を進めることにより、さまざまな内リンパ液の代謝障害を伴う平衡感覚障害の病因を解明することにつながることを期待される。