

厚生省

神経疾患研究委託費

筋ジストロフィー症動物の生産・
開発に関する研究

野村班

昭和56年度研究報告書

昭和57年3月

研究報告書の作成にあたり

厚生省神経疾患研究委託費による、筋ジストロフィー症研究班の第5班として3年間を終了いたしました。

本研究班の目的は、1) 筋ジストロフィー症モデル動物の生産・供給、2) 新しい筋ジストロフィー症モデル動物の開発・改良、および3) 筋ジストロフィー症動物の飼育管理方法の検討、であります。

従来から申しあげておりますとおり、新しいモデル動物の開発には、その遺伝的背景を確立するため、極めて長い歳月を要するものであります。また、このようにして育成されたモデル動物も、その飼育・維持方法によっては疾病感染により、実験に供することができなくなるなど、これらのモデル動物の飼育管理方法の検討も併せて実施する必要があります。

本研究班では、筋ジストロフィー症研究進展のため、より良いモデル動物の開発・改良を目指すとともに、大量の実験動物を供給できるよう、今後もなお一層努力を重ねる所存であります。そのため、本研究班では、例えば、発生工学の手法をもちまして新しいモデル動物を開発する、などの検討も進めております。

今後も、諸般の先生方のご協力をお願い申しあげる次第であります。

おわりに、ご協力下さった班員各位、ならびに本研究委託費の取扱いに種々お世話いただいた厚生省当局、国立神経センター、日本筋ジストロフィー協会の方々に心から感謝いたします。

目 次

筋ジストロフィー症動物の生産・開発に関する研究	総括概要(3年間).....	1
	野村達次	
I. 筋ジストロフィー症に関する文献調査		5
	野村達次	
II. 筋ジストロフィー症動物の生産と飼育管理方法の研究		
1. 筋ジストロフィー症動物の生産・供給		13
	水谷 誠 江橋 節郎 斉藤 宗雄	
2. 筋ジストロフィーチキンの飼育管理とその問題点		15
	斉藤 宗雄	
III. 筋ジストロフィー症モデル動物の開発		
1. ニホンウズラにおける疾患モデル系統の開発		25
	若杉 昇 近藤 恭司	
2. 糖原病Ⅱ型ウズラの育成		35
	水谷 誠	
3. 産業の場で見い出される異常ウズラの調査 — 疾患モデル動物の素材としての検討 —		53
	伊藤 慎一	
4. 筋ジストロフィー症鶏浅胸筋の除神経に伴う組織学的、酵素組織 化学的变化		67
	菊池 建機	
5. 新たに発見された遺伝性骨・軟骨異常マウス		79
	江崎 孝三郎	
6. 後軀麻痺を好発するJc1:ICRマウス由来の1系統		95
	江崎 孝三郎	

筋ジストロフィー症動物の生産・開発に関する研究 総 括 概 要 (3 年 間)

班長 野 村 達 次*

本研究班は、筋ジストロフィーのモデル動物を生産し、他の研究班々員に供給するとともに、新しいモデル動物を開発することを目的として組織された。そして、昭和54年度より3年間にわたって、筋ジストロフィー症モデル動物に関する文献調査、モデル動物の生産・供給ならびに飼育管理方法、および新しいモデル動物の開発についての調査・研究を実施した。以下に3年間の研究成果の概要ならびに反省点と将来への展望を述べる。

研究 成 果 の 概 要

I. 筋ジストロフィー症モデル動物に関する文献調査

筋ジストロフィー症のモデル動物の生産・開発に当り、国際的にどのようなモデル動物が開発され、研究に使用されているかを知る目的で、文献調査がなされた。

野村班員は、1978年～1981年に報告された筋ジストロフィーに関する文献のなかより、モデル動物を用いた論文約300編を選び、集録して、神経疾患研究委託費による研究班々員に紹介した。

これらの論文のなかで高頻度で使用されている動物は、マウス、ニワトリ、ハムスターであったが、一部ではウサギ、ラット、ヒツジ、ウマ、サル類なども使用されていた。

また江崎班員は、マウスにみられる遺伝性神経・筋疾患について調査し、50余りの突然変異形質について、特性の要約を報告した。

II. 筋ジストロフィー症モデル動物の生産・供給ならびに飼育管理方法に関する研究

各研究者の要望によって、筋ジストロフィーモデル動物の生産・供給をおこなった。

水谷班員は、筋ジストロフィーニワトリを維持し、種卵の生産をおこなうとともに、各班員への供給をおこなった。3年間の供給数は累計約2万5千個となった。なお、江橋班員は、種卵配布の手続き、調整を分担した。

斉藤班員は、筋ジストロフィーマウスを維持、生産し、約1,500匹の筋ジストロフィーマウスを供給した。

野村班員は、筋ジストロフィーハムスターを米国より輸入する手続きをおこない、昭和56年より輸入を開始した。

一方、筋ジストロフィーニワトリの飼育・管理に関し、多くの班員から、その困難なことが指摘

* (財)実験動物中央研究所

された。そこで、水谷班員は、飼育・管理についての基準を作製し、それを各班員に配布した。また斎藤班員は、実験中のニワトリがコクシジウムなどの病気に感染することを防御するための、ニワトリ用ビニールアイソレータを開発し、作製した。

III. 筋ジストロフィー症モデル動物の開発

筋ジストロフィーニワトリの基礎的特性の検索、筋ジストロフィーニワトリの機能障害の検討、筋ジストロフィーニワトリの改良、および神経・筋異常についての新しいモデル動物の開発がなされた。

1. 筋ジストロフィーニワトリの基礎的特性の検索

水谷班員は、現在使用されている筋ジストロフィーニワトリ413系と、その対照となる正常ニワトリ412系の遺伝的背景を検索した。同種自然凝集素、同種免疫抗血清、抗ウズラ赤血球ニワトリ血清、および植物性凝集素のいずれに対する反応においても、413系と412系の間に差がみられ、両系の遺伝的背景がかならずしも同一でないとする成績を得た。そして、このことは、両系でみられる特性の差を直ちに、筋ジストロフィーと正常との違いと関連させて論議することは危険であり、十分な配慮が必要であることを指摘した。

菊池班員は、正常ニワトリ、筋ジストロフィーニワトリ、およびそれらのF₁ニワトリ(キャリア)について、組織学的、酵素組織化学的、および血液生化学的検索をおこなった。キャリアの浅胸筋において、1)巨大線維が一次筋束のなかに散在し、周辺を小径線維がとりかこむ、2)巨大線維の多核化や再生現象は、筋ジストロフィーニワトリより遅れるが、周辺の小径線維の場合は急激に進行する、3)筋線維の崩壊像、空胞形成は個体により差はあるが、一般には稀である。また、キャリアの血清PK活性は、孵卵後70~86日から正常ニワトリより有意に高くなる、などの知見を得た。

2. 筋ジストロフィーニワトリの機能障害の測定法についての検討

従来、筋ジストロフィーニワトリの機能障害の測定としてflip testが広く用いられているが、この方法は定量的な測定には、かならずしも満足できるものではない。菊池班員は、前肢の肘関節伸展度を、翼膜縁—尺骨角(WEUA)を測定し、上腕骨—尺骨角(HUA)を算出し、この値を比較することによって、症状の進行度を知ることができることを見出した。この方法は、定量的な比較が可能であると同時に、ヘテロニワトリの異常の進行も測定することができる。

3. 筋ジストロフィーニワトリの改良

前述のように、現在使用されている412系と413系は、それらの遺伝的背景がかならずしも同一でない、体型が大きいなどの欠点がみられる。そこで、遺伝的背景が明確で、小型の筋ジストロフィーニワトリの作出がおこなわれている。菊池班員は、白色レグホン岩谷系へ、水谷班員は、ファヨウミGSN/2系へ、筋ジストロフィー遺伝子を導入している。現在、もどし交配を継続中であるが、近い将来には、遺伝的背景が同一の対照ニワトリと筋ジストロフィーニワトリのライン

が育成されるであろう。

4. 新しい神経・筋疾患モデル動物の開発

a. 鳥類におけるモデル動物の開発

近藤班員は、鳥類は飛翔という行動、卵生である特性を利用できる点で、実験動物として高い価値のあることを指摘している。そして、愛玩用、観賞用などの品種の中に生理的に特異的な筋をもつ系（シャモ、烏骨鶏）があり、これらが研究に利用できるであろう、と示唆している。

若杉、伊藤、水谷班員は、研究室および産業の場で飼育されているニホンウズラのなかから、神経・筋異常を呈するものを発掘することを試みている。若杉班員は、興奮すると頭を後に引きあげ、空を見上げるような姿勢をする（star-gazingに類似）異常を発見し、系統の育成ならびに異常発現様式についての検索をおこなっている。伊藤班員は、産業の場で発見された幾つかの羽色異常のウズラのなかから、ホモになると首をねじまげ、前方への回転を繰り返えず行動異常を発現するウズラを発見した。この異常ウズラは生後1週以内に死亡し、系統維持が不可能であるので、ヘテロの状態で、形質を保存している。これら2つの異常は、いずれも神経異常に起因するものであろう、と予想され、今後の検索が期待される。

水谷班員は、彼が飼育しているウズラのなかに翼が開かない個体を発見した。このウズラの子孫を得ると同時に、病理、生化学的検索をおこない、この異常がヒト糖原病II型に類似していることを明らかにした。また、酸性マルターゼ値の低いものを選択することにより、糖原病モデルウズラの系を確立した。

b. マウスにおけるモデル動物の開発

江崎班員は、マウスを用い、神経・筋異常のモデル動物の発掘をおこなっているが、新たに、3種類の異常を発見し、検索を進めている。その1つは、生後200日頃に、後軀麻痺を発症するものである。この異常を発現する系は、リンパ性白血病を発症するものであるが、それらの50%以上に後軀麻痺が現われる。筋組織の検索によって、3種のタイプの異常がみられた。第1のタイプは、筋外より間質にそってリンパ球が浸潤し、重症のものでは、リンパ腫細胞の間に筋細胞が浮んでいるようになる。第2のタイプは、筋線維内にリンパ腫細胞が転移しているものである。第3のタイプでは、リンパ腫細胞の浸潤はみられず、筋壊死のみがみられるものである。この異常の検索はまだ不十分であるので、ヒト疾患との類似性を示すことはできないが、筋壊死の原因の検索などによって、興味ある知見が得られると期待される。

第2は、出生時に内反足様の症状を呈し、生長すると下垂足歩行をおこなうものである。この異常には、総腓骨神経の欠失または退行、前・外側下腿筋群の萎縮のみられることが明らかになっている。Charcot-Marie-Tooth型筋萎縮症あるいはWarding-Hoffman症のモデルとなる可能性がある。

第3の異常は、生後3週頃より、四肢関節が屈曲せず、つま先立ちで歩行するものである。症状は加齢とともに進行し、脊椎関節も固定し、体軀が強直したようになる。この異常では、関節部に無構造な石灰沈着がみられ、脊椎は軟骨部が骨化し、一本の棒のようになっている。肋骨の胸骨あるいは背骨関節部も骨化している。さらに、アキレス腱、ヒゲの毛包、血管壁にも石灰の沈着がみ

られる。詳細については検索中であるが、強直性脊椎炎、変形性関節症、骨軟骨代謝異常症、石灰代謝異常症、あるいはこれらの類似疾患のモデルとなる可能性をもっている。

反省点と将来への展望

1. 筋ジストロフィーニワトリの供給に関して、種卵を研究者に供給してきたが、採卵から孵卵までの貯蔵期間が長い、輸送が繰り返えられる、研究者の孵卵技術がかならずしも十分でない、などのために、供給卵数に比して、使用できるヒナの数が極めて少ないと云える。今後は、孵卵技術の安定している個所で孵化をおこない、ヒナを供給することを検討する必要がある。
2. モデル動物の開発・改良に関して、動物の異常を発見し、それを系統化する技術は可成り進歩していると云える。一方、発見された異常について、速やかに病理学的あるいは生化学的検索をおこない、ヒト疾患との類似性、相異性を検討するための研究組織は十分とはいえなかった。今後、この点の組織作りが必要である。
3. 動物の開発、系統の育成には、ある程度の年月が必要なことは云うまでもない。神経・筋疾患のモデル動物の開発・改良のためには、長期的な、かつ安定した研究体制を立てる必要があると考えられる。
4. 疾患モデル動物の開発には、自然発生の突然変異個体の出現を待つだけではなく、将来は、発生工学の手法を用いて、積極的に神経・筋疾患モデル動物を作成しうる研究体制をつくる必要がある。

I. 筋ジストロフィー症に関する文献調査 (1980・1981)

野村達次*

筋ジストロフィー症モデル動物の開発研究の一環として「疾患モデル動物」「哺乳類・トリ類における筋ジストロフィーとその近縁疾患」ならびに「筋ジストロフィーとその近縁疾患に関する動物実験」についての、文献調査をおこなっている。それらの中から、筋ジストロフィーに関する文献(1980~1981)を以下に紹介する。

M I C E

Submandibular glands in mice with muscular dystrophy: Studies with nerve growth factor. Murphy, R.A., Watson, A.Y., et al. Anat. Rec., 200, 2, 177-94, 1981.

Serum creatine phosphokinase variations in dystrophic mice. Lieberman, J.S., Taylor, R.G. & Fowler, W.M., Jr. Exp. Neurol., 73, 3, 716-24, 1981.

Slowing of fast-twitch muscle in the dystrophic mouse. Parslow, H.G. & Parry, D.J. Exp. Neurol., 73, 3, 686-99, 1981.

Fiber type susceptibility in the dystrophic mouse. Parry, D.J. & Parslow, H.G. Exp. Neurol., 73, 3, 674-85, 1981.

The three-dimensional cytoarchitecture and pattern of motor innervation of branched striated myotubes. Ontell, M. & Feng, K.C. Anat. Rec., 200, 1, 11-31, 1981.

Phosphodiesterase activity in muscles of control and dystrophic mice. Garbagna, L., Cojazzi, M., Marcucci, F. & Mussini, E. Res. Commun. Chem. Pathol. Pharmacol., 31, 3, 537-44, 1981.

Differences in enzyme efflux from dystrophic mouse skeletal muscle and heart. Morgan, J., Bozyk, M.E., Bittner, S. & Cohen, L. Res. Commun. Chem. Pathol. Pharmacol., 30, 3, 555-76, 1980.

Plasma creatine kinase isoenzymes in the Bar Harbor dystrophic mouse. Nicholson, G.A. & Matheson, E. J. Neurol. Sci., 51, 1, 3-10, 1981.

Muscle fiber necrosis in murine dystrophy. Ontell, M. Muscle Nerve, 4, 3, 204-13, 1981.

財実験動物研究所

Altered acetylcholinesterase isozyme patterns in mice with hereditary muscular dystrophy. Kuhn, D.E., Logan, D.M. & Rathbone, M.P. *J. Exp. Zool.*, 216, 2, 213-33, 1981.

Rate and extent of functional reinnervation in fast-twitch and slow-twitch muscles of the dystrophic mouse (C57BL/6J DY2J/DY2J). Parry, D.J. & Melenchuk, S. *Exp. Neurol.*, 72, 2, 446-61, 1981.

Biochemical changes in progressive muscular dystroph. XI. Cyclic nucleotides in the skeletal and cardiac muscle of normal and dystrophic mice. Srivastava, U., Sebag, M. & Thakur, M. *Can. J. Physiol. Pharmacol.*, 59, 4, 329-34, 1981.

The membrane morphology of the neuromuscular junction, sarcolemma, sarcoplasmic reticulum and transverse tubule system in murine muscular dystrophy studied by freeze-fracture electron microscopy. Ellisman, M.H. *Brain Res.*, 214, 2, 261-73, 1981.

Endocytosis in skeletal muscles of dystrophic mice and chickens. Jirmanova, I., Libelius, R., Lundquist, I. & Thesleff, S. *Folia Morphol. (Praha)*, 29, 2, 186-8, 1981.

Partial purification and characterization of the components of the neutral ribonuclease II-inhibitor system of normal and dystrophic mouse skeletal muscle. Little, B.W. & Meyer, W.L. *Can. J. Biochem.*, 59, 3, 220-31, 1981.

Ongoing block of schwann cell differentiation and deployment in dystrophic spinal roots. Perkins, C.S., Bray, G.M. & Aguayo, A.J. *Brain Res.*, 227, 2, 213-20, 1981.

Increased calcium accumulation by brain mitochondria in dystrophic mice. Frosthalm, A., Baudry, M. & Rennet, W.F. *Brain Res.*, 210, 1-2, 437-40, 1981.

Plasma enzyme determinations in normal and dystrophic mice. Morgan, J., Shanahan, W. & Cohen, L. *Res. Commun. Chem. Pathol. Pharmacol.*, 31, 2, 341-56, 1981.

Control of abnormal guanine nucleotide concentration in dystrophic mouse muscle. Shuttlewood, R.J. & Griffiths, J.R. *Biochem. Soc. Trans.*, 9, 1, 74-5, 1981.

Developmental changes in glycopeptides synthesized by normal and dystrophic satellite cells in culture. Cossu, G., Pacifici, M., et al. *Exp. Cell Res.*, 132, 2, 349-57, 1981.

Immunologic function and cell surface antigen expression of lymphocytes of dystrophic mice. Ludwig, C.L., Kanellopoulos-Langevin, C., et al. *Cell Immunol.*, 59, 1, 138-50, 1981.

Necrotic extrafusal muscle fibers of the dystrophic mutant mouse: The ultrastructure of the myoneural junction. Ontell, M. & Haller, E. *Anat. Rec.*, 197, 4, 397-411, 1980.

Collagenase-releasable and -resistant cholinesterases in normal and dystrophic muscles. Sung, S.C. *Neurochem. Res.*, 5, 9, 935-41, 1980.

Membrane elasticity of erythrocytes from normal and dystrophic mice. Missirlis, Y.F., Vanderwel, M. & Brain, M.C. *Muscle Nerve*, 4, 2, 141-8, 1981.

Intracellular potassium activities in muscles of normal and dystrophic mice: An in vivo electrometric study. Charlton, M.P., Silverman, H. & Atwood, H.L. *Exp. Neurol.*, 71, 1, 203-19, 1981.

Fatty acid metabolism in skeletal muscle mitochondria from two strains of dystrophic mice. Martens, M.E. & Lee, C.P. *Can. J. Biochem.*, 58, 7, 549-58, 1980.

Ephaptic transmission between single nerve fibres in the spinal nerve roots of dystrophic mice. Rasminsky, M. *J. Physiol. (Lond)*, 305, 151-69, 1980.

Aberrant axon-schwann cell junctions in dystrophic mouse nerves. Rosenbluth, J. *J. Neurocytol.*, 8, 5, 655-72, 1979.

In vitro differentiation of satellite cells isolated from normal and dystrophic mammalian muscles. A comparison with embryonic myogenic cells. Cossu, G., Zani, B., et al. *Cell Differ.*, 9, 6, 357-68, 1980.

Skeletal muscle lipids in normal and dystrophic mice. Pearce, P.H. & Kakulas, B.A. *Aust. J. Exp. Biol. Med. Sci.*, 58, 4, 397-408, 1980.

Dystrophic mouse muscles have leaky cell membranes. Molak, V., Stracher, A. & Erlij, D. *Exp. Neurol.*, 70, 2, 452-7, 1980.

Esterase activity in the skeletal muscles of dystrophic and normal mice. Bianchi, R., Pagliacci, E., Spreafico, F. & Mussini, E. Biomedicine [Express], 33, 4, 116-9, 1980.

Animal models of muscle diseases. Part III: Compilation of therapeutic trials for hereditary muscular dystrophy. Cosmos, E. & Butler, J. Muscle Nerve, 3, 5, 427-35, 1980.

Effects of slow frequency electrical stimulation on muscles of dystrophic mice. Luthert, P., Vrbova, G. & Ward, K.M. J. Neurol. Neurosurg. Psychiatry, 43, 9, 803-9, 1980.

Surface density of T tubules in normal and dystrophic mouse muscle. Silverman, H. & Atwood, H.L. Exp. Neurol., 70, 1, 40-6, 1980.

Animal models of muscle diseases. Part II: Murine dystrophy. Cosmos, E., Butler, J., Mazliah, J. & Allard, E.P. Muscle Nerve, 3, 4, 350-9, 1980.

Characterization of ATPase in sarcoplasmic reticulum from two strains of dystrophic mice. Neymark, M.A., Kopacz, S.J. & Lee, C.P. Muscle Nerve, 3, 4, 316-25, 1980.

Skeletal muscle protein and amino acid metabolism in hereditary mouse muscular dystrophy. The role of disordered cyclic nucleotide metabolism in the accelerated alanine and glutamine formation and release. Garber, A.J., Birnbaumer, L., et al. J. Biol. Chem., 255, 17, 8325-33, 1980.

Skeletal muscle protein and amino acid metabolism in hereditary mouse muscular dystrophy. Accelerated protein turnover and increased alanine and glutamine formation and release. Garber, A.J., Schwartz, R.J., et al. J. Biol. Chem., 255, 17, 8315-24, 1980.

Animal models: What is their relevance to the pathogenesis of human muscular dystrophy? Harris, J.B. & Slater, C.R. Br. Med. Bull., 36, 2, 193-7, 1980.

Studies of muscular performance in normal and dystrophic subjects. Edwards, R.H. Br. Med. Bull., 36, 2, 159-64, 1980.

Skeletal muscle: Regeneration and transplantation studies. Sloper, J.C. & Partridge, T.A. Br. Med. Bull., 36, 2, 153-8, 1980.

CHICKENS

Enhanced functional ability in drug-treated dystrophic chickens: Trial results with indomethacin, diphenylhydantoin, and prednisolone. Hudecki, M.S., Pollina, C.M., Heffner, R.R. & Bhargava, A.K. *Exp. Neurol.*, 73, 1, 173-85, 1981.

Serum IgG levels in the Storrs strain of hereditary muscular dystrophic chickens. Sanders, B.G., Kline, K. & Morton, C.J. *Biochem. Genet.*, 18, 11-12, 1149-58, 1980.

Enzymatic activity of dystrophic chicken sarcoplasmic reticulum. Hanna, S., Kawamoto, R., McNamee, M. & Baskin, R.J. *Biochem. Biophys. Acta*, 643, 1, 41-54, 1981.

Endocytosis in skeletal muscles of dystrophic mice and chickens. Jirmanova, I., Libelius, R., Lundquist, I. & Thesleff, S. *Folia Morphol. (Praha)*, 29, 2, 186-8, 1981.

Creatine kinase isozyme transition in chicks with hereditary muscular dystrophy. Stewart, P.A., Percy, M.E., Chang, L.S. & Thompson, M.W. *Muscle Nerve*, 4, 2, 165-73, 1981.

Avian muscular dystrophy: Thyroidal influence on pectoralis muscle growth and glucose-6-phosphate dehydrogenase activity. King, D.B., King, C.R. & Jacaruso, R.B. *Life Sci.*, 28, 5, 577-85, 1981.

In vivo effects of protease inhibitors on chickens with hereditary muscular dystrophy. Hudecki, M.S., Pollina, C.M. & Heffner, R.R. *J. Clin. Invest.*, 67, 4, 969-74, 1981.

Phenytoin, methysergide, and penicillamine in hereditary muscular dystrophy of the chicken. Entrikin, R.K., Patterson, G.T. & Wilson, B.W. *Exp. Neurol.*, 72, 1, 82-90, 1981.

Intracellular concentration of elements in normal and dystrophic skeletal muscles of the chicken. Misra, L.K., Smith, N.K., Chang, D.C., et al. *J. Cell Physiol.*, 103, 2, 193-200, 1980.

The effects of dietary selenium and vitamin E on avian white muscle disease as measured by both chemical and physical parameters. Gill, T.A., Sundeen, G.B., Richards, J.F. & Bragg, D.B. *Poult. Sci.*, 59, 9, 2088-97, 1980.

Parallel regulation of acetylcholinesterase and pseudocholinesterase in normal, denervated and dystrophic chicken skeletal

muscle. Silman, I., Di Giamberardino, L., et al. *Nature*, 280, 5718, 160-2, 1979.

Animal models of muscle diseases. Part III: Comilation of therapeutic trials for hereditary muscular dystrophy. Cosmos, E. & Butler, J. *Muscle Nerve*, 3, 5, 427-35, 1980.

Electrical properties of muscle membrane and of neuromuscular junctions in normal and dystrophic chickens. Korenga, S. *JPN J. Physiol.*, 30, 3, 313-31, 1980.

Effect of leupeptin on protein turnover in normal and dystrophic chicken skeletal muscle cells in culture. Riebow, J.F. & Young, R.B. *Biochem. Med.*, 23, 3, 316-23, 1980.

Screening of antiserotonergic drugs with the genetically dystrophic chicken. Hudecki, M.S., Pollina, C.M., Bhargava, A.K. & Hudecki, R.S. *Arch. Neurol.*, 37, 9, 545-50, 1980.

Animal models: What is their relevance to the pathogenesis of human muscular dystrophy? Harris, J.B. & Slater, C.R. *Br. Med. Bull.*, 36, 2, 193-7, 1980.

Morphological changes in dystrophic muscle. Cullen, M.J. & Mastaglia, F.L. *Br. Med. Bull.*, 36, 2, 145-22, 1980.

Microtubules and Duchenne muscular dystrophy. Shay, J.W., Cook, J., Fuseler, J.W., et al. *Trans. Am. Neurol. Assoc.*, 104, 12-5, 1979.

HAMSTERS

Erythrocyte life-span in dystrophic hamsters. Toffelmire, E.B. & Boegman, R.J. *Can. J. Physiol. Pharmacol.*, 58, 10, 1245-7, 1980.

Nerve physiology in hamster dystrophy. Hunter, E.G. & Elbrink, J. *Proc. West Pharmacol. Soc.*, 24, 49-51, 1981.

Axonal transport in dystrophic hamsters. Boegman, R.J. & Wood, P.L. *Can. J. Physiol. Pharmacol.*, 59, 2, 202-4, 1981.

Cholinesterase in muscle of dystrophic hamsters (BIO-40.54). Henderson, N.S., Tweedle, C.D. & Kabara, J.J. *Neurochem. Res.*, 5, 12, 1221-30, 1980.

Growth of neonatal hamster skeletal muscle in culture. Tautu, C., Jasmin, G. & Solymoss, B.C. *Muscle Nerve*, 4, 2, 149-54, 1981.

Incorporation of amino acids into soluble and membrane protein fractions of dystrophic hamsters. Nicholls, D.M., Creasy, R.C., Chin-See, M.W., et al. *Biochem. J.*, 190, 2, 341-8, 1980.

Surface-membrane defects in muscular dystrophy. Pennington, R.J. *Biochem. Soc. Trans.*, 8, 6, 690-2, 1980.

Protein synthesis and degradation in skeletal muscle of normal and dystrophic hamsters. Li, J.B. *Am. J. Physiol.*, 239, 6, E401-6, 1980.

Animal models of muscle diseases. Part III: Compilation of therapeutic trials for hereditary muscular dystrophy. Cosmos, E. & Butler, J. *Muscle Nerve*, 3, 5, 427-35, 1980.

On the ultrastructure of primary cultures of normal and dystrophic hamster tongue muscle. Thakar, J.H., Thede, A. & Strickland, K.P. *Muscle Nerve*, 3, 4, 340-4, 1980.

Cobra venom cardiotoxins as probes of altered membrane structure in dystrophic skeletal muscle. Parker, C.J., Jr. & Hudson, R.A. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 100, 2, 746-52, 1981.

Animal models: What is their relevance to the pathogenesis of human muscular dystrophy? Harris, J.B. & Slater, C.R. *Br. Med. Bull.*, 36, 2, 193-7, 1980.

Tissue culture of dystrophic muscle cells. Thompson, E.J. *Br. Med. Bull.*, 36, 2, 181-5, 1980.

Morphological changes in dystrophic muscle. Cullen, M.J. & Mastaglia, F.L. *Br. Med. Bull.*, 36, 2, 145-, 1980.

Similar in vitro fatigue patterns of normal and BIO 40.54 dystrophic hamster extensor digitorum longus muscle. Kozachuk, W.E., Oteruelo, F.T. & Bressler, B.H. *Exp. Neurol.*, 65, 1, 29-41, 1979.

R A T S

A biochemical and ultrastructural study of skeletal muscle from rats fed a magnesium-deficient diet. Robeson, B.L., Martin, W.G. & Friedman, M.H. *J. Nutr.*, 110, 10, 2078-84, 1980.

Skeletal muscle: Regeneration and transplantation studies. Sloper, J.C. & Partridge, T.A. *Br. Med. Bull.*, 36, 2, 153-8, 1980.

RABBITS

Immunologic function and cell surface antigen expression of lymphocytes of dystrophic mice. Ludwig, C.L., Kanellopoulos-Langevin, C., et al. Cell Immunol., 59, 1, 138-50, 1981.

SWINE

Synthetic oligopeptide substrates: Their diagnostic application in blood coagulation, fibrinolysis, and other pathologic states. Huseby, R.M. & Smith, R.E. Semin. Thromb. Hemostas., 6, 3, 175-314, 1980.

[Methodic aspects of creatine-kinase-test (CK-test) in pigs] Bickhardt, K. & Richter, L. DTW, 87, 8, 296-8, 1980 (DE).

SHEEP

Trophic activity of sheep sciatic nerve extracts in skeletal muscle cultures from normal and dystrophic chick embryos: Failure of dystrophic muscle to respond. Johnson, D.D., Bailey, S. & Wenger, B.S. Exp. Neurol., 73, 2, 421-9, 1981.

An outbreak of white muscle disease in lambs born of ewes on a zero grazing system in natal. Bryson, R.W. & Zumpt, G.F. J.S. Afr. Vet. Assoc., 50, 3, 159-60, 1979.

Ⅱ. 筋ジストロフィー症動物の生産 と飼育管理方法の研究

1. 筋ジストロフィー症動物の生産・供給

水谷 誠^{*}, 江橋節郎^{**}, 斉藤宗雄^{***}

研究協力者 布谷鉄夫^{*}, 日置恭司^{***}

前年度に引き続き筋ジストロフィーニワトリおよびマウスを生産し、厚生省神経疾患研究委託費による各研究班へ供給した。

また本年度は、従来から供給していた筋ジストロフィーニワトリおよびマウスに加えて、各班から要望のあった筋ジストロフィーハムスターを、米国BIO Research Inc. より輸入し、各班員へ供給した。

1. 筋ジストロフィーニワトリの生産・供給

種卵の生産コロニーとして、筋ジストロフィー発症ラインNH-413の雄10、雌40、合計50羽および対照正常ラインNH-412の雄10、雌30、合計40羽を維持している。

前年度、生産コロニーの老令化により種卵の生産率が低下したため、これらのコロニーを更新した。しかしながら、前年度中に、全部の更新が行なえず、一部が今年度に延引した。このため、生産数は次第に向上しているが、本年度の種卵供給数は約6,000個で、次年度以降は7,000個以上を供給できるみとおしである。

2. 筋ジストロフィーマウスの生産

筋ジストロフィーマウスの生産コロニーとして約200匹の種マウスを維持し、年間約700匹の筋ジストロフィーマウスおよび約900匹の正常マウスを生産・供給した。

3. 筋ジストロフィーハムスターの供給

従来、本研究班では筋ジストロフィーニワトリおよび筋ジストロフィーマウスの生産・供給を実施してきたが、今年度は、新たに筋ジストロフィーハムスターを輸入、400匹を供給した。

なお、将来は当研究班において維持・繁殖することを検討する。

* (財)日本生物科学研究所

** 東京大学医学部

*** (財)実験動物中央研究所

2. 筋ジストロフィーチキンの飼育管理とその問題点

齊藤 宗雄*

研究協力者 松崎 哲也*

筋ジストロフィー症の研究の進展に伴ない、近年、筋ジストロフィー症チキン(筋ジスチキン)を使用する研究者が増えている。

一方、筋ジスチキンは胸筋が弱いため、一度倒れると自力では起きあがれない。また、感染症に弱く動物実験の場では、コクシジウム症と思われる病気によって、斃死するが多い。

このことは、筋ジスチキンをを用いた動物実験の障害となるばかりでなく、実験成績をしばしば狂わせる原因となる。

このような状況にかんがみ、我々は昭和54、55、56年にわたって、筋ジスチキンのいくつかの飼育を試みた。そこで、ここでは、それらの飼育管理を比較し、今後、筋ジスチキンをを用いた研究において、実験動物学の立場から解決されなければならない問題について考察した。

1. 筋ジスチキンのいくつかの飼育管理

筋ジスチキンの飼育管理は、維持・繁殖を目的としたものと動物実験を目的としたものに大別される。さらにそれらは、飼育施設の状況に応じて、コンベンショナルな飼育、SPF状態での飼育ならびにビニールアイソレータを用いた飼育が考えられる。以下、これらの飼育状況について説明する。

1) 繁殖、生産場の飼育管理

現在、筋ジスチキンの維持と生産は、山梨県八ヶ岳高原にある、財団法人日本生物科学研究所附属実験動物研究所でおこなわれている。(写真1, 2) ここでの筋ジスチキンの飼育施設は木造トタン屋根で、床は土間、換気扇のみで空調機は設置されていない。感染防御施設(例えばSPF動物舎)としては充分とはいえない。また飼育器材等の定期的な滅菌もおこなっていない。

しかしながら、この地域は周囲に人家は少なく、ニワトリの飼育場はない。東京からは比較的遠方であり外来者も少ない。飼料は施設内で製造し、水は井戸水である。動物は自家繁殖動物のみで、外部からの導入はほとんどなく、まれに搬入する資材は、隔離、消毒などを厳重におこなっている。

筋ジスチキンの生産は、このような飼育環境で7年間にわたって維持・繁殖が事故なくおこなわれている。これらのことは動物飼育施設の周辺環境が良く、外来者、搬入物品等に十分な注意を

* (財)実験動物中央研究所

払うことによって、コンベンショナルな施設でも、病気の感染を防ぎ、長期の飼育が可能なことを示している。

2) 動物実験施設での飼育管理

(1) 通常（コンベンショナル）の動物実験の場合

筋ジストキンをを用いた通常飼育室における動物実験は、各地の研究室で、いろいろな飼育実験がおこなわれている。そこで、ここでは、飼育技術者が信頼でき、飼育記録が明確で、途中飼育方法の改善をおこなった動物室の一例を示す。

i 改造前

飼育室は通常、白色レグホン種を用いた実験がおこなわれているニワトリ用飼育実験室であった。昭和54年10月より、筋ジストキンの飼育にその一角をあてた。飼育室は空調機付きで、温度、湿度ともコントロールされていた。飼育器材は筋ジストキン専用とし、他との共用は避けたが、滅菌はおこなわなかった。飼育者にはニワトリ係専任者がたずさわった。しかし、飼育室へは白色レグホンの実験も含めて不特定多数の実験者が常時出入りしていた。

筋ジストキンの実験は、研究班から供給された受精卵を、隣接した洗滌室に設置された孵卵器で孵化し、飼育室内に移し育雛した。実験用ケージには10週令で移した。

数回にわたっておこなわれた飼育実験では、孵化率の低下、ヒナの死亡、成鶏の下痢、血便が多発した。このような現象はコクシジウム症の典型である。

日本の産業用ニワトリのほとんどがコクシジウムに汚染されており、動物実験に使用されるニワトリも、その流用であることから、例外とはいえない。この動物室のコクシジウム汚染は濃厚で、使用前に動物室を消毒し、飼育器材を別けてみても、コクシジウムの伝播を防ぐことはできなかった。

ii 改造後

そこで、その動物室で飼育されているニワトリ（白色レグホンも含む）すべてを処分し、動物室ならびに洗滌室などを洗滌消毒し、飼育管理方法を根本的に改善した。

すなわち、飼育室は従来と同じであるが、飼育動物は筋ジストキンのみを収容し、飼育者は専任とするのみならず、実験者の入室も限定し、入室にあたっては専用の作業衣、履物を着けるようにした。オートクレーブを設置し、飼育器材の滅菌を定期的におこなうようにした。

その結果、その後、数回にわたっておこなわれた飼育実験では、ヒナの死亡、成鶏の下痢、血便などはなくなり、発育も良好で、コクシジウム症は排除されたと推定された。

(2) SPF動物施設における飼育実験の場合

実験動物分野で普及している、SPF動物施設（Barrier System と呼ぶこともある）では、外からの病原体の感染を防御するために、次のような飼育管理が成される。すなわち、導入される動物は、SPFとして信頼のおける動物を感染のない経路で搬入する。飼育器材はすべて、両扉の

オートクレーブを用いる。その方法は外側（汚染域）の扉を開け器材を入れ、蒸気滅菌後内側（清浄域）の扉を開け滅菌済器材を搬入する。飼育者ならびに実験者は汚染側の更衣室で全裸となり、シャワーを浴び、清浄側の更衣室で、滅菌済作業衣を着用して、清浄区域内に入室する。空気は、高性能（HEPA）フィルターを通し除菌され、温度20～23℃、湿度50～60%に調節されて送られる。飼育室の構造は気密で、壁、床、天井等は消毒がおこない易いものである。このような動物舎は、マウス、ラットを始め感染防御飼育室として広く利用されている。

そこで、この動物施設の1つの動物室を用い、筋ジスチキンの飼育実験をおこなった。

筋ジスチキンの飼育管理は次のようである。

受精卵は、輸送の影響を少なくするため、繁殖場より直接入手した。対象とした卵は、NH-412系20個、NH-413系60個である。

孵化は、昭和卵卵器研究所製P-008型卵卵器を用い、ホルマリン消毒後入卵した、検卵は4日目と10日目に行なった、発生枠には19日目に下した。

SPF動物室には、孵化直後のヒナを、滅菌輸送箱に入れ、バスボックスを通して搬入した。飼育器材はすべて滅菌又は消毒した。飼育者はニワトリ係専任とした。飼料は3Mrad γ 線照射済のものを用いた、水は水道水をそのまま与えた。搬入ヒナは、30日迄育雛器で飼育し、以後、中離用ケージに収容した。

その結果、2ヶ月令迄の飼育実験でヒナの死亡、下痢は全く見られず、発育も順調であった。

このようなことから、SPF動物舎においては、筋ジスチキンの飼育は可能であり、コクシジウム等の発生も防止できた。

(3) ビニールアイソレータによる、筋ジスチキンの飼育実験

無菌動物飼育装置（ビニールアイソレータ）は、外界からの感染を確実に絶つことのできる、簡易な飼育装置である。この装置は、1956年、P.C. Trexlerの考案によるものである。その概要は、軟質塩化ビニール製の120×60×60cmほどの大きさの袋（ビニール本体）に動物を収容し、空気は、細菌を完全に汚過できるフィルターを通して送り、同じ性能のフィルターを通して排出する。飼料、その他飼育器材は専用の特殊滅菌缶に入れ、高圧蒸気滅菌し、物品搬入口より術式に順って搬入する。飼育操作は、ビニール本体に密着した長い手袋を介しておこなう。

このようなビニールアイソレータは、長期にわたり、微生物感染を確実に絶つことができるので、無菌動物の飼育実験に広く用いられている。また、本体が軟質ビニールフィルムであるので、飼育する動物種や、実験目的によって種々の形のもを製作することも容易である。とくに、動物実験において、小数の動物を微生物感染から防止するには、大きさも適当で、価格も比較的安価であり、実験台サイドにも置けることから、筋ジスチキンの実験用飼育装置として適当であると考えられた。

従来、ニワトリ用アイソレータとしては、NIH, USAにおける白血病フリー卵採取用など、一般に大型のものが使用されている。我々は、実験用として、小型で取扱い易いことを目的として、筋ジスチキン用アイソレータを製作した。

試作したビニールアイソレータは、写真3, 4に示すものである。ビニール本体の大きさは120×90×90cmで、その底より10cmの位置に金網を敷いた。手袋は両側に2双、物品搬入口は、直径45cmのもの、30cmのもの2個を取付けた。フィルターは給気、排気とも同型の円筒型とした。ブローアは70Wのもので、換気回数は12回/時間である。

このアイソレータの使い方は、基本的にはマウス、ラット用アイソレータに準じた。但しビニール本体の滅菌にはエチレンオキサイドガスを用い、飼料は3Mrad r線照射滅菌した。

筋ジスチキンの飼育は次のように行なった。

受精卵は繁殖場より直接導入し、孵卵器には、ホルマリン消毒後入卵した。

ビニールアイソレータへは、孵化直前の卵を育雛用アイソレータのジャーミサイドトラップを通して搬入した。孵化のためにアイソレータの底に保温マットを敷いた。育雛はそのまま放飼いとし、給餌は孵化後2日目より、予めアイソレータ内に搬入してある、飼料を床にまいた。水はオートクレーブで滅菌したものを与えた。汚物処理は週2回、床に留った残余飼料および糞尿をすて、新しい紙と交換した。(床には滅菌新聞紙を敷いてある。)

前述のニワトリ用アイソレータには、育雛30日目に移した。アイソレータ内では筋ジスチキンは放飼いとし、飼料は滅菌済のものを給餌器で、水は滅菌したものを給水器で与えた。また爪と嘴はビニール製本体が破られるのを防ぐために、ニッパーで切断した。

その結果、ビニールアイソレータ内で筋ジスチキン18羽を孵化し、育雛2ヶ月迄16羽を得ることができた。これらのチキンの発育は良好で、微生物的には極めて清浄であった。

このように、筋ジスチキンはビニールアイソレータで飼育できることが判った。この飼育方法は微生物統御が確実であることから、動物実験用飼育に利用されるばかりでなく、マウス、ラットなどの大量生産に応用されているように、繁殖、生産群の感染事故対策の一環として、原種維持への応用も考えられる。

以上、筋ジスチキンについて、いくつかの飼育方法を試みた。その結果、いずれの飼育方法によっても、①汚染チキンと同居しない、②汚染した作業者と接しない、③飼育器材は熱による消毒あるいは滅菌をおこなうなど、基本的な感染防御の心づかいがおこなわれれば、環境が、コンベンショナル動物室、SPF動物室あるいはビニールアイソレータであっても、正常な発育が得られる。

動物は、ヒト同様呼吸し、毎日エサを食べ水も飲む、糞尿も排泄する。1日1回動物の状態を観察するなどの心づかいが、飼育管理をとどこおりなく行なうために最も重要なコツである。

2. 筋ジスチキン飼育管理の今後の問題点

筋ジスチキンを用いた動物実験は、従来実験動物分野でとられている、微生物感染を防止する方法により、飼育はとどこおりなくおこなえることが判った。

とはいえ、筋ジスチキンを実験動物としてみた場合、改良すべき点が多い。飼育器具器材についてみると、現在用いられているものは、大量の飼育を目的とした、畜産用のもので、少数の動物を

いくつかの群で扱うような、実験動物用として造られたものは少ない。今後、孵卵器、育雛器、成鶏ケージならびに飼育装置の開発、改良が待たれる。

一方、孵化率の問題もある。表に、前述の飼育実験における入卵数に対する得られたヒナの数（孵化率）と、5週令迄の育雛率を示した。育雛率は90%前後でいづれの飼育場でも良好であった。

飼育場間の孵化・育すう成績の比較

	入卵年月	系 統	入卵数	孵化数	孵化率	5週令育すう率
繁 殖 場 (日生研)	56. 4	NH-412	59個	28羽	47.5%	89.3 %
	"	NH-413	45	24	53.3	79.2
	10	GSN	35	15	42.8	93.3
共 同 研 究 (実中研)	56. 7	NH-412	20	13	65.0	92.3
	"	NH-413	60	28	46.7	96.4
	10	GSN	49	18	36.7	88.4
S 機 関	56. 9	NH-412	40	17	42.5	100.0 (7日令)
	"	NH-413	70	28	40.0	100.0 (")
	54. 10	NH-412	36	25	69.4	※92.0 (")
		NH-413	60	19	31.6	※89.4 (")

※ 下痢多発、治療剤使用

但し下痢がみられた場合もある。しかしながら、筋ジスチキンの孵化率はいづれの場合でも40%前後で極めて悪い。これは繁殖場においても同程度で、筋ジスチキン自体の問題ともいえる。

ニワトリ受精卵の孵化率は、採卵鶏の年令、採卵の時期ならびに採卵後入卵迄の期間や、その保存状況に著しく影響を受けると言われている。とくに、高温や振動の影響は大きい。そこで、筋ジスチキン研究班の受精卵の配布経路を省りみると、山梨県小淵沢で採卵された卵は、15℃の冷室に保存され、2週間に1回トラックで東京本郷の一時抑留所に届けられる。ここに保存された卵を、研究者がいろいろな輸送手段で各地の研究機関に引きとり、その後孵卵器に入卵している現状である。この間、短時間で振動も少ない場合の障害は比較的少ないが、長距離を輸送する場合の障害は、かなり大きいものと予想される。

孵化率30%の場合、100個の卵の分与があっても、得られるヒナは30羽で、オスメスを別けた場合、15羽前後の実験群が得られるに過ぎない、この状況にコクシジウム等の感染症が発生すると、実験そのものがむづかしくなる。

今後、生産された筋ジスチキン受精卵を動物実験に有効に使うためには、輸送によるロス、孵化技術によるロス、性差のロスをなくすべく、すでに畜産の分野などで行なわれている、孵化直後のヒナの配布が検討されるべきである。なお、ニワトリの輸送は、孵化直後のヒナが最も強いと言われている。

筋ジストロフィー症研究進展のために、今後、実験動物としての筋ジスチキンの検討が望まれる。

文 献

- 1) 近藤恭司：実験動物としてのニワトリ。実験動物学各論，田嶋嘉雄編，朝倉書店，1972。
- 2) 水谷誠：わが国における筋萎縮症ニワトリの繁殖。実験動物，26(3) 288~289，1977。
- 3) 前島一淑，田嶋嘉雄，野村達次：Germfree, Gnotobiotte ならびにSPF。実験動物学総論，田嶋嘉雄編，朝倉書店，1970。
- 4) Trexler, P.C. and Reynolds, L.I. : Flexible film apparatus for the rearing and use of germ-free animals. Applied Microbiology, 5, 406-412, 1957.
- 5) 齊藤宗雄：ビニールアイソレータとその使用法。クリアニュース，№8，1，1969。
- 6) 齊藤宗雄：筋ジストロフィーニワトリ飼育用アイソレータの開発。昭和54，55年度厚生省神経疾患委託研究「筋ジストロフィーニワトリの生産・開発に関する研究」報告書。

