

アセチルコリンおよびヒスタミン吸入に対する気道感受性を異にする モルモット二系統の選抜育種

三上 博輝¹⁾・西端 良治¹⁾・河本泰生²⁾・猪 貴義²⁾

¹⁾日本臓器製薬(株)生物活性科学研究所 ²⁾岡山大学農学部

はじめに

モルモットは他の実験動物と比較して種々の特異形質を有している。その中でも、抗体産生能が高く、アレルギー反応を惹起しやすいことから、喘息・アレルギーモデルとして古くから繁用されてきた。

その他の形質として、抗生物質に対して鋭敏に反応すること、サルやヒトと同様にビタミンCの体内合成のできないこと、酸素欠乏に対して抵抗性を有することなどが良く知られている

このように、モルモットは古くから種々の実験に使用されてきたにも関わらず、実験動物の中でもマウスやラットと比較して基礎研究が進んでおらず、研究者の少ない領域の一つである。世界的にみても1960年代までは欧米各国や日本を中心として研究が進められてきたが、現在ではモルモットについての基礎研究は日本においては極めて少ない。

また、モルモットを用いた選抜育種による疾患のモデル動物の開発は世界的にみても3例しか報告されていない。これらの報告はいずれも家系図や遺伝率などの育種学的データは記載がほとんどない。

このような報告を参考にしながらモルモットの選抜育種に着手した。ヒト気管支喘息患者において気道過敏性の亢進していること、さらに喘息症状により過敏性の変化することは良く知られた事実である。しかしながら、この気道過敏性は先天的あるいは後天的に獲得されたものであるか否かについて未だ明確にされていない面も多い。そのため、著者らはこれらの研究には遺伝的に気道過敏性が亢進し、かつ一定の過敏性を有するモデル動物が必要と考え、患者の気道閾値を調べる際一

般的に使用されるアセチルコリン (ACh) およびヒスタミン (Hist) を吸入させ、その気道反応性を指標として気道過敏系およびその対照として気道非過敏系の二系統のモルモットを開発した。

また、これら動物を開発するまでの基礎的研究も含めて報告するが、紙面の都合で主要な点しか紹介できない。著者らの文献を参考にして頂きたい。

気道過敏性の動物種差¹⁾

ACh や Hist などの気道収縮薬をモルモットに吸入させると喘息様の気道反応が観察されるが、他の実験動物についての報告は極めて少ない。呼吸機能よりみた Hist に対する気道過敏性は健康人で10,000 μ g、イヌで30,000 μ g に対し、モルモットで640 μ g であり、極めて微量で反応することが知られている。また、ネコ、ラットおよびマウスに対し ACh や Hist を吸入させても、モルモットのみを生ずる喘息様症状は観察されないとする報告は古くからみられたが、いずれも総説あるいは単行本中に記載されており、出典が不明で原著論文を確認できなかった。

また、モルモットの気道過敏性が他の実験動物と比較し亢進していること理由の一つとして、末梢の気管支平滑筋の分布量が多く、良く発達していることが原因であるとされてきた。しかしながら、これらの報告も出典が不明であった。

これらの事実を踏まえ、気道過敏性の動物種差あるいは選抜育種に用いる動物種を明らかにする目的で以下の実験を行った。

気道過敏性：マウス、ラット、ハムスターでは ACh および Hist を60分間吸入させても全例とも呼吸状態のみでなく、一般症状にもなら変化は認められず、特にマウスについては吸入開始数10分後

にグルーミングが観察される例があり、これら動物の気道過敏性は極めて低いことが示唆された。逆にモルモットでは、ACh および Hist とともに過敏性が高く、全例に呼吸困難による横転が認められ、吸入開始から横転までの平均時間 \pm S. E はそれぞれ 186 ± 24 秒, 175 ± 11 秒であった。さらに、ウサギでは吸入開始10分前後より60分後まで軽度から中等度の呼吸困難の症状が観察されたが横転は認められず、モルモットよりも気道過敏性は明らかに軽度であった。

気管支の形態学的観察：ラットおよびハムスターの呼吸細気管支では、平滑筋の厚さの平均値 \pm S. E はそれぞれ $6.3 \pm 0.5 \mu\text{m}$, $6.1 \pm 0.3 \mu\text{m}$ であった。モルモットおよびウサギでは、それぞれ $17.2 \pm 1.2 \mu\text{m}$, $13.0 \pm 0.9 \mu\text{m}$ であり、ラット、ハムスターと比較して2倍以上の厚さがあり、肺の辺縁部に近接する部位でも認められたが、その局在はモルモットでは呼吸細気管支の全周囲に渡って平滑筋がみられたのに対し、ウサギでは一部で断続する部分も観察された（注：マウスには呼吸細気管支はない）。さらに、終末細気管支では今回の実験に使用した全動物種で平滑筋が認められたが、マウス； $7.9 \pm 0.8 \mu\text{m}$ 、ラット； $11.1 \pm 0.9 \mu\text{m}$ およびハムスター； $10.9 \pm 1.0 \mu\text{m}$ と少なく、逆にモルモット $37.6 \pm 4.1 \mu\text{m}$ およびウサギ $25.9 \pm 2.3 \mu\text{m}$ と多くの平滑筋が観察された。

これらの結果から、選抜育種にはモルモットが適していることが明らかにされた。また、気道過敏性と末梢気管平滑筋の間には密接な関係があることが示唆された。

モルモットにおける気道過敏性の基礎的検討²⁾

気道過敏性について研究するためには、実験に適用できる過敏性を有するモデル動物が必須である。喘息の発症機序を検討するための動物モデルは近年確かに多くなった。しかし、気管支喘息の病因・型が多様であるためモデル動物の開発が難しく、現在繁用されているアレルギー性の動物モデルにしても、ヒト喘息とのギャップは大きいとされる。また、気道過敏性のモデル動物にしてもウサギ、モルモットなどに種々の刺激物質を吸入させることにより作製する人為的方法が応用され

る。すなわち、適当な自然発症のモデル動物が存在しないことから、これらの動物の開発が望まれている。

気道過敏性について研究するためには過敏性を正確に、しかも数値化できることが必要である。ヒト臨床では、気道閾値 (dose threshold) として示されることが多いが、この方法は患者に対して ACh や Hist などを用い、低濃度から高濃度の薬液を倍量づつ濃度を増し、単位時間につき順次吸入させ、気道反応を惹起した濃度が閾値 ($\mu\text{g}/\text{ml}$) として示される。動物実験においても本方法が応用されている。しかしながら、この方法は多数の動物を用いる実験には繁雑であることあるいは時間を要するなどの面から極めて不利である。この点からの追及も行った。過去にモルモットの気道過敏性に関する応用研究は多数なされてきたが、性や過齢による相違などについてもほとんど知られていないことから、このことも併せて検討した。**横転時間と閾値との関係：**モルモットに対し、ACh および Hist の吸入開始から呼吸困難による横転までの時間 (横転時間) と閾値の間にはいずれも高い相関関係が認められた。この結果から、気道過敏性に関する実験において、横転時間を測定することより閾値と同様に数値化できることが明らかにされた。この方法の利点は、最初に実験目的に合った薬物濃度を予備実験で設定すれば、極

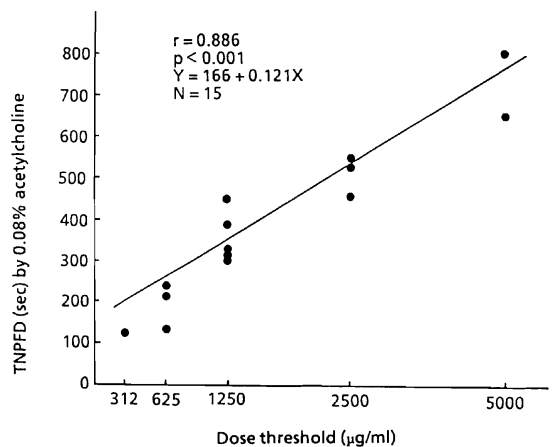


Fig. 1 Correlation between the time needed to produce falling down (TNPF) and dose threshold ($\mu\text{g}/\text{ml}$) of acetylcholine exposed to guinea pigs.

めて簡便な点である (Fig. 1)。

性 差：モルモットに対し、ACh および Hist の吸入による平均横転時間 \pm S. E は雄：356 \pm 31秒，雌：398 \pm 35秒および雄：121 \pm 5秒，雌：122 \pm 6秒であり、いずれも有意差はなく気道過敏性には性差のないことが明らかにされた。

週齢による変化：モルモットは生後2週齢より離乳が可能であることから、2から20週齢に至るまでのモルモットを用い、ACh および Hist の吸入による横転時間との関係について検討した結果、いずれも6週齢をピークとする横転時間の延長、すなわち気道過敏性の低下が認められた。さらに、8週齢以降の気道過敏性はほぼ一定となり、週齢により過敏性の変化することが明らかにされた。

気道過敏性におけるモルモット系統差³⁾

気道過敏性の亢進したモデル動物の開発にはモルモットが適していることが明らかにされた。さらに、モルモットの系統差を明確にすることで、選抜育種に適している系統およびコロニーを選択する目的で実験を行った。

横転時間：まず、ACh の吸入に対する横転時間による各系統モルモットの気道過敏性について示した。各系統の平均横転時間 \pm S. E は Strain 2；182 \pm 28秒，Strain13；148 \pm 22秒，JY-1；210 \pm 30秒，Hartley (日本 SLC)；342 \pm 24秒ならびに Hartley (常陸動物)；406 \pm 36秒であった。近交系の Starin 2，Starin 13 および JY-1 は非近交の Hartley と比較して過敏性は有意に高かった。しかしながら、近交系間あるいは非近交系間同志では有意差は認められなかった。

閾 値：各系統モルモットに対し、低濃度から高濃度の ACh を2分間ずつ吸入させた。Strain 2；524 $\mu\text{g}/\text{ml}$ ，Strain 13；424 $\mu\text{g}/\text{ml}$ ，JY-1；614 $\mu\text{g}/\text{ml}$ ，Hartley (日本 SLC)；1317 $\mu\text{g}/\text{ml}$ ，Hartley (常陸動物)；1651 $\mu\text{g}/\text{ml}$ であった。本方法においても、横転時間による方法と同様な結果が得られた。

摘出気管肺の灌流：各系統モルモットの摘出気管肺に ACh 溶液を灌流し、その収縮率で示した。近交系モルモットの用量反応曲線は非近交系の Hartley と比較し、左方 (低濃度) にシフトして

おり、約10倍反応性の高いことが示唆された。

以上の結果から、各系統モルモットの気道過敏性が明らかにされるとともに、常陸動物のコロニーの動物個体差が最もあることから genetic variation が大きいと考えられ、選抜育種に適していることが推察された。

選 抜 育 種⁴⁾

世界における近交系モルモットで現存しているものは約20系統であるが、なんらかの特性を有するモルモットの選抜育種は極めて少ない。しかも、その家系図、近交係数、遺伝率などもほとんど明らかにされていない。このように報告例が少ないために、近交退化あるいは維持管理にも充分注意を払いながら、兄妹 (full and half sib)、いとこを含む遺伝的血縁の関与する交配法により選抜育種を進め、F₆世代において二方向に分離した。この間約4年を要した。

家系図：選抜育種は長い年月を要し、しかもその信頼性を得るために家系図を残すことは極めて重要である。上述したような交配方法を採用したことから、複雑な家系図となった。各世代ごとに、いずれも産仔数をできるだけ多くとることで選抜圧を強め、選抜効果を高めた (Fig. 2, 3)。

出現率：世代の上昇とともに二方向に分離が進み、F₆世代において100%の出現率となった (Fig. 4, 5)。

近交係数：F₆世代における気道過敏性および非過敏系の近交係数は42—45%、42%であった。

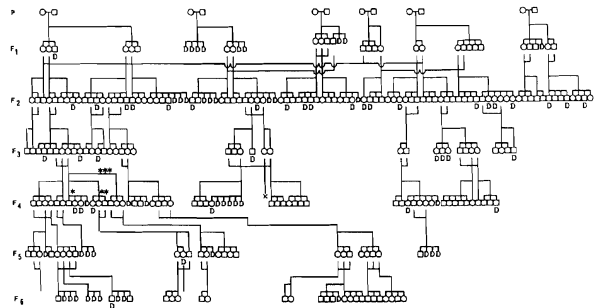


Fig. 2 Pedigree of bronchial hypersensitive line (BHL/S) to acetylcholine and to histamine. Note: \square : Male, \circ : Female, D: Death or stillbirth, \times : Infertility, *: First parity, **: Second parity, ***: Third parity.

遺伝率：選抜育種を行う場合，目標とする形質が遺伝的であるか否かについて推進する必要がある，そのため遺伝率が算出される。このことから，ACh に対する気道過敏系および非過敏系の遺伝率 (h^2) は Lush の方法により 0.54, 0.69 の比較的高い値が推定された。この結果から，モルモットの気道

過敏性の形質は遺伝的に支配されていることが明らかにされた。

過去にモルモットを用いた選抜育種において，遺伝率の示された例として体重の大小について調べられている。遺伝率の少ない理由としてモルモットはマウス，ラット，ハムスターなどと比較し，近交退化が著しく，産仔数も少ないうえに妊娠期間も平均60日以上と長いこと，さらに必ずしも育種の専門家ではなく，算出が困難であることがあげられる。また，比較的初期の世代から分離が認められたことから，モルモットの気道過敏性に関与する遺伝子は少数であることが推定された。

体重：選抜育種には各世代ごとに反応性のみならず，発育の良好な動物の選択や近交退化を防ぐためにも必要であることから，生後0，20および40日齢の体重につき調べた。この結果，気道過敏系の雌雄の各世代ごとの体重にはほとんど変化を認めなかったが，気道非過敏系の生後20および40日齢の体重は，世代の上昇とともに明らかな減少を示した。

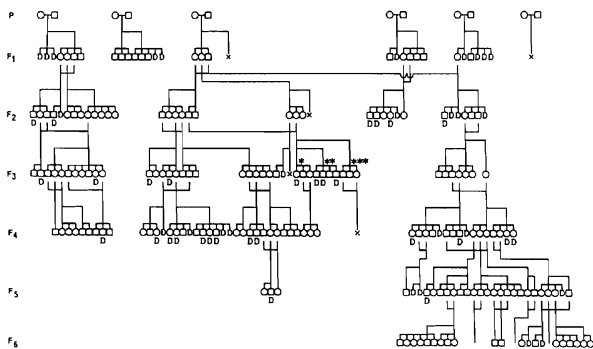


Fig. 3 Pedigree of bronchial hypersensitive line (BHL/R) to acetylcholine and to histamine. Note : □ : Male, ○ : Female, D : Death or stillbirth. × : Infertility, * : First parity, ** : Second parity, *** : Third parity.

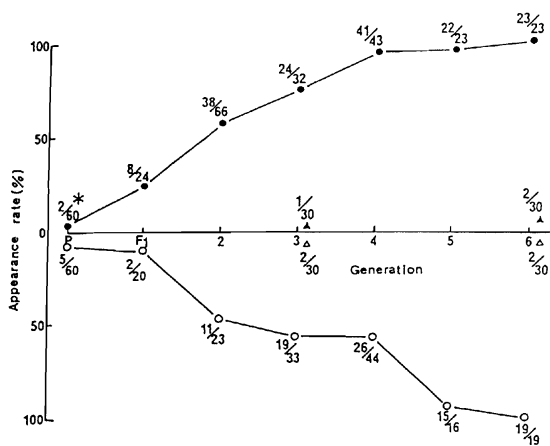


Fig. 4 Appearance rate (%) in bronchial hypersensitive line (BHS : ●) and bronchial hyposensitive line (BHR : ○) with each generation and original strain (▲ and △) to 0.08% acetylcholine exposure. Guinea pigs with the time needed to produce falling down (TNPFD) under 150 seconds to 0.08% acetylcholine were regarded as BHS, and those of TNPFD not less than 600 seconds to 0.08% acetylcholine were regarded as BHR.* : shows number or animals showing hypersensitivity or hyposensitivity/number of animals tested.

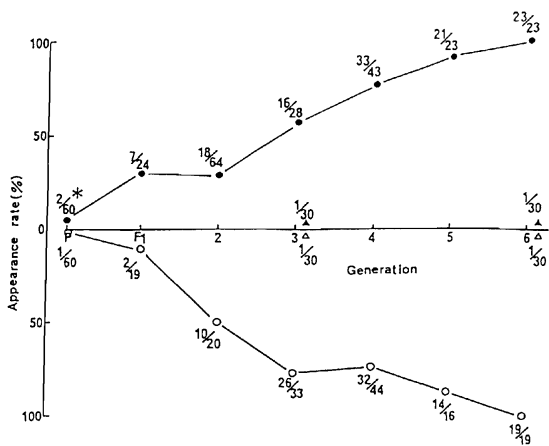


Fig. 5 Appearance rate (%) in bronchial hypersensitive line (BHS : ●) and bronchial hyposensitive line (BHR : ○) with each generation and original strain (▲ and △) to 0.025% histamine exposure. Guinea pigs of the time needed to produce falling down (TNPFD) under 150 seconds to 0.025% histamine were regarded as BHS, and those of TNPFD not less than 350 seconds to 0.025% histamine were regarded as BHR.* : shows number of animals showing hypersensitivity or hyposensitivity/number of animals tested.

一腹産仔数：繁殖性も重要である事から、各世代ごとの一腹産仔数についても調べた。気道過敏系および非過敏系の平均産仔数は2.24—3.47匹, 2.63—3.33匹の範囲内であったが、一定の傾向は観察されなかった。

死亡率：近交係数の上昇に伴う死亡率について調べた。気道過敏系および非過敏系における各世代ごとの生後40日齢までの死亡率は21.4—37.5%, 14.3—36.5%の範囲内であり、各世代ごとに大きな死亡率の変化が認められた。

性比：性比について、性別の不明な出産時の死亡率例が多いことから正確には確認できないが、F₆世代までの性別の総計は、気道過敏系で雄114匹：雌106匹, 気道非過敏系で雄92匹：雌90匹と約1：1の性比が観察された。

気道過敏系および非過敏系モルモットの生物学的特性⁵⁾

上記の選抜育種により開発された F₄—F₆世代のモルモットを用い生物学的特性について検討し、以下の結果が得られた。

気道抵抗：気道過敏系、気道非過敏系およびオリジンのモルモットに ACh および Hist の静脈内投与による気道抵抗について調べた。ACh の10および20 $\mu\text{g}/\text{kg}$ では、気道過敏系および非過敏系間に有意差が認められ、いずれも気道過敏系の反応が高かった。このように ACh に対する気道抵抗は用量依存的に増加し、気道過敏系、オリジン、気道非過敏系の順であった。特に40 $\mu\text{g}/\text{kg}$ の投与における平均気道収縮率 (%) \pm S. E は、気道過敏系で64 \pm 3%, オリジンで54 \pm 4%および気道非過敏系で41 \pm 3%であり、これら3群間にはいずれも有意差が観察された。また、低濃度から高濃度になるに従い反応差は顕著に認められた。さらに、Hist の場合でも同様の結果が得られた。

肺膜における receptors：気道過敏系、気道非過敏系およびオリジンのモルモットの肺膜における muscarinic ACh receptors (mAChR), histamine H₁ receptors (H₁ R), β -adrenergic receptors (β AdrR) について調べた。

mAChR における気道過敏系の B_{max} \pm S. E は 130 \pm 9.5 fmol/mg protein であり、気道非過敏系の 89 \pm 6.9 fmol/mg protein と比較し有意に多く、オリジンの 98 \pm 9.8 fmol/mg protein との間においても有意差が認められた。しかしながら、H₁ R および β AdrR では3群間に有意差はみられなかった。

抗体産生能：気道過敏系、気道非過敏系およびオリジンのモルモットを用い、卵白アルブミン + アルミナゲルを30日間隔で計5回の能動感作 (i. p.) により IgE 抗体産生能について比較検討した。これらモルモットの抗血清を使用し、7日間 homologous PCA 反応により抗体値について調べたところ、3群の平均体値 \pm S. E は気道過敏系で880 \pm 196, 気道非過敏系で1,000 \pm 268であり、3群間にいずれも有意差は認められなかった。

この結果から、モルモットにおける IgE 抗体産生能および気道過敏性に関する形質は互いに独立した遺伝形質であることが推定された。

謝 辞

このような機会を与えられました岡山実験動物研究会、猪 貴義会長、事務局、佐藤勝紀教授をはじめ、常務理事ならびにお世話頂きました諸先生方に厚く御礼申し上げます。

また、御多忙の中、座長をお務め頂きました岡山大学薬学部長、田坂賢二教授に深謝致します。

文 献

- 1) 三上博輝, 井上明文, 西端良治, 名村昌吾, 猪 貴義, 河本泰生: 実験動物, 37, 269 (1988).
- 2) Mikami, H., Nishibata, R., Kawamoto, Y. and Ino, T.: Exp. Anim., 38, 107 (1989).
- 3) Mikami, H., Nishibata, R., Kawamoto, Y. and Ino, T.: Exp. Anim., 39, 49 (1990).
- 4) Mikami, H., Nishibata, R., Kawamoto, Y. and Ino, T. Exp. Anim., 40, (1991), In press.
- 5) 三上博輝, 西端良治, 尾崎清文, 沼澤拓身, 河本泰生, 猪 貴義: 日疾動録, 6, 28, 1990.