

関西実験動物研究会会報

Kansai Journal of Laboratory Animals

平成元年 1 月 5 号

関西実験動物研究会

Kansai Laboratory Animal Research Association

目 次

＜第 1 5 回 研 究 会＞

講 演 会

1. 実験動物における腎臓の毒性病理

宮 崎 宏 彰 （武田薬品工業（株）中央研究所） 1

2. 欧米におけるGLPの実施状況について

柴生田 正 樹 （武田薬品工業（株）中央研究所） 3

＜第 1 6 回 研 究 会＞

会員の研究発表 5

特 別 講 演

動物細胞における生理活性物質の合成系の利用について

河 本 馨 （東京大学農学部） 20

＜第 1 7 回 研 究 会＞

講 演 会

「自然発症てんかんラットの作出とその応用」

芹 川 忠 夫 （京都大学医学部） 21

編 集 後 期

< 第 15 回 研 究 会 >

講 演 会

1. 実験動物における腎臓の毒性病理

宮 崎 宏 彰 (武田薬品工業(株)中央研究所)

2. 欧米におけるGLPの実施状況について

柴生田 正 樹 (武田薬品工業(株)中央研究所)

日時： 昭和62年9月12日

場所： 京大会館

1. 実験動物における腎臓の毒性病理

宮崎 宏彰(武田薬品・中研)

1. はじめに

諸種薬物の毒性試験において腎臓はもっとも毒性が発現しやすい臓器の一つである。それは、腎臓が各種薬物における主要な代謝・排泄経路の一つであり、循環血流量が極めて豊富で、薬物が電解質などの吸収・排泄に関連して腎実質内や尿細管の管腔内に蓄積しやすく、尿濃縮能によって薬物濃度が局所的に高まることなどに起因するからである。

腎臓は形態学的には皮質と髄質にわけられ、糸球体、尿細管、間質組織から構成されている。尿細管はさらに近位尿細管(曲部と直部; S1、S2とS3)、ヘンレの係蹄細い部、ヘンレの係蹄太い部を含む遠位尿細管および集合管から成り、複雑な機能に対応した特徴的な細胞構築を備えている。腎毒性の発現は、このような複雑な腎臓の構造と多様な機能に密接に関連している。

2. 薬物による病理変化

ラットに薬物を投与したときの主要な標的部位と各種の病理変化は、糸球体では各種の polycation や aminonucleoside などみられる基底膜の露出や上皮の足突起の融合などがあり、これは基底膜の透過性の異常や負電荷の消失が原因と考えられている。近位尿細管曲部では、ある種の cephem 系抗生剤にみられる上皮の変性・壊死などがある。これは lysosome の変化とよく対応し、薬物の上皮への吸収・蓄積に由来する。近位尿細管直部では、cisplatin でみられるように薬物が上皮細胞の核の DNA に作用して核の病変が発現することが知られている。

ヘンレの係蹄太い部を含む遠位尿細管では、folic acidの投与によって管腔内および上皮細胞内に結晶が析出し、上皮に変性・壊死が発現する。この部位はNa, K-ATPase 活性 (Na ポンプ) がもっとも高い部位であり、薬物の濃縮と関連して発現した病変と解釈される。集合管では、acarboseを投与するとlysosomeの α -glucosidase を抑制して集合管上皮にglycogenが異常に蓄積すること、またaspirin やphenacetinを投与すると髄質にいわゆる乳頭壊死が発現することが知られている。

このような病理組織学的変化が特定の薬物に起因することを明確にするには、i) 組織学的に自然発生病変と区別できる、ii) 病変の程度や発現頻度に用量相関性がある、iii) 実験的に再現性がある、iv) 薬物の投与時期と病変発現に密接な関連がある、v) 休薬によって病変が修復する、などの事実が満たされることが必要であろう。

3. 腎毒性評価の留意点

腎毒性の病理検索に際しては、i) 動物の種、系統、年齢、性、ii) 自然発生病変、iii) 死後変化、iv) アーチファクト、などについて十分留意する必要がある。

自然発生病変の把握はもっとも重要で、例えば10週齢のwistar ラットでは好塩基性尿細管の出現は雌雄ともに多い(約40%)が、皮髄境界部尿細管の石灰沈着は雌では多く(約70%)雄ではほとんどみられない。通常の毒性試験に用いられる年齢のビーグル犬では集合管の石灰沈着が多く(約50%)、次でhyaline castを伴った尿細管の拡張がみられる(約10%)。カンクイザルでは、尿細管の褐色色素の沈着(約20%)と好塩基性尿細管の出現が多い(約15%)。同一種の動物でも加齢とともに病変が多様化することは言うまでもない。

また、幼若動物が必ずしも薬物に高感受性ではなく、腎機能が未熟なため吸収・濃縮能が不完全で、cephem系の抗生剤やfolic acidを投与したときのように成熟動物よりかえって腎毒性が発現しにくいことがある。種により代謝・吸収・排泄パターンが異なり多様な腎毒性病変が発現することやウサギが一般的に腎毒性が発現しやすい動物であることはよく知られている。

死後変化(核濃縮・空胞変性など)は部位によって異なる速さで進行する。系球体、近位尿細管、ヘンレの係蹄細い部、髄質集合管で遅く、ヘンレの係蹄太い部を含む遠位尿細管、皮質集合管で早い。後者の上皮細胞ではNa, K-ATPase 活性が強く、血流停止後に細胞内ATPレベルが急速に低下するためと考えられる。

以上、腎毒性の病理検索に際しては腎臓各部位の複雑な形態学的特徴を十分に把握し、加齢性変化を含む自然発生病変の種類や発現頻度、死後変化、アーチファクトなどの詳細な理解が不可欠であり、これらの理解が正確な毒性評価の前提であると考えられる。

欧米における G L P の実施状況について

柴生田 正樹（武田薬品、中研）

欧米の 5 個所の大規模な安全性試験受託施設における G L P の実施状況を概観した。

これらの施設は、日本の大手受託施設にくらべて、2～3 倍の規模を有する。総床面積、従業員数、小動物室数、大動物室数の平均はそれぞれ、2.2 万平米、530 人、62 室、30 室である。また年間の平均試験実施数は、癌原性試験と小動物慢性毒性試験については 37、大動物毒性試験については 20 に達する。従って、これらの試験のバックグラウンドデータは豊富であり、特に癌原性試験のデータは日本に比べて格段に多い。

大規模化に伴い、分業化が進んでいるのが特色である。毒性部門（投薬、飼育観察をする）、臨床検査部門、病理部門の他に、専任の被験物質と媒体との混合物調製部門および解剖部門が設けられている。米国では、さらにレポート作成部門が独立している。この部門が飼育期間中のデータをまとめ、また病理、臨床検査部門のテクニカルレポートを受けて報告書原稿を作成する。試験責任者がこの原稿をレビューし、要約と結論を書いて最終報告書を仕上げている。また試験責任者は試験実施部門から独立している。分業化により各業務は効率化し信頼性は高くなっている。

コンピュータによるデータ収集と処理の自動化は、重量測定、臨床検査、病理組織検査等において行われている。この面では米国が欧州に比べて進んでいる。

動物室の S P F バリヤーは日本に比べて欧米とも弱い。白衣、帽子、マスクを着用するだけで動物室へ入るし、S P F を購入した後、試験中は病原菌モニタリングは実施していない。特に米国ではバリヤーの低い傾向があるが、彼等は、施設が田舎にあり環境自体がクリーンであるからこれで十分 S P F が保たれているし、また問題は発生していないと説明をしている。

化学分析部門はいずれにおいても完備しており、手順書を定めて

投与液、混餌中の被験物質の分析を実施している。欧米のG L Pが投与液中の被験物質の均一性と含量分析を義務付けていることへの対応と考えられる。

その他、犬舎の広さや犬の運動対策については動物愛護規制のある欧州が進んでいる。また実験者の考え方の違いにより、小動物は欧州では群飼、米国では個別飼いが一般的である。さらに癌原性試験の統計解析法にも欧米で差が認められる。剖検は病理学者の定めた手順で実施されているが、この際の病理学者の立ち会いについては、無条件に常時実施する施設と、試験計画書で指示されれば常時立ち会うが、指示されなければ常時は立ち会わない施設とがある。

結論として、これら試験施設の試験実施状況の信頼性は高いと判断する。一方、分業化に伴い部門間の連絡の悪さによる手違いが生じたり、ラボオート化により作業がルーチンに流れ過ぎて意味のある現象が見過ごされる可能性があるので、委託時にはこれらの点に留意すべきである。また試験施設の特色に注意して必要な条件は予め試験計画書に盛り込んで置くことが重要である。

＜第16回研究会＞

会員の研究発表

特別講演

動物細胞における生理活性物質の利用について

河 本 馨 （東京大学農学部）

日時： 昭和62年12月4日（金）

場所： 大阪科学技術センター

1. 低栄養状態下によるラット肝への影響
2. 可移植性肉腫を再接種されたイヌにおけるリンパ球の態度
3. ラットの血液学的検査値に及ぼす採血方法の影響
4. 実験小動物の微生物モニタリングへのELISA導入の検討
5. バリヤー施設での手指消毒効果
6. 若齢ラットに自然発生した後軀麻痺の病理学的検討
7. 遺伝性白内障マウスにみられた異常症状について
8. C₃Hマウスにみられた自然発症リンパ腫
9. 若齢ラットにみられた唾液腺腫瘍
10. Tremor ラットの生殖器病変について
11. ラットの真性半陰陽の一例
12. 自然発症てんかんラット（SER）を用いた抗てんかん薬の評価
Phenobarbitalの持続投与について
13. 糖尿病発症遅延NODマウスの観察
14. ヒトA γ / β -グロビン遺伝子によるトランスジェニックマウス

特別講演

動物細胞における生理活性物質の利用について（要 旨）

1. 低栄養状態下によるラット肝への影響

寺嶋昭夫, 奥田敏明, 北川 登, 吉中一郎 (科研製薬)

〔目的〕 毒性試験において薬物を大量投与すると摂餌量の低下に伴う体重の減少あるいは増加抑制がしばしば生じ、生化学的及び諸臓器の組織学的変化が認められる。従って、上記の変化が摂餌量低下のみに起因したものか、あるいは薬物によって特異的に生じたものであるかを区別しなければならない。しかしながら、低栄養状態下時の肝への影響について体重増加抑制程度の諸飼育条件下の実験報告例は極めて少ない。今回我々は、栄養障害によって生ずる肝の変化を明らかにする目的で、低栄養状態下のラットを作製して、血液生化学的並びに肝組織の形態学的検索を行った。

〔方法〕 5週齢のWistar系ラット雄を用いた。実験群としてⅠ群；自由摂食（ラット飼育用固型飼料、MF、粗蛋白質量24%含有）、Ⅱ群；50%制限食（Ⅰ群の1日平均摂餌量の1/2）、Ⅲ群；低蛋白食（ラット用低蛋白固型飼料、粗蛋白質量12%含有）を設けた。これらの摂餌条件下でⅠ群5匹とし、個別ケージにて6週間飼育した。検査項目として体重は実験期間中毎日測定し、実験終了時に動物を屠殺し、血清生化学的検査、肝重量測定及び肝組織の光顕、電顕的観察を行った。

〔結果〕 1) 体重及び肝重量；Ⅱ、Ⅲ群共に体重増加抑制が明瞭にみられ、実験終了時の体重値をⅠ群と比較するとⅡ群で44%、Ⅲ群で33%の抑制を示した。肝実重量は、Ⅰ群に比しⅡ群で60%、Ⅲ群で45%の減少を示した。2) 血清生化学的検査；Ⅰ群と比較した結果、Ⅱ群ではTP、TG、Glucoseの減少、Ⅲ群ではTP、TG及びBUNの減少が認められたが、特にTP、TGの変動が著明であった。TPの減少程度はⅡ群よりⅢ群の方が強かったが、TGは両群間に明らかな差は認められなかった。3) 病理組織学的検査；Ⅱ群では細胞質の好酸性化を伴う肝細胞の萎縮及びPAS陽性物質の消失が小葉全域にみられ、電顕的には好酸性所見に相当すると思われる肥大したミトコンドリアが密に認められた。また、粗面小胞体の短縮も明らかに認められた。Ⅲ群では脂肪滴を伴う肝細胞の萎縮が小葉全域に、PAS陽性物質の減少が小葉中心から中間域に認められた。電顕的には細胞質にdensityの低い大小不同の脂肪滴が増加していた。また、脱リボゾームを伴う粗面小胞体の減少及びミトコンドリアの変形を伴う肥大が認められた。

以上の結果より、低栄養状態下では生化学並びに形態学的に肝への影響が明らかとなり、条件の変動によっても差異の生ずることが示唆され、薬物の毒性評価をする上で認識しておく必要があると思われる。

2. 可移植性肉腫を再接種されたイヌにおけるリンパ球の態度

水野信哉、藤永 徹、田島誉士、大友勘十郎、小池寿男（北大・獣医）

我が国において確立された移植可能なイヌの腫瘍として、北海道大学獣医学部家畜外科学教室で小池らが同種移植により継代・維持したイヌ可移植性肉腫が知られている。本腫瘍は同種移植可能であり、通常自然退縮し、退縮後免疫が成立する。再接種時にみられる速やかな肉腫の消失は、移植免疫における2次応答に相当した反応とも考えられる。

そこで今回、再接種における本腫瘍の退行に関与するリンパ球サブポピュレーションの本態を明らかにするために免疫組織学的に検索した。次いで、肉腫の消長に伴う宿主生体反応を血液学のおよび免疫学的に検査した。その結果、以下の成績を得た。

1) 全例において再接種後3日目に、肉腫の発症を認め、6ないし9日目に母指頭大を示したものの、肉腫はまもなく退行しおおむね15日前後で消失した。

2) 再接種後、肉腫組織への速やかなリンパ球浸潤が辺縁部より観察され、肉腫細胞を囲環・変性・脱落させる像がみられた。浸潤リンパ球の大部分が免疫組織学的に検索した結果、胸腺細胞抗原陽性を示した。

3) 再接種後の血液学的検査の結果、末梢血リンパ球の軽度の上昇を除いて著明な変化は認められなかった。

4) 末梢血胸腺細胞抗原陽性リンパ球数は再接種後、漸次増加の傾向を示した。一方、末梢血リンパ球胸腺細胞抗原陽性率は60ないし70%の間で一定していた。

5) 末梢血表面免疫グロブリン陽性リンパ球数は再接種後、漸次増加の傾向を示した。一方、末梢血リンパ球表面免疫グロブリン陽性率は20ないし30%の間で一定していた。

6) 末梢血エステラーゼ陽性リンパ球数は再接種後減少し、肉腫の退行に伴って回復の傾向を示した。末梢血リンパ球エステラーゼ陽性率は再接種後、特に6および9日目に低値を示し、以後肉腫の退行に伴い、再接種前値に近づいた。

7) Tリンパ球分化・増殖マイトジェンを用いた末梢血幼若化試験の結果、再接種後早期にSI値は高値を示し、肉腫の退行に伴い回復の傾向を示した。

以上の成績から、イヌ可移植性肉腫再接種時に観察された速やかな退行過程に胸腺細胞抗原陽性リンパ球が深く関与していることが示された。また、末梢血リンパ球のエステラーゼ活性の減少はTリンパ球の活性化を示唆し、本実験においても*in vitro*での末梢血リンパ球幼若化能の上昇が観察された。

近年、イヌTリンパ球の他に、NK細胞の一部にも胸腺細胞抗原が見出され、今回の検索のみで抗腫瘍エフェクター細胞がTリンパ球であると結論するまでには至らなかったものの、別途実験および文献上の知見から得た(1) 感作によってリンパ球が高いキラー活性を発現するようになる、(2) エフェクター細胞の電子顕微鏡的形態像がlarge granular lymphocyte と異なる、などの点からみても本腫瘍退行エフェクター細胞がTリンパ球である可能性が高いものと考えられた。

3. ラットの血液学的検査値に及ぼす採血方法の影響

○永江祐輔・一二三智子・佐藤真理・小林清隆(日本チバガイギー・薬安研)

医薬品の毒性試験法ガイドラインによると、血液学的検査及び血液生化学的検査の項目は、できる限り多項目にわたることが望ましいとされている。一般的に実施されるこれらの項目について再測定分等を考慮すると、約 7 ml の血液が必要と考えられる。一方、ラットでは腹大動脈からの全採血量は雄で 10 ml、雌で 7 ml が限度である。このような限界量に近い採血を行うことが、検査値（特に血液学的検査値）に影響を及ぼす可能性が考えられた。

そこで、今回、ラットの血液学的検査値（WBC、RBC、Hgb、Hct）に及ぼす採血法の影響を検討した。測定には Sysmex CC-170（東亜医用電子）を用いた。

1. 腹大動脈採血における引き始めと引き終わりの血液の検査値の相違について：19 週齢の SD 系ラット雌雄各 10 匹をペントバルビタール麻酔下で開腹し、腹大動脈から注射筒でゆるやかに吸引採血しながら、三方活栓を用いて引き始めの 1.5 ml と引き終わりの 1.5 ml（全量雄で 10 ml、雌で 7 ml 採血した）を各々採取し、検査値を比較した。雄の WBC、RBC、Hgb、Hct をみると、引き始めが各々、 $6850/\text{mm}^3$ 、 $964 \times 10^4/\text{mm}^3$ 、17.5 g/dl、48.7 % であったのに対して、引き終わりでは、 $3075/\text{mm}^3$ 、 $888 \times 10^4/\text{mm}^3$ 、16.0 g/dl、45.3 % であった。雌でも同様の傾向にあり、雌雄ともいずれの検査項目においても引き終わりが引き始めに比較して有意（ $p < 0.01$ ）に低い値を示した。

2. 貧血ラットにおける腹大動脈採血と尾静脈採血値の相違について：7 週齢の雌性 SD 系ラット各群 5 匹に 5、10、20 mg/kg の indomethacin を 1 回経口投与後 2 日目に採血した。まず、ペントバルビタール麻酔下で、注射針（22 G）から切断した針の部分を用いて尾静脈血を滴下させ 500 μ l を採取した。直後に腹大動脈血（引き終わりの部分）を採取し、各々検査に供した。尾静脈血と腹大動脈血を比較すると、各投与量群ともいずれの検査項目においても、腹大動脈血の方が低い傾向にあり、特に全投与量群の WBC および対照群の RBC と Hgb では有意（ $p < 0.05$ 、0.01）な差であった。一方、投与量間で検査値を比較すると、尾静脈血と腹大動脈血のいずれも、貧血を示唆する用量相関のある値（RBC、Hgb、Hct では 10 mg/kg で対照群の 70 %、20 mg/kg で 50 %、WBC では 20 mg/kg で対照群の 70 %）を示した。

3. 以上のことから、血液学的検査に際して採血条件がその値に大きく影響を及ぼす反面、今回実施した検査項目については一定の採血条件に固定しておけば、いずれの条件においても評価に値するデータが得られることが示唆された。

4. 実験小動物の微生物モニタリングへのELISA導入の検討

平沢 勉、大原真代子、三日月勝見、林 幸之（塩野義・油日）

Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) は近年各種感染症診断への応用が幅広く試みられており、実験動物の微生物モニタリングの分野においても、本法が卓越した検査法であることが確認されつつある。そこで、当ラボラトリーズにおいても ELISA 導入を目的とし、マウス、ラットの主な伝染性呼吸器疾患である Mycoplasma pulmonis (M. pulmonis) および Sendai virus 感染症の血清診断について検討を加えた。

ELISAの術式は、M. pulmonis については町井らの方法 (Jpn. J. Vet. Sci. 47 : 845-848, 1985) に、Sendai virus については岩井らの方法 (Microbiol. Immunol. 28 : 481-491, 1984) に準じた。補体結合 (CF) 反応および血球凝集抑制 (HI) 試験は常法に従い、マイクロタイター法により実施した。調査は M. pulmonis ならびに Sendai virus 陽性の某動物実験施設および当ラボラトリーズのマウス、ラットについて実施した。M. pulmonis に関しては、CF 反応および ELISA を実施した。某施設において CF 反応では抗体陽性率がマウス 1/54(1.9%)、ラット 0/41(0%)、抗体価は 1:20 であったのに対し、ELISA では陽性率がマウス 7/54(13%)、ラット 15/41(37%)、抗体価は各々 1:10～1:2,560 および 1:1,280～1:10,240 であった。当ラボラトリーズのマウス、ラット各系統はいずれも ELISA で陰性であり、血清診断法として ELISA が CF に優ると考えられた。Sendai virus に関しては、HI 試験および ELISA を実施した。某施設において HI 試験では陽性率がマウス 14/15(93%)、ラット 41/41(100%)、抗体価は各々 1:32～1:512 および 1:32～ $\geq$ 1:1,024であり、ELISA では陽性率がマウス 54/54(100%)、ラット 41/41(100%)、抗体価は各々 1:320～1:5,120 および 1:80～1:5,120であった。当ラボラトリーズのマウス、ラットにおいては、定期検査で HI 抗体陰性であるにもかかわらず ELISA で OD 値のやや高いものがマウスで 2/224(0.9%)、ラットで 1/92(1.1%) 認められ、ELISA の特異性および陽性限界の設定についてさらに検討が必要と考えられた。

5. バリヤー施設での手指消毒効果

大野周三、石川尚明、高島俊行（藤沢薬品 実験サービス）

安全性の長期試験はバリヤー施設で実施しており、施設内へ搬入する飼育器材、資材は全てオートクレーブまたは、E.O.ガスにより滅菌後搬入している。一方、人の入室時には全身のシャワーは実施せず、手指消毒後無菌服等により全身をカバーして入室することから、微生物学的統御の上で手指消毒は非常に重要である。そこで施設利用者の消毒効果をスタンプ法で検査した。

方法：施設利用者の親指、人差指、中指より薬用石鹼及び0.05%グルコン酸クロルヘキシジン・消毒用アルコールによる洗浄消毒前後の菌数を一般細菌用フードスタンプを用いて検査した。菌数は37℃で24時間培養後指別に測定した。検出菌はグラム染色し鏡検した。

結果：1) 同一個人の消毒効果を男性9人、女性12人について実施した結果、男性で消毒前に3本の指の合計菌数が100個以上と多い例は消毒後も多くの菌数が残存した。

2) 同一個人で5回以上の検査を実施した男性7人（平均6.0回）、女性13人（平均7.5回）の結果は、例えば1本の指に1個でも菌が認められた場合を陽性とした時の男性の検出率は38.8%であり、女性の検出率は16.1%であった。また、男性の特定の個人において80.0%、83.0%と高い検出率を示したものもあった。

3) 男性消毒前23例、消毒後78例及び女性消毒前33例、消毒後127例について検査した結果、消毒前の男性はいずれの指においても女性より多くの菌数が認められ、合計菌数でみると男性が67.0個、女性が26.4個であったが有意差はなかった。また男女共に消毒前のそれぞれの指の間の菌数にも有意差は見られなかった。消毒後、男性女性共にそれぞれの指で有意（ $P<0.05$ ～ $P<0.01$ ）な菌数の減少が見られ、合計菌数では男性が2.6個で女性が0.9個であり消毒前に比べてそれぞれ96.1%と96.6%の減少率を示した。3本の指の内1本の指に1個でも菌が認められた場合を陽性とする合計の検出率で見た時も男性は消毒前91.3%から消毒後33.3%、女性は消毒前100.0%から21.3%と明らかな減少が認められた。

4) 消毒後に検出された菌を鏡検した結果、多くの菌がG（+）の球菌であった。

考察：今回の結果より消毒前に菌数が多かった例は消毒後も菌数の残存が多い傾向にあることから、施設使用時には手指を清潔に保つこと、また汚れている場合には念入りに消毒を行う必要性があることが示唆された。消毒前後を通じて男性は女性より多くの菌数が認められた。これはスタンプ検査時の圧力が男性の方が一般的に強かったことも考えられ、これが付着力や付着面積に影響したとも考えられるため、今後は均一な条件下でのサンプリング方法についても検討したい。同一個人の繰返し検査から消毒後特定の個人に頻繁に菌が検出された事から、再度教育の必要性を感じた。また、消毒後に無菌服等の着用時に頭髮等から菌を拾うケースも考えられたため、現在は最後に再度浸漬による消毒を行っている。ブライス等は皮膚細菌を通過菌と常在菌に分類し、一般的に常在菌は消毒剤で洗っても除きにくいとしている。今回の成績からは薬用石鹼と0.05%グルコン酸クロルヘキシジンを用いてブラッシングする方法で十分な効果があることが判った。消毒後検出された菌は、G（+）の球菌が多く検出されたが、今後は菌の同定や由来等の検査も実施したい。

6. 若齢ラットに自然発生した後軀麻痺の病理学的検討

田中丸善洋、水野信哉、伊藤隆康、安藤孝夫、宮脇宏彰（武田薬品・中研）

後軀麻痺を示した20週齢、雄のJcl:Wistarラットについて病理組織学的に検索した。

本ラットは5週齢より毒性試験の対照群として用いられていたが、17週齢より体重および摂餌量の著しい減少、自発運動の低下、排尿障害、歩行失調がみられ、後軀麻痺を示すようになった。血液検査では赤血球数、Ht値及びHb濃度の減少がみられたが白血球数は正常範囲をわずかに上回る程度であった。血液生化学的にはGOT、GPT、ALP、LDH、BUNの顕著な増加、総タンパク、アルブミン、A/G比の減少が認められた。また、末梢血塗抹標本の白血球分類では、細胞質に乏しく大型の核を持った芽球様細胞が8%みられた。剖検では、大脳および脊髄の硬膜の混濁、肥厚、脾臓（5.8×2.2 cm）および全身リンパ節の腫大が認められた。また、肝臓は暗赤色調で腫大し、表面に黄白色巣が散見された。この他、著しい尿貯留による膀胱の腫大（直径約4 cm）、前立腺の硬化、腫大が認められたが、胸腺は萎縮していた。組織学的には、大脳では硬膜およびクモ膜下腔に、脊髄では硬膜にそれぞれ腫瘍細胞の浸潤がみられた。さらに腰髄では白質および灰白質における出血、背根における軸索の崩壊および脱髄がみられた。また、大腿部の筋線維では、萎縮がみられた。その他、下垂体、脾臓、リンパ節、骨髄、肝臓、腎臓等にリンパ芽球様腫瘍細胞の浸潤がみられた。この腫瘍細胞は、クロマチンに乏しく明瞭な核小体と大型の核および極めて乏しい細胞質を有していた。脾臓やリンパ節においては、腫瘍細胞の核分裂像が数多く散見され、崩壊産物を取り込んだ組織球もみられた（starry sky appearance）。肝臓では中心静脈あるいはグリソン鞘周囲に巣状または結節状に腫瘍細胞が浸潤しており、肝細胞の萎縮、壊死が認められた。一方、胸腺では腫瘍細胞の浸潤は認められなかった。この他、膀胱では腔内に細菌がみられ、前立腺の管腔に膿の貯留がみられた。電子顕微鏡的には、腫瘍細胞は小器官に乏しく、ミトコンドリアとわずかな粗面小胞体、多くの遊離リボゾームがみられ、核膜は陥入していた。免疫組織学的には、腫瘍細胞は抗W3/25(helper T-cell marker) マウス単クローン性抗体に陽性を示し、一方、抗ラットIaマウス単クローン性抗体には陰性であった。

以上の所見より本例の腫瘍は、形態的にリンパ芽球様腫瘍細胞から成ること、末梢血中の白血球数の著増のないこと、胸腺は萎縮し腫瘍細胞の浸潤を認めないこと、さらにT細胞抗原を認識する抗体に陽性であったことから、若齢のWistarラットで極めて稀な非胸腺型のリンパ腫であり、その起源はT細胞である可能性が高いと考えられた。これらの腫瘍細胞の脊髄硬膜への浸潤に起因する脊髄の圧迫および出血などに伴う循環障害が神経線維の変性をもたらし、後軀麻痺や脊髄の排尿中枢の障害の原因となったと考えられた。

7. 遺伝性白内障マウス (cac マウス) にみられた異常症状について

坂本雄二、美濃豊 (千寿製薬・伊丹研究所)

千寿製薬伊丹研究所では1958年に国立予防衛生研究所で発見された劣性遺伝型白内障マウス (cac マウス) を1961年に分与を受け、以来順調に系統維持してきた。ところが1985年頃から生後約6ヶ月位で眼瞼、皮膚の爛れ、毛並み不良等を起こし死亡するものが出はじめた。異常症状を示しはじめたマウスは交配に用いてもなかなか妊娠が成立せず、感染症の疑いを持ち、爛れた眼瞼からの菌の分離、同定を行なったところ3菌株が検出されたがいずれも常在菌であった。また血清反応にてセンダイウイルス、マイコプラズマ、マウス肝炎、気管支敗血症、ネズミコリネ菌の5項目について検査を行なったところいずれも陰性であった。そこで異常の原因は他にあるのではないかと考え、以後このマウスの調査を一年にわたりおこなった。

約一年間で85匹のマウスを調査した結果、平均産仔数は4.2匹と通常のマウスの半分以下となっていた。体重はICRマウスと比較したところ明らかにcacマウスの方が軽く、離乳直後の生後1ヶ月の時点でもすでに軽かった。これは親マウスの健康状態の不良が仔マウスの哺乳状態に影響しているのではないかと考えられる。異常の発生については、約65%に異常がみられ、半数が死亡した。その発生、死亡状況とも雌雄に差はみられなかった。そして死亡したマウス43例について解剖を行なったところ、脾臓腫大42例、腸間膜リンパ節の腫大24例、肝臓腫大14例、その他にも腎臓、副腎、胸腺、リンパ小節の腫大、肺の炎症、胆のう、膀胱の膨満などほぼ全例が脾臓の腫大プラス何らかの病変を伴って死亡していた。腫大した脾臓の重量は雄で平均1.3g、雌で平均1.5gと通常のマウスの10倍以上の重量となっていた。肝臓についても雄平均2.4g、雌平均2.8gとほぼ倍近い腫大であった。平均寿命は9ヶ月と通常のマウスの半分以下であった。また生存しているマウス42匹については触診で内7匹に脾臓の腫大が確認された。血液学的検査成績は白血球、赤血球数とも平均するとICR、ddYと比較して大差ないが個体別にみると白血球数が減少しているものもあり悪性リンパ種の疑いがもたれる。

8. cacマウスにみられた自然発症リンパ腫

林 新茂, 永井博文, 野々山孝, 鈴木香奈美, 宮嶌宏彰(武田薬品・中研)

マウスのリンパ腫は、自然発症の外にウイルスや化学物質、放射線照射などによって誘発されることが知られているが、ほとんどはT細胞系であり、B細胞系のリンパ腫は極めて稀である。我々は千寿製薬研究所で繁殖維持している cacマウス(劣性型遺伝性白内障マウス) に多発したリンパ腫について千寿製薬の御好意により入手する機会が与えられ、そのうちの9匹(雄2匹; 31, 65週齢, 雌7匹; 31~63週齢) について光顕、電顕および免疫酵素組織化学的手法を用いて病理学的に検討したので報告する。

臨床的には、いずれの動物も腹部の膨満が著しく、1週間から2ヵ月の経過の後剖検した。

肉眼的には脾臓および全身リンパ節の腫大を特徴とし、肝臓に灰白色結節が密発した例もみられたが胸腺はいずれの例も退縮していた。白内障は全例の両眼に認められた。

光顕的に腫瘍細胞は全例の脾臓の白脾髄域、腸間膜、顎下、腎門などのリンパ節および盲腸のリンパ小節において結節状に増殖し、これら腫瘍細胞の増殖巣の周辺域に plasmacytosisを伴う例も認められた。肝臓での浸潤増殖はグリソン鞘を中心とし、骨髄では9匹中3匹に腫瘍細胞の増殖がみられ、うち2匹は末梢血中に大小不同のリンパ性腫瘍細胞が出現した。この外、腎臓、肺、脾臓、顎下腺などへ浸潤し、小結節状に増殖した例もみられたが、いずれも軽度であった。

電顕的に腫瘍細胞は直径6~16 μ m, 核細胞質比が比較的大きく、核の陥凹を示す細胞もあり、クロマチンは核膜に沿ってみられ、核小体が核膜に接していた。細胞質には遊離型のリボゾームがとくに豊富で、粗面小胞体の拡張が著しいものでは槽内にウイルス様粒子の出芽像もみられた。なお、c-particleは全例に認められた。

免疫酵素組織化学的には、全例の腫瘍細胞表面または細胞質が抗マウスIgM抗体および抗マウス kappa light chain抗体に陽性を示し、抗マウスIgAや抗マウスIgG抗体に陽性を示した例もみられた。

以上の形態学および免疫酵素組織化学の特徴から、本症例をマウスB細胞リンパ腫と診断した。

9. 若齢ラットにみられた自然発生唾液腺腫瘍

永井博文, 林新茂, 小林明, 野々山孝, 宮脇宏彰 (武田薬品, 中研)

ラットにおける自然発生唾液腺腫瘍の発生頻度は極めて低く、とくに若齢ラットでの発生報告はない。また、発癌物質による誘発腫瘍を除いては、詳細な病理学的検討はなされていない。我々は当研究所で亜急性毒性試験に使用された18週齢のWistar雄ラットの1例に自然発生唾液腺腫瘍を認め、形態学および免疫酵素組織学的に検討した。

このラットは唾液腺腫瘍以外には、各種検査において異常は認められなかった。剖検時の18週齢において腫瘍は右顎下腺外側後部皮下に直径約8mmの硬い白色腫瘤として認められ、光学顕微鏡的には薄い結合組織で被われ、周囲組織への浸潤は認められなかった。腫瘍細胞は類円形で単一の形態を示し、細胞境界は不明瞭で、主として充実性の増殖を示したが、鍍銀染色により明瞭な腺房様構造がみられ、一部には腺管様構造も認められた。間質は粗で、血管、繊維芽細胞のほか、多数の単核円形細胞の浸潤がみられたが筋上皮細胞の増殖は認められなかった。電子顕微鏡的には、腫瘍細胞は一般に未分化で、細胞質内小器官に乏しく、核/細胞質比が高く、核は正染色質に富み、核小体明瞭で、時に核分裂像も認められた。腫瘍細胞の増殖巣周囲には連続した基底板の形成がみられ、細胞の上部には微絨毛が、隣接する細胞間にはinterdigitationが認められた。一部の増殖巣では狭小な管腔形成が認められ、管腔内側には多数の微絨毛が、細胞間にはdesmosomeの形成がみられるなど、腺上皮細胞由来を示唆する所見が得られた。腫瘍細胞の一部には張原繊維をもつ細胞がみられ、この種の細胞では特にdesmosomeが発達しており、扁平上皮細胞への分化の傾向を示す細胞もみられた。免疫組織化学的には、抗cytokeratin抗体および抗myosin抗体はいずれも、正常顎下腺の導管上皮細胞、主として線条部導管や小葉間導管の上皮細胞および腫瘍細胞に陽性反応を示したが、正常腺房細胞は陰性であった。抗vimentin抗体に対しては腫瘍細胞は陽性反応を示さなかった。

以上、主として形態学的所見より本腫瘍をWHOの分類に基づき、solid typeの単形性腺腫(monomorphic adenoma)と診断した。また、微細形態学および免疫組織化学的成績から、この腫瘍細胞は、導管上皮細胞あるいはその前駆細胞由来であるものと推察された。

10. Tremorラットの生殖器病変について

山村高章, 乾 俊秀, 川合是彰, 岡庭 梓(田辺製薬・安全研)

芹川忠夫, 山田淳三(京大・医・動物施設)

1980年、山田らによりKyo:Wistar系ラットに見出されたtremorラットは、行動時の全身の振戦、触毛・被毛の曲りならびに雌雄の不妊を特徴とする突然変異体である。我々はtremorラットの病態解明を目的とし、病理組織学的検討を加えてきた。不妊に関しては、成熟tremorラットにおいて精子形成ならびに卵胞発育に異常があること、さらに卵巣移植実験の結果から卵巣を取り巻くホルモン環境はほぼ正常であることを報告してきた。今回、精巣ならびに卵巣の形態学的な異常を経時的に観察したので、その概要を報告する。検索材料は出生直後から生後80日齢までのtremorラットの精巣ならびに卵巣で、比較対照として同日齢の同腹正常ラットを用いた。

1) 精巣 ; 20日齢tremorラットの精細管では精祖細胞、精母細胞ならびにセルトリ細胞がみられ、正常ラットの精上皮と同様な組織像を示していた。30日齢tremorラットでは核質が濃縮し、細胞質は空胞状となった精母細胞をもつ精細管のほかに、精祖細胞ならびにセルトリ細胞からのみなる精細管もみられた。30日齢以降のtremorラットでは精子細胞ならびに精子は認められなかった。30日齢tremorラット精巣の電顕観察では正常な精母細胞もみられたが、細胞質や細胞小器官に乏しい精母細胞も認められた。また、核質が顆粒状に濃縮し、核近傍の細胞質が空胞状に拡張した変性精母細胞からなる精細管も認められた。

2) 卵巣 ; 2日齢tremorラットでは、数個の卵母細胞が未発達な卵胞上皮様細胞に囲まれており、正常ラットと同様の組織像を示していた。5日齢tremorラットでは原始卵胞ならびに一次卵胞の形成はみられなかった。10日齢以降のtremorラットでは黄体様細胞や腺管様構造を示す卵胞上皮様細胞の集塊がみられたが、一次卵胞あるいは二次卵胞とみなされる正常な卵胞発育像はみられなかった。電顕的に5日齢tremorラットでは、数個の卵母細胞の集まりを未発達な卵胞上皮様細胞が取り囲んでいたが、10日齢以降のtremorラットでは、卵細胞を欠き卵胞上皮様細胞の集塊を見るにすぎなかった。

以上の結果から、tremorラットの性腺では精母細胞ならびに卵母細胞に至る生殖細胞は認めるものの、精母細胞ならびに卵母細胞以降への発育が起こらないために、不妊となることが明らかとなった。

11. ラットの真性半陰陽の一例

今泉和則, 今戸奈保子, 湊 良雄, 和田 功, 武下政一, 岡庭 梓 (田辺製薬・安全研)

真性半陰陽とは一個体に雌雄両性の生殖腺を併有する先天奇形の一つであり, ラットを含む各種哺乳類で報告されているが, その発生は極めてまれである. 今回我々はラットで真性半陰陽の症例に遭遇したので, その形態学的特徴について報告する.

動物は繁殖用に飼育された無処置のCrj:CD(SD)系ラットで, 雌として飼育を行い, 12週齢時に数回陰スメアーを採取したが, いずれも休止期の像を呈していた. また, 交配も試みたが交尾は成立しなかった. この時点で動物を剖検し, 生殖器を含む主要臓器・組織を採取し, 10%中性緩衝ホルマリン液で固定後, 病理組織学的検査を実施した.

外観では外陰部に尿道下裂が認められ, やや肥大した陰核腺が露出していた. 内部生殖器はおおむね雌の生殖器の形態を示したが, 右子宮角は短かく, その先端に脂肪組織におおわれた 0.7 x 0.5 cm の卵円形の淡黄色組織塊が認められた. 病理組織学的にこの組織塊は大部分が精巣組織で, その表面の一部に卵巣組織を有する卵精巣であった. 精巣組織は精細管とその間隙を埋める多数の Leydig's cell から構成されていた. 精細管内は Sertoli cell のみで占められ精子形成は認められなかった. 卵精巣の卵巣組織の部分には少数の卵胞がみられた. 左生殖腺は卵巣の組織像を呈し, 少数の未熟な卵胞と多数の大きな胞状の卵胞が認められたが, 胞状卵胞の多くは閉鎖卵胞であった. なお, 黄体形成は観察されなかった. 子宮では左右の子宮角が合体する直前の左子宮角粘膜の一部に扁平上皮化生が観察された. 副生殖腺としては腔周囲の結合織内に分泌物を貯留した前立腺および尿道球腺と思われる腺組織が観察された.

以上の所見より, 本症例は右側に卵精巣, 左側に卵巣を有する片側性真性半陰陽と診断された.

真性半陰陽は3つのタイプに分類される. すなわち, 両側に精巣および卵巣を有する両側性真性半陰陽, 一方が卵精巣であり, 他方が精巣あるいは卵巣を有する片側性真性半陰陽, 一方が精巣であり, 他方が卵巣である非対称性真性半陰陽の3種である. 我々が文献を検索した限りにおいては, ラットでは今までに14例報告されている. そのうちわけは両側性真性半陰陽が6例, 片側性真性半陰陽が本症例を含めて5例, 非対称性真性半陰陽が3例であった. これら症例の生殖腺に対する生殖道および副生殖腺の表現型は様々で, その差異は性分化時の生殖腺から分泌される性ホルモンによる影響の違いと考えられている. したがって本症例で認められた前立腺および尿道球腺の存在は, 性分化時に卵精巣の精巣部分から分泌されたホルモンの影響によるものと考えられた.

12. 自然発症てんかんラット (S E R) を用いた抗てんかん薬の評価

Phenobarbitalの持続投与について

小岸克美、芹川忠夫、山田淳三、(京大、医、動物施設)

大野行弘、氏原久充、笹 征史、高折修二 (京大、医、薬理)

自然発症てんかんラット (S E R) は、Zitterラット (zi/zi) と Tremorヘテロラット (tm/+)間の F₁動物のなかで、ziとtmをともにヘテロにもつ雌雄を交配して得た二重突然変異体である。現在、ziをホモにtmをヘテロにもつ雌雄間の交配によって維持されている。S E Rは外来刺激を加えることなく、脳波上 5 ~ 7 Hzの棘徐波結合を伴う欠伸様発作と強直性けいれんを自然発症する。抗てんかん薬の単回投与による発作抑制試験において、欠伸様発作はヒトの小発作(欠伸発作)治療薬で抑制され、強直性けいれんはヒトの大発作治療薬で抑制され、さらにこれらの両発作はPhenobarbital(P B)と Valproateによって共に抑制される事を、すでに報告した。今回は、P Bの持続投与によって、強直性けいれんが持続的に抑制され、体重の増加および生存期間の延長にその効果が認められるか否かを検討した。＜材料と方法＞ P Bの持続的投与方法は、0.1% P B混入固形飼料を7週齢から自由摂取させることによった。8、9、11、14、17および20週齢時の血しょう中のP B濃度は、酵素免疫抗体法によって測定した。強直性けいれんの発症頻度は、透明のアクリル箱(W×D×H:24×30×35 cm)の中に放置したS E Rの行動を、毎週ビデオ装置で記録し、2時間あたりの発症回数によって求めた。体重と摂餌量は毎週測定した。＜結果＞ 血しょう中のP B濃度は8週齢時に雄が平均 80 μ g/meで、雌が平均 110 μ g/meであったが、その後しだいに低下し、11週齢以降は 30~50 μ g/meに維持された。強直性けいれんは雌雄いずれもP B投与前の7週齢時から認められたが、8~9週齢時に完全に抑制され、10~15週齢時までには有意な抑制効果が認められた。しかし、雌では16週齢以降、雄では17週齢以降において対照群よりも有意な発作抑制効果は認められなくなり、17週齢時の2時間あたりの強直性けいれんの発作回数は雌雄ともに平均10回であった。P B投与群の体重は雄において対照群よりも有意な増加を認めた。一方、雌では11週齢時までのみ有意な増加を示した。生存期間においても雄では有意な延長効果をもとめ、対照群が 16.2 $\pm$ 1.3週 (平均 $\pm$ S.E., n=14) に対してP B投与群は、22.1 $\pm$ 1.5週(n=8)であったが、雌では対照群が 14.5 $\pm$ 0.7週 (n=14) に対して15.6 $\pm$ 0.7週 (n=8) であり、延長効果は雄ほど明らかではなかった。

以上のように、P Bの長期投与はS E Rの強直性けいれんを全生涯ではないが持続的に抑制させ、体重の増加および生存期間の延長をもたらした。これまで、抗てんかん薬の長期投与時の効果を評価する上で、適切な方法がなかったことから、S E Rは単回投与試験に加えて、長期投与試験にも用いることができる有効なモデル動物であると考えられる。

13. 糖尿病発症遅延NODマウスの観察

東盛友紀^{*1} 古賀誠治^{*1} 石川俊憲^{*2} 三浦富夫^{*2} 黒澤努^{*3}

(阪大医病^{*1} 純系動物事業場^{*2} 動物施設^{*3})

はじめに

NODマウスは1980年に塩野義製薬(株)油日ボトラーズで近交系として確立された自然発症のI型糖尿病である、このマウスには糖尿病の発症に先立って脾島内へのリンパ球浸潤という特異的な病変が出現する。すなわち浸潤したリンパ球により脾島の β 細胞が破壊されその結果NODはインスリン絶対不足のI型糖尿病を発症すると考えられている。

1985年5月から本学純系動物事業場で維持されているNODマウスを観察したところ糖尿病発症が遅延しているマウス群を発見した。NODマウスには近縁の糖尿病非発症コントロール系統がないところから糖尿病非発症マウスの確立は重要と考えその開発に着手した。

材料及び方法

動物は本学純系動物事業場で維持しているNODマウスである。尿糖検査は2週間に1度おこない尿糖を確認すると別ケージに収容した。次にデーター処理を行うためパーソナルコンピュータ(NEC.PC.9801VX)D-BESEⅢデーターベースソフトを使用しデーターベースを作成した。本学純系動物事業場におけるNODマウスの飼育管理匹数はオス122匹、メス115匹、合計237匹である。まず全てのNODマウスを登録し各マウスの生年月日、性別、測定月日、発症日令を登録した。

このデーターベースから発症日令、発症パターンなどを計算した。

結果

メスマウスの糖尿病発症は10例に見られ最短日令は生後173日であり発症日令の平均は242日であった。このメスマウスの検査の中で第2回目の4例では陽性から陰性に変化する症例があり、さらにその後の検査で陰性から陽性に変化する症例も見いだされた。本コロニーのオスマウスの最高令は366日であるが全オス122匹中尿糖が確認されたのは1例のみでその発症日令は246日であった。

今後血中グルコース定量、組織的な検索及び遺伝子的な検索を行って糖尿病非発症そして発症遅延NODマウス系統の確立とその解析を続ける方針である。

14. ヒト $A\gamma/\beta$ - グロビン遺伝子によるトランスジェニックマウス

東條 英昭（富山医薬大、動物実験）、服巻 保幸（九大、遺伝情報）

萩田 善一（富山医薬大、和漢研）

機能する5つの遺伝子から成るヒト β -グロビン遺伝子群は、それらの遺伝子の発現が発生にともないスイッチする興味ある遺伝子である。我々は、この遺伝子の発現におけるスイッチングの機構を探るためのモデル動物を作出するために、ヒト β -グロビン遺伝子群のうち、 $A\gamma$ と β との $A\gamma/\beta$ -グロビン合成遺伝子（8.9 kb）を受精卵の前核に顕微注入する方法でマウスに導入した。尾部から抽出したDNAをドットプロット法によって解析した結果、雌2匹、雄3匹のトランスジェニックマウス（以下、Tgマウス）が得られた。ついで、サザンブロッティング法により解析したところ、これらのマウスにおいて、導入遺伝子が3-50コピー、head-to-tailの配列で挿入されていた。次に、挿入された β -グロビン遺伝子からの転写を調べるために、成熟したTgマウスにフェニールヒドラジンを12 hrs 毎に3回（1.2 mg/29 g B.W.）、腹腔内注射し、5日目に全採血を行ない網状赤血球から全RNAを抽出した。一方、 $A\gamma$ -グロビン遺伝子の発現を調べるためにTgマウス同士を交配し、妊娠14-15日目に胎児の肝臓を採取し、同じく全RNAを抽出した。遺伝子発現の組織特異性を調らべるために、同時に脳および筋肉のRNAを抽出した。これらのRNAを用いたノーザンブロッティング法により解析した結果、 $A\gamma$ 、 β -グロビン遺伝子ともに成熟マウスの赤血球と胎児肝臓でそれぞれ発現していた。一方、脳および筋肉では発現していなかった。さらに、遺伝子発現の最終産物であるヒトグロビン蛋白がマウスで生産されているかどうかを等電点電気泳動法で調べたところ、赤血球および胎児肝臓中ともにヒトグロビンは検出されなかった。その要因としては、mRNAからの翻訳により生産されたヒトグロビンが異種蛋白であるため分解されていることも考えられるが詳細は不明である。なお、本実験において、外来性遺伝子がY染色体に挿入されたTgマウスが得られた。

河 本 馨 (東大農)

DNA 組換え技術を用いてバクテリアに生理活性をもった種々の蛋白質を合成させることは早くから試みられていたし、また最近いくつかの蛋白質が合成されている。しかしバクテリアの合成した蛋白質にはいまなお解決すべきいくつかの問題が残されている。一例をあげると、大腸菌は蛋白質を分泌しないので、菌体から蛋白質を抽出するとき、毒性の強い菌体の蛋白質ををを除くため、十分精製しなければならない。また分泌されない蛋白質はどこか構造に差異があるのか活性が低く、この中から活性の高い蛋白質の画分を精製分離すると、最終的には収量が低くなる。当然のことながら分泌されないためシグナルペプチドが分離されていない。現在の技術では、酵素処理によってシグナルペプチドのみを切り離すことができない。さらにバクテリアでは糖蛋白質が合成できない。このような不利を克服するため、最近では動物由来の株細胞に蛋白質を合成させることが考えられている。

下垂体腺葉ではプロラクチンを含む6種類の蛋白質ホルモンが合成されている。そのうち他の5種類は視床下部の放出因子により分泌が調節されており、視床下部から放出の指令がきたときのみ放出される。一方、プロラクチンのみは視床下部の放出抑制因子により分泌が調節されており、通常はこの抑制因子により分泌が抑制されているが、抑制因子がなくなると分泌が起こる。そのため下垂体が視床下部の支配から自由になった移植や培養条件下では、プロラクチンのみが分泌される。私は下垂体の器官培養により培養液中に分泌されたプロラクチンを限外濾過による濃縮、ゲル濾過、DEAEイオン交換クロマトグラフィーにより精製した。このプロラクチンは SDS 電気泳動により単一のバンドを、またオークテルローニーの沈降反応でも単一の沈降線を示した。この方法では培養中に合成・分泌されるので、直接下垂体から貯蔵蛋白質を抽出するより収量が良い。また培養液より回収するため、他の蛋白質の夾雑が少なく純度が高いうえ、少ないステップ数で精製されるので回収率も高い。

すべての器官が下垂体のように培養系で効率よく蛋白質を合成するとは限らない。しかし一方、生体の器官のなかにも効率的に蛋白質を合成する外分泌器官が存在する。一つの例として乳腺をあげることができる。泌乳期の乳腺は大量の蛋白質を合成し分泌する。ミルクの蛋白質の主要な成分も、またこれを合成・分泌するホルモン要求も十分知られている。ミルクの蛋白質はカゼインが大部分を占めるので、この中に異なる種類の蛋白質を分泌させ、回収することはあまり難しくない。乳腺をこのような蛋白質合成系として用いるためには、乳腺で発現するカゼインのような蛋白質の遺伝子を組換え、そのプロモーターに発現させようとする蛋白質の構造遺伝子を連結して乳腺細胞に導入しなければならない。乳腺に特異的に遺伝子を導入する方法はないので、前核期受精卵の段階から導入する方法が確実である。このようにして外来遺伝子を導入した例は外国にはすでにある。

＜第 17 回研究会＞

講演会

1. 肝炎・肝癌ラットにおける肝酵素の特異的発現

松 本 耕 三 （徳島大学医学部）

（次号に掲載予定）

2. 自然発症てんかんラットの作出とその応用

芹 川 忠 夫 （京都大学医学部）

日時： 昭和63年3月11日

場所： 京都大学 楽友会館

自然発症てんかんラットの作出とその応用

京都大学医学部付属動物実験施設

芹 川 忠 夫

1. は じ め に

てんかんは有史以前から存在することが知られている神経疾患で、我が国はもちろん、全世界に広く存在している。その有病率は1000人あたり8.2人という報告もあることから、我が国には約100万人の患者がいると推定される。対症療法的ないくつかの抗てんかん薬が開発され、発作の完全あるいは部分的な抑制例が増加してきているが、薬剤に無効な難治性てんかんも依然として存在する。薬効のみられる患者においても服薬の長期継続による副作用が指摘されている。てんかんは衆知のとおり、急速な致死作用をもたない反面、偏見、差別あるいは職種の制限等の社会的問題を含んでいる。このような状況を踏まえると、副作用のない新薬の開発、発症メカニズムの解明、さらに根本的な治療法の確立は極めて重要な研究課題であると考えられる。

これらの問題を解決するにあたって、これまでいくつかのてんかんモデル動物が開発されてきたが、その多くは音、光あるいは体位変換などの外的刺激を加えることによって、発作を誘発するものである。そのうちいくつかの動物では発作が起こるようになるまで、たとえばEIマウス (Imaizumi, K. et al. 1959, Suzuki, J. 1982) ではほうり上げ刺激が、Genetically epilepsy-prone rat (GEPR) (Reigel et al. 1986) では、音刺激がけいれん発作を安定して生じさせるために用いられてきた。けいれん発作をおこすその他のマウスには、epf, sps, staggerer, weaver, lurcher および quaking マウス等が紹介されている

(Seyfried, T. N. and Glaser, G. H. 1985)。一方、欠神様発作をおこすマウスには tottering マウス (Kaplan, B. J. et al. 1979, Noebels, J. L. et al. 1979) が報告されているが、ラットではいくつかのコロニーの一部に見い出される例 (Robinson, P. F. and Gilmore, S. A. 1980, Vergnos, M. et al. 1982) があるのみで、その遺伝性の明らかかなものは報告されていない。

自然発症てんかんラット (Spontaneously epileptic rat: SER) は、振戦を示す2系統のミュータントである tremor ラットと zitter ラットを起源として我々が作出した新しいてんかんモデルラットであり、tremor と zitter の常染色体性劣性突然変異遺伝子をともにホモにもつ二重突然変異体である。この動物は外来刺激を与えることなく、自発的にけいれん発作と欠神様発作の両者をくり返すこれまでに例のない表現型をもっている。ここにその起源、特性および抗てんかん薬評価試験への応用について、検討した成績を紹介する。

2. 自然発症てんかんラットの起源

(1) tremor ラット zitter ラットについて

tremor ラットは、ビニールアイソレータ内の無菌環境下で維持されていた Kyo: Wistar ラットから全身振戦と屈曲した触毛をもつミュータントとして 1980 年に発見され、育種された系統である (Yamada, J. et al. 1985)。tremor ラットの生殖器は雌雄ともに萎縮しており、雄では生後 20 日齢まで精祖細胞および精母細胞が認められたが、それ以降では精子発生に異常がみられ、成熟時においても 2 次分裂以降の精子形成は認められなかった。以上の所見が示すように、振戦発症個体は雌雄ともに不妊であったので、振戦ラットの同腹正常ラットをランダム交配して振戦ラットを産んだペアを選び出し、これをもとに継代する方法をとった。現在、兄妹交配を重ね F₁₈ 代に達している。振戦ラットを産んだ 27 ペア 73 腹における振戦発症個体の発現率は 21.8% であった。また、由来の異なる WAG ラッ

トとの交配実験、すなわち(WAG(+/+))×振戦ヘテロラット(tm/+))F₁雌ラットと振戦ヘテロ雄ラット(tm/+)との交配において1匹以上の振戦発症個体を産んだF₁雌ラットにおける成績で、振戦発症個体の発現率は26.1%であり、ほぼ25%に一致した。以上の結果、tremorラットの振戦表現型はtremor(tm)と名付けられた常染色体上の劣性突然変異遺伝子がホモになったとき現れるものと推察された。

tremorラットの特性を研究するにあたって、類似の表現型を示すzitter rat (Rehm S. et al. 1982)を西ドイツのDr. Rehm からもらいうけた。両系統の振戦ミュータントを比較研究して得られた知見は以下の通りである。

- ① 触毛： tremorラットの触毛は先端が屈曲しているが、zitterラットでは中央部が屈折している。tremorラットの触毛は出生時にその異常を認めることができ、zitterラットにおいても離乳時までに、正常動物と識別することができる。
- ② 被毛： tremorラットの被毛は、その生え始める時期から波状を呈している。zitterラットでは約2ヶ月齢頃から被毛の長さが一様でないように見える。
- ③ 振戦： tremorラットでは離乳前期から行動時に左右方向の全身性振戦が現われる。振戦の程度は4週齢頃が顕著で、加齢とともに弱まり、行動時にまれに頭部を振るのが観察される程度になる。一方、zitterラットの場合はtremorラットと異なり、後駆および尾部における上下動の振戦である。振戦は離乳時頃から観察され、加齢に伴う減弱傾向は明らかでない。
- ④ 発育： tremorラットは加齢とともに肥満となる傾向があるが、zitterラットではむしろ削そう傾向を示す。
- ⑤ 発作： 1年齢以上のtremorラットでまれに、強直性けいれんとこれに続くwild runningあるいはjumpingが観察される。zitterラットでは、同じ年齢頃から弛緩性麻痺(Rehm et al. 1982)が散見される。ケージ交換等の刺激を加えた時、後駆の麻酔が1～2分間継続後、通常状態に復帰する。
- ⑥ 海綿状脳症： tremorラットでは35日齢で既に中枢神経組織に大小の空胞が多数観察された。空胞形成は脳幹および小脳髄質のほぼ全域で顕著なほか、大脳皮質および育髄灰白質にも軽度に認められた。神経細胞の減数、あるいはその胞体内の空胞形成は認められなかった。その後の加齢に伴う形態変化は明らかでなかった。一方、zitterラットの35日齢では中脳蓋、小脳核等に極めて軽度の空胞形成が観察されるのみで、3ヶ月齢になって小脳顆粒層、オリブ核等に空胞形成が増加した(表1参照)。

表1 tremorラットとzitterラットの中樞神経組織の形態学的比較

	tremorラット	zitterラット
(光顕所見)		
空胞形成	発現部位 組織要素との関連 発現時期	脳幹の神経核領域(視床、赤核、後丘、脳幹網様体) 大脳皮質、小脳核、脊髄灰白質 ニューロビルに孤立性に出現(しばしば神経細胞体を高度に圧迫) 15日齢より発現 徐々に進行し5カ月齢頃より顕著
軸索の変形	—	稀
神経細胞体の変性、封入体形成	—	稀
星状膠細胞の膨化	顕著	軽度
血管壁の石灰沈着	4カ月齢以降顕著	—
脳室の拡張	2〜3カ月齢以降有り	—
(電顕所見)		
空胞化する神経要素	主に樹状突起(ニューロビルが海綿状を呈す) 軸索、軸索周囲腔、星状膠細胞突起も多数	主に軸索、(樹状突起も) 稀に軸索周囲腔、膠細胞
軸索の腫大(organelle増加)	—	時折

空胞形成部位における細胞小器官の構造変化とその系統間の相違については、現在さらに検討がなされている。

以上のように、tremorラットとzitterラットは類似点を多くもっているが、それらの細部を検討すると明らかな相違が認められた。

(2) tremor遺伝子とzitter遺伝子の非同座性とそれらの二重突然変異体であるSE Rの作出

類似の表型をもつtremor遺伝子(tm)とzitter遺伝子(zi)が同じ遺伝子座に属するか否かを交配実験によって検討した。最初にtremor遺伝子をヘテロにもつことが後代検定によって確認されている1匹の雄ラットをzitterホモラットと交配した。得られた41匹(雄19匹、雌22匹)の産仔はすべて正常な表現型を示したことから、この2つの遺伝子はallelicではないと考えられた。次いで、F₁動物のうち7匹の雌と4匹の雄をtremorヘテロラットと交配した結果、tremorヘテロラットに交配された雌4匹と雄2匹のペアにおいて1匹以上のtremor型の振戦ラットが得られた。この交配結果で、zitterとtremorがともにヘテロであると判明したF₁動物のうち、雄1匹と雌4匹を交配して165匹のF₂世代を得た。

表2に示したように、これらの産仔を5週齢時に触毛、被毛、振戦および生殖器の4項目について観察し、4群に分類した。このうち、屈曲した触毛、波状化した被毛、および萎

表2 ((zi/+ , tm/+) × (zi/+ , tm/+))
の交配によって得られた165匹の産仔内訳

Phenotypic classification	A	B	C	D
Hair	normal	normal	waved	waved
Whiskers	normal	bent	curled	curled
Tremor				
region	—	hind		whole body
intensity	—	intermediate	obscure	intense
Gonad	normal	normal	atrophied	atrophied
Presumed genotype	(+/-, +/-)	(zi/zi, +/-)	(+/-, tm/tm)	(zi/zi, tm/tm)
No. rats	87	33	26	19
				45
Expected*	92.8	30.9		41.3

* On basis of 9:3:4 ratio ($\chi^2 = 0.837$)

縮した生殖器をもつC群とD群は、その振戦の程度によって区分したが、明確なものではなかった。そこで、C群とD群をプールした例数をもとに統計学的に検定した結果、A、B、C+D群の分離率は9:3:4の期待値に相応し、ziとtmの両遺伝子が独立して遺伝することが示された。そこで二重突然変異型をtremor型から明確に区別するために、zitter型の表型をもつF₂世代をランダム交配した。交配した4ペアのうち2ペアからzitter型とは異なる表現型をもつ産仔すなわち、二重突然変異体を得られた。これは46匹の産仔のうちの12匹であり、4分の1の期待値に一致した。この結果はzi遺伝子とtm遺伝子が近く連鎖していないことを示す。

tm遺伝子がホモの場合、不妊となることから、二重突然変異体の維持および近交化は、図1に示したように二重突然変異体を含む兄妹間の中でzitter表現型を示す個体をランダム交配することによって達成できる。現在、兄妹交配を重ねF₁₀代の産仔が得られている。

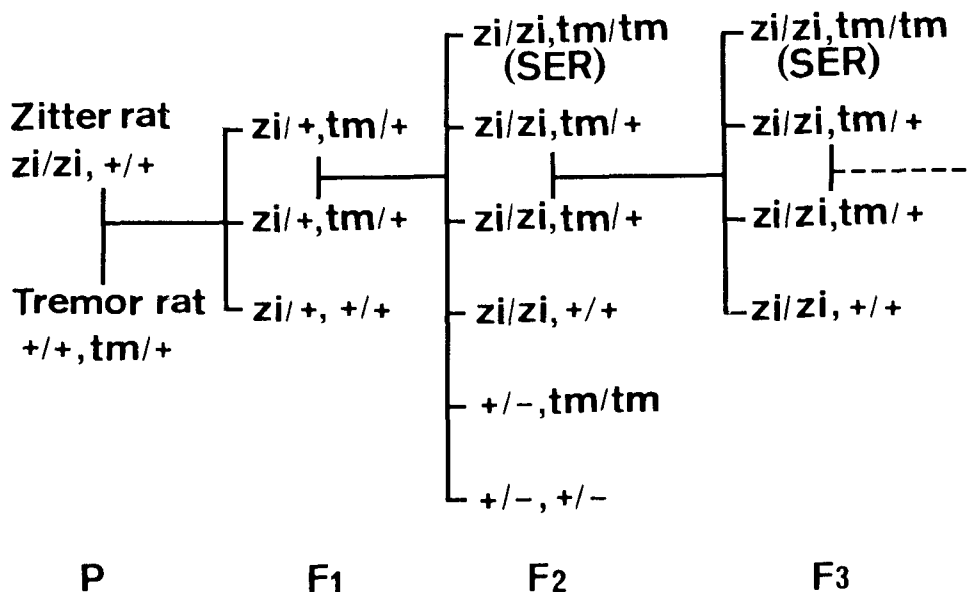


図1 SERの作出、継代法

作出した二重突然変異体は容易にてんかん様発作を発症したので自然発症てんかんラット (Spontaneously epileptic rat; SER) と命名した。

(3) zitterラットにおける標識遺伝子のタイピングとzitter遺伝子の第IV連鎖群へのあてはめ

SERの表現型の発現に関与するzitter (zi) 遺伝子とtremor (tm) 遺伝子は異なる遺伝子座に属することが前節の交配実験成績から明らかになったが、各々の遺伝子座の所在についてはわかっていない。本研究ではzitterラットについて①標識遺伝子のタイピング、②zi遺伝子に連鎖する標識遺伝子の検索および③振戦、触毛の屈折そして中枢神経組織の空胞形成が同じ遺伝子に起因しているか否かについて検討した。

調べた標識遺伝子座は、毛色遺伝子5座と蛋白、酵素の生化学的遺伝子30座についてである。検査に供した3～5ヶ月齢のzitterラットは、西ドイツから導入後、F₈代に達したものであった。すべての遺伝子座において、その遺伝子型は個体間に相違なくホモ型であり、以下のようにタイピングされた。毛色遺伝子座 (A、B、C、h、P) 生化学的遺伝子座 (Acon-1^b、Acp-2^b、Ahd-2^c、Ahd-C^b、Akp-1^a、Alp-1^b、Amy-1^a、Cs-1^b、Es-1^a、Es-2^d、Es-3^c、Es-4^b、Es-6^a、Es-7^b、Es-8^a、Es-9^c、Es-10^b、Es-si^b、Fh^b、Gc^a、Gdc-1^b、Gst-1^b、Hao-1^a、Hbb^b、Lap-1^a、Mup-1^a、Pep-3^a、

Pg-1^d、Pg^d、Sup-1^d)。西ドイツでこのzitterラットが発見されてから、5年後に我々がこの系統を導入した経緯から推察するとzitterラットの近交係数はかなり高い可能性がある。

zi遺伝子と連鎖している標識遺伝子を検索するための交配動物には、できるだけ多くの標識遺伝子座において異なる対立遺伝子をもつ系統を選ぶことが望ましい。この研究においてはBNとTM系統を近交系ラットの生化学的遺伝子座に関する調査成績 (Bender, K. et al. 1984) を参考にして選び出し、改めて、zitterラットと同様に35の遺伝子座についてタイピングを行った。その結果、zitterラットとBNでは19、zitterラットとTM間では18の遺伝子座において相違が認められた。

交配実験におけるzi遺伝子のタイピングには振戦、触毛の屈折及び小脳の空胞形成の有無に基づいた。(zitter×TM)×zitterの交配実験においては、zi遺伝子に連鎖する標識遺伝子はみつけれなかった。

一方(zitter×BN)×zitterの交配実験において、F₁ 動物は全て正常型 (非zitter型) であった。もどし交雑仔では、非振戦型で空胞形成が認められた2個体を除いて、振戦型の個体は空胞形成が認められ、非振戦型の個体は空胞形成は認められなかった。また、振戦と触毛の屈折の関係では、振戦型の2個体において触毛の屈折が認められなかった。さらにその2例を含めた3例は触毛の屈折がみられないが空胞形成を認めた。空胞形成の有無によって109匹のもどし交雑仔を分類すると、空胞陽性群が57匹で正常群が52匹となり、その分離比は1対1 ($\chi^2 = 0.23$) に近似した。

F₁ 個体とzitterラット間でその表現型が異なる9標識遺伝子座とzitter表現型 (空胞形成に基づく) との間の連鎖を調べた結果、zi遺伝子とHao-1 (Hydroxyacid oxidase) 遺伝子間では組み換え型と非組み換え型はそれぞれ10匹と99匹であり、ziとHao-1は1%水準で有意に連鎖していることがみつけれられた。Hao-1と同じ第IV連鎖群に属するSvp-1 (精のう腺蛋白) を加えて3点テストを行なった結果、得られた組み換え価は、それぞれzi対Hao-1が0.09、zi対Svp-1が0.32であり、Hao-1対Svp-1は0.28であった。Cramer et al. (1986) によって報告されたHao-1、a、Svp-1の順序を参考にすると、ラット染色体第IV連鎖群におけるこれらの遺伝子座はSvp-1、a、Hao-1、ziの順序であると推定された。

ラットとマウス間の染色体の相同性を考慮してHao-1、Svp-1、aを共通にもっているマウス第2染色体とラット第IV連鎖群を比較したところ、マウスの第2染色体上で

Hao-1からSvp-1とは反対方向にあるPa (pallid)とCm (coloboma)の表現型にはともに振戦があり、ro (rough)とWe (wellharig)の表現型には触毛、被毛の異常がある (Green, M. C. 1981)。zitterラットの表現型と類似の表現型がマウスの第2染色体上に、しかもHao-1からSvp-1とは反対方向の領域に個別に存在していることと、今回の実験において、それぞれ逆の組み換え個体が生まれなかったが、zitterラットの振戦、触毛、空胞形成の表現型が必ずしも一致して遺伝しなかったことを考え合わせると、これらの表現型は1つの遺伝子座の多面発現ではなく、それぞれに関与する遺伝子が個別に隣接して存在している可能性がある。

3. SERの特性

(1) 行動学的特徴、体重および生存期間

自然発症てんかんラット (SER) は2週齢頃から全身の振戦が認められ、3～5週齢を極期として、その後減弱してくる。7～8週齢から自然発症性にあるいは軽度の外来刺激で容易に強直性けいれんをおこし始める。また、まれに強直性けいれんに引き続いて間代性けいれんを伴うwild runningあるいはjumping 行動が観察された。表3は6匹 (雌3匹、雄

表3 SERにおける強直性けいれんの発現頻度

Onset of seizure (weeks old)	Rat number					
	1 (♀)	2 (♀)	3 (♀)	4 (♂)	5 (♂)	6 (♂)
	7	7	7	7	7	8
Age (weeks)						
10	13*	8	7	3	2	5
11	not done	18	16	23	2	2
12	16	15	16	21	12	3
13	20	died	6	13	died	8
14	11		8	8		8
15	17		11	10		10
16	21		8	14		killed
17	killed		died	killed		

* Number of convulsions during 2-hour observation period

3匹)のSERについて、10～16週齢の間、週1回各2時間のビデオ観察成績をまとめたものである。強直性けいれんは1時間あたり2～3回の頻度で自然発症した。12週齢時に全照明期間である12時間のビデオ観察を2日間連続で行った結果、12時間あたりの強直性けいれんの発症頻度は 9.6 ± 8.9 回(平均値 $\pm$ 標準誤差)であり、wild runningの頻度は 2 ± 0.7 回であった。

行動観察上認められたその他の異常には、よろめき歩行が挙げられる。これは強直性けいれんの発現開始時期(7～8週齢)に呼応して顕著となった。また、時折、動作を急に停止して、意識の減弱を疑わせる状態が観察された。SERは生存期間は短く、雌では50%が14週齢までに死亡し、雄では17週齢までに死亡し、調べた雌雄各10匹いずれも20週齢までに死亡した。死因は、ほとんどの例が頻繁にくり返される強直性けいれんに関連した摂餌量の低下による衰弱死であると推定されるものであった。

(2) 病理形態学的特徴

屈曲した触毛、被毛および萎縮した生殖器はtremorラットの異常とほぼ一致していた。中枢神経組織について認められたSERの病変を図2にまとめた。35日齢SERでは、

35日齢より
認められた変化

空胞形成:	脳幹網様体(赤核・オリブ核・蝸牛核)
	小脳白質・中脳蓋・視床脳
	海馬・大脳皮質(第3層以下)

神経細胞および神経線維の変性: 中脳腹側被蓋核(軽度)

2カ月齢以降で
認められた変化

空胞形成: 小脳核・小脳顆粒層
神経細胞および神経線維の変性: 中脳腹側被蓋核(高度)
好銀性塊状物の多発: 小脳顆粒層
(ゴルジ細胞および神経線維の変性とおもわれる)

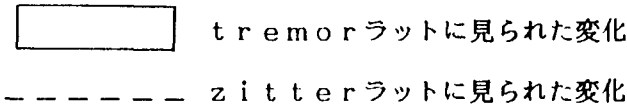


図2 SERに認められた中枢神経病変

tremorラットと同様に視床脳、脳幹網様体、中脳蓋、小脳白質等が高度な空胞形成によって海面状態を呈していた。空胞形成はその他大脳皮質、嗅脳、海馬、線条体、小脳顆粒層および脊髄灰白質にも認められた。tremorラットに比較して、頭頂部大脳皮質、脳梁、小脳白質等でわずかに高度な空胞形成を示すように思われたが、病変に質的な差異は気づかれなかった。2～3カ月齢の強直性けいれん発現時期においても中枢神経系における病変の主体は高度の空胞形成にあった。

電顕所見では、この空胞は髄鞘のintrapeliod line、軸索周囲腔の拡大、膠細胞の膨化を主体とするものであった。また、神経細胞は、ほとんど正常に保たれていたが、他に白質のhypomyelinationが特徴的な所見であった。

(3) SERとその起源系統の脳波学的所見

SERおよびその起源系統であるtremorラットとzitterラットに出現する行動異常を詳細に検討する為、脳波検査を行なった。

2～3カ月齢のSER、tremorラット、zitterラットおよびKyō Wistar ラットについて、左側前頭部皮質と海馬に慢性的に記録電極を固定し、非拘束下で自発脳波を測定した。得られた各系統の所見を以下にまとめた。SERについては週齢に伴う発作の推移について観察した成績も合わせて報告する。

① SER

発作間隙期の大脳皮質脳波は正常で、低振幅速波の覚醒時脳波と中振幅徐波の安静時脳波を示したが、海馬では26匹調べたいずれにも覚醒時の θ 波が観察されなかった。

SERには前節に述べたように、時折、欠伸様の状態が観察された。これは不動の姿勢と固定した視線によって特徴づけられ、この時、大脳皮質と海馬の脳波には5～7Hz（通常6Hz）の棘徐波結合の群発放電が現れた。脳波測定用ボックス内に30分間順化した後、15分間の測定期間中に出現したこの群発放電の頻度は5～62回（ 1.3 ± 0.2 回/分、 $n = 26$ ）であり、その各発作継続時間は3.0～20.5秒（ 9.2 ± 1.0 秒）であった。

四肢、尾の強直伸展によって特徴づけられる強直性けいれんは欠伸様発作に続いて発症する傾向があったが、安静時や欠伸様発作時に音、光あるいは触刺激を加えることによって容易に誘発することができた。発作後は眠ることなく、起き上り徘徊する場合が多かった。ほとんどの場合、低振幅棘波あるいは連波が継続したが、まれにその連波につづいて10～15Hzの棘波が群発した後に脳波が10～15秒間平坦化する場合があった。脳

波測定用ボックス内に順化後、3、8、13分に拍手と触刺激によって強直性けいれんを誘発する条件下で測定した強直性けいれんの頻度は1分あたり 0.2 ± 0.01 回（平均値±標準誤差）であり、各発作継続時間は 23.8 ± 1.6 秒であった。欠神様発作と強直性けいれんは性差なく認められた。

上記の測定法によって5週齢から15週齢まで週齢を追って脳波測定と行動観察を行った。この実験においては、慢性記録電極を左側前頭部皮質と頭頂部皮質に固定した。5～7週齢においては行動時に激しい全身振戦が認められた。振戦を伴う歩行時の大脳皮質脳波には異常所見は認められなかった。強直性けいれんがまだ認められていない5週齢の14匹のうち3匹において行動の停止時に棘波、徐波および棘徐波結合よりなる群発放電が観察された。6週齢以降すべての個体に5～7 Hzの棘徐波結合よりなる発作波が認められ、週齢に伴ないその出現頻度および持続時間は漸次増大傾向を示した。10～12週齢における5～7 Hzの棘徐波結合を伴う欠神様発作の発現時間は1分あたり 8.7 ± 2.6 秒であった。また、この棘徐波結合は、まれに振戦あるいはよろめき行動時にも観察されることがあった。

強直性けいれんは、6週齢までは自然発症および外来刺激による誘発は認められなかった。強直性けいれん発症個体は7週齢から増加し、12週齢ですべての個体に認められた。1回あたりのけいれん継続時間は週齢差を認めなかったが、発作頻度が上昇するため1分あたりの発作時間は週齢とともに増大する傾向を示した。

② tremorラット

SERの起源系統であるtremorラットにも大脳皮質および海馬に5～7 Hzの棘徐波結合からなる群発放電を伴う欠神様状態が認められた。この発作頻度はSERと差がなく、1分間に 1.2 ± 0.4 回（ $n=6$ ）であったが、その継続時間は、SERに較べて有意に短く、 4.1 ± 1.5 秒であった。強直性けいれんは観察されず、覚醒時には海馬に θ 波が観察された。 図3参照

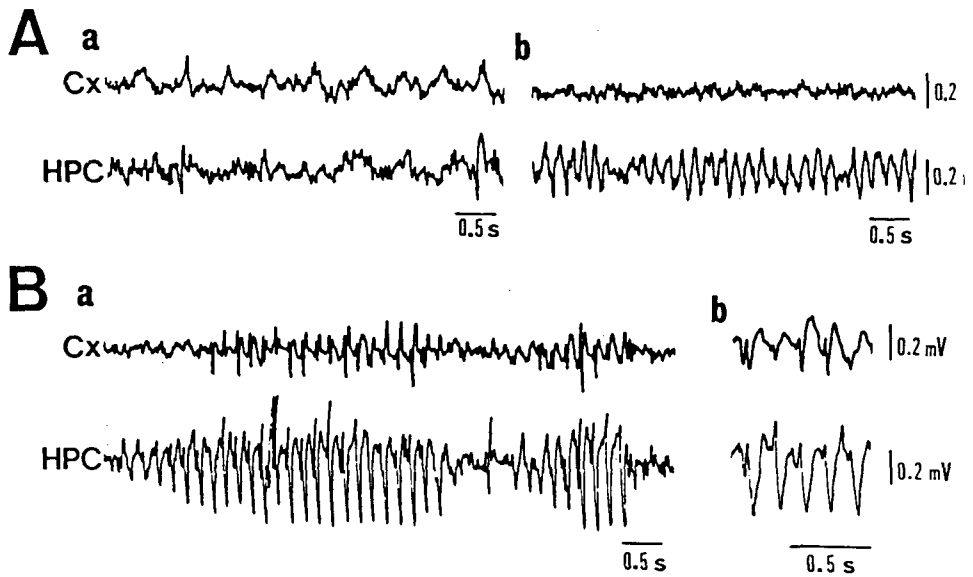


図3 tremor rat の脳波
Aa 安静状態 Ab 覚醒状態 Ba,b 欠神様発作時

③ zitterラット

後駆および尾部に上下動の振戦が絶えず観察された。この時、海馬には θ 波が明瞭に認められる典型的な覚醒時脳波が見られ、安静時に得られる徐波は少なかった。また、弛緩性麻痺を発症する約1年齢の3匹のzitterラットを同様に脳波検査したが、弛緩性麻痺をおこしている時にも発作波は認められなかった。

④ Kyo: Wistar ラット

tremorラットの起源系統であるKyo: Wistar ラットにおいては、欠神様発作、強直性けいれんおよび弛緩性麻痺は観察されず、発作性脳波やその他の異常所見は特に認められなかった。

4. SERの抗てんかん薬評価試験への応用

(1) SERにおけるてんかん様発作に対する各種抗てんかん薬の単回投与試験

キンドリングなどで作製した実験てんかんモデルに加えて、てんかん様発作易発性の実験動物であるGEPR (Dailey, J. W. and Jobe, P. C. 1985, Reigel, C. E. et al. 1986) とEI マウス (Sugaya, E. et al. 1986)を用いた抗てんかん薬の評価試験が報告されている。この研究においては、SERの欠神様発作と強直性けいれんがヒトのてんかん

発作に対応するものか否か、さらに新しい抗てんかん薬の評価にこの動物が有用であるか否かを明らかにするため、既存の代表的な抗てんかん薬の単回投与による発作抑制効果を調べた。

2～3カ月齢のSERを麻酔後、左側大脳皮質と海馬に記録電極を刺入し、慢性的に固定した。手術後、1週間以上の回復期間の後、動物を測定用ボックス内に放ち、非拘束条件下で行動観察ならびに自発脳波の記録を行った。

各種抗てんかん薬の投与前15分間と投与後15～30分および45～60分の各15分間における欠神様発作と強直性けいれんの発現時間を平均値と標準誤差で集計した。ヒトの大発作治療薬であるPhenytoin (10mg/kg、20mg/kg、i.p., n=4)は欠神様発作に影響を与えることなく用量依存性に強直性けいれんを抑制した。ヒトの小発作(欠神)治療薬であるTrimethadione (100mg/kg、i.p., n=4)とEthosuximide (100mg/kg、i.p., n=4)は、欠神様発作を抑制したが強直性けいれんを抑制しなかった。さらに、Phenobarbital (100mg/kg、i.p., n=5)とSodium valproate (100mg/kg、200mg/kg、i.p., n=5)は、いずれも欠神様発作と強直性けいれんの両者を抑制した。以上の結果、抗てんかん薬の効果からみるとSERの欠神様発作はヒトの小発作に対応するものと考えられ、SERの強直性けいれんはヒトの大発作に対応するものと考えられた。このように、SERは抗てんかん薬に対する抑制効果が明らかに異なる2種類のてんかん様発作を合わせもつことが明らかになったので、抗てんかん薬の開発には有益なモデルであると考えられる。tremorラットにおいても欠神様発作がみられることを前節で述べたが、これもSERの欠神様発作と同様の薬剤反応性が認められた。

(2) SERを用いたフェノバルビタールの長期投与試験

自然発症てんかんラット(SER)は、欠神様発作と強直性けいれんを外的刺激なしに自然発症する。前節の抗てんかん薬の単回投与による発作抑制試験において、欠神様発作はヒトの小発作(欠神発作)治療薬で抑制され、強直性けいれんはヒトの大発作治療薬で抑制され、さらにこれらの両発作はPhenobarbital(PB)とValproateによって共に抑制されることを報告した。臨床において、これらの抗てんかん薬は長期間持続的に使用されているので、この研究においては、抗てんかん薬の長期投与時の効果と問題点を評価する上でSERが応用できるか否か、PBを例にとって検討した。

実験1では、0.1%PB混入個形飼料を7週齢から自由摂取させることによって、強直性けいれんが持続的に抑制され、体重の増加および生存期間の延長にその効果が認められるか否かを検討した。血しょう中のPB濃度は8、9、11、14、17および20週齢に、酵素免疫抗体法によって測定した。強直性けいれんの発作頻度は、透明のアクリルボックス

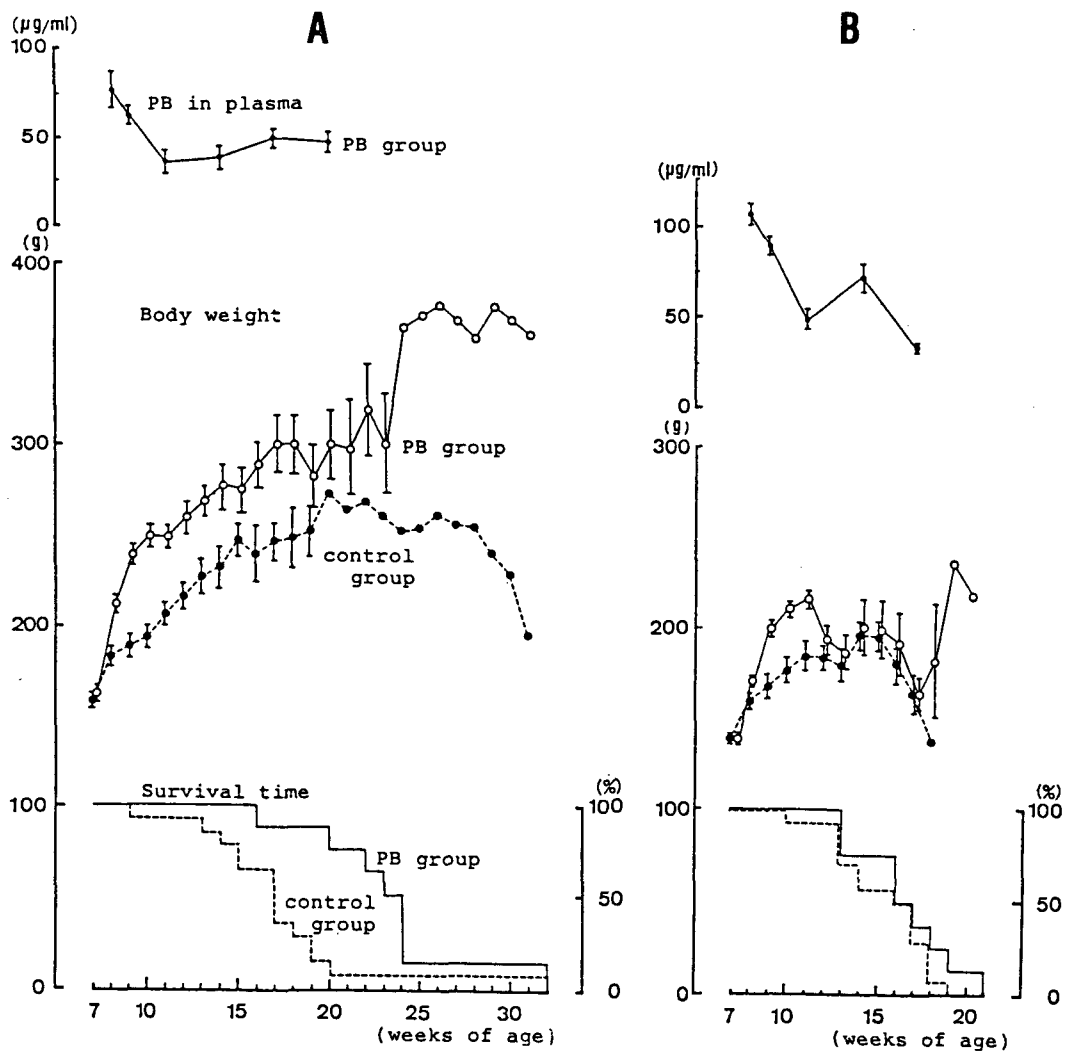


図4 0.1%PB混入個形飼料を7週齢から給餌されたSERにおける
血しょう中のPB濃度、体重および、生存率の推移
A：雄SER、PB群（8匹）、対照群（14匹）
B：雌SER、PB群（8匹）、対照群（14匹）

($W \times D \times H$: $24 \times 30 \times 35$ cm) の中に放置したSERの行動を毎週ビデオ装置で記録し、2時間あたりの発作回数によって求めた。体重と摂餌量は毎週測定した。血しょう中のPB濃度は図4に示したように、8週齢時に雄が平均 $80 \mu\text{g}/\text{ml}$ で、雌が平均 $110 \mu\text{g}/\text{ml}$ であったが、その後しだいに低下し、11週齢以降は $30 \sim 50 \mu\text{g}/\text{ml}$ に維持された。PB投与群の体重は雄において対照群よりも有意な増加を認めた。一方、雌では11週齢時までは有意な増加を示した。生存期間においても雄では有意な延長効果を認め、対照群が 16.2 ± 1.3 週(平均 $\pm$ S.E., $n=14$)に対してPB投与群は 22.1 ± 1.5 週($n=8$)であった。しかし、雌では対照群が 14.5 ± 0.7 週($n=14$)に対してPB投与群は 15.6 ± 0.7 週($n=8$)であり、延長効果は雄ほど明らかではなかった。PBによる強直性けいれんの抑制効果を図5にまとめた。強直性けいれんは雌雄いずれもPB投与前の7週齢時から認められたが、8~9週齢時で完全に抑制され、10~15週齢までは有意な抑制効果が認められた。しかし、雌では16週齢以降雄では17週齢以降において対照群よりも有意な発作抑制効果は認められなくなり、17週齢時の2時間あたりの強直性けいれんの発作回数は雌雄ともに10回であった。

実験2では、10週齢において慢性埋め込み電極を大脳皮質に設置した雌雄のSERに11週齢から0.1PB混入固形飼料を自由摂取させ、PB投与前の11週齢時と投与3、7および14日後に行動観察と同時に脳波記録を行ない、PBの継続的投与による欠神様発作と強直性けいれんの抑制効果を調べた。脳波と行動の記録は前記と同様に脳波測定用ボックス内に順化した後、15分間行なった。記録開始、3、8および13分後に拍手および触刺激によって強直性けいれんの誘発試験を行なった。

強直性けいれんはPB投与3、7および14日後のいずれにおいても雌雄ともに抑制された。特に3と7日後の雄では、触刺激によっても全く強直性けいれんを誘発することはできなかった。一方5~7Hzの棘徐波結合を伴う欠神様発作は、投与前に比較して有意な抑制効果を示さなかった。

PBを単回投与した場合と、この研究で示した長期投与の場合の効果の相違は臨床においていわれていることと一致した。PBの長期投与はSERの強直性けいれんを全生涯ではないが持続的に抑制させ、体重の増加および生存期間の延長をもたらした。これまで、抗てんかん薬の長期投与時の効果を評価する上で、適切な方法がなかったことから、SERは単回投与試験に加えて、長期投与試験にも用いることができる有効なモデル動物であると考えられる。

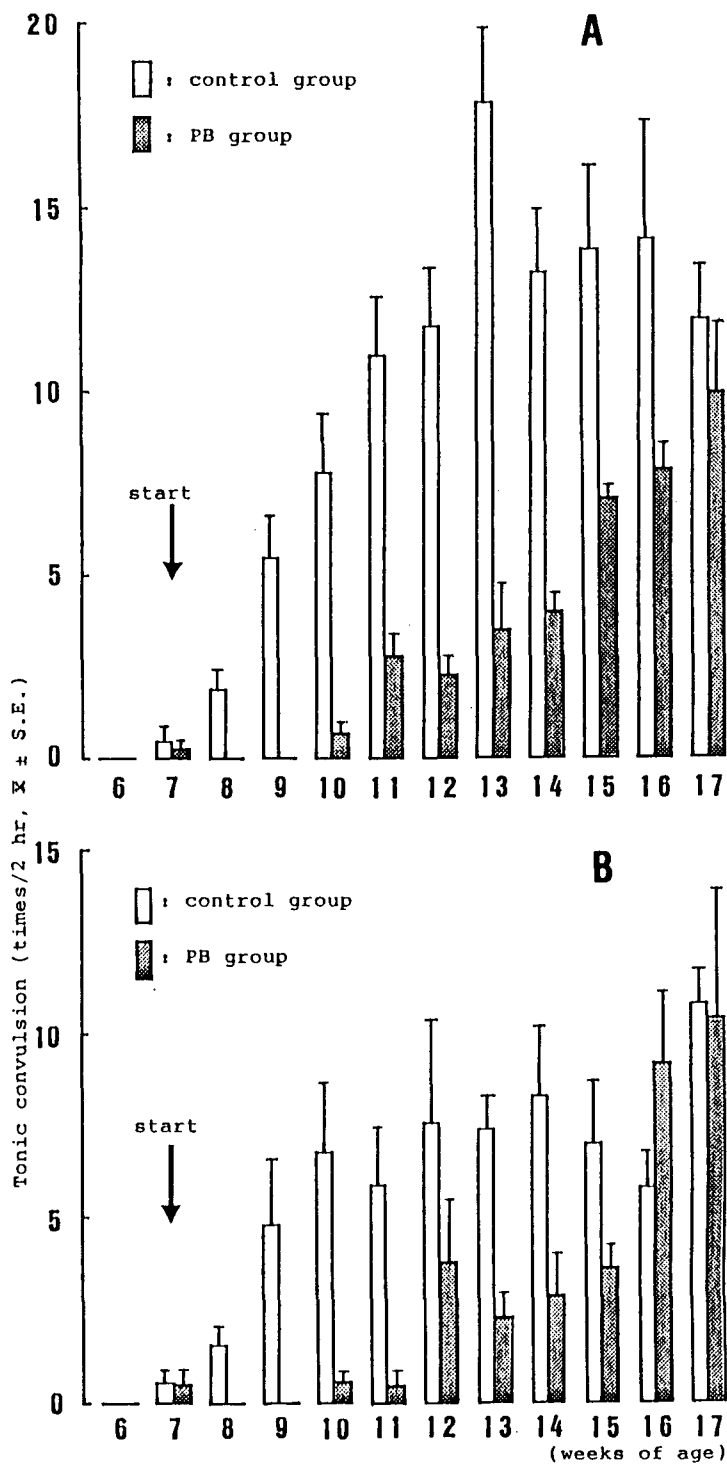


図5 0.1%PB混入固形飼料を7週齢から給餌されたSERにおける
強直性けいれんの抑制効果
A:雄SER(各群8匹)、B:雌SER(各群8匹)

5. ま と め

本研究で明らかになった主要な事項を列挙すると以下の通りである。

①京都大学医学部付属動物実験施設で発見された一つの振戦ミュータントであるtremorラットのtm遺伝子は常染色体性劣性遺伝子であること、その表現型には振戦以外に触毛と被毛の屈曲および中枢神経組織の広汎な空胞形成があること、又、雌雄ともに不妊であること。

②同様な振戦遺伝子ziをホモにもつzitterラットを西ドイツのDr. Rehm からもらいうけ、両系統の交配により同座性を調べたところ、この両遺伝子は互いに別の遺伝子座にあり、両者の二重ホモ動物（SER）は外来刺激を加えることなく自然発症性に強直性けいれんをくり返すこと。

③tm遺伝子をホモにもつtremorラットは自然発症的に5～7 Hz の棘徐波結合を伴う欠神様発作を起こすこと。

④SERにはtremorラットと同様の棘徐波結合を伴う欠神様発作と強直性けいれんが自然発症的に現われること。ヒトの大発作治療薬及び小発作治療薬の単回投与によりSERの強直性けいれんおよび欠神様発作が特異的に抑制されること。

⑤Phenobarbitalの長期投与によってSERの強直性けいれんが抑制され、特に雄において体重および生存期間の延長効果がみられること。

⑥zi遺伝子は交配実験効果からラット第IV連関群のHao-1と強く連鎖していること。

今後の研究課題としては、(1)SERの改良（妊性の賦与、コンジェニック系統の作出）、(2)SERのてんかん様発作の発現機構の解明および、(3)SERを用いた新しいてんかん薬の評価に分類することができる。

てんかん薬スクリーニングへのSERの応用は、直接的なてんかん制圧に関与するものであるが、SERに関する知見の集積もまた、その目的に貢献するものである。SERが多くの研究者によって研究され、あるいは利用され、てんかん学あるいはそれ以外の分野にも新たな展開が生まれれば幸いである。

なお、ここに紹介したSERに関する研究成果は下記の諸先生方ならびに協力研究者によって得られたものである。

大野行弘、氏原久充、藤田泰彦、笹 征史、高折修二（京都大学、医学部、薬理）、長柄 等、立石 潤（九州大学、脳研、病理）、乾 俊秀、浅野裕三、高田 博、川合是彰、岡庭 梓（田辺製薬、安全研）山田昌夫、中島一男、山田宣永、森 政之、浜田修一、山田淳三（京都大学、医学部、動物実験施設）

参考文献

- Bender, K., Adams, M., Baverstock, P. R., Bieman, M., Bissbort, S., Brdicka, R., Butcher, G. W., Cramer, D. V., Deimling, O., Festing, M. F. W., Gunteher, E., Guttmann, R. D., Hedrich, H. J., Kendall, P. B., Kluge, R., Moutier, R., Simon, B., Womach, J. E., Yamada, J. and van Zutphen, B. (1984). Biochemical markers in inbred strains of the rat (*Rattus norvegicus*). Immunogenetics 19: 257-266.
- Cramer, D. V., Mowery, P. A. and Adams, M. (1986). Biochemical markers in rats: linkage relationships of aconitase (*Acon-1*), aldehyde dehydrogenases (*Ahd-2* and *Ahd-c*), alkaline phosphatase (*Akp-1*) and hydroxyacid oxidase (*Hao-1*). Biochem. Genet. 24: 217-227.
- Dailey, J. W. and Jobe, P. C. (1985). Anticonvulsant drugs and the genetically epilepsy-prone rat. Fed. Proc. 44: 2460-2464.
- Green, M. C. (1981) Catalog of mutant genes and polymorphic loci. In Genetic variants and strains of the laboratory mouse, pp. 8-279, Green, M. C. (edit.), Gustav Fischer Verlag. Stuttgart. New York.
- Imaizumi, K., Ito, G., Kutsukake, T., Takizawa, K., Fujiwara, K. and Tutikawa, K. (1959). Epilepsy like anomaly of mice. Bull. Exp. Anim. 8: 6-10.
- Kaplan, B. J., Seyfried, T. N. and Glaser, G. H. (1979). Spontaneous polyspike discharges in an epileptic mutant mouse (Tottering). Exp. Neurol. 66: 577-586.
- Noebels, J. L. and Sidman, R. L. (1979). Inherited epilepsy: spike-wave and focal motor seizures in the mutant mouse tottering. Science 204: 1334-1336.
- Reigel, C. E., Dailey, J. W. and Jobe, P. C. (1986). The genetically epilepsy-prone rat: an overview of seizure-prone characteristics and responsiveness to anticonvulsant drugs. Life Sci. 39: 763-774.
- Rehm, S., Mehracin, P., Anzil, A. P. and Deerberg, F. (1982). A new rat mutant with defective overhairs and spongy degeneration of the central nervous system: clinical and pathologic studies. Lab. Anim. Sci. 32: 70-73.
- Robinson, P. F. and Gilmore, S. A. (1980). Spontaneous generalized spike-wave discharges in the electrocorticograms of albino rats. Brain Res. 201: 452-458.

Sasa, M., Ohno, Y., Ujihara, H., Fujita, Y., Yoshimura, M., Takaori, M., Serikawa, T., Yamada, J. Effects of antiepileptic drugs on absence-like and tonic seizures in spontaneously epileptic rat, a double mutant rat. *Epilepsia* (submitted).

Serikawa, T., Kogishi, K., Yamada, J., Ohno, Y., Ujihara, H., Sasa, M. and Takaori, S. Effects of continual intake of phenobarbital on spontaneously epileptic rats (SER). In *Proc. IX ICLAS Int. Symp. Lab. Anim. Sci.* (submitted).

Serikawa, T., Ohno, Y., Sasa, M., Yamada, J. and Takaori, S. (1987). A new model of petit mal epilepsy: spontaneous spike and wave discharges in tremor rats. *Lab. Anim.* 21: 68-71.

Serikawa, T. and Yamada, J. (1986). Epileptic seizures in rats homozygous for two mutations, zitter and tremor. *J. Hered.* 77: 441-444.

Serikawa, T., Yamada, J., Ohno, Y., Sasa, M., Ujihara, H., Akaike, A., Fujita, Y. and Takaori, S. (1987). A genetically defined epileptic model in rats: the genetics, characteristics of behavior, and electroencephalogram in spontaneously epileptic rats. *Transplant. Proc.* 19: 3205-3206.

Seyfried, T.N. and Glaser, G.H. (1985). A review of mouse mutants as genetic models of epilepsy. *Epilepsia* 26: 143-150.

Sugaya, E., Ishige, A., Sekiguchi, K., Iizuka, S., Ito, K., Sugimoto, A., Aburada, M. and Hosoya, E. (1986). Pentylentetrazol-induced convulsion and effect of anti-convulsants in mutant inbred strain El mice. *Epilepsia* 27: 354-358.

Suzuki, J. (1976). Paroxysmal discharges in the electroencephalogram of the El mouse. *Experimentia* 32: 336-337.

Vergnes, M., Marescaux, C., Micheletti, G., Reis, J., Depaulis, A., Rumbach, L. and Warter, J.M. (1982). Spontaneous paroxysmal electroclinical patterns in the rat: a model of generalized non-convulsive epilepsy. *Neurosci. Lett.* 33: 97-101.

Yamada, J., Serikawa, T., Ishiko, J., Inui, T., Takada, H., Kawai, Y. and Okaniwa, A. (1985). Rats with congenital tremor and curled whiskers and hair. *Exp. Anim.* 34: 183-188.

Yamada, T., Mori, M., Hamada, H., Serikawa, T. and Yamada, J. Assignment of body tremorous mutant zitter (zi) to linkage group IV of the rat. *J. Hered.* (submitted).

編集後記

第1号が発行されてから間もなく4年になる。その間の編集後記をみると何やら言い訳ばかり目につくようである。私はいま、2度目の編集後記に筆を走らせている。早いものである。

近頃は年末をひかえて、巷も騒々しくなってきた。編集作業も思うにまかせぬことが多い。

ふと、4年前の自分にとって4年後の目標が現在の自分であったのかと思うことがある。忙しさに追われて自分を見失う不安を思うことがある。

現在の目標は年2回の発行と背表紙に会報名が書ける程度の厚さにすること、そして内容の充実である。諸先生方の御協力を切にお願いしたい。

—H・M記—

平成1年1月18日 印刷
平成1年1月20日 発行

編集兼発行者 山田 淳 三
発行所 関西実験動物研究会
〒606 京都市左京区吉田近衛町
京都大学医学部附属動物実験施設
印刷所 関西ナショナル印刷株式会社
〒532 大阪市淀川区十三本町3-4-23