食虫目スンクスにおける
自然発症モデル動物の開発

大野民生

名古屋大学図書
和 1203392

目次

第Ⅰ章　序論

１．自然発症モデル動物の必要性　1

２．スンクスにおける自然発症モデル開発の意義　2

３．本研究の目的と構成　3

付表　5

付図　6

第Ⅱ章　行動異常モデルの開発

（１）　行動異常突然変異"waltzing"の遺伝解析ならびに行動，繁殖特性の把握とWZ(walting Suncus)ラインの育成

１．目的　7

２．材料と方法　7

３．結果　9

４．考察　１０

（２）　行動異常の原因についての組織学的研究

１．目的　１２

２．材料と方法　１２

３．結果　１３

４．考察　１３

付表　１５

付図　１８

第Ⅲ章　糖尿病モデルの開発

（１）　糖尿病を多発するEDS(early-onset diabetes in Suncus)
ラインの育成
１．目的　２８
２．材料と方法　２９
３．結果　３０
４．考察　３２
（２）　EDSラインの糖尿病発症個体の病態解析
１．目的　３４
２．材料と方法　３５
３．結果　３６
４．考察　３７
付表　４２
付図　５０
第Ⅳ章　新たな遺伝標識の開発と近交系育成の試み
（１）　新たな毛色変異"red-eyed dilution"
１．目的　５９
２．材料と方法　５９
３．結果　６１
４．考察　６３
（２）　巻き毛(ch),クリーム毛色(cr),赤色眼淡毛色(rd)遺伝子を
ホモ型に持ちスクラーゼ活性欠損個体(suc/suc)を分離する
TESS(tester in Suncus)ラインの育成
１．目的　６４

２．材料と方法　６５

３．結果と考察　６５

（３）　遺伝的に大きく分化している2地域を起源とする
ラインからの近交系育成の試み

１．目的　６７

２．材料と方法　６７

３．結果と考察　６８

付表　６９

付図　７４

第Ⅴ章　総合論議　８２

第Ⅵ章　総括　８４

謝辞　８８

引用文献　８９

第Ⅰ章　序論

1．自然発症モデル動物の必要性

現在、モデル動物を使用した研究は、生物学や医学の分野で重要な役割を果しており、今後もその必要性は増加してゆくと考えられる。モデル動物は使用目的により、ヒトや動物の生体機構の解明を目的とする生物学的モデル(生物機能モデル)と、ヒト疾患の原因究明や治療法の確立を目的とする疾患モデル(病態モデル)に大別されている。またそれらは作出方法から、実験的感染や薬物投与等の処置により人為的に類似の病態を作り出す実験的モデルと、遺伝的に発現する形質を利用する自然発症モデルに分類され、最近では遺伝子工学の技術を応用した遺伝子導入によるモデル動物も作成されている。そのなかでも自然発症モデルは、疾患モデルとして利用される場合、モデル動物を開発する必要性の高いとされるヒト疾患の多くが、遺伝的要因を背景に発症することが多いため、病因の解明において有効であること、また生物学的モデルとして利用される場合、異常形質について遺伝子発現のレベルでの解析が可能であることから、その重要性は広く認識されている(辻,1986)。

疾患モデル動物を用いた研究の最終的な目標は、その結果のヒトへの外挿である。しかし、ヒトと実験動物がそれぞれの生物学的特性を有する以上、両者に全く同じ病態が出現するとは考え難いうえ、まして一種類のモデル動物にヒト病態の全容を期待することはできない(松尾ら,1989)。したがって、ヒトへの外挿の精度を高めるためには、複数のモデル動物から得られた実験結果を比較生物学的に検討し、そこに存在する普遍的な特性を明確にすることが重要である。正常生理機能についても異常形質(病態)についても、モデル動物の種類が豊富であればあるほど、その形質の本質につ

いてより詳細な比較生物学的研究を行うことができるため、新しいモデル動物を開発することの重要性は極めて高い。

2．スンクスにおける自然発症モデル開発の意義

現在使用されているモデル動物の大多数は、小型で取り扱いやすく繁殖力に優れるマウス,ラットをはじめとしたげっ歯目の動物種で占められている。モデル動物のなかで、特にマウスは高い遺伝的変異性を背景として、多数の特徴ある系統の育成と変異形質の発見,蓄積により、染色体上に2000以上の遺伝子がマッピングされ、発現される諸形質について個体レベルから分子(遺伝子)レベルまで遡って研究できる段階にある(森脇,1993)。しかし、先に述べたようにヒトとマウスの間には生物学的な種差が存在するため、マウスのモデルから得た実験の結果を、すべてヒトに外挿することができるわけではない。したがって、マウス(げっ歯目)とは異なる生物学的特性を有する別の動物種においてもモデル動物を開発し、それらの間で十分な比較研究を行うことが重要であると考えられる。

スンクス(Suncus murinus)は食虫目トガリネズミ科に属する小型哺乳動物であり、げっ歯目の実験動物群とは系統分類学上遠縁にあたり、それらとは異なる生物学的特性を有している動物種として注目され実験動物化が開始された(織田ら,1983)。スンクスの分布は南アジア,東南アジアを中心に東アフリカから日本までの広い地域におよび、その野生集団には成体体重(Ishikawa et al.,1989),染色体数(Yoshida,1982),mtDNA(Yamagata et al.,1990)等に大きな地理的変異が存在している。そこで、地理的遺伝変異を実験室内で保持するため、幾つかの採集地域別のライン(実験室系統)が育成されてきた(Figure 1)。その過程で、スンクスの様々な生物学的特性が明らかに

されて(近藤,1985)広い分野の研究に使用されるようになり、最近ではモデル動物としての研究も行われるようになってきた(Table Ⅰ-1)。しかし、マウス,ラットのモデルを使用した研究の多くが、同種内で異常形質と正常形質を比較して得た情報からヒトの正常生理機能や病態の解明を試みているのに対し、スンクスにおいては、あるヒトの形質とそれに類似したスンクスの正常形質とを直接比較している点で大きく異なっている。これはスンクスがげっ歯目の動物とは異なる生物学的特性を有していることに着目し実験動物化されたことに加え、実験動物化の歴史が浅いため遺伝的異常形質の発見,蓄積が十分でなく、同種内での異常形質と正常形質の比較を行う段階になかったことに原因があると考えられる。しかし、スンクスの実験動物化から20年以上経過し、最近ではモデル動物として利用できる可能性がある異常形質がライン内に出現してきた。スンクスにおいて遺伝的異常形質を利用した自然発症モデルを開発することは、実験動物としてマウス,ラット等のレベルに一歩近づくことを意味し、スンクスの実験動物としての存在価値を高めることになると考えられる。

３．本研究の目的と構成

本研究では、実験動物育種学の立場から、新たな実験動物種として開発された食虫目スンクスを、より利用価値の高い実験動物として発展させることを目標とし、ライン育成の過程で偶然発見された遺伝的変異形質について、その形質の解析とライン育成を行った。なかでも、特に自然発症モデルを開発することを目的とし、その可能性を有する遺伝的異常形質に着目し研究を行った。

まず、第Ⅱ章では旋回,首振り,多動などの行動異常を示す突然変異"waltzing"の遺伝解析と繁殖,行動の特徴ならびにWZ(waltzing Suncus)ラインの育成の結果を示し、

更にその行動異常モデルとしての可能性について考察する。

次に、第Ⅲ章では若年型発症のインスリン非依存型糖尿病(NIDDM)を高頻度に発症するEDS(early-onset diabetes in Suncus)ラインの育成の育成の結果を示し、更に糖尿病発症個体の病態解析に基づき、EDSラインの糖尿病モデルとしての有用性について考察する。

また、第Ⅳ章では、新たな毛色突然変異遺伝子rd(red-eyed dilution)の遺伝解析,4種類の突然変異遺伝子を保有するTESS(tester in Suncus)ラインの育成,近交系育成の試みについて論じる。

Table Ⅰ-1　スンクスの生物学的特性を利用したモデル動物としての研究

モデル	概要	文献
毛包脂腺系腫瘍	皮膚癌と異なり毛包と皮脂腺の両方への分化がみられる皮膚腫瘍で、老齢の雄個体で観察される。	Matsuyama and Suzuki (1982)
肝障害(脂肪肝)	肝臓のトリグリセライドの汲み出し機構に必要なアポ蛋白Bの合成分泌に異常があるため、24時間の絶食により脂肪肝となる。	Yasuhara et al. (1991[a]) Yasuhara et al. (1991[b]) Ohama et al. (1993)
動揺病(おう吐)	小型哺乳動物では珍しく単純な加速度刺激により、短時間でおう吐する。	Ueno et al. (1987) Ueno et al. (1988)
ストレス負荷	ストレス応答に関与する副腎でのカテコラミンの代謝が昂進している。	Maruoka et al. (1989) Yazawa et al. (1989)
スクラーゼ活性欠損	小腸の二糖類分解酵素スクラーゼ活性が欠損しており、スクロースを与えると脱水症状を呈する。	Oda et al. (1991) Yokota et al. (1992)

捕獲地	'75	'80	'85	'90	ライン名	文献
バングラデシュ (Mymensingh)			――	――	BAN	Ishikawa et al. (1987)
ネパール (Kathmandu)				――	KAT	
日本 (長崎)	――	――	――	――	NAG	織田ら (1976)
(那覇)			――	――	OKI	Ohno et al. (1992)
(多良間島)			――	――	TR	織田ら (1989)
(徳之島)		――	――	――	TKU	

Figure I-1 スンクスの採集(捕獲)地域別ラインの一覧表

第II章　行動異常モデルの開発

（1）　行動異常突然変異"waltzing"の遺伝解析ならびに行動,繁殖特性の把握とWZ(waltzing Suncus)ラインの育成

1．目的

神経系の機能障害を呈する突然変異形質は、多くの場合行動異常を伴うため発見しやすく、マウスでは多数の突然変異遺伝子が発見,報告されている(Sidman et al., 1965, Green,1989)。そして、それらの多くはヒトの脳神経系の疾患に対する疾患モデルや、脳神経系の未知の機能を探るための生物学的モデルとして研究に利用されている(辻,1986)。

1988年、左右方向への旋回行動,水平方向への首振り行動,多動傾向を主徴とする行動異常を示す雄2個体を発見した。その後、行動異常雄個体の子孫に、同様の形質を示す個体が多数出現し(Figure II-1)、行動異常形質が遺伝的要因により引き起こされていることが強く示唆された。

本研究では、行動異常形質の遺伝解析と行動,繁殖の特徴について調査し、その結果をもとにラインの育成を行った。

2．材料と方法

1) 起源と交配実験

1987年9月、沖縄県宜野湾市で捕獲された野生雄1個体とNAGライン(織田ら,1976)の雌個体との交配より得られた雌個体(F1)を、先の野生雄個体へ戻し交配したところ、

同腹4個体中の雄2個体が左右方向への旋回行動,水平方向の首振り行動,著しい多動傾向を示した。更に、この行動異常雄2個体をF1雌個体に戻し交配したところ、正常に繁殖し、これらの交配から得られた13個体(雄10,雌3)のうち6個体(雄4,雌2)が同様の行動異常を示した(Figure II-1)。この結果から、行動異常形質は遺伝的で、かつ常染色体性単一劣性遺伝様式をとる可能性が予想された。そこで、行動異常個体と過去に行動異常の出現例のないNAGラインの個体を用いて、以下の5種類の交配 (1) NAG × Mutant, (2) F1(NAG × Mutant) × F1(NAG × Mutant), (3) F1(NAG × Mutant) × Mutant, (4) F1(NAG × Mutant) × NAG, (5) Mutant × Mutant を行い、次世代での行動異常個体の出現頻度より遺伝様式の推定を試みた。交配タイプ(1),(3),(4)については正逆交配を行った。

2) 行動観察

交配実験で得られた全個体について、少なくとも生後10日,15日,20日(離乳時),60日齢において、旋回行動,首振り行動,多動傾向等行動異常の有無を調査した。また、生後10日,15日齢ではスンクスの母子間で特徴的に観察されるキャラバン行動(Tsuji and Ishikawa,1984)についても観察した。生後3日,5日齢での行動異常の観察は、初産時の母親に行動観察による過度のストレスを与え、仔が食殺されるのを避けるため、経産雌においてのみ行った。

3) 繁殖能力の調査

行動異常雄個体が妊性を有していることはFigure II-1から明確である。したがって、特に雌の妊性および哺育能力について調査することとし、交配実験の際、妊娠,出産した全雌個体について、妊娠期間(同居させた雌雄を分離した日を妊娠0日とした出産日までの日数),産仔数(生後10日,20日齢),離乳率(生後10日齢の産仔数／生後20

日齢の産仔数)を調査し、20日齢(離乳時)では仔の体重についても測定した。

4) 飼育管理

動物は温度25±2℃,照明14L10D,湿度無調節のコンベンショナルな飼育室内で、内部に木製のチップを入れ、巣材として細切りのペーパータオルと木製のネストを備えたプラスチックケージに単飼した。水と基礎飼料としてのペレット状の養鱒用飼料(日本配合飼料)は自由摂取させ、副食として鶏頭ミンチまたはゆで卵を隔日給与した。交配実験には、生後60日齢以上の個体を使用し、一晩ないし二晩同居の対交配により行った。

3．結果

1）遺伝解析

交配実験の結果をTable II-1に示した。交配タイプ(1),(2),(3),(4),(5)における行動異常個体の出現頻度は、それぞれ0%,25%,51%,0%,100%であり、行動異常形質が、完全な浸透度を有する常染色体性単一劣性遺伝子により支配されていると仮定したときの出現頻度に極めて良く一致していた。

2）行動特性

行動異常を呈する成体は、左右方向への旋回行動(Figure II-2),水平方向の首振り,顕著な多動傾向を示すため容易に識別できた。ただし、睡眠,休息,飲水,摂餌,咀嚼等の際には行動異常を示さなかった。首振り行動については生後3～5日齢から観察された。また、旋回行動と多動傾向については生後7～8日齢から観察され始め、その後歩行能力の向上に伴い顕著化した。旋回の方向は一定しておらず、突然逆方向へ旋回することもしばしば観察されたが、よろめきや斜頭は伴わなかった。また、行動異常個

体は尾を持ってぶら下げると、体をさかんにくねらせるため(Figure II-3)、生後1週齢以前の行動異常個体の識別には極めて有効であった。ただし生後2週齢以降、行動異常が激化することはなく、行動異常形質は非進行性であった。行動異常個体を泳がせると、手足を激しく動かすが、頭部を水面上に保持することができなかった。行動異常の母親と正常の仔,正常の母親と行動異常の仔の間でのキャラバン行動は観察されたが、正常の母仔間での場合と比較して解除されやすい傾向があった。行動異常の母仔間では、キャラバン行動はほとんど観察されなかった。

３）繁殖能力

Table II-2に遺伝子型別の妊娠期間,産仔数,離乳率を示した。どの項目についても遺伝子型の間に有意差は認められず(t-検定)、行動異常雌個体が正常の繁殖能力を有することが明らかとなった。しかし、食殺は正常雌個体では観察されないが、行動異常雌個体ではしばしば観察され、その頻度は約21%(6/28)であった。

Table II-3に3種の異なる交配タイプより得られた仔の生後20日齢の体重を示した。母親あるいは仔の行動異常の有無にかかわらず、雌雄共に体重に有意差は認められなかった。以上の結果から、行動異常の母親の哺育能力と、行動異常の仔の発育は正常であることが判明した。また、離乳後の行動異常個体の生育力にも重大な障害は認められなかった。ただし、同腹内に行動異常個体と正常個体が同時に出現した場合の離乳時体重の分布では、行動異常個体は正常同腹個体に比べて体重がやや少ない場合が多く、競争条件下での行動異常個体の生育力は僅かに劣る傾向にあった(Figure II-4)。

４．考察

交配実験の結果、行動異常形質は、完全な浸透度を有する常染色体性単一劣性遺伝子により支配されていることが判明した。そこで、行動異常形質を"waltzing"と命名し、遺伝子記号wzを提唱した。この形質が発見された経緯(Figure II-1)と遺伝様式から、沖縄で捕獲された1匹の野生雄個体がwz遺伝子のキャリアー(wz/+)であったと考えられる。交配実験を行う過程で、正常個体にはすべてNAGラインの個体を使用したため、この集団の遺伝的背景は、NAGラインのそれに急速に近づいたと推定されるが、行動異常形質は全く変化しなかった。したがって、wz遺伝子の発現は遺伝的背景の変化にほとんど影響されないと考えられる。

約20%の行動異常雌個体は出産時に仔を食殺したが、これを除けば、行動異常個体は雌雄ともほぼ正常な繁殖能力,生育力を有していた。そこで、交配実験から得た行動異常(wz/wz)14個体(雌9,雄5),正常(wz/+)8個体(雌4,雄4)とNAGラインの雌1個体を起源として、毎世代30個体以上から成る閉鎖集団WZ(waltzing Suncus)ラインを育成した。WZラインは行動異常個体と正常個体が毎世代分離して出現するように、wz遺伝子を約75～80%の遺伝子頻度で維持しながら、現在第10世代に達している。

行動異常個体(wz/wz)は、旋回行動の他に、尾を持ってぶら下げると、体をさかんにくねらせたり、水中では頭部を水面上に安定して維持できないなど、平衡感覚に障害があることがまず疑われた。マウスでは1965年までに、シェイカー・ワルツァー行動と呼ばれる旋回,首振り,多動等の行動異常を示す突然変異遺伝子が30種以上報告されており、それらのほとんどに内耳の形態異常が認められている(Sidman et al., 1965)。本研究におけるスンクスの行動異常は、マウスのシェイカー・ワルツァー行動に極めて類似していることと、行動異常は少なくとも生後3日齢から生涯安定して観察されることから、この行動異常が内耳の先天奇形によるものである可能性が考えら

れた。

（２）　行動異常の原因についての組織学的研究

１．目的

マウスではシェイカー・ワルツァー行動を示す突然変異遺伝子が40種以上報告されており、それらのうち組織学的研究の行われた大半に、内耳の形態異常が観察されている(Green,1989)。また、最近発見された内耳の形態異常を伴うシェイカー・ワルツァー行動を示すマウスは、内耳の形態形成について分子レベルで研究するためのモデルになるのではないかと期待されている(Crenshaw et al.,1991, Ting et al., 1994)。前節で述べたように、"waltzing"スンクスはシェイカー・ワルツァー行動に酷似した行動異常を呈するため、行動異常の原因として内耳の先天奇形が予想された。本研究では内耳と小脳の形態について組織学的な観察を行ない、行動異常の原因となりうる形態異常の有無を調べた。

２．材料と方法

行動異常個体(wz/wz)と正常個体(wz/+)の交配から得られた生後3日齢の個体を、行動異常の有無によって行動異常個体(wz/wz)と正常個体(wz/+)に分け、各2個体づつをエーテル深麻酔下に、左心室から燐酸緩衝10%ホルマリンによる灌流固定を行った。同固定液にEDTAを加えた溶液で脱灰後、パラフィン包埋し、10μmの完全連続矢状断と横断切片を作成した。切片はHE染色を施し、三次元立体構築ソフトOZ(ライズ社製)により、PC-9801RSパーソナルコンピューター上で三次元立体画像を作成した。トレ

ースは、内耳の膜迷路の輪郭,前・後・外側半規管膨大部稜,前庭・蝸牛神経節について行った。また、同標本により各半規管膨大部稜,卵形嚢斑,球形嚢斑,各神経節の形態の組織学的観察も合せて行った。また、中枢神経系についても前述の方法で固定後10μmの完全連続横断切片を作成し、クリューバー・バレラ染色及びクレジール紫染色を施し、光学顕微鏡下で組織像の観察を行った。

3．結果

行動異常個体(wz/wz)と正常個体(wz/+)の内耳の三次元立体構築像をFigure II-5に示した。行動異常個体(wz/wz)の前半規管の一部が、切片作成の際に人工的に壊れてトレースできなかったため、その部位については立体像を構築できなかったが、内耳の輪郭,各半規管膨大部稜,各神経節の大きさについて、行動異常個体(wz/wz)と正常個体(wz/+)の間に違いは観察されなかった。行動異常個体の半規管膨大部稜,卵形嚢斑,球形嚢斑をFigure II-6に、前庭神経節をFigure II-7に示した。観察を行った行動異常個体の内耳のすべての組織に、形態学的な異常は認められなかった。行動異常個体の小脳の組織像をFigure II-8に示した。内耳と同様に、小脳にも形態学的な異常は観察されなかった。

4．考察

シェイカー・ワルツァー行動を示す多数の突然変異マウスでは、半規管や蝸牛を中心に様々な部位で、比較的強度の形態異常が観察されている(Steel and Bock,1985)。しかし、行動異常スンクス("waltzing")の内耳では形態異常が全く観察されず、シェイカー・ワルツァー行動を示す突然変異マウス群とは明らかに異なっている。すなわ

ち、"waltzing"スンクスの行動異常は、内耳の形態異常を伴わない別の原因に起因していると推定される。"waltzing"スンクスの行動異常は、遺伝的背景の影響を受けない浸透度の完全な単一劣性遺伝子により支配され、かつ内耳や小脳に形態形成の異常が全く認められないことから、行動異常が神経系の物質的異常、すなわち神経伝達物質等の合成放出や受容機構に関与する物質の異常に起因している可能性が高いと考えられる。

ラットの神経薬理学的研究では、脳内へのドーパミン等の神経伝達物質の投与により旋回行動等の異常行動を引き起こすことができるとの報告(Pycock,1980)があり、物質的異常によってシェイカー・ワルツァー行動が誘起され得ることを示している。また、最近報告されたシェイカー・ワルツァー行動を示すマウスでは、線条体のドーパミンレセプター濃度の上昇が認められるが、内耳や小脳の形態学的な異常は全く観察されていない(Ratty et al.,1990)。それゆえ、このマウスの行動異常は中枢神経系の物質的異常に起因していると考えられている(Fitzgerald et al.,1992)。

"waltzing"スンクスのモデル動物としての可能性について検討するには、脳のGABA,セロトニン,ドーパミン等の神経伝達物質やその代謝物質、あるいはそれらレセプターの濃度測定,免疫組織化学等を行い、行動異常が具体的にどの物質系の異常に起因しているかを特定する必要がある。もし、行動異常スンクスにおいて、行動異常の原因となる物質の異常が明らかとなれば、脳の行動制御系を解析する有用なモデルになると考えられる。

Table II-1 Segregation of the waltzing shrews in the five mating types at day 10 after birth

Crosses (Presumed genotypes)	No. of progeny	Progeny phenotypes		Expected ratio[a]	χ^2-Value (Probability)
		Normal	Waltzing	Normal:Waltzing	
(1) NAG (+/+) × Mutant (wz/wz)	63[b]	63	0	1 : 0	—
(2) F1[c] (wz/+) × F1[c] (wz/+)	40	30	10	3 : 1	0 (P>0.99)
(3) F1[c] (wz/+) × Mutant (wz/wz)	39[b]	19	20	1 : 1	0.0256 (0.80<P<0.90)
(4) F1[c] (wz/+) × NAG (+/+)	24[b]	24	0	1 : 0	—
(5) Mutant (wz/wz) × Mutant (wz/wz)	34	0	34	0 : 1	—

a) based on an autosomal recessive inheritance

b) pooled values over the reciprocal crosses because of no significant difference between them

c) individuals from the type (1) cross

Table II-2 Gestation period, litter size and weaning ratio. Comparison among the different maternal genotypes at the wz locus

Maternal genotypes	No. of litters	Gestation period Mean ± SD	Litter size[a] Mean ± SD	Percentage of weaning ratio[b]
wz/wz	22	30.6 ± 0.7	2.8 ± 1.0	96.8 (60/62)
wz/+	30	30.2 ± 0.9	3.3 ± 0.8	99.0 (98/99)
+/+	18	30.7 ± 1.1	2.9 ± 0.8	100.0 (52/52)

a) observed at day 10 after birth

b) proportion of total numbers of youngs weaned (day 20 after birth) to those of observed at day 10 after birth

Table II-3 Body weight (g) of progeny at day 20 after birth

Parents (genotypes) Female × Male	Female n[a]	Female Mean ± SD	Male n[a]	Male Mean ± SD
wz/wz × +/+[b]	10	25.36 ± 4.60	5	32.81 ± 3.61
+/+[b] × wz/wz	18	25.26 ± 3.77	18	30.85 ± 5.78
wz/wz × wz/wz	7	24.30 ± 4.49	11	29.13 ± 5.59

a) number of shrews weighed

b) NAG shrews were used

Explanation of Figures

Figure II-1 The pedigree of the waltzing shrew family initiated from the wild shrew captured in Ginowan city, Okinawa. Open squares and circles indicate normal males and females, and solid squares and circles indicate waltzing males and females, respectively.

Figure II-2 An adult waltzing shrew running in circles in both directions (A, B).

Figure II-3 Normal (wz/+) and waltzing (wz/wz) pups in the same litter were held up by the tail at day 5 after birth. (A) shows stretching in a normal pup, and (B) twisting in a waltzing one.

Figure II-4 Distributions of body weight of the normal and waltzing shrews in respective litters at day 20 after birth. Open squares and circles indicate normal males and females, and solid squares and circles indicate waltzing males and females, respectively. Coupled marks show littermates. Litters segregating both waltzing and normal females were depicted in this figure. Waltzing females show obviously a small body weight in comparison with their normal female littermates.

Figure II-5 Three dimensional reconstructions of the inner ear. Red parts show the spiral and vestibular ganglia. Yellow, green and blue parts show crista ampullaris of the lateral, anterior and posterior ducts, respectively.

(A) Right side inner ear of waltzing (wz/wz) shrew. Antero-lateral view of the right side.

(B) Left side inner ear of normal (wz/+) shrew. Antero-dorso-medial view of the right side.

a: lateralis duct, b: posterior duct, c: anterior duct, d: cochlea, e: vestibulum.

Figure II-6 Photomicrograph of a sagittal section of the inner ear in the waltzing (wz/wz) shrew. HE stain.

(A) Vestibulum. Normal maculae and cristae are shown. (×94)

(B) Crista amupullaris of the posterior duct. Sensory cells and cupula are normal. (×190)

(C) Macula. Size, arrangement and density of the sensory cells and statoconia are normal. Space between the cell layer and statoconia is artificial structure. (×944)

Figure II-7 Photomicrograph of the vestibular ganglion in the waltzing (wz/wz) shrew. Size, shape and cell arrangement are normal. HE stain. (A; ×190, B; ×944)

Figure II-8 A transvers section through the medulla oblongata and the cerebellum in the waltzing (wz/wz) shrew.

(A) Size, shape and lobular formation of the cerebellum are normal. Kluever-Barerra Stain. (×9)

(B) Thickness of laminae, cell arrangement and Purukinje cells are normal. Cresyl violet stain. (×94)

a: molecular layer, b: Purukinje cell layer, c: granular layer, d: medullar matter.

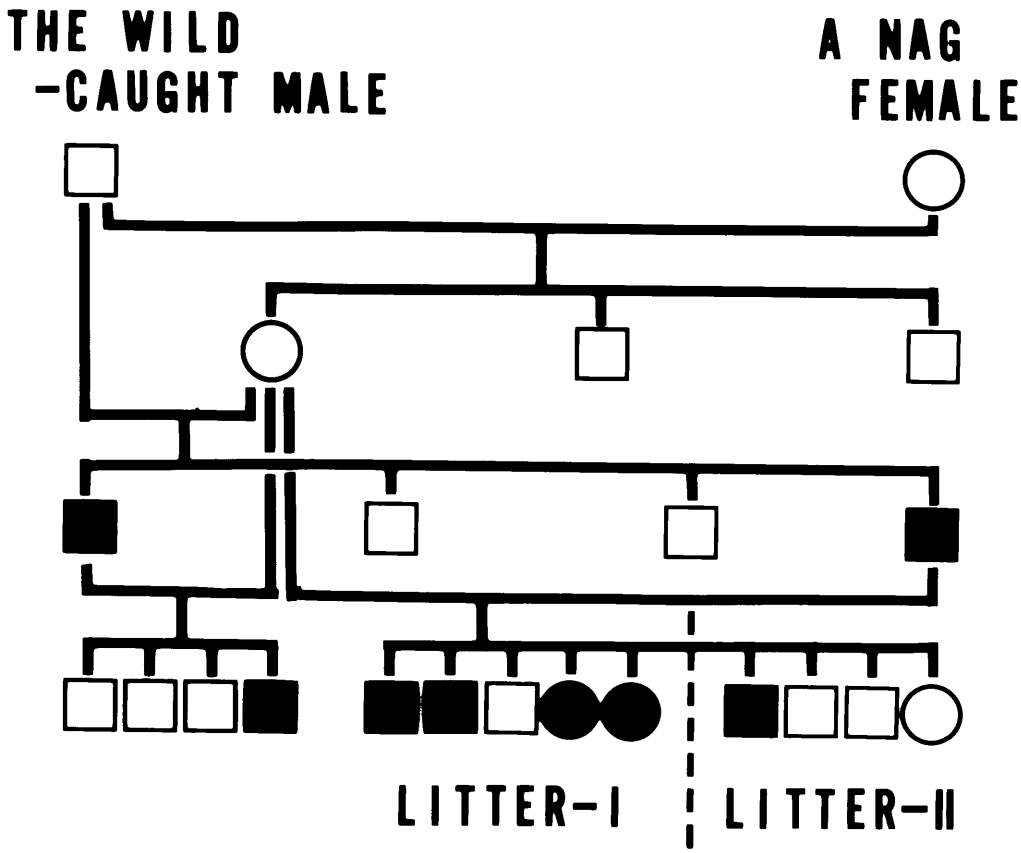


Figure II-1

Figure II－2 (A) (B)

Figure II－3 (A) (B)

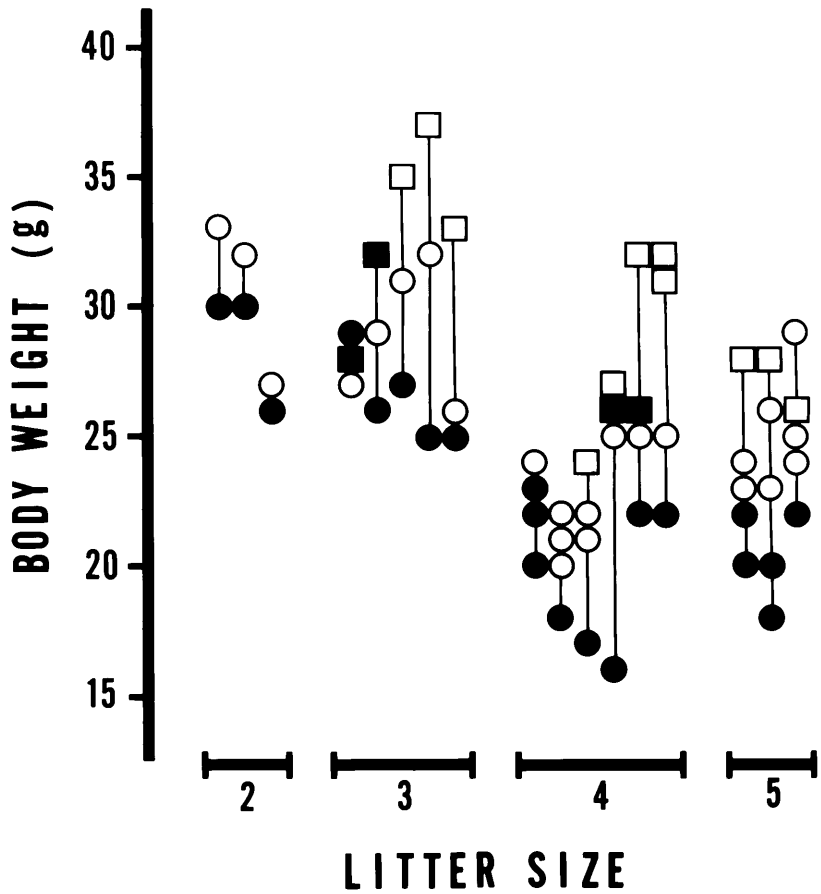


Figure II-4

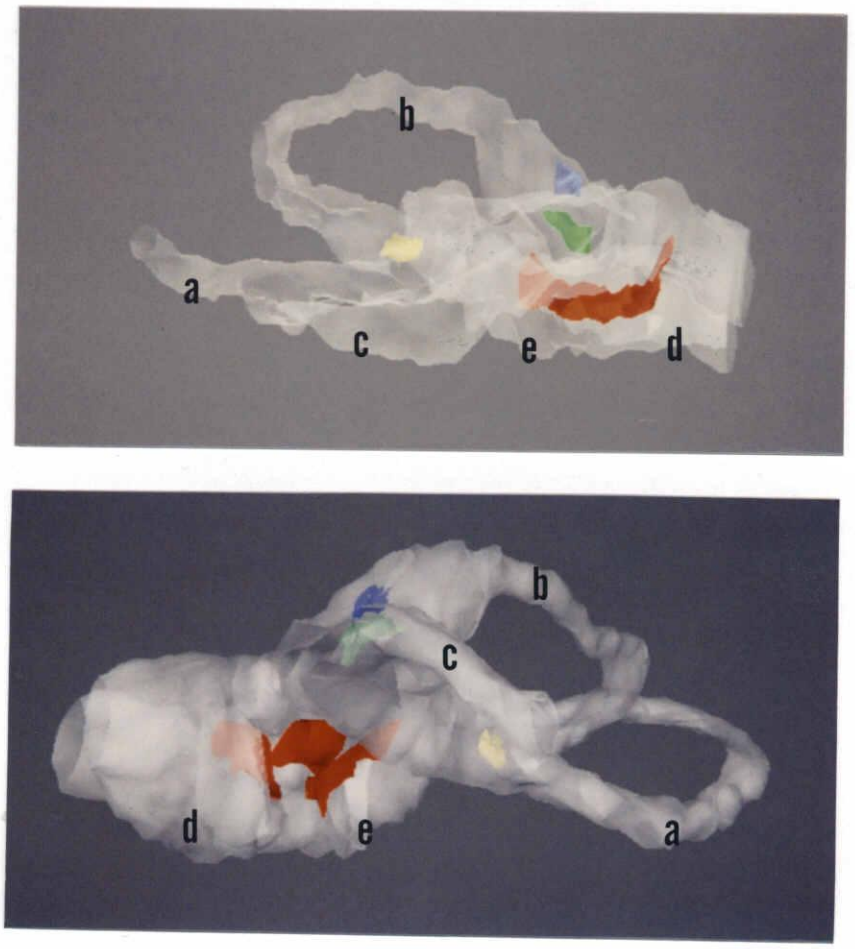
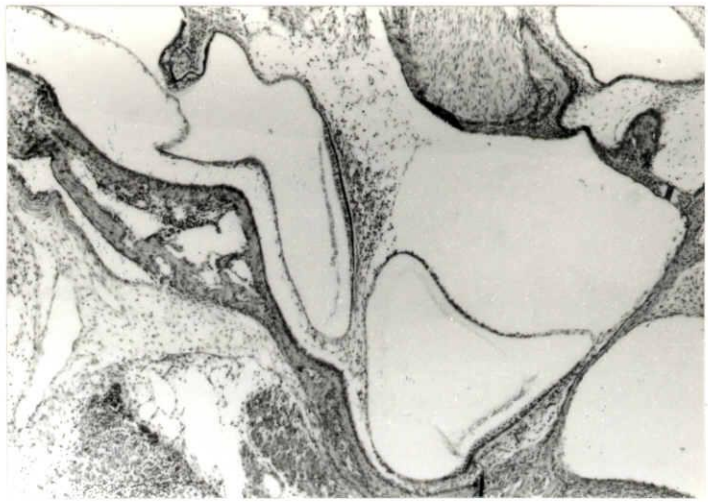
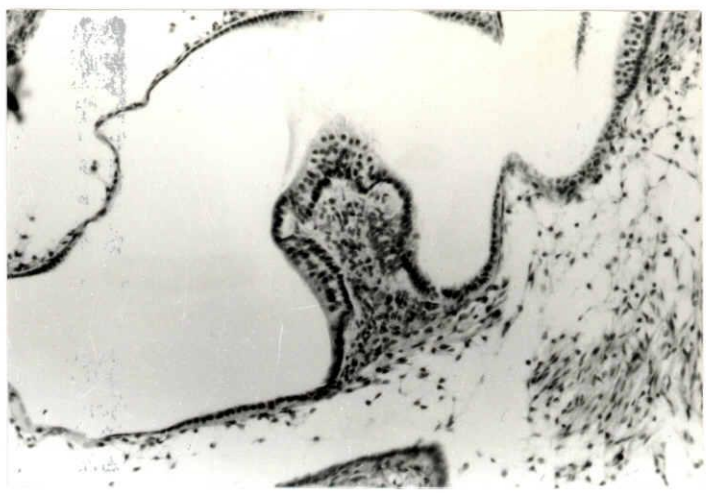


Figure II－5 (A)

(B)





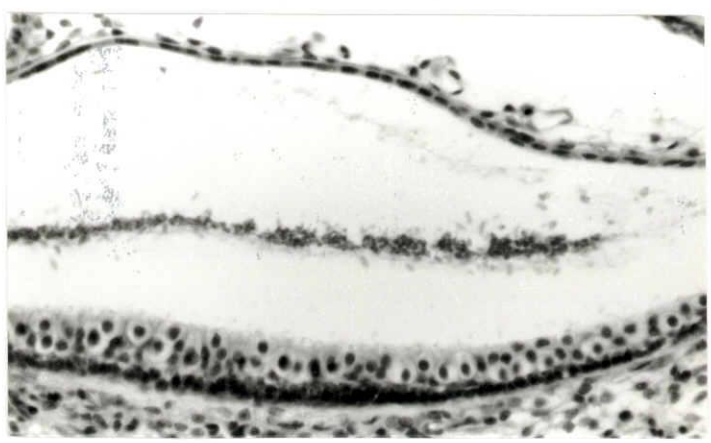


Figure II－6 (A)

(B)

(C)

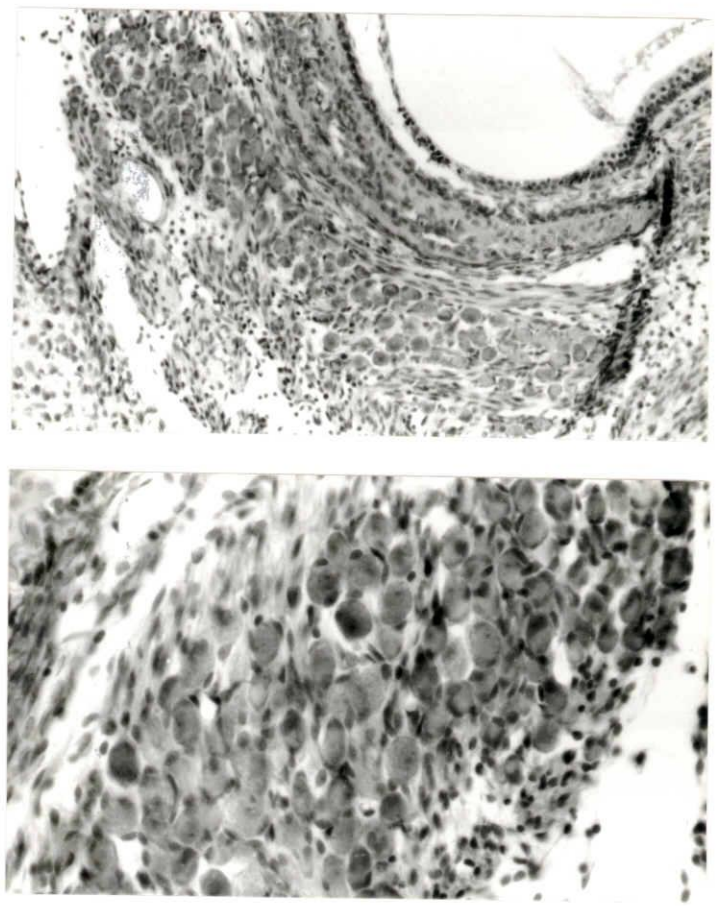


Figure II－7 (A)

(B)

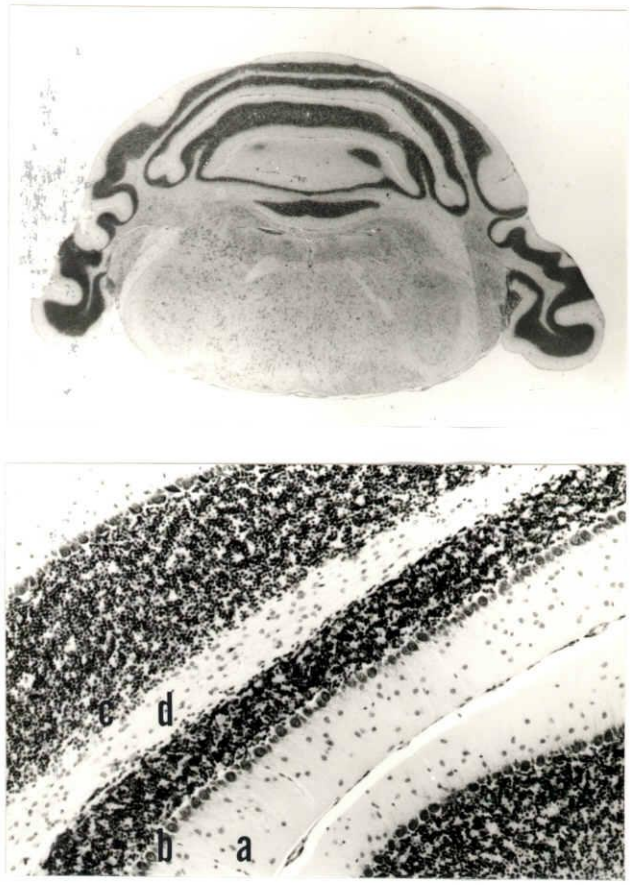


Figure II-8 (A)

(B)

第Ⅲ章　糖尿病モデルの開発

（１）　糖尿病を多発するEDS(early-onset diabetes in Suncus)ラインの育成

１．目的

ヒト糖尿病の発症要因,合併症の発症機構の解明,治療薬の開発は依然医学領域の重要課題であって、モデル動物を使用した研究の必要性は増大しつつある。しかし、ヒトと実験動物がそれぞれの種特性を有する以上、両者の間に常に同じ病態が出現するとは考えがたい。特に、糖尿病のように多くの因子が関与し複雑な病態を呈する疾患については、多種多様なモデルから得られた情報を総合的に比較検討することが重要であり、それによりヒト糖尿病への効果的な外挿が可能になると考えられる。したがって、数多くの自然発症糖尿病モデルがマウス,ラットなどげっ歯目の動物を中心に開発されている(Table Ⅲ-1)が、更に新たな糖尿病モデルを開発する努力が続けられている。食虫目に分類されるスンクスは、げっ歯目の動物とは異なる生物学的特性を多く有しており(近藤,1985)、この動物で糖尿病モデルを開発することができれば、比較生物学的検討を行い得る動物種が目のレベルで拡がることになり、その意義は極めて大きい。

1989年9月、ケージの床敷に過度の水濡れを起こす雄個体を、BANライン(Ishikawa et al.,1987)と、BAN-kcライン(Ishikawa et al.,1992)にそれぞれ1個体づつ発見した。当初、水濡れは飲水漏れによるものと考えていたが、詳しい観察の結果、顕著な多尿によるものであることが判明した。そこで、糖尿病による多尿を疑い、尿糖試験紙(Tes-Tape, Eli Lilly Co.)によりそれらの尿を調べたところ強陽性を示した。そ

こで、尿糖発症雄2個体とBANおよびBAN-kcラインの尿糖非発症雌個体との間で得られた雌個体を、尿糖発症雄個体に戻し交配したところ、多尿,尿糖を示す個体(雄4,雌1)が雌雄とも出現した(Figure Ⅲ-1)。この結果から、この多尿,尿糖(糖尿病)形質の発現には遺伝的な要因が強く関係していると推定された。

本研究では、食虫目スンクスにおいて糖尿病モデル系統を育成することを目的として、尿糖発症雄2個体を起源に、尿糖発症を指標とした糖尿病多発ラインの選抜育成を行った。

2．材料と方法

1989年11月、BANおよびBAN-kcラインの尿糖発症雄2個体と、BANラインの尿糖非発症雌4個体との交配より得られた雌個体を、雄親に戻し交配して得られた個体群のなかに、多尿,尿糖を呈する個体が複数出現した。ここにBANラインの尿糖発症雌1個体を加えて基礎繁殖集団(fundamental breeding stock)とし、そのなかで交配を進め子孫を得たところ、雌で約20%,雄で約40%の個体が尿糖を発症した(Table Ⅲ-2)。

1991年、基礎繁殖集団の尿糖発症6個体(雌1,雄5)、尿糖非発症雌6個体とBANラインの尿糖発症雄1個体の合計13個体(雌7,雄6)を起源として、EDS(early-onset diabetes in Suncus)ラインの育成を開始した。スンクスでは近交系は未だ作出されておらず、近交係数の上昇に伴う繁殖力の低下等の近交退化現象の実態も十分に把握されていないことから、EDSラインは近親交配による近交退化を避けるため各世代約50個体からなる閉鎖集団とした。世代交代は1年に2回行い、ライン育成開始から2年間(G1-G4)は、集団内での尿糖発症個体の出現頻度の上昇を目的として、雄においては発症個体のみを選抜し交配した。しかし、雌では雄に比べて発症個体が少なく、発症雌個体のみを

選抜することにより近交退化が促進されるおそれがあるため、雌についてはほとんど全ての個体を交配に用いた。

基礎繁殖集団からEDSラインを通じて、尿糖発症個体の繁殖力,生育力について観察を行ったが、雄の妊性,雌の産仔数や離乳率は全く正常で、繁殖性に全く問題はなかった。また。発症雌からの奇形仔の出現や、発症個体の早死傾向等の生育上の異常も観察されなかた。

尿糖はTes-Tape(Eli Lilly Co.)により判定した。その際、軽度の尿糖(1+,2+)を呈する個体はほとんど観察されなかったため、3+以上を示した個体を発症個体とした。血糖値の測定は、尾の先端より採血を行い、自動分析器(Fuji Dri-Chem 100G,富士フィルム社)により行った。動物の飼育管理は第II章に述べた方法に従った。

３．結果

EDSラインの各世代(G1-G6)における発症個体の出現頻度(Table Ⅲ-2)から、2つの事実が明らかとなった。まず、すべての世代において雄の発症頻度は常に雌より高く、平均発症頻度は雌33.1%,雄57.8%であった。ただし、家系解析の結果から、発症頻度の雌雄差(雌＜雄)は、一対の伴性遺伝子の影響によるものでないことが判明した。次に、発症頻度は1世代ごとに高低を繰り返しており、奇数世代(G1,G3,G5)の平均発症頻度は60.8%(101/166)で、偶数世代(G2,G4,G6)の平均発症頻度29.1%(46/158)の約2倍であった。EDSラインでは年に2回の世代交代を行っているため、この、世代ごとの発症頻度の変動は、季節変化ではないかとの疑いがもたれた。そこで、EDSラインの全個体について、出生した季節ごとの発症頻度を調べTable Ⅲ-3に示した。春夏期の発症頻度は61.9%(91/147)であり、秋冬期の発症頻度31.6%(56/177)の約2倍であること

から、発症頻度の変動は季節変化に関連していると考えられた。次に、選抜交配の効果を季節変化の影響なしに検査するため、連続な2世代づつを合計した発症頻度をTable Ⅲ-2に示した。G1-G2(37.9%)からG3-G4(47.0%)の間での選抜交配では、発症頻度は僅かに増加した(+9.1%)が、選抜交配を停止したG5-G6(42.6%)では発症頻度は僅かに減少した(-4.4%)。

EDSラインのG1からG6世代における、尿糖発症個体の頻度を3種類の交配タイプ別にTable Ⅲ-4に示した。ただし、発症頻度の季節変化を考慮して、奇数世代(Table Ⅲ-4A)と偶数世代(Table Ⅲ-4B)に分けて示した。奇数世代での発症頻度は、尿糖発症個体同士の交配(67.6%)＞尿糖発症個体と尿糖非発症個体の交配(59.8%)＞尿糖非発症個体同士の交配(53.3%)であった。偶数世代での発症頻度も同様に、尿糖発症個体同士の交配(39.4%)＞尿糖発症個体と尿糖非発症個体の交配(25.7%)＞尿糖非発症個体同士の交配(3.7%)であった。ただし、尿糖発症個体同士の交配と尿糖非発症個体同士の交配との発症頻度の差は、発症頻度の低い偶数世代では35.7%であり、奇数世代の14.3%よりかなり大きかった。また、雌雄の発症頻度の差も発症頻度の低い偶数世代では28.6%であり、奇数世代の21.3%より広がる傾向にあった。

Table Ⅲ-5にEDSラインの個体の、生後2ケ月齢での非絶食条件下の血糖値を示した。尿糖発症個体の血糖値は雌雄ともすべて250mg/dl以上で、平均値は400mg/dlを超え(雌:437±108mg/dl,雄:414±91mg/dl)、顕著な高血糖状態であるのに対し、尿糖非発症個体の血糖値は雌雄ともすべて200mg/dl以下で、平均値は約80mg/dlであった(雌:82±31mg/dl,雄:80±29mg/dl)。すなわち、尿糖発症個体群と非発症個体群の間には極めて明確な血糖値の差が存在したが、各群内の雌雄の間には有意な差は認められなかった。

4．考察

食虫目スンクスにおいて、生後2ケ月齢以前から顕著な糖尿病症状(多尿,尿糖,高血糖)を呈する個体が多発するEDSラインを育成した。自然発症糖尿病はヒトやげっ歯目の動物以外にも多数報告されている(Meier,1960, Howard and Palotay,1979, Johnson and Hyden,1979, Rosenblum et al.,1979)が、これらは家畜や愛玩動物において散在的に出現してくるものであり、EDSラインはげっ歯目以外の動物種で系統として育成された初めての糖尿病モデルとして比較生物学的見地から重要な存在である。

雄の発症頻度は、雌の約2倍弱と明らかに高い(Table Ⅲ-2, Ⅲ-3 and Ⅲ-4)。このように雌雄により発症頻度が大きく異なる例はマウス,ラットの糖尿病モデルでも幾つか報告されている。そのうち、KKマウス(Nonaka and Oki,1987), NODマウス(Makino et al.,1981), WBN/kobラット(森ら,1989)等では、性腺摘出により発症頻度が顕著に変化することから、発症頻度の雌雄差と性ホルモンが強く関連していると考えられている。したがって、この糖尿病スンクスにおける発症頻度の雌雄差にも、雄性ホルモンが"positive"に雌性ホルモンが"negative"に関与している可能性がある。

選抜交配は糖尿病発症個体の症状の程度には影響を及ぼさなかったが、発症頻度の上昇に関しては効果が認められた。すなわち、選抜交配を行ったG1-G2からG3-G4にかけて発症頻度が緩やかに上昇したのに対し、選抜交配を行わなかったG5-G6では緩やかに低下した(Table Ⅲ-2)。これは、糖尿病形質が単一遺伝子でなく、複数の遺伝子により支配されているためと考えられる。また、BANラインの飼育記録によると、1985年から1989年(最初の尿糖発症個体が発見された年)までに、顕著な多尿傾向を示す個体が散発的に、少なくとも12個体(雌4,雄8)出現している。本研究において、

EDSラインで顕著な多尿傾向を示した個体は、すべて尿糖を発症していることから、それらBANラインで多尿傾向を示していた個体が糖尿病であった可能性は高い。したがってこの糖尿病形質は、実験室内で起きた単一の突然変異遺伝子によるものでなく、1983年にバングラデシュで捕獲し実験室に導入した野生個体群が保有していた複数の催糖尿病遺伝子が、BANライン育成の過程で集積し発現したものと考えられる。

3種類の交配タイプ別の発症頻度(Table Ⅲ-4)の比較においてもTable Ⅲ-2と同様に、糖尿病形質は単一遺伝子に支配されているとは考え難く、複数の遺伝子の支配によるものであると考えられた。また、Table Ⅲ-4において、尿糖発症個体同士の交配では他の交配タイプと比較して明らかに発症頻度が高いため、尿糖発症に関与している遺伝子群はEDSライン内で完全には固定されていないと考えられる。したがって、更に選抜交配を行うことで、発症頻度を上昇させることができると思われる。しかし、尿糖発症個体同士の交配でもすべての個体が発症するわけではないため、選抜交配によって到達できるEDSラインの発症頻度は、尿糖発症個体同士の交配における発症頻度程度、即ち奇数世代で雌50%,雄90%,(雌雄平均70%)、偶数世代で雌20%,雄60%,(雌雄平均40%)と考えるべきであろう。3種類の交配タイプ別の発症頻度の差も雌雄の発症頻度の差も、発症頻度の低い偶数世代(Table Ⅲ-4B)では、奇数世代(Table Ⅲ-4A)より広がる傾向にあった。その原因として、遺伝的に発症しにくい素因を持つ個体(非発症個体同士の交配から得られた個体,あるいは雌個体)は発症しにくい環境要因(秋冬期)の影響を、そうでない個体(発症個体同士の交配から得られた個体,あるいは雄個体)より、より受けやすいためと推定される。

発症頻度には季節性が大きく関与し、春夏期に高く秋冬期に低かった(Table Ⅲ-3)。年間を通じて飼料は同じであり、更に、動物飼育室内の温度は25±2℃に保たれ光制

御も一定であることから、飼料,室温,日照時間と発症頻度の季節変化とはほとんど関連していないと考えられる。しかし、動物室は常時、外気を直接室内に取り込んで換気を行っているため湿度調節がされていない。したがって、飼育室内の微生物環境が季節によって大きく変化している可能性もあり、発症頻度の季節性との関連が予想される。また、湿度変化による摂餌量,飲水量の変化等についても考慮しなければならないと考えられる。しかし、現在のところその具体的な理由については全く不明であり、湿度等の環境コントロールの可能な施設内で発症頻度について調査,検討する必要があると考えられる。ヒトの糖尿病の発症は、遺伝的要因に加え環境要因がかなり影響していると言われているが、モデル動物でスンクスのように発症頻度が季節により大きく周期的に変化する例は珍しく、発症と環境要因の関係を調べるうえでEDSラインは興味深い。

（２） EDSラインの糖尿病発症個体の病態解析

１．目的

糖尿病スンクス系統(EDSライン)を、ヒト糖尿病のモデル動物として利用する際に、その病態について把握しておくことは必要不可欠である。特に、糖尿病はすい臓β細胞におけるインスリン分子の生合成,分泌,そして標的細胞における作用発現のいずれの過程が障害されても起りうる、多様な病態を示す疾患(春日,1992)とされており、現在ではその臨床像から、WHOの指針に従いIDDM(insulin dependent diabetes mellitus),NIDDM(non-insulin dependent diabetes mellitus),その他の3種の病型に

分類され、NIDDMは更に肥満型と非肥満型分けられている。そこで、本研究では糖尿病の発症時期,肥満傾向の有無,糖負荷時における血糖値と血中インスリン値の動態,すい臓のランゲルハンス島の観察等の病態解析を行い、EDSラインの発症個体の病型分類を行うことを目的とした。

ヒト糖尿病治療における最大の問題は合併症であるが、その成因は多様であり糖尿病の発症機構だけでなく合併症の機構の解明の点からも糖尿病モデルの開発は重要である。糖尿病の合併症は、主に細小血管の障害により起きるもので、特に眼(白内障,網膜症),腎臓(腎症),神経系(神経障害)において顕著であり、これらは三大合併症と言われている(米田,1993)。そこで、糖尿病スンクスの合併症モデルとしての可能性についても検討するために、発症個体の眼と腎臓での合併症出現の有無についても調査した。

2．材料と方法

EDSライン個体の糖尿病や白内障の発症時期および肥満傾向の有無等を明らかにするため、尿糖,血糖値,体重,白内障の有無を生後1ケ月間隔で測定,観察した。尿糖の判定と血糖値の測定は前節で述べた方法に従った。糖負荷試験は、18～24時間の絶食後、10%のブドウ糖溶液を体重1kgあたり1gの割合で腹腔内に注射し行った。その後、頸静脈から1時間間隔で採血を行い、血糖値と血中インスリン値を測定した。血糖値の測定には自動分析器(YSI 23A Glucose Analyzer, Yellow Spring Instrument Co.)を用い、血中インスリン値の測定には二抗体法による市販のキット(Dainabot RI Laboratories Co.)を使用した。

腎臓の組織標本は、メタカルン溶液(メタノール:クロロホルム:酢酸=6:3:1)で固定

した後、パラフィン包埋し2μmの切片をPAS染色して光学顕微鏡下(×400)で観察した。

3．結果

EDSライン(G5,G6)の雌雄別の尿糖の累積発症頻度をFigure Ⅲ-2に示した。世代や性別に関係なく、累積発症頻度は生後1ケ月齢から急激に上昇し、2ケ月齢以降はほぼ一定となった。すなわち、生後1ケ月齢以前から発症する個体が出現し、発症する個体はほとんど生後2ケ月齢までに発症することを示していた。ただし、発症後症状が完全に消失する(寛解)個体が出現し、集団内で発症している個体の頻度は、生後2～3ケ月齢をピークに月齢の経過とともに低下した(Figure Ⅲ-3)。特に、雌ではその傾向が強く、生後4ケ月齢以降まで糖尿病状態が持続している個体は極めて少数であった。寛解個体の経時的な出現割合は、発症頻度の高い世代(G5)も低い世代(G6)も概ね同様の傾向を示した(Figure Ⅲ-3)。また、雌においては、寛解後出産に伴い糖尿病が再発する個体が観察された(Figure Ⅲ-3 right)。

Table Ⅲ-6にEDSラインの個体の生後3ケ月齢の体重を示した。雄では発症個体と非発症個体の間に有意差はなかった。雌では、発症個体が非発症個体より僅かに大型化する傾向があったが、肥満と言う程のものでなかった。また、1ケ月間隔での体重測定の結果、発症個体も非発症個体も生後3ケ月齢から生後6ケ月齢の間の体重はほぼ一定であり、この期間に急激に肥満したり痩せたりする個体は、ほとんど観察されなかった。したがって、発症個体は顕著な肥満も痩せも呈さないことが判明した。

糖負荷試験時の血糖値の変化をFigure Ⅲ-4に示した。非発症個体の血糖値は糖負荷後1時間で最高値となり、その後低下してゆく一方、発症個体の血糖値は糖負荷前から高く、糖負荷2時間後まで上昇し続け、耐糖能が顕著に低下していることが判明

した。糖負荷試験時の血中インスリン値の変化をFigure Ⅲ-5に示した。非発症個体の血中インスリン値は血糖値の上昇に対応して、糖負荷後1時間で急激に上昇しその後低下した。糖尿病症状の継続期間が6ケ月未満の個体の血中インスリン値は、糖負荷前では非発症個体より僅かに高いが、糖負荷により血糖値が上昇しても分泌量はほとんど変化せず、インスリン分泌応答性の顕著な低下が観察された。また、症状の継続期間が6ケ月以上の個体の血中インスリン値は、糖負荷前から低くインスリン分泌応答性は完全に失われていた。

糖尿病発症直後のすい臓ランゲルハンス島をFigure Ⅲ-6に示した。IDDMで観察される"insulitis"(すい島への白血球やリンパ球等の浸潤)の所見は、発症直後の個体から発症が長期間に及んだ個体まですべてに認められなかった。

Table Ⅲ-7に生後5ケ月齢における白内障の発症頻度を示した。糖尿病を発症しなかった個体では白内障が全く観察されなかったのに対し、生後5ケ月齢まで糖尿病状態が継続した個体全例に、両眼とも白内障が観察された。また、糖尿病状態が6ケ月間継続した個体の腎糸球体には、ヒト糖尿病性腎症類似の所見(基底膜の肥厚やメサンギウム領域の拡大)が観察される場合があった(Figure Ⅲ-7)。

4．考察

糖負荷試験時の血糖値の変化(Figure Ⅲ-4)から、この発症個体は耐糖能の低下が顕著であることが判明した。また、血中インスリン値の変化(Figure Ⅲ-5)から、発症個体ではグルコース刺激に対するインスリン分泌応答性の顕著な低下が観察され、典型的なNIDDMであることが判明した。すい臓に"insulitis"が観察されないこと(Fiure Ⅲ-6)は、これを裏付けていると考えられる。

発症個体は、血糖値の平均値が400mg/dlを超え、尿糖も常時3+以上を示すことから、その症状はNIDDMモデルのなかでは比較的重篤な部類に属すると言える。糖負荷試験において、糖尿病症状の継続期間が6ケ月以上の個体では、糖負荷前の血中インスリン値は非発症個体より低く、インスリン分泌応答性も完全に失われている(Figure Ⅲ-5)。これは重度の糖尿病状態が長期間継続したため、β細胞が疲弊しインスリン分泌能が低下したためと考えられる。一般的にNIDDMの病態は、インスリン分泌応答性の低下やインスリン作用不全(抵抗性)であるとされている(春日,1992)。糖負荷試験の結果から、発症個体のインスリン分泌応答性の低下は確認されたが、インスリン作用不全については調べられていない。したがって、インスリン作用不全について解析するため、インスリン負荷時の血糖値の変化を調べる必要があると考えられる。また、スンクスは絶食により脂肪肝を呈する珍しい動物である(Yasuhara et al.,1991[a])ため、インスリンの標的器官である肝臓に関して脂質代謝特性を考慮に入れた糖代謝機能の解析も必要かもしれない。

Table Ⅲ-6より、発症個体は肥満傾向を示さないことが明かとなった。これまでに、肥満傾向を示すNIDDMモデルとしては、NZO,KK-A^y,ob/ob,db/dbマウスやfa/fa,OLETFラットなどが開発されているが、比較的重度の糖尿病症状を示す非肥満型NIDDMモデルは少ない(Table Ⅲ-1 and Ⅲ-8)。日本人のNIDDM患者には、欧米と比べて肥満を呈する症例が少ないとされており(松尾ら,1989)、糖尿病スンクスは、これら非肥満型NIDDMの病因解析において有効なモデルとなるかもしれない。しかし、マウス,ラットでは通常の飼育条件下でも肥満傾向を呈する個体が観察されるが、スンクスではその様な個体はほとんど観察されないため、スンクスが本来肥満に対して強い抵抗性を有している可能性があると考えられる。したがって、糖尿病スンクスが非肥満型である

と断定するには、まずスンクスの脂肪蓄積の特性について十分検討する必要がある。

発症個体は、生後1ケ月齢以前から発症しはじめ、大半が生後2ケ月齢までに発症する(Figure Ⅲ-2)。スンクスの性成熟は生後40日齢前後であり(古村ら,1985)、またその体成長の期間は雌で生後40日齢,雄で生後60日齢頃までである(Ishikawa and Namikawa,1987)ことから、糖尿病スンクスは明らかに若年発症である。若年発症の糖尿病モデルには、NODマウスやBB,LETLラットがあるが(Table Ⅲ-1)、これらはすべてIDDMであり、若年時から顕著な尿糖,高血糖を示すNIDDMモデルはこれが始めてであり(Table Ⅲ-8)重要なモデルである。また、発症後症状が完全に消失する(寛解)個体が出現するため、発症頻度は生後2～3ケ月齢をピークとして低下していった(Figure Ⅲ-3)。寛解の原因については全く不明であるが、糖尿病スンクスと同様に、マウスのNIDDMモデルの多く(KK-A^y,ob/ob,db/db)にも発症後月齢の経過とともに寛解個体が出現し、最後は全例寛解する(西村,1973)。糖尿病スンクスでは生後6ケ月齢までしか調査していないが、この時点まで発症している個体が少ないことから、生後24ケ月齢頃まで調査すれば、マウスのNIDDMモデルと同様に全例寛解すると推定される。寛解個体の経時的な出現状況は、世代に関係なく同様の傾向を示すことから、寛解個体の出現に季節変化の影響はほとんどないと考えられる。また、寛解後出産に伴い糖尿病が再発する場合があり(Figure Ⅲ-3 right)、この原因として出産後の性ホルモン環境や哺乳(哺育)に伴う代謝機能の変化等が考えられるが、現段階で結論を出すことはできない。

眼と腎臓での合併症の存在について調査し、ともに持続的高血糖状態によると考えられる合併症が観察された。糖尿病状態が継続した個体では、生後3ケ月齢から白内障を発症する個体が出現し始め、生後5ケ月齢では全個体に観察された(Table Ⅲ-7)。

この結果は、高血糖状態が2～4ケ月継続すれば白内障が出現することを示しており、発症個体の症状が他のNIDDMモデルと比べて比較的重症であることと深い関係があると考えられる。また、腎臓での合併症についてはデータが十分でないが、持続的高血糖状態に起因すると考えられる病変が認められる個体が発見された(Figure Ⅲ-7)。そのうち、メサンギウム領域の拡大という所見はヒトでは観察されるが、モデル動物ではあまり観察されていないため重要な所見である。合併症については、神経障害や動脈硬化等の観点から他の臓器についても調査し、これらを含めて総合的に検討する必要がある。糖尿病スンクスは若年発症であり、しかも発症後の生育力に全く問題が無いため、合併症の研究に適していると考えられる。今後、性ホルモンの投与や飼料への糖質の付加により発症期間を長期化する個体の頻度を上昇することができれば、糖尿病の合併症モデルとしても期待できる。

EDSラインの糖尿病発症個体の病型は、肥満傾向を示さない若年発症NIDDMという既存のモデルにはない全く新しいタイプであるため、複雑な病態を呈するヒト糖尿病に対するモデル動物を充実させる上で、EDSラインは興味深い存在であると考えられる。糖負荷試験時における尿糖非発症個体の血糖値の変化は、マウス,ラットと比較して大変緩やかであった(Figure Ⅲ-4)。それは食虫目のスンクスは、自然生息条件下ではげっ歯目の動物ほど炭水化物を摂取しないため血糖値が急激に変化する可能性が少なく、その調節機構が鋭敏である必要性に乏しいためと推測される。また、スンクスではマウス,ラットと比較して、血糖上昇物質の一種であるカテコラミンの血中濃度が高いとされ(Maruoka et al,1989, Yazawa,1989)、発症個体の重度の高血糖状態と関係している可能性もある。このように、スンクスは既存のモデル動物種とは異なった生物学的特性を有しており、ヒト糖尿病に対するモデル動物として利用する際には、

種としての生物学的特性について十分に考察する必要があると考えられる。

Table III-1 Spontaneous diabetes models in rodents

Speices	IDDM strains	NIDDM strains
Mouse	NOD (Makino et al., 1980)	NZO* (Bielschowsky and Bielschowsky, 1956)
		KK* (Nakamura, 1962)
		KK-A^y* (Nishimura, 1969)
		ob/ob* (Ingalls et al., 1950)
		db/db* (Hummel et al., 1966)
Rat	BB (Nakhooda et al., 1977)	WBN/kob (Tsuchitani et al., 1985)
	LETL (Kawano et al., 1991)	GK (Goto et al., 1975)
		OLETF* (Kawano et al., 1992)
		fa/fa* (Zucker and Antoniades, 1972)
Others	chinese hamster (Meier and Yerganian, 1961)	
	guinea pig (Lang and Munger, 1976)	

* obese type

Table III-2 Incidence (%) of the glycosuric shrews (exhibited Tes-Tape value ≧ 3+) at 40 days after birth in the fundamental breeding stock and the subsequent closed colony, named EDS

Colony (Generation)		Period	Female	Male	Total
Fundamental stock		Dec.'89-Feb.'91	19.0 (11/58)	40.3 (29/72)	30.8 (40/130)
EDS colony	(G1)	Apr.'91-Oct.'91	36.4 (8/22)	57.1 (16/28)	48.0 (24/50)
	(G2)	Nov.'91-Mar.'92	20.8 (5/24)	33.3 (7/21)	26.7 (12/45)
Pooled	(G1-G2)	Apr.'91-Mar.'92	28.3 (13/46)	46.9 (23/49)	37.9 (36/95)
	(G3)	May '92-Aug.'92	69.7 (23/33)	85.0 (17/20)	75.5 (40/53)
	(G4)	Oct.'92-Jan.'93	15.4 (4/26)	53.6 (15/28)	35.2 (19/54)
Pooled	(G3-G4)	May '92-Jan.'93	45.8 (27/59)	66.7 (32/48)	47.0 (59/107)
	(G5)*	Feb.'93-Jul.'93	37.9 (11/29)	76.5 (26/34)	58.7 (37/63)
	(G6)*	Oct.'93-Jan.'94	10.3 (3/29)	40.0 (12/30)	25.4 (15/59)
Pooled	(G5-G6)*	Feb.'93-Jan.'94	24.1 (14/58)	59.4 (38/64)	42.6 (52/122)
Average	(G1-G6)	Apr.'91-Jan.'94	33.1 (54/163)	57.8 (93/161)	45.4 (147/324)

* No selective breeding was done.

Table III-3 Seasonal variation of the incidence (%) of the glycosuric (exhibited Tes-Tape value ≧ 3+) shrews at 40 days after birth in the EDS line (G1-G6)

Season* (Month)	Female	Male	Total
Spring (Mar.-May)	45.2 (14/31)	73.3 (22/30)	59.0 (36/61)
Summer (Jun.-Aug.)	59.1 (26/44)	69.0 (29/42)	64.0 (55/86)
Autumn (Sep.-Nov.)	15.9 (7/44)	54.3 (30/55)	37.4 (37/99)
Winter (Dec.-Feb.)	15.9 (7/44)	35.3 (12/34)	24.2 (19/78)
Average	33.1 (54/163)	57.8 (93/161)	45.4 (147/324)

* all shrews were typed by season according to birthmonth

Table III-4(A) Incidence of the glycosuric shrews (exhibited Tes-Tape value ≧ 3+) in different mating types in the odd-numbered generation (G1, G3, G5) of the EDS colony at 40 days after birth

Crosses Female	×	Male	Female	Male	Total
Glycosuric	×	Glycosuric	52.4 (11/21)	87.5 (14/16)	67.6 (25/37)
Non-glycosuric	×	Glycosuric	54.0 (27/50)	66.0 (31/47)	59.8 (58/97)
Non-glycosuric	×	Non-glycosuric	30.8 (4/13)	70.1 (12/17)	53.3 (16/30)
Average			50.0 (42/84)	71.3 (57/80)	60.4 (99/164)

Table III-4(B) Incidence of the glycosuric shrews (exhibited Tes-Tape value ≧ 3+) in different mating types in the even-numbered generation (G2, G4, G6) of the EDS colony at 40 days after birth

Crosses Female	×	Male	Female	Male	Total
Glycosuric	×	Glycosuric	18.2 (8/44)	58.0 (29/50)	39.4 (37/94)
Non-glycosuric	×	Glycosuric	20.0 (4/20)	33.3 (5/15)	25.7 (9/35)
Non-glycosuric	×	Non-glycosuric	0 (0/13)	7.1 (1/14)	3.7 (1/27)
Average			15.6 (12/77)	44.3 (35/79)	30.1 (47/156)

Table Ⅲ-5 Blood glucose concentration (mg/dl) of the EDS shrews in non-fasting condition at two month after birth

Animal	Sex	n[a]	Mean±SD	Range
Glycosuric[b]	Female	12	437±108[c]	280-600
	Male	36	414± 91[c]	259-587
Non-glycosuric	Female	42	82± 31[d]	40-175
	Male	23	80± 29[d]	41-143

a) number of animals measured

b) exhibited Tes-Tape value ≧ 3+

c, d) means with the same letters are not significantly different at $P<0.05$ (t-test)

Table III-6 Body weight of the EDS shrews in non-fasting condition at three months after birth

Sex	Animals	n[a]	Mean ± SD
Female	Glycosuric[b]	11	81 ± 8[c]
	Non-glycosuric	36	74 ± 7[d]
Male	Glycosuric[b]	33	125 ± 13[e]
	Non-glycosuric	21	126 ± 17[e]

a) number of animals measured

b) exhibited Tes-Tape value ≧ 3+

c, d, e) means with the same letters are not significantly different at $P<0.05$ (t-test)

Table III-7 Incidence of cataract in the EDS animals at five month after birth

Animal	Sex	Incidence (%)
Diabetic*	Female	100 (2/2)
	Male	100 (18/18)
	Total	100 (20/20)
Non-diabetic	Female	0 (0/24)
	Male	0 (0/14)
	Total	0 (0/38)

* continued hyperglycemic condition from the onset to five month after birth

Table III-8 Comparison with the diabetic features in the spontaneous NIDDM models

Animals (Speices)	Models (Strains)	Onset of glycosuria	Obesity	Blood insulin	Sex difference	Remission	Genetics
Mouse	NZO	late type	+	hyper	+ (♂ > ♀)	+	polygene
	KK	late type	±	hyper	+ (♂ > ♀)	+	polygene
	KK-A^y	late type	+	hyper	+ (♂ > ♀)	+	+ single gene
	C57BL/6J-ob/ob	late type	+	hyper	+ (♂ > ♀)	+	single gene
	C57BL/6KsJ-db/db	late type	+	hyper→hypo	+ (♂ < ♀)	+	single gene
Rat	WBN/kob	late type	−	hyper→hypo	+ (♂only)		
	GK	late type	−	hyper	−	−	polygene
	OLETF	late type	+	hyper→hypo	+ (♂only)		several genes
	WKY-fa/fa	late type	+	hyper	+ (♂ > ♀)	+	single gene
Suncus	EDS	early type	−	hyper→hypo	+ (♂ > ♀)	+	several genes

Explanation of Figures

Figure Ⅲ-1 Partial pedigree of the glycosuric male shrews initiated from the BAN and BAN-kc line.

○: non-glycosuric female, ●: glycosuric female,

□: non-glycosuric male, ■: glycosuric male.

Figure Ⅲ-2 Cumulative incidence (%) of the the glycosuric shrews in the G5 and G6 of the EDS line.

Figure Ⅲ-3 Incidence rate (%) of the glycosuric shrews in the G5 and G6 of the EDS line.

Figure Ⅲ-4 Plasma glucose responses in the glucose tolerance test. Animals were fasted for 20～24h, given i.p. in 10% glucose solution at 1g/Kg.

○: non-diabetic shrews,

■: diabetic shrews (continued diabetic condition < 6 month after birth),

●: diabetic shrews (continued diabetic condition ≧ 6 month after birth).

Figure Ⅲ-5 Plasma insulin responses in the glucose tolerance test. Animals were fasted for 20～24h, given ip in 10% glucose solution at 1g/Kg.

○: non-diabetic shrews,

■: diabetic shrews (continued diabetic condition < 6 month after birth),

●: diabetic shrews (continued diabetic condition ≧ 6 month after birth).

Figure Ⅲ-6 Insulitis is not observed in the islet of diabetic shrew at 1 month after birth. HE stain.

Figure Ⅲ-7 Glomerular lesion of diabetic shrew that continued hyperglycemic condition until 6 month after birth. PAS stain. Expansion of mesangial area and thickening of basal membrane are observed.

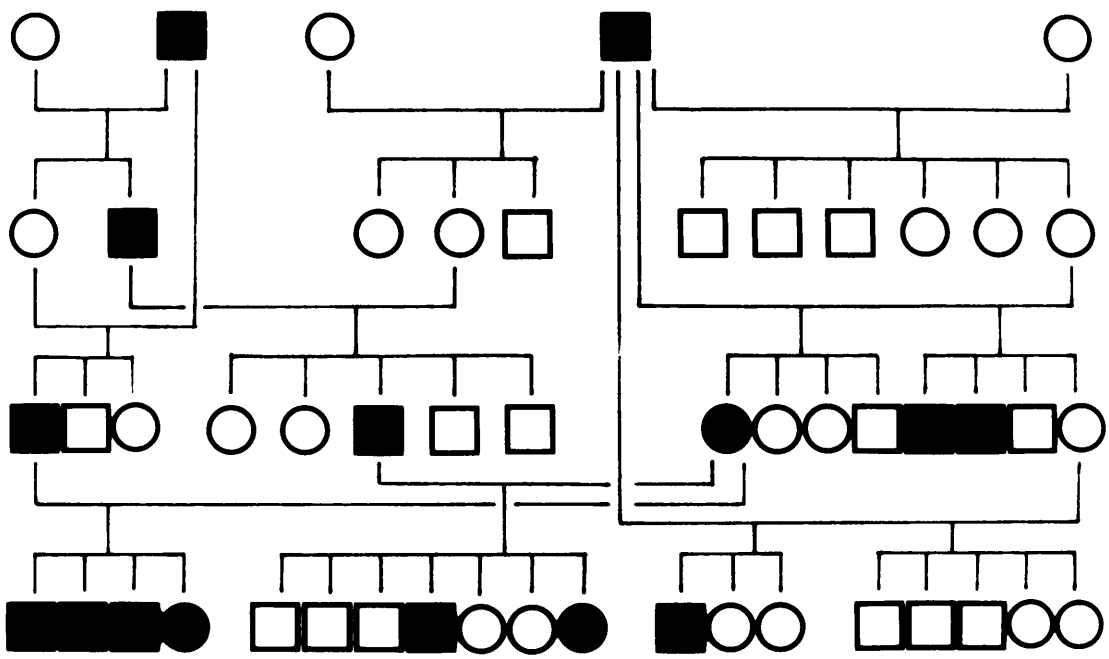


Figure Ⅲ－1

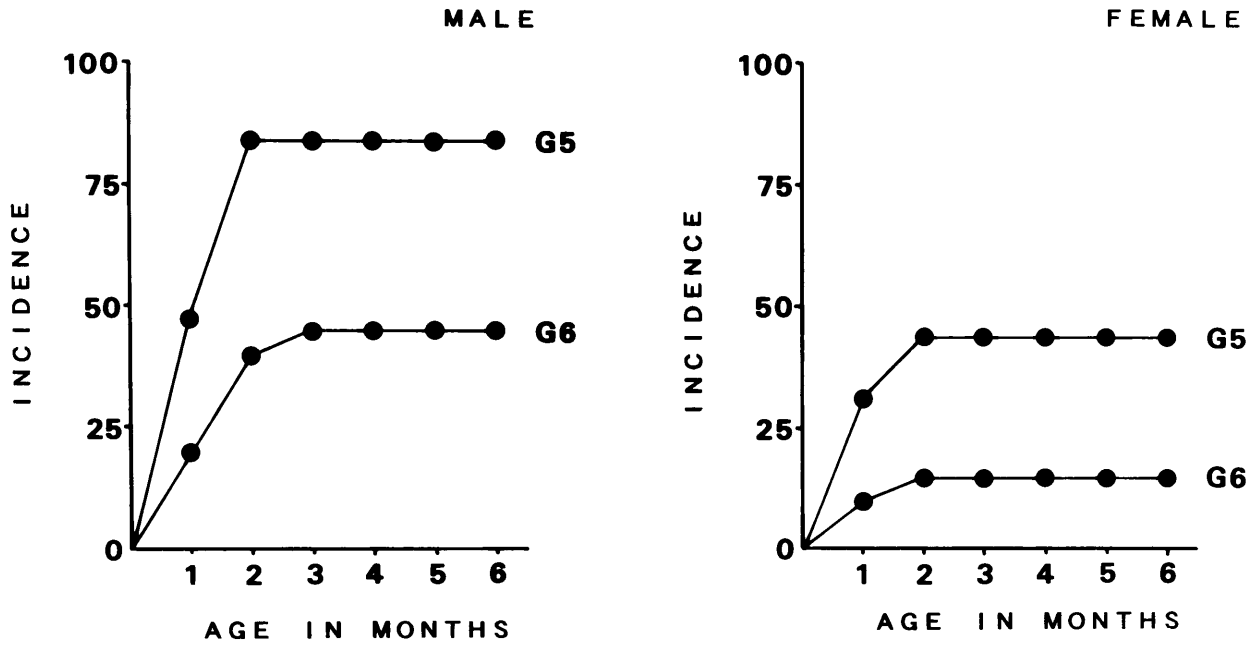

MALE
FEMALE
INCIDENCE
100
75
50
25
0
G5
G6
1
2
3
4
5
6
AGE IN MONTHS

Figure Ⅲ－2

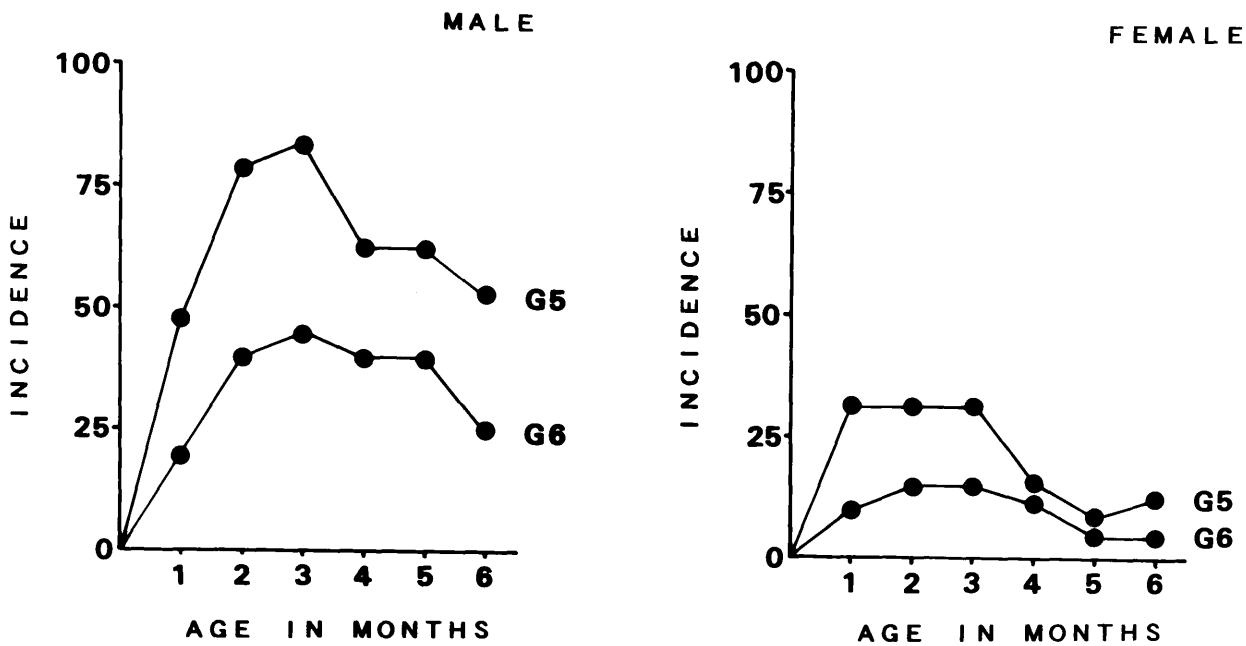

MALE
FEMALE
INCIDENCE
100
75
50
25
0
1
2
3
4
5
6
AGE IN MONTHS
G5
G6

Figure Ⅲ－3

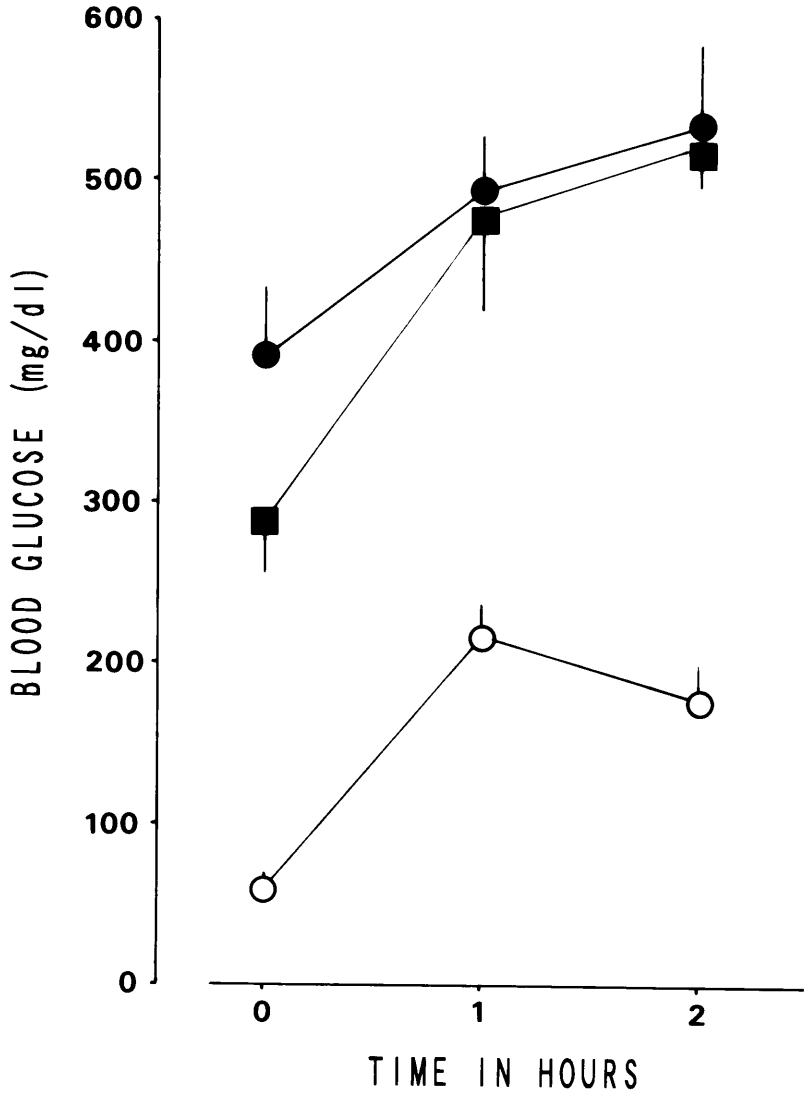


Figure Ⅲ－4

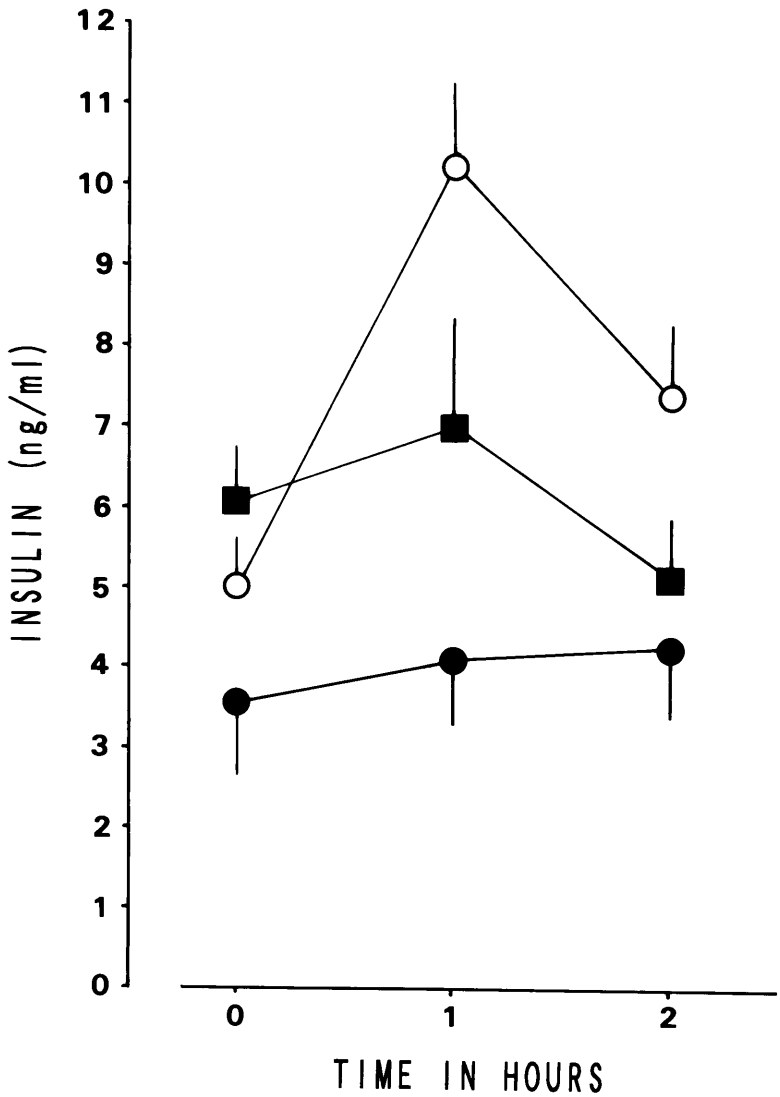


Figure Ⅲ－5

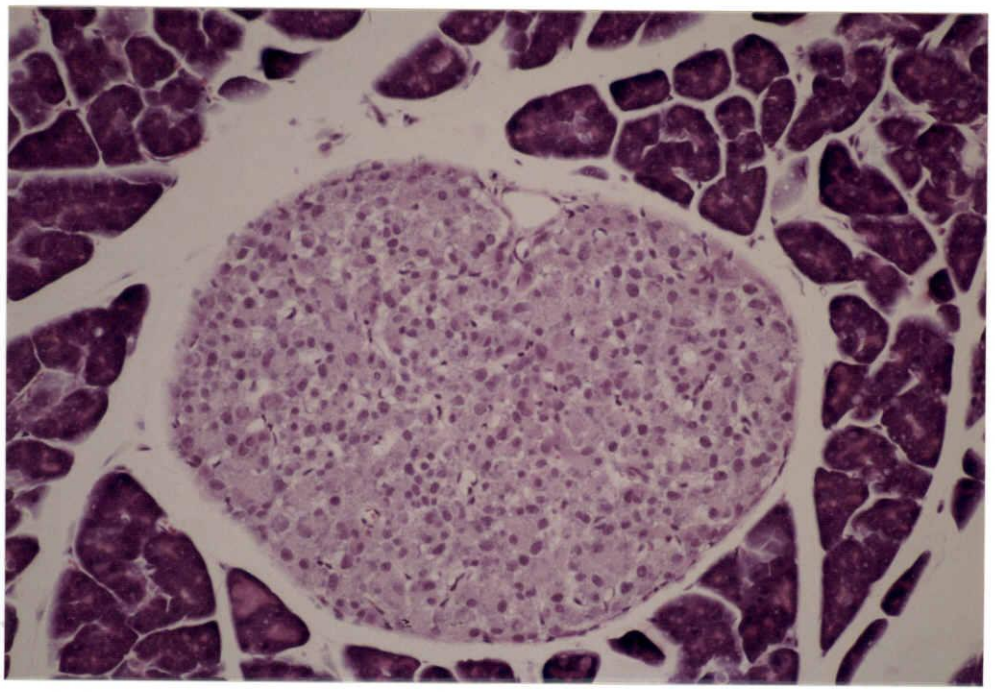


Figure Ⅲ－6

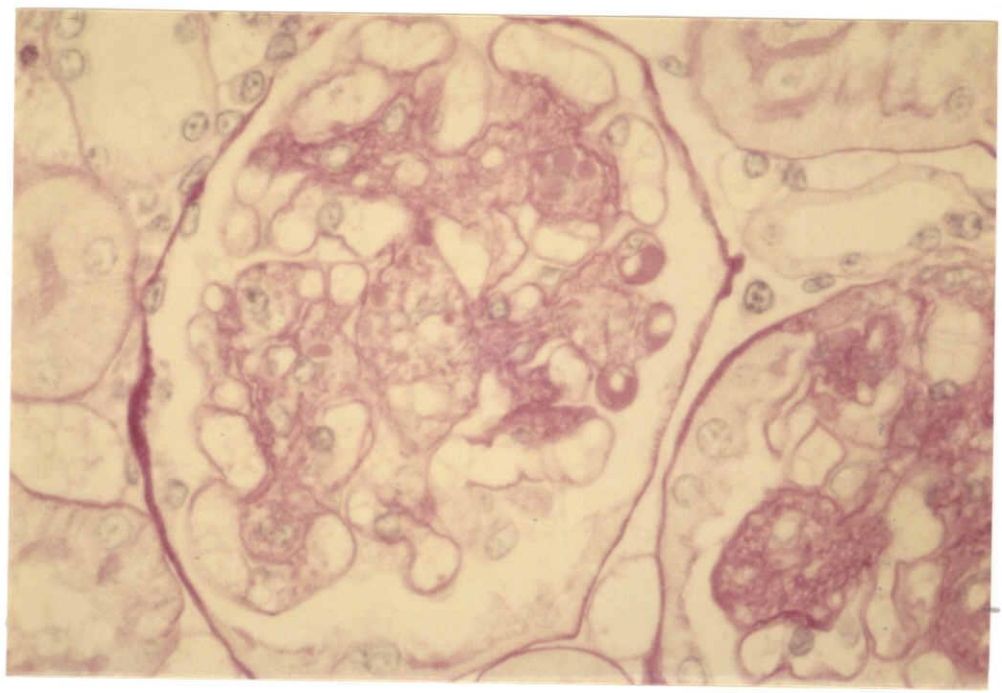


Figure Ⅲ－7

第Ⅳ章　新たな遺伝標識の開発と近交系育成の試み

（１）　新たな毛色突然変異"red-eyed dilution"

１．目的

毛色等の形態学的突然変異遺伝子は、識別が容易であることから標識遺伝子としては有効である。特にマウスでは、多数の形態学的突然変異遺伝子が発見,蓄積され(Green,1989)、連鎖解析の有用な遺伝標識として使用されている。したがって、スンクスでも遺伝標識となる突然変異遺伝子を発見,蓄積してゆくことは、実験動物としての利用価値を向上させるうえで重要であると考えられる。

1984年沖縄県那覇市で捕獲し、実験室に導入した個体同士の交配から、ピンク色の皮膚に淡い灰色の被毛色を呈する個体(雌1,雄1)が出現した。その後の交配から、同様の特徴を有する個体が出現し、この形質は遺伝的である可能性が示唆された。そこで、新たな遺伝標識の開発を目的として、この毛色変異形質の遺伝解析を行った。

２．材料と方法

1983年7月沖縄県那覇市で、正常の毛色および皮膚色を呈する野生個体(雌45,雄58)を捕獲し本研究室に導入した。そのうち雌16,雄10個体が子孫を残し、その個体群を起源として各世代40個体以上から成る閉鎖集団(OKIライン)が育成された。OKIラインの最初の世代(G1)において、ピンク色の皮膚に淡い灰色の毛色を呈する個体が、異なるペアから雌雄各1個体づつ出現した。そのうち毛色変異雌個体は多数の子孫を残し、その後同様の毛色変異個体が3世代にわたり継続的に出現した。したがって、毛色変

異形質は遺伝的であると考えられた。これまでにOKIラインに出現した毛色変異個体には、繁殖力や生育力の異常は認められなかったため、OKIラインでは毛色変異形質(遺伝子)を保存するよう留意してラインを維持してきた。動物の飼育管理については、第II章で述べた方法に従った。

1) 遺伝解析

毛色変異形質の遺伝様式を解析するため、OKIライン内での交配実験を行った。OKIライン内で、毛色変異形質が維持されてきた過程から、この形質は常染色体性単一劣性遺伝様式をとる可能性が予想された。家系解析から毛色変異遺伝子を保有していないと考えられるOKIラインの正常毛色個体を対照群として用いて、以下の5種類の交配(1) Normal(non-carrier) × Mutant, (2) Normal(carrier) × Normal(carrier), (3) Normal(carrier) × Mutant, (4) Normal(carrier) × Normal(non-carrier), (5) Mutant × Mutant を行い、次世代での毛色変異個体の出現頻度より遺伝様式の推定を行った。この際、交配タイプ(1),(3),(4)については正逆交配を行った。

2) 同座性検定

OKIラインの毛色変異個体と、MIライン個体の正逆交配から得られたF1個体の毛色を観察し、毛色変異遺伝子とクリーム毛色遺伝子との同座性について調べた。MIライン個体は浸透度が完全で常染色体性単一劣性遺伝様式をとるクリーム毛色遺伝子:cr (Iseki et al.,1984)と巻き毛遺伝子:ch(織田,1989)をそれぞれホモ型に有している。また、OKIラインに出現した毛色変異はBANラインの被毛色とも類似しているため、OKIラインの毛色変異雌個体と、BANラインを起源としBANラインと同様の被毛色を呈するEDSラインの雄個体との交配から得られたF1個体の毛色を観察し、OKIラインに出現した毛色変異遺伝子とBANライン型被毛色の発現に関与する遺伝子との同座性につ

いても調べた。

3) 連鎖解析

同座性検定の際に得られた、OKIラインの毛色変異個体とMIライン個体のF1個体同士を交配しF2世代を得た。そのF2世代における各表現型の分離比から、OKIラインに出現した毛色変異遺伝子座と、クリーム毛色遺伝子座および巻き毛遺伝子座の連鎖関係の有無を調べた。

3．結果

1) 遺伝解析

交配実験の結果をTable Ⅳ-1に示す。交配タイプ(1),(2),(3),(4),(5)における毛色変異個体の出現頻度は、それぞれ0%,29%,50%,0%,100%であり、毛色変異形質が浸透度が完全な常染色体性単一劣性遺伝子に支配されていると仮定したときの出現頻度に極めて良く一致していた。

2) 同座性検定

OKIラインの毛色変異6個体(雌,雄)と、MIライン6個体(雌,雄)の正逆交配から得られたF1世代46個体(雌19,雄27)はすべて正常の毛色および皮膚色を呈した。したがって、OKIラインに出現した毛色変異遺伝子とクリーム毛色遺伝子(cr)は異なる遺伝子座に存在することが判明した。また、OKIラインの毛色変異雌1個体とEDSラインの雄1個体との交配から得られたF1世代2個体(雌1,雄1)の毛色および皮膚色は、両親よりもかなり濃い灰色を示した。この毛色および皮膚色は、NAGライン(正常毛色)の雌個体とBANラインの雄個体から得られるF1個体の毛色(Ishikawa and Namikawa,1991)と同様であり、OKIラインに出現した毛色変異遺伝子とBANライン型被毛色の発現に関与す

る遺伝子は異なる遺伝子座に存在することが判明した。

3) 連鎖解析

同座性検定の際に得られたF1個体同士を交配して、F2世代112(雌48,雄64)個体を得た。F2世代で出現した個体の表現型は正常毛色型,クリーム毛色型,OKIラインに出現した毛色変異型,淡いクリーム毛色型の4種類に大別できた。このうち、淡いクリーム毛色を呈した個体は、後代検定によりOKIラインに出現した毛色変異遺伝子とクリーム毛色遺伝子(cr)をともにホモ型に有していることが判明した。F2世代における上記4種類の表現型の分離状況をTable Ⅳ-2に示した。クリーム毛色遺伝子座(cr)と毛色変異遺伝子座が連鎖関係にないと仮定したときの分離比(9:3:3:1)と4種類の毛色表現型の分離比との間に有意差はなかった(χ^2=1.905,0.50<P<0.70)。次に、正常型,巻き毛型,OKIラインに出現した毛色変異型,毛色変異かつ巻き毛型の4種類の表現型のF2世代における分離状況をTable Ⅳ-3に示した。巻き毛遺伝子座(ch)と毛色変異遺伝子座が連鎖関係にないと仮定したときの分離比(9:3:3:1)と4種類の表現型の分離比との間に有意差はなかった(χ^2=1.682,0.50<P<0.70)。

4) F2世代に出現した4種類の毛色表現型の比較

正常個体は黒眼で濃い灰色の毛色と皮膚色を呈するのに対し、OKIラインに出現した毛色変異個体は赤眼で淡い灰色の毛色とピンク色の皮膚色を呈し、クリーム毛色個体は暗赤色眼でクリーム色の毛色とピンク色の皮膚色を呈した。また、毛色変異遺伝子とクリーム毛色遺伝子をともにホモ型に有している個体は、ピンク眼色で淡いクリーム色の毛色と淡いピンク色の皮膚色を呈した。皮膚色を濃い(黒い)順に並べると、正常>クリーム毛色>OKIラインに出現した毛色変異>両毛色遺伝子の2重ホモとなり、眼色を濃い(黒い)順に並べた場合も同様であった(Figure Ⅳ-1)。

4．考察

交配実験の結果、OKIラインに出現した赤眼でピンク色の皮膚色と淡い灰色の毛色を呈する毛色変異形質は、完全な浸透度を有する常染色体性単一劣性遺伝子に支配されていることが判明した。また、この遺伝子はクリーム毛色遺伝子(cr)やBANライン型被毛色の発現に関与する遺伝子とは異なる遺伝子座に存在することが判明した。そこで、この毛色変異形質を"red-eyed dilution"(赤色眼淡毛色)と命名し、遺伝子記号rdを提唱した。現在、OKIライン内でのrd遺伝子の遺伝子頻度は約75%程度である。

連鎖解析の結果(Table Ⅳ-2 and Ⅳ-3)、rd遺伝子座はcr遺伝子座とch遺伝子座のどちらとも連鎖関係にないことが判明した。cr遺伝子座とch遺伝子座が連鎖関係にないことは既に報告されている(織田,1989)ため、これら3種の遺伝子座は互いに連鎖関係にないことが判明した。これらの突然変異遺伝子は、いずれも表現型において識別が容易であるため、新たな突然変異遺伝子が出現した場合、連鎖解析を行う有用な遺伝標識になると考えられた。また、連鎖解析の過程で、rd遺伝子がホモ型になっている場合ではcr遺伝子は付加的に作用することが判明した。すなわち、毛色,皮膚色,眼色とも色素発現の多い(濃い)順に並べると(+/+,rd/rd)>(cr/+,rd/rd)>(cr/cr,rd/rd)となり、この3種の遺伝子型は肉眼での判別が可能であった(Figure Ⅳ-2)。ただし、(cr/cr,+/+)個体と(cr/cr,rd/+)個体の肉眼での区別は不可能であり、cr遺伝子がホモ型になっている場合のrd遺伝子の付加的な効果は認められなかった。

毛色変異形質が最初に出現した経緯とその遺伝様式から、沖縄県那覇市で捕獲し実験室に導入した103個体のうちの少なくとも4個体が、rd遺伝子のキャリアー(rd/+)で

あったと考えられた。これまでに、スンクスで発見,報告されている突然変異遺伝子はrd以外に、クリーム毛色:cr(Iseki et al.,1984),巻き毛:ch(織田,1989),行動異常:wz(Ohno et al.,1992),縮れ毛:kc(Ishikawa et al.,1992),スクラーゼ活性欠損:suc(Oda et al.,1991)があるが、kc以外の遺伝子はいずれも実験室に導入した野生個体が保有していた劣性遺伝子であることが判明している。したがって、スンクスのように実験動物化の歴史が浅く、遺伝的標識として利用できる突然変異遺伝子が多数発見されていない動物では、野生個体を実験室に導入して、野生集団内に潜在的に存在している突然変異遺伝子を積極的に発掘してゆくことも必要かもしれない。

(2) 巻き毛(ch),クリーム毛色(cr),赤色眼淡毛色(rd)遺伝子をホモ型に持ちスクラーゼ活性欠損個体(suc/suc)を分離するTESS(tester in Suncus)ラインの育成

1. 目的

スンクスでは、これまでに幾つかのラインが育成されているが、その多くはスンクスの地理的な遺伝的変異を、異なる採集地域別のライン間での変異として保存することを目的としたものである(Figure I-1)。前節で述べたように、スンクスで発見されている6種の突然変異遺伝子のうち5種は実験室に導入した野生個体が保有していた劣性遺伝子で、しかもそれらの遺伝子は、それぞれが異なる地域で捕獲された個体に由来している。したがって、スンクスでは突然変異遺伝子を複数保有し連鎖解析に使用できるようなラインはほとんど育成されてこなかった。しかし、スンクスの実験動

物としての利用価値を高めていくには、採集地域別のラインだけでなく、新たな特徴のあるラインを育成してゆく必要があると考えられる。

スンクスでは、今後も新たな突然変異遺伝子が発見されると予想される。そこで、互いに連鎖関係にないクリーム毛色(cr),巻き毛(ch),赤色眼淡毛色(rd)の3種の遺伝子をすべてホモ型に持ち、新たに出現してくる突然変異遺伝子との連鎖解析が可能なラインの育成を行った。

2．材料と方法

前節の連鎖解析の際に得られたF2個体のうち、3種の遺伝子座(ch,cr,rd)のうちの複数に劣性突然変異遺伝子を保有し、かつ繁殖が良好な7個体(雌3,雄4)とMIラインの雌1個体の合計8個体(Table Ⅳ-4)より基礎集団を育成した。基礎集団内での交配から出現した個体のうち、まず毛色についてcrとrd遺伝子がともにホモ型になっている個体を優先的に選抜し、その後、ch,cr,rdの3種の遺伝子ともホモ型になっている個体を選抜して、3種の突然変異遺伝子を全てホモ型に有するラインを育成した。動物の飼育管理については、第Ⅱ章で述べた方法に従った。

3．結果と考察

3種の遺伝子をすべてホモ型に有する個体(ch/ch,cr/cr,rd/rd)は、ピンク眼色に淡いピンク色の皮膚色と淡いクリーム色の毛色を呈し、かつすべての体毛が強い巻き毛となっていた(Figure Ⅳ-3)。このような特徴を有する個体は各世代30個体以上から成る閉鎖集団TESS(tester in Suncus)ラインとして育成され、3種の遺伝子がすべてホモ型になってから4世代が経過した。

MIライン個体はスクラーゼ活性が欠損しており、OKIラインとMIラインを起源として育成されたTESSラインにもスクラーゼ活性欠損遺伝子が存在すると考えられた。スクラーゼ活性欠損遺伝子は常染色体性単一劣性遺伝様式をとり、ホモ型個体(suc/suc)は活性がなく、ヘテロ型個体(suc/+)では活性が正常個体の半分程度になるため、腸管を摘出しスクラーゼ活性を調べることで、個体の遺伝子型が判別できる(Oda et al.,1991)。TESSライン35個体の遺伝子型を調べたところ、suc/sucが5個体,suc/+が14個体,+/+が16個体であり、TESSライン内でのsuc遺伝子の頻度は34.3%と推定された。また、各遺伝子型の分離比はハーディー・ワインベルグ平衡によく一致していた(χ^2=0.377,0.80<P<0.90)。TESSラインは、OKIラインとMIライン間のF2個体を主な起源として、3種の遺伝子(ch,cr,rd)がすべてホモ型になるように選抜交配して育成されたため、suc遺伝子座が3種の遺伝子座のいづれかと強く連鎖していれば分離比はハーディー・ワインベルグ平衡に一致しなくなると考えられる。したがって、suc遺伝子座は、ch,cr,rdのいずれの遺伝子座とも強く連鎖していないと考えられる。

スクラーゼ活性欠損個体は、給水瓶に水の代りに10%スクロース水溶液を入れて与えると脱水症状を起こし、2日間で体重が15%以上激減するため容易に識別できる(Figure Ⅳ-4)。ただし、体重激減後、飲水を10%スクロース水溶液から水に戻すと2～3日で体重が回復することから、これはスクラーゼ活性欠損個体を生きたまま選抜する有効な方法であった。したがって、この方法により選抜したTESSライン個体を使用すれば、互いに連鎖関係にない4種の遺伝子座(ch,cr,rd,suc)との連鎖解析が可能である。

（３） 遺伝的に大きく分化している2地域を起源とするラインからの近交系育成の試み

１．目的

マウスでは、それぞれが高い遺伝的均一性と特有の遺伝的性質を有する近交系が多数育成され、哺乳類の遺伝学の発展に大きな役割を果し、急速に進歩している分子遺伝学の分野においても貴重な資産であると考えられている(森脇,1993)。今後、スンクスにおいて分子遺伝学的な研究を行う際に、遺伝的プロファイルが大きく異なる複数の近交系の存在の必要性が高まってくることが予想されるが、スンクスでは未だ近交系は確立されていない。そこで、スンクスにおいて遺伝的性質の異なる複数の近交系の確立を目的とし、遺伝的に大きく分化していると考えられる異なる2地域を起源とするラインから近交系の育成を試みた。

２．材料と方法

1982年8月に鹿児島県徳之島で捕獲した野生個体(雌6,雄6)を起源とするTKUラインの1ペアより、1987年5月から兄妹交配による継代を開始した。また、1991年3月にネパールのカトマンズで捕獲した野生個体(雌2,雄1)を起源とするKATラインの1ペアより、1992年3月から兄妹交配による継代を開始した。動物の飼育管理については、第II章で述べた方法に従った。

TKU,KATラインとも染色体数は2n=40で、毛色にも大きな違いは観察されなかったが、成体体重はKATライン(雌:45-55g,雄:80-100g)とTKUライン(雌:30-40g,雄:50-60g)の間には顕著な差があるうえ、mtDNAの解析から両者の間にはマウス亜種間レベルに相

当する大きな遺伝的分化が存在することが判明している。ただし、両者の交配からは雌雄とも正常な(妊性を有する)F1個体を得ることができる。

3．結果と考察

TKUラインを起源とする系統は、育成開始から約7年間で兄妹交配11代(F11)に至り(Figure Ⅳ-5)、この時点(F11)での近交係数は0.90以上に達している。これまでにも、他の研究機関でスンクスの近交系作出の試みがなされたことがあったが、兄妹交配8代(F8)以上に至った系統はないため、F11はスンクスにおける兄妹交配の最多到達世代である。また、KATラインを起源とする系統は、約3年間で兄妹交配6代(F6)に至り(Figure Ⅳ-6)、この時点での近交係数は0.75程度であると推定される。

両系統とも兄妹交配5代(F5)から、近交退化によると考えられる現象が観察された。産仔数は兄妹交配開始当時(F1)の半分以下となり、初産日齢も遅延化した(Table Ⅳ-5)。しかし、TKUラインを起源とする系統の産仔数は、兄妹交配8代(F8)あたりから回復する兆しがあり、スンクスではまずF5～F7あたりで顕著な近交退化現象が起ると考えられる。元来スンクスはマウスに比べて繁殖力が劣るうえ、これに急激な近交退化現象がF5～F7世代で加わることが、これまで近交系スンクスが確立されなかった原因と考えられる。

一般に、近交系は兄妹交配が20代以上継続されている系統と定義されている。したがって現時点では、TKUあるいはKATラインを起源とする近交系が確立されるかどうかは全くわからない。しかし、もし両ラインを起源とする近交系の育成が成功すれば、遺伝的プロファイルが大きく異なる2つの近交系の存在は、スンクスの分子遺伝学的研究に有用であると期待されるため、今後も両系統の育成を継続する必要性は高い。

Table Ⅳ-1 Segregation of the red-eyed dilution shrews in five mating types examined at 20 days after birth with the naked eye

Crosses (Presumed genotypes)	No. of progeny obtained	Progeny phenotypes		Expected segregation ratio[a]	χ^2-value (Probability)
		Normal	Mutant		
(1) Normal (+/+)[b] × Mutant (rd/rd)	18	18	0	1 : 0	–
(2) Carrier (rd/+) × Carrier (rd/+)	27	21	6	3 : 1	0.111 (0.70<P<0.80)
(3) Carrier (rd/+) × Mutant (rd/rd)	84	42	42	1 : 1	0 (P>0.99)
(4) Carrier (rd/+) × Normal (+/+)[b]	20	20	0	1 : 0	–
(5) Mutant (rd/rd) × Mutant (rd/rd)	28	0	28	0 : 1	–

a) based on the presumption of an autosomal recessive inheritance

b) presumed by the test-crosses and pedigree analysis

Table Ⅳ-2 Phenotypes of progeny at the F2 generation between the cream (cr/cr, +/+) and red-eyed dilution (+/+, rd/rd) shrews

Phenotypes	No. of progeny observed			Expected segregation ratio[a)]
	Female	Male	Total	
Normal	24	33	57	63
Cream	9	15	24	21
Red-eyed dilution	12	13	25	21
Cream and red-eyed dilution	3	3	6	7

a) χ^2-value is 1.905 and the probability is 0.50<P<0.70 against the expected segregation ratio of 9:3:3:1 (normal: cream: red-eyed dilution: cream and red-eyed dilution)

Table Ⅳ-3 Phenotypes of progeny at the F2 generation between the curly hair (ch/ch, +/+) and red-eyed dilution (+/+, rd/rd) shrews

Phenotypes	No. of progeny observed			Expected segregation ratio[a)]
	Female	Male	Total	
Normal	26	39	65	63
Curly hair	6	10	16	21
Red-eyed dilution	14	10	24	21
Curly hair and red-eyed dilution	2	5	7	7

a) χ^2-value is 1.682 and the probability is $0.50<P<0.70$ against the expected segregation ratio of 9:3:3:1 (normal: curly hair: red-eyed dilution: curly hair and red-eyed dilution)

Table Ⅳ-4 Genotypes of the shrews in the fundamental colony to develop the TESS line

Sex	Line	Genotypes		
Female	(OKI × MI) F2	ch/+,	cr/cr,	rd/rd
	(OKI × MI) F2	ch/+,	cr/+,	rd/rd
	(OKI × MI) F2	ch/+,	cr/+,	rd/rd
	(OKI × MI) F2	+/+,	cr/cr,	rd/rd
	MI	ch/ch,	cr/cr,	+/+
Male	(OKI × MI) F2	ch/ch,	cr/+,	rd/rd
	(OKI × MI) F2	ch/+,	cr/cr,	rd/rd
	(OKI × MI) F2	+/+,	cr/cr,	rd/rd

Table Ⅳ-5 Litter size and age of primipara in the inbreeding line, TKU and KAT

	Litter size Mean ± SD (n)[a]		Age of primipara Mean ± SD (n)[a]	
	TKU	KAT	TKU	KAT
F1	4.0 (1)	5.0 (1)	149 (1)	93 ± 5 (3)
F2	3.3 ± 0.6 (3)	3.8 ± 1.9 (4)	148 ± 2 (2)	91 ± 2 (3)
F3	3.0 ± 0.8 (4)	3.4 ± 0.9 (5)	149 ± 0 (2)	98 ± 10 (3)
F4	3.2 ± 0.8 (5)	3.4 ± 0.9 (8)	371 ± 162 (5)	117 ± 33 (5)
F5	1.5 ± 0.8 (12)	2.4 ± 1.3 (8)	168 ± 10 (3)	138 ± 49 (4)
F6	1.9 ± 1.2 (12)	2.0 ± 0.6 (7)	206 ± 108 (3)	
F7	1.8 ± 0.5 (5)		214 ± 67 (3)	
F8	2.5 ± 1.1 (8)		122 ± 39 (3)	
F9	2.7 ± 1.0 (9)		227 ± 122 (3)	
F10	2.5 ± 0.5 (10)		257 ± 3 (3)	
F11	3.0 ± 0 (3)			

a) number of shrews observed

Explanation of Figures

Figure Ⅳ-1 (A) Coat and skin color of adult shrews. a: light-cream coat on pale pinkish skin of the cr/cr, rd/rd shrew, b: dilution coat on pinkish skin of the +/+, rd/rd shrew, c: cream coat on pinkish skin of the cr/cr, +/+ shrew, d: wild-type (dark-grey) coat and skin of the +/+, +/+ shrew. (B) Eye color of adult shrews in bright illumination. a: pink eye of the cr/cr, rd/rd shrew, b: red eye of the +/+, rd/rd shrew, c: dark-red eye of the +/+, +/+ shrew, d: black eye of the +/+, +/+ shrew.

Figure Ⅳ-2 (A) Coat and skin color of young shrews with different genotypes at the cr locus under the homozygous condition of the rd gene. a: light-cream coat on pale pinkish skin of the cr/cr, rd/rd shrew, b: the cr/+, rd/rd shrew in a color between the cr/cr, rd/rd and +/+, rd/rd shrew, c: dilution coat on pinkish skin of the +/+, rd/rd shrew. (B) Eye color of young shrews in bright illumination. a: pink eye of the cr/cr, rd/rd shrew, b: light-red eye of the cr/+, rd/rd shrew, c: red eye of the +/+, rd/rd shrew.

Figure Ⅳ-3 Adult male shrew of the TESS and NAG line (A, B). The TESS shrew (ch/ch, cr/cr, rd/rd) was characterized by pink eyes, curly hair and light-cream coat color on pale pink skin. The NAG shrew (+/+, +/+, +/+) exhibiting black eyes and wild-type coat-color on dark-gray skin.

Figure Ⅳ-4 The amount of body weight change (in % of the initial body weight) among the TESS line shrews having different suc genotypes, that aroused two days after replacement of the drinking water for its 10%-sucrose solution. Solid squares and circles indicate males and females, respectively. Genotypes were identified by examining the sucrase activity level in the intestine after the test.

Figure Ⅳ-5 Pdigree chart of the inbreeding strain originated from the TKU line.

Figure Ⅳ-6 Pedigree chart of the inbreeding strain originated from the KAT line.

Figure Ⅳ－1 (A)

(B)

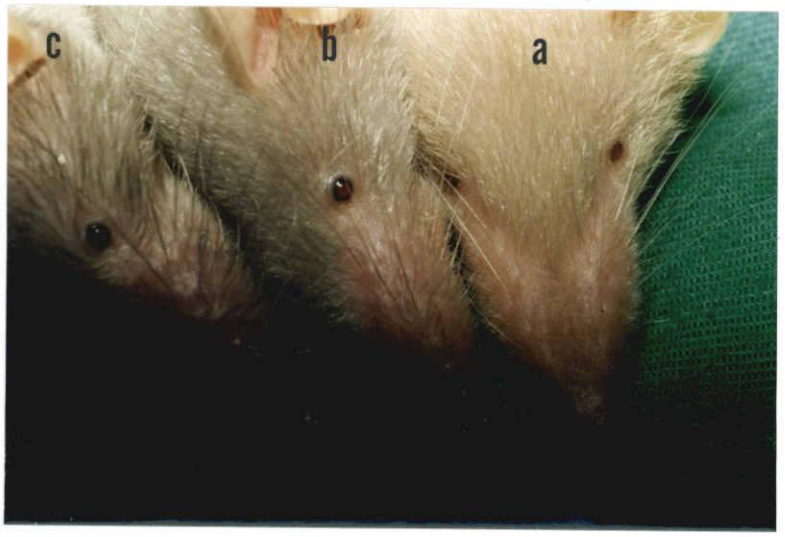


Figure Ⅳ－2 (A)

(B)

Figure Ⅳ-3 (A)

(B)

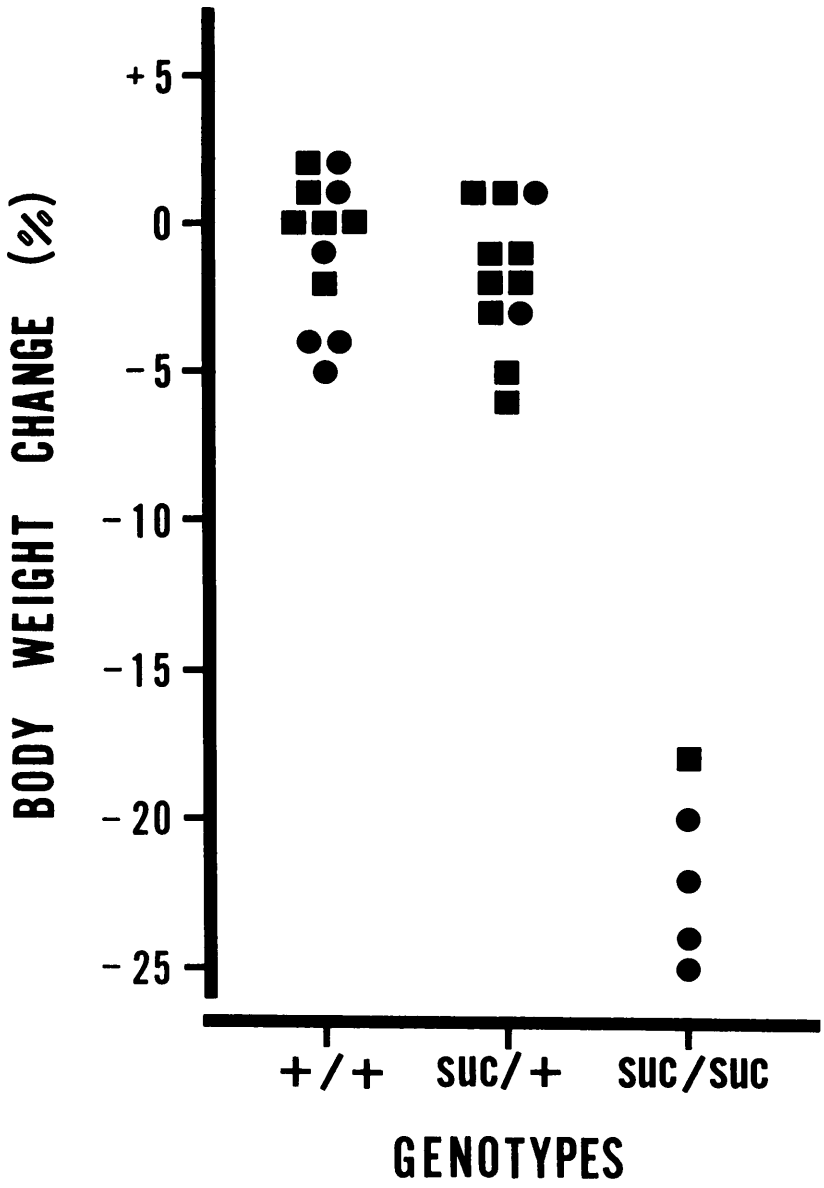


Figure Ⅳ-4

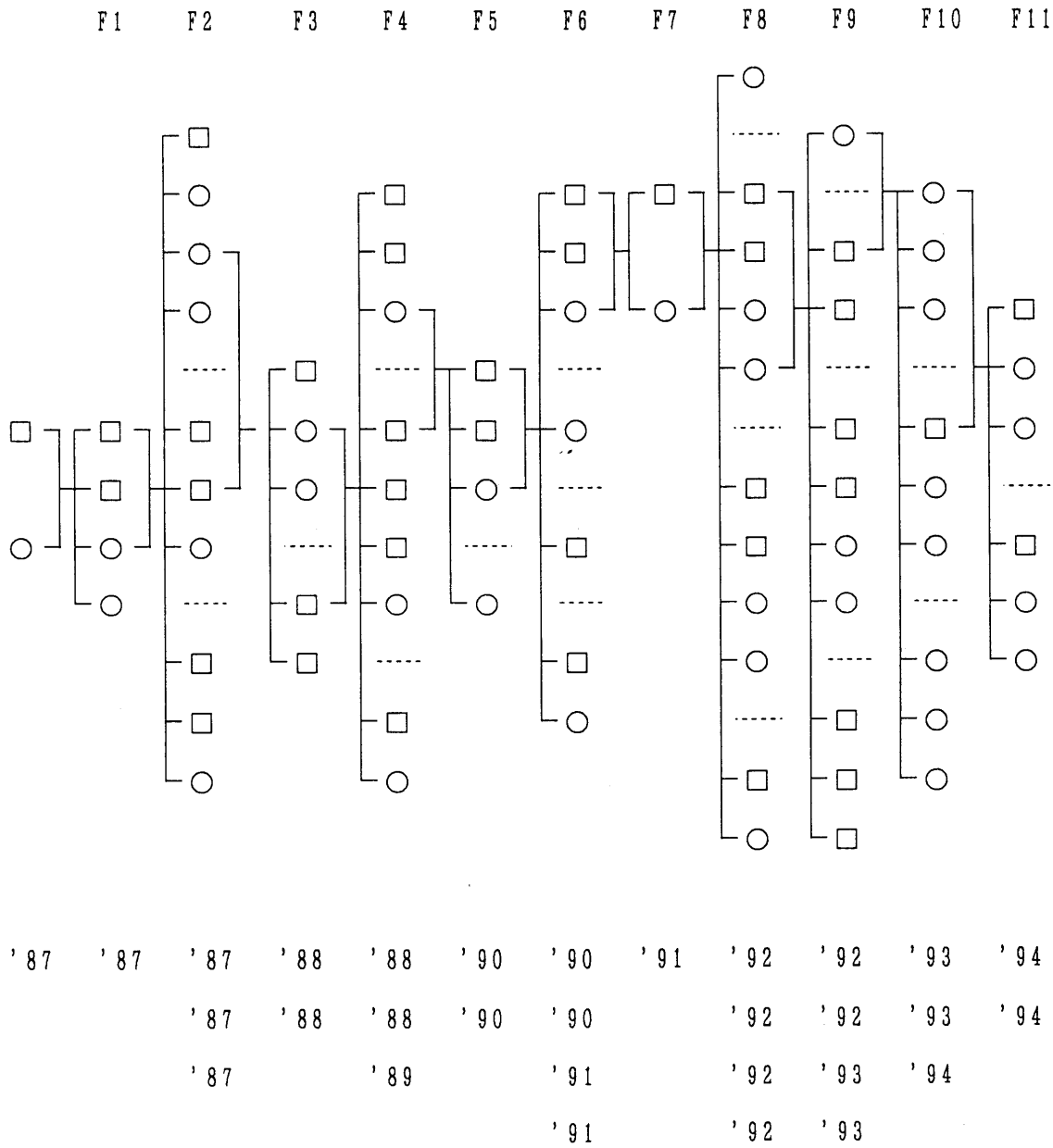

F1 F2 F3 F4 F5 F6 F7 F8 F9 F10 F11
'87 '87 '87 '88 '88 '90 '90 '91 '92 '92 '93 '94
'87 '88 '88 '90 '90 '92 '92 '93 '94
'87 '89 '91 '92 '93 '94
'91 '92 '93

Figure Ⅳ-5

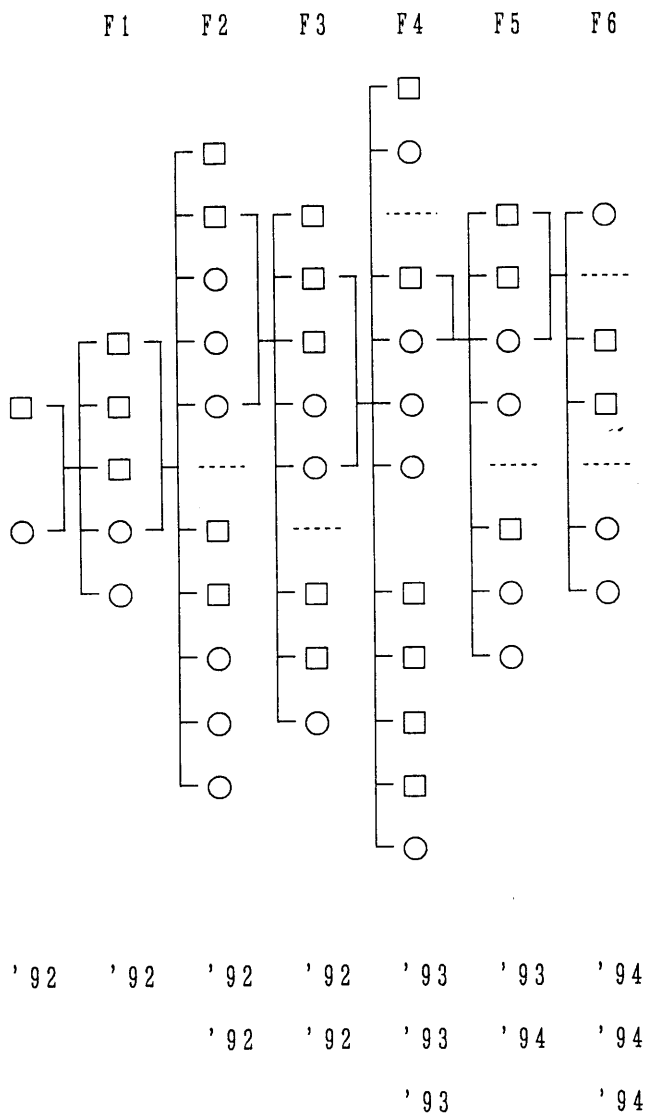


Figure Ⅳ-6

第Ⅴ章　総合論議

本研究では、実験動物育種学の立場から、新たな実験動物種として開発された食虫目スンクスを、より利用価値の高い実験動物として発展させることを目標とし、ライン育成の過程で発見された遺伝的異常(行動異常,糖尿病)形質から、自然発症モデルの開発を行った。旋回,首振り,多動などの行動異常を呈する個体からは、行動異常モデルとしてWZラインが、また、多尿,尿糖を呈する個体からは糖尿病モデルとしてEDSラインがそれぞれ育成された。WZラインについては、行動異常の原因となる物質的異常を同定し脳の行動制御の機構を解析するという観点から、また、EDSラインについては糖尿病の病因,病態や、持続的高血糖状態に伴う合併症の発症機構の解析という観点から、動物育種学以外の分野の研究者に利用され始めた。しかし、実験動物育種学の立場から、今後これらのモデル動物系統(WZ,EDS)から、研究者の使用目的に、より適した新たなラインを育成する必要がある。スンクスのライン内にはマウス,ラットの近交系とは異なり、高い遺伝的変異が保持されているため、新たなライン育成の手法としては選抜交配が有効であると考えられる。例えば糖尿病モデルにおいて、EDSラインは尿糖発症のみを指標として選抜交配により育成されたが、更にそのEDSラインにおいて、発症期間や血糖値など尿糖以外の選抜指標を設定することで、症状が重篤で発症期間が長期およぶラインとして育成することが可能であると考えられる。合併症は発症期間や症状の程度と密接な関係を持つことから、EDSラインより症状が重篤で発症期間が長期およぶラインは、合併症の発症機構を解析するうえで有用であり、育成を試みる必要があると考えられる。

スンクスでは、これまでにもその生物学的特性について種々の研究が行われてきた

が、その特性が十分に研究されているとは言い難い。例えば、本研究でスンクスの糖代謝について、げっ歯目の動物とは異なる機構を有する可能性を示唆したが、その具体的な差違については解明されていない。 疾患モデルを使用した研究の最終目的は、ヒトへの外挿であり、その外挿の精度を高めるためには、ある病態について多種多様なモデル動物を開発し、それらの間で十分な比較研究を行う必要がある。特に、異なる動物種のモデルの間で比較研究を行う際、両種間の生物学的特性(正常生理機能)の差異について考察することが不可欠である。したがって、スンクスの糖尿病モデルを研究する場合、糖尿病の病態解析と同時に、正常スンクスの糖代謝機構等の生理機能について研究する必要がある。

行動異常遺伝子(wz)も糖尿病の発症に関与する遺伝子群も、実験室に導入した野生個体に由来していると考えられる。また、これら以外にスンクスで発見されている突然変異遺伝子の大半も、導入した野生個体に由来していることが判明している。スンクスはマウス,ラットのように全世界で莫大な個体数が実験動物として飼育されているわけではないため、ライン内での突然変異の出現にはあまり期待できない。しかし、野生スンクスの分布はアジアを中心に広範囲に及んでおり、その中にはマウスの亜種間レベルに相当する大きな遺伝的変異が存在していることが、mtDNAの解析から明らかになっている(Yamagata et al.,1990)。遺伝的変異に富むスンクス野生集団には、自然発症モデルとしての可能性を有する、変異遺伝子が無数に存在している考えられる。したがって、野生個体を導入し実験室系統の個体と交配させて、野生集団の変異遺伝子を発掘することは、スンクスにおいて新たな自然発症モデルを開発するための有効な方法であると考えられる。

第VI章　総括

食虫目スンクスは、マウス,ラット等のげっ歯目の動物とは系統分類学上遠縁にあたり、これらとは異なる生物学的特性を有していることに注目され、実験動物化されてきた。その過程で、スンクスの様々な生物学的特性が明らかになり、複数の分野の研究材料として使用され、最近ではモデル動物としても利用され始めた。しかし、マウス,ラットのモデル動物を使用した研究の大半は、同種内で正常形質と異常形質を比較して得た情報から、ヒトの正常生理機能や病態の解明を試みているのに対し、スンクスでは、ヒトの生理機能や病態と類似したスンクスの正常形質を直接比較している点で大きく異なっている。この最大の原因は、スンクスは実験動物としての歴史が浅いため、遺伝的異常形質の発見,蓄積が十分でなく、同種内で異常形質と正常形質との比較研究を行う段階になかったことにある。しかし、最近、モデル動物として利用できる可能性のある遺伝的異常形質が、スンクス実験室系統(ライン)内に出現してきた。そこで、本研究では、スンクスの実験動物としての利用価値を高めることを目標とし、遺伝的異常形質から育種学的手法により、自然発症モデル動物の開発を行った。また、新たな遺伝標識の開発を行うと同時に、近交系の育成も試みた。

1．行動異常モデルの開発

マウスのシェイカー・ワルツァー行動に類似した行動異常(旋回行動,首振り行動,多動傾向)を呈す突然変異形質"waltzing"が、沖縄県宜野湾市で捕獲された野生雄個体とNAGラインの雌個体との戻し交配世代に出現した。交配実験と家系解析から、この行動異常形質は沖縄で捕獲された野生個体に由来し、完全な浸透度を有する常染色体

性単一劣性遺伝子(wz)により支配されていることが判明した。また同時に、wz遺伝子は完全な浸透度を有し、その発現には遺伝的背景の影響をほとんど受けないことも判明した。行動異常個体はほぼ正常な生育力,繁殖力を有しており、毎世代30個体以上から成るWZ(waltzing Suncus)ラインとして育成されている。

シェイカー・ワルツァー行動を示す多数の突然変異マウスでは、内耳に比較的強度の形態異常が観察される。そこで、"waltzing"スンクスの行動異常の原因解明のため、内耳と小脳の形態について組織学的な観察を行ったが、全く異常は認められなかった。したがって、"waltzing"スンクスの行動異常は内耳の形態形成の異常を伴わない別の原因に起因していると考えられ、その原因として中枢神経系の物質的異常が予想された。

２．糖尿病モデルの開発

バングラデシュで捕獲した個体群を起源とするラインに、糖尿病を呈する雄2個体を発見し、この2個体を起源として選抜交配により糖尿病を多発するEDS(early-onset diabetes in Suncus)ラインを育成した。げっ歯目以外の動物で糖尿病系統が育成されたのはこれが初めてであり、スンクスはマウス,ラットとは異なる生物学的特性を有していることから、EDSラインは大変興味深い糖尿病モデルである。選抜交配による発症頻度の変化や交配実験の結果から、糖尿病形質には複数の遺伝子の関与が考えられた。更に、ラインの育成経過の解析より、発症に関与する遺伝子群はバングラデシュで捕獲した野生個体群に由来すると推定された。また、発症頻度には明確な季節性(夏期＞冬季)が存在することから、環境要因が発症に強く関与していることが示唆されたが、その具体的な理由については不明である。

発症個体は生後2ケ月齢以前から顕著な糖尿病症状(多尿,尿糖,高血糖)を呈し若年発症である。糖負荷試験の結果から、発症個体はグルコースに対するインスリン分泌応答性の欠如による耐糖能の低下が顕著であり、NIDDM(インスリン非依存型糖尿病)であることが判明した。経時的な体重測定の結果、発症個体は肥満傾向を示さないことも明かとなった。以上より、EDSラインの糖尿病発症個体は肥満傾向を示さない若年発症NIDDM(インスリン非依存型糖尿病)であり、既存の糖尿病モデルには存在しない病型であることが判明した。複雑な病態を呈するヒト糖尿病の研究には、多種多様なモデルの存在が必要とされるため、糖尿病モデルとしてのEDSラインの存在は興味深い。また、高血糖状態が数ケ月間継続した個体では、白内障や腎症(メサンギウム領域の拡大)等の合併症が観察される場合があり、糖尿病の合併症モデルとしても更に検討する必要性があると考えられた。

3．遺伝標識の開発と近交系育成の試み

(1) OKIラインに、新たな毛色突然変異形質"red-eyed dilution"(赤色眼淡毛色)を発見した。交配実験と家系解析から、この形質が沖縄県那覇市で捕獲した野生個体に由来し、完全な浸透度を有する常染色体性単一劣性遺伝子(rd)に支配されていることが判明した。また、連鎖解析の結果、rd遺伝子座はクリーム毛色遺伝子座(cr)や巻き毛遺伝子座(ch)と連鎖関係にないことも判明した。

(2) OKIラインに出現した毛色変異個体(赤色眼淡毛色)と、MIライン個体(巻き毛,クリーム毛色,スクラーゼ活性欠損)を起源として、選抜交配により、3種の常染色体性単一劣性遺伝子(ch,cr,rd)をホモ型に有し、スクラーゼ活性欠損遺伝子(suc)を約35%の遺伝子頻度で保有するTESSラインを育成した。スクラーゼ活性欠損個体はス

クロース投与試験により容易に選抜できるため、TESSラインはch, cr, rd, sucの4種の遺伝子座との連鎖解析に利用可能である。

(3) 鹿児島県徳之島で捕獲した個体を起源とするTKUラインより、兄妹交配による継代を開始し、F11代に達した。また、ネパールのカトマンズで捕獲した個体を起源とするKATラインからも、同様に兄妹交配による継代を開始し、F6代に達した。

行動異常遺伝子(wz)や糖尿病発症に関与する遺伝子群の他、スンクスで発見されている突然変異遺伝子の大半は、実験室に導入した野生個体に由来していることが判明している。野生スンクスの分布は広い範囲に及び、その中にはマウスの亜種間レベルに相当する大きな遺伝的変異が存在することが、mtDNAの解析から判明している。実験動物としてのスンクスの背景に、遺伝的変異に富む野生集団が存在することから、スンクスでは遺伝的変異を利用した特徴ある系統の開発,育成の可能性が高いと言え、野生集団から遺伝的異常(変異)形質を積極的に発掘し、そのなかから、育種学的手法により新たな自然発症モデル動物を開発することも可能であると考えられる。また、こうして開発されたスンクスの自然発症モデルを、疾患モデルとして使用する場合、スンクスが有するヒトやげっ歯目の実験動物群とは異なる生物学的特性が、疾患モデルの病態と密接に関係している可能性もあるため、病態解析と同時に、スンクス特有の生物学的特性についても研究する必要があると考えられる。

謝辞

本研究を遂行するにあたり御指導を賜り、かつ本論文の御校閲をいただいた、名古屋大学農学部動物遺伝制御学教室・並河鷹夫博士と、本研究の全般にわたり御指導を賜った、名古屋大学農学部動物遺伝制御学教室・富田武博士、石川明博士、山縣高宏氏に深く感謝いたします。行動異常や糖尿病についての組織学的研究に御助言と御指導を賜り、かつ本論文の御校閲をいただいた、名古屋大学医学部動物実験施設・鬼頭純三博士に深く感謝いたします。糖尿病についての組織学的研究に御助言と御指導をいただいた、日本医科大学解剖学教室・山下和雄博士と、糖尿病の病態と合併症の解析について御助言と御指導をいただいた愛知県身体障害者コロニー・吉田太博士に深く感謝いたします。本研究の随所において、有益な御助言をいただいた、名古屋大学農学部動物繁殖制御学教室・若杉昇博士、家畜管理学教室・織田銑一博士に深く感謝いたします。また、動物の飼育管理に御協力いただいた伊藤美登氏に厚く感謝いたします。

引用文献

(欧文)

Bielschowsky,M. and Bielschowsky,F. (1956). The New Zealand strain of obese mice. Their response to stilbesterol and to insulin. Aust.J.Exp.Biol.Med., 34,181-198.

Crenshaw Ⅲ,E.B., Ryan,A., Dillon,S.R., Kalla,K. and Rosenfeld,M.G. (1991). Wocko, a neurological mutant generated in a transgenic mouse pedigree. J.Neurosci.,11,1524-1530.

Fitzgerald,L.W., Miller,K.J., Ratty,A.K., Gulick,S.D., Titeler,M. and Gross,K.W. (1992). Asymmetric elevation of striatal dopamine D_2 recepters in the Chakragati mouse: Neurobehavioral dysfunction in a transgenic insertional mutant. Brain Res.,580,18-26.

Goto,Y., Kakizaki,M. and Masaki,N. (1975). Spontaneous diabetes produced by selective breeding of normal wistar rats. Proc.Japan Acad.,51,80-85.

Green,M.C. (1989). Catalog of mutant genes and polymorphic loci. In Genetic Variants and Strains of the Laboratory Mouse (second edition), pp12-403, Lyon,M.F. and Searle,A.G. (ed.), Oxford University Press, Oxford.

Howard,C.F. and Palotay,J.L. (1979). Spontaneous diabetes mellitus in Macaca nigra and other nonhuman primates. In Spontaneous Animal Models of Human Disease (volume 1), pp121-126, Edwin,J.A., Billy,C.W. and Norman,H.A. (ed.), Academic Press, London.

Hummel,K.P., Dickie,M.M. and Coleman,D.L. (1966). Diabetes, a new mutation in the mouse. Science,153,1127-1128.

Ingalls, A.M., Dickie, M.M. and Snell, G.D. (1950). Obese, a new mutation in the house mouse. J.Hered., 41, 317-318.

Iseki, R., Namikawa, T. and Kondo, K. (1984). Cream, a coat-color mutant in the musk shrew. J.Hered., 75, 144-145.

Ishikawa, A. and Namikawa, T. (1987). Postanatal growth and development in laboratory strains of large and small musk shrews (Suncus murinus). J.Mamm., 68, 766-774.

Ishikawa, A. Tsubota, Y. and Namikawa, T. (1987). Morphological and reproductive characteristics of musk shrews (Suncus murinus) collected in Bangladesh, and development of the laboratory line (BAN line) derived from them. Exp.Anim., 36, 253-260.

Ishikawa, A., Akadama, I., Namikawa, T. and Oda, S. (1989). Development of laboratory line (SRI line) derived from the wild house musk shrew, Suncus murinus, indigenous to Sri Lanka. Exp.Anim., 38, 231-237.

Ishikawa, A. and Namikawa, T. (1991). Postanatal growth pattern of F_1 hybrids of a cross between two strains of large and small musk shrew, Suncus murinus. Exp.Anim., 40, 223-230.

Ishikawa, A. Hirunagi, K., Oda, S. Namikawa, T. and Tomita, T. (1992). Kinky coat, a new autosomal recessive mutation in the musk shrew, Suncus murinus. Exp.Anim., 41, 203-214.

Johnson, K.H. and Hayden, D.W. (1979). Diabetes mellitus in cats with amyloidosis of pancreatic islets. In Spontaneous Animal Models of Human Disease (volume 1), pp118-121, Edwin, J.A., Billy, C.W. and Norman, H.A.

(ed.), Academic Press, London.

awano, K., Hirashima, T., Mori, S., Saitoh, Y., Kurosumi, M. and Natori, T. (1991). New inbred strain of Long-Evans Tokushima Lean rats with IDDM without lymphopenia. Diabetes, 40, 1375-1381.

awano, K., Hirashima, T., Mori, S., Saitoh, Y., Kurosumi, M. and Natori, T. (1992). Spontaneous long-term hyperglycemic rat with diabetic complications. Diabetes, 41, 1422-1428.

ang, C. M. and Munger, B. L. (1976). Diabetes mellitus in the guinea pig. Diabetes, 25, 434-443.

akino, S., Kunimoto, K., Muraoka, Y., Mizushima, Y., Katagiri, K. and Tochino, Y. (1980). Breeding of a non-obese, diabetic strain of mice. Exp. Anim., 29, 1-13.

akino, S., Kunimoto, K., Muraoka, Y. and Katagiri, K. (1981). Effect of castration on the appearance of diabetes in NOD mouse. Exp. Anim., 30, 137-140.

aruoka, Y., Nishiyama, N., Saito, H., Nakajima, T. and Yazawa, K. (1989). Determination of catecholamines and their metabolites in brain, heart and adneral of Suncus murinus. Biogenic Amines, 6, 135-143.

latsuyama, M. and Suzuki, Y. (1982). Spontaneous development of pilosebaceous tumors in the Japanese house musk shrew (Suncus murinus). Gann, 73, 115-118.

leier, H. (1960). Diabetes mellitus in animals, a review. Diabetes, 9, 485-489.

leier, H. and Yerganian, G. (1961). Spontaneous diabetes mellitus in the

chinese hamster (Cricetulns Griseus). Diabetes, 10, 12-18.

Nakamura, M. (1962). A diabetic strain of the mouse. Proc. Jap. Acad., 38, 348-352.

Nakhooda, A. F., Like, A. A. and Chappel, C. I. (1977). The spontaneously diabetic Wistar rat. Metabolic and morphologic studies. Diabetes, 26, 100-112.

Nishimura, M. (1969). Breeding of mice strains for diabetes mellitus. Exp. Anim., 18, 147-157.

Nonaka, T. and Oki, Y. (1987). Obese diabetes induced by over-dose of monosodium-L-gultamate and/or monosodium-L-aspartate in KK mice. Bull. Nippon Vet. Zootech. Coll, 36, 8-15.

Oda, S., Yokota, K. and Takesue, Y. (1991). The house musk shrew: the new animal model for hereditary sucrase deficiency. In Man and the Laboratory Animal: Perspectives for 1992 (Proc. 4th Feder. Europ. Lab. Anim. Sci. Assoc. Symp. at Lyon-France in 1990), pp137-140, Found. Marcel Merieux, Lyon.

Ohama, T., Matsuki, N., Wang, C.-H., Saito, H., Kinoshita, M., Tsukamoto, K., Kurokawa, K., Katsuragawa, K., Yamanaka, M. and Teramoto, T. (1993). Characterization of serum lipoproteins from suncus: a candidate animal model for abetalipoproteinemia. J. Biochem., 113, 786-789.

Ohno, T., Ishikawa, A. Yamagata, T., Namikawa, T. and Tomita, T. (1992). Inheritance and breeding of the waltzing mutant in the musk shrew (Suncus murinus, Insectivora) characterized by the circling and head-shaking behaviors. Exp. Anim., 41, 123-129.

Pycock, C. J. (1980). Turning behavior in animals. Neuroscience, 5, 461-514.

Ratty, A. K., Fitzgerald, L. W., Titeler, M., Gulick, S. D., Mullins, J. J. and Gross, K. W. (1990). Circling behavior exhibited by a transgenic insertional mutant. Mol. Brain Res., 8, 355-358.

Rosenblum, I. Y., Black, H. E. and Capen, C. C. (1979). Diabetes mellitus in the dog. In Spontaneous Animal Models of Human Disease (volume 1), pp115-118, Edwin, J. A., Billy, C. W. and Norman, H. A. (ed.), Academic Press, London.

Sidman, R. L., Green, M. C. and Appel, S. H. (ed.) (1965). Catalog of the neurological mutants in the mouse, Harvard University Press, Cambridge, MA.

Steel, K. P. and Bock G. R. (1985). Genetic facters affecting hearing development. Acta. Otolaryn., 421, 48-56.

Ting, C.-N., Kohrman, D., Burgess, D. L., Boyle, A., Altschuler, R. A., Gholizadeh, G., Samuelson, L. C., Jang, W. and Meisler, M. H. (1994). Insertional mutation on mouse chromosome 18 with vestibular and craniofacial abnormalities. Genetics, 136, 247-254.

Tsuchitani, M., Saegusa, T., Narama, I., Nishikawa, T. and Gonda, T. (1985). A new diabetic strain of rat (WBN/kob). Laboratory Animals, 19, 200-207.

Tsuji, K. and Ishikawa, T. (1984). Some observation of the caravaning behavior in tha musk shrew (Suncus murinus). Behavior, 90, 167-183.

Ueno, S., Matsuki, N. and Saito, H. (1987). Suncus murinus: a new experimental model in emesis research. Life Sci., 41, 512-518.

Ueno, S., Matsuki, N. and Saito, H. (1988). Suncus murinus as a new

experimental model for motion sickness. Life Sci., 43, 413-420.

Yamagata, T., Tanaka, Y., Ishikawa, A., Namikawa, T. and Tomita, T. (1990). Genetic relationship among the musk shrews, Suncus murinus Insectivora, inhabiting islands and the continent based on mitochondrial DNA types. Biochem. Genet., 28, 185-195.

Yasuhara, M., Ohama, T., Matsuki, N., Saito, H., Matsushima, T., Kurokawa, K. and Teramoto, T. (1991[a]). Deficiency of apolipoprotein B synthesis in Suncus murinus. J. Biochem., 110, 751-755.

Yasuhara, M., Ohama, T., Matsuki, N., Saito, H., Shiga, J., Inoue, K., Kurokawa, K. and Teramoto, T. (1991[b]). Induction of fatty liver by fasting in suncus. J. Lipid Res., 32, 887-891.

Yazawa, K. Wang, C.-H., Maruoka, Y., Nakajima, T. Saito, H. and Nishiyama, N. (1989). Determination of catecholamines and their metabolites in adrenals of stress-loaded and wild suncus (Suncus murinus). Japan. J. Pharmacol., 51, 443-445.

Yokota, K., Oda, S., Takesue, S. and Takesue, Y. (1992). Intestinal disaccharidases in the house musk shrew, Suncus murinus: occurrence of sucrase deficiency. Comp. Biochem. Physiol., 103, 629-634.

Yosida, T. H. (1982). Cytogenetical studies on Insectivora. II. Geographical variation of chromosomes in the house shrew, Suncus murinus (Soricidate), in East, Southeast-and Southwest Asia, with a note on the Karyotype evolution and distribution. Japan. J. Genet., 57, 101-111.

Zucker, L. M. and Antoniades, H, N. (1972). Insulin and obesity in the Zucker genetically obese rat "fatty". Endocrinology, 90, 1320-1330.

(和文)

織田銑一・近藤恭司 (1976). リュウキュウジャコウネズミ Suncus murinus riukiuanus, その実験動物化の現段階, 哺乳類科学, 33, 13-30.

織田銑一・井関利恵子 (1983). スンクス(食虫目ジャコウネズミ)の実験動物化, 実験動物の遺伝的コントロール, pp125-138, 近藤恭司(監修), ソフトサイエンス社, 東京.

織田銑一 (1989). スンクス Suncus murinus における巻毛形質の遺伝子分析と形質の特徴, 名古屋大学環境医学研究所年報, 40, 268-271.

春日雅人 (1992). 糖尿病の分類と診断, 糖尿病の分子医学, pp14-21, 門脇孝(編), 羊土社, 東京.

長田嘉重郎 (1993). 糖尿病, 疾患別モデル動物の作製と新薬開発のための試験・実験法-薬理・薬効評価と安全試験への応用-, pp236-256, 内貴正治・浅野敏彦(監修), 技術情報協会, 東京.

近藤恭司(監修), 織田銑一・鬼頭純三・太田克明・磯村源蔵(編) (1985). スンクス-実験動物としての食虫目トガリネズミ科動物の生物学, 学会出版センター, 東京.

土繁勝 (1986). 比較生物学 2, 新実験動物学, pp225-256, 朝倉書店, 東京.

西村正彦 (1973). 自然発症糖尿病動物, Diabetes Journal, 1, 63-70.

吉村圭子・栗木隆吉・太田克明・横山明 (1985). 生殖, スンクス-実験動物としての食虫目トガリネズミ科動物の生物学, pp126-139, 近藤恭司(監修), 織田銑一・鬼頭純三・太田克明・磯村源蔵(編), 学会出版センター, 東京.

公尾隆夫・小高裕之 (1989). 糖尿病の病態モデル, 代謝, 26, 641-648.

森豊・横山淳一・蔵田英明・三浦順子・池田義雄・芹沢治・西村正彦 (1989).
自然発症糖尿病モデルWBN/kobラットに関する研究 第7報:糖尿病発症の性差について，糖尿病動物 3，pp163-168，後藤由夫(編)，医薬ジャーナル社，大阪.

森脇和郎 (1993). 遺伝子を基盤とする動物モデルの意義，実験医学，11，411-412.

主論文（要約）の印刷公表の方法および時期

1) Ohno, T., Ishikawa, A. Yamagata, T., Namikawa, T. and Tomita, T.
Inheritance and breeding of the waltzing mutant in the musk shrew (Suncus murinus, Insectivora) characterized by the circling and head-shaking behaviors.
Exp. Anim., 41, 123-129. (1992).

2) Ohno, T., Oda, S., Ishikawa, A. and Namikawa, T.
Red-eyed dilution (rd), a novel coat-color mutant gene in the musk shrew (Suncus murinus, Insectivora).
Exp. Anim., 41, 173-179. (1992).

3) Ohno, T., Oda, S. and Namikawa, T.
TESS line: a laboratory line of the musk shrew (Suncus murinus, Insectivora), triple-homozygous for the curly hair (ch), cream coat-color (cr) and red-eyed dilution (rd) genes, and segregating the sucrase deficients (suc/suc).
Exp. Anim., 43, 111-113. (1994).

4) Ohno, T. and Namikawa, T.
Development of a laboratory colony in the musk shrew (Suncus murinus, Insectivora) exhibiting high incidence of spontaneous diabetes.
Lab. Anim. Sci., submitted.