

実験用ラットの遺伝的品質管理における技術改良について

医学研究科 附属動物実験施設 中西 聡

1. はじめに

実験動物は、生物学、医学、薬学、農学などの広範囲の研究分野で動物実験に使用するために、合目的で繁殖、生産された動物である。動物実験に使用される実験動物は主にラットとマウスが 90%以上を占めており、生命科学の基礎研究や医薬品等の開発等の分野で多用されてきた。動物実験は、実験の精度、再現性を高めるために、実験結果に影響を与える要因はできる限り制御する必要がある。影響を与える要因として、主に遺伝的要因、疾病要因、環境要因がある。実験動物の種や系統によって遺伝的要素は異なるので、遺伝的制御が行われていない動物を使用することにより、結果や成果のバラツキが生じる事になる。その為、実験動物における遺伝的品質管理の目的は、遺伝的要因によって生じる個体間のバラツキを小さくし、動物実験の精度と再現性を高めることである。

2. 実験用ラット

実験用ラットはドブネズミ（学名 *Rattus norvegicus*, 英名 *Norway rat*）を馴化したものである。雌雄の成熟体重は 300~600g であり、ヒトが片手で持つことができる大きさである。その性格も温順でヒトに馴れやすいため、取り扱いが容易である。マウスに比べ体が 10 倍ほど大きいことにより、血液や尿等の試料を経時的に多量に採取しやすく、臓器の移植も容易に行える利点がある。分類学的には、ヒトと同じ哺乳類に属し、栄養、代謝、生理学上の生物的特徴がヒトと類似している点が多いことから、医学、薬理学、毒性学、生物学、栄養学、行動・心理学、免疫学、腫瘍学などの幅広い分野での動物実験および医薬品等の毒性試験や安全性試験に広く使用されている。我が国においても高血圧、糖尿病、がん、てんかんなどの貴重なヒト疾患モデルラット系統が数多く開発されている。

3. 実験用ラットの遺伝的統御の違い

実験動物としてのラットは、その遺伝的統御の違いから、近交系 (Inbred strains) とクローズドコロニー (Outbred rats とも言う) に大別される¹⁾。近交系とは兄妹交配を 20 代以上継続し、ほぼすべての遺伝子座がホモ型に固定した遺伝的に均一な動物であり、その近交係数はほぼ 100%となっている¹⁾。更に、個体間の遺伝的相似度を示す血縁係数も 100%に近い為、近交系を使用した実験データは遺伝的に再現性が確保されることになるとともに、その誤差を少なくする大きな要因となっている。一方、クローズドコロニーは、5 年以上にわたって他の群からの遺伝子の移入がなく、一定の集団のみで繁殖を継続している維持集団である。一般的に、クローズドコロニーでは個体ごとに遺伝子組成が異なる¹⁾。このクローズドコロニーの遺伝的多様性は、各コロニーの遺伝子頻度の違いによって具体的に比較することができる。ある時点での集団内の遺伝子頻度を後代にわたって保つためには、その集団内に分離や隔離が生じることに起因する近交係数の上昇を抑制した、無作為交配や循環交配を行う必要がある。ヒト集団の遺伝的組成はヘテロ性が高く遺伝的に多様である。それゆえ、医薬品等の毒性試験、医学、農薬あるいは食品添加物などの安全性評価試験などでは、ヒトと同様な遺伝的ヘテロ性が高い実験動物を求めるという考えから、クローズドコロニーラットを用いる傾向がある²⁾。このように近交系ラットとクローズドコロニーラットは、遺伝的特徴が異なるものの、両ラット共に、その維持には遺伝的な品質管理が必要である^{3)、4)}。そして、研究の目的により、両者を使い分けることが重要である。さらに、近年における遺伝子改変技術の進歩により、ラットにおいても様々な遺伝子改変ラット (トランスジェニックやノックアウトラット) が作製されている。遺伝子改変ラット同士の交配から多重遺伝子変異モデルを作製し、遺伝子の相互作用の解析や疾患モデルとしての利用する研究もおこなわれている。

4. ラットのバイオリソース

京都大学大学院医学研究科附属動物実験施設は、2002 年よりナショナルバイオリソースプロジェクト「ラット」(NBRP-Rat) の代表機関として遺伝資源としてラットの「収集・保存・提供」事業を行っている。これまでに国内外から近交系ラット、ミュータント系統、遺伝子改変ラットなど 800 系統以上を収集しており、研究者の要望により提供されている。収集された主要な系統については、血液、尿、体温、行動などについて検査を行い、それぞれの検査項目ごとに系統ランキングが作成されている。また、ラット系統間の遺伝的特徴を比較するために、DNA 多型マーカーや遺伝子機能に関わる遺伝子型に関するプロファイルが作成されている。これらの情報はホームページで公開されており、研究目的に最適なラット系統を選択するのにとても参考となる^{5)、6)}。

5. 遺伝的品質管理

それぞれの近交系ラット系統が有する様々な形質は、遺伝的要因により強く影響されているので、維持集団への遺伝的に異なる個体の混入による遺伝的汚染によってラット系統の本来持つその特性は歪められる。そのような動物を使用した場合、実験に再現性が得られないという問題が生じることになる⁷⁾。近交系ラットに求められる厳密な遺伝的な品質管理は、その維持しているラット群に対して PCR (polymerase chain reaction) による遺伝多型マーカーを用いたジェノタイピングにより、遺伝的プロファイルを作成することから始まる¹⁾。次に、定期的にプロファイルと比較するという遺伝的モニタリングを実施することで、効率的に、かつ遺伝的に均一なラットを供給する体制を整えることができる^{3)、4)}。通常、PCR によるジェノタイピングを行う場合、被検体から組織を採取して DNA の抽出を行う必要がある。ラットにおいても遺伝多型マーカーを用いて、遺伝的なモニタリングが行われているが、その遺伝多型マーカーとして、SSLP (simple sequence length polymorphism) マーカーを用いる。SSLP マーカーは、1~4 塩基のコア配列が繰り返している配列のことでゲノム上に散在しており、繰り返し回数は系統間において相違がある⁸⁾。この領域を PCR により特異的に増幅した後、アガロースゲルにより電気泳動を行って系統間の多型を容易に判定することができる(図 1)。

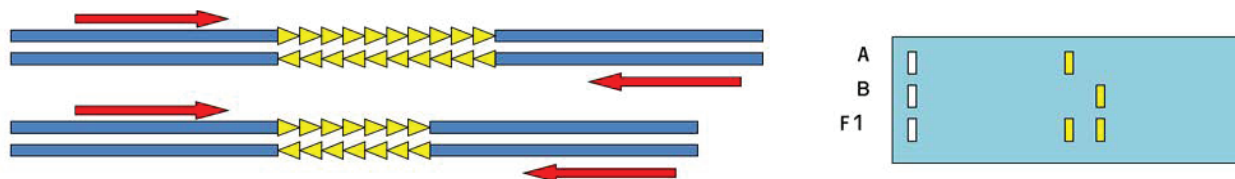


図 1 SSLP マーカーを用いた系統間多型の検出

NBRP-Rat に寄託された系統の内、京都大学にて生体で維持を行っている近交系ラット系統については、繁殖コロニー形成時に 20 個の SSLP マーカーを用いて遺伝的プロファイルを作成しておき、定期的な遺伝的モニタリングにより遺伝的品質管理を行っている。また、ミュータント系統や遺伝子改変動物においては、特定の対立遺伝子や標的遺伝子についてもジェノタイピングを行い、目的遺伝子を持つラットを選び繁殖に用いている⁹⁾。特に遺伝子改変ラット同士の交配による多重遺伝子変異モデルを作製する場合、単なる遺伝子改変ラットの維持だけでなく、交配によって得られた数多くの産仔から、目的遺伝子をもつラットを選びださなければならない。

6. 迅速、簡便なジェノタイピング法の改良について

ミュータント系統や遺伝子改変動物を維持し、供給する繁殖業者やバイオバンクなどでは、その遺伝的な品質管理の目的で、迅速、簡便ジェノタイピング法の確立が最重要課題である。また、不測の交雑など遺伝的汚染が疑われる場合、遺伝子型の再検査が必要なので、繰り返し PCR を行うためゲノム DNA の保存性も重要である¹⁰⁾。通常 PCR によるジェノタイピングを行う場合、被検体から組織を採取して DNA の精製を行う必要がある。DNA 精製にはいくつかの方法があるが、精製するためにはいくつかの工程を踏まなければならない。また、精製した DNA は冷蔵庫で保管を行う必要があり保管スペースの確保も必要となる。

NBRP-Rat では、DNA 精製や保存性の問題について検討を行い、2004 年から DNA の抽出、精製、保存用のカ

ードである Flinders technology associates (FTA) カード (GE ヘルスケア・ジャパン) を導入した。FTA カードは、幅広い生物資源から核酸を精製できるように設計されており、簡便に DNA を収集することができる。一旦、FTA カード上に血液を塗布すると、FTA カード上の試薬により細胞が破壊されることにより、露出した DNA が FTA カード上に固定される。FTA カード上で固定された DNA は微生物、酵素、ラジカルによる分解から保護されるので、室温で長期保管ができる。しかし、FTA カード上の血液を PCR テンプレートとして用いる場合は、FTA カード上の変性したタンパク質が PCR 反応を阻害するので、それを取り除く必要があり、専用の洗浄試薬で洗浄を行うように推奨されている。そこで、株式会社島津製作所が開発した血液中のタンパク質や糖などの PCR 阻害物質に対し中和作用を持つ PCR バッファーである Ampirect Plus と FTA カードと組み合わせて PCR を行う方法 (Amp-FTA 法) について改良を行った。Amp-FTA 法は、まず、マウスやラットから採取したごく少量の血液や口腔スワブなどの試料を FTA カード上に塗布して十分に乾燥させる。次に、FTA カード上に塗布した試料を直径 1.5mm のディスクに打ち抜く。そして、Ampdirect Plus バッファー、プライマーと *Taq* ポリメラーゼで調整を行った PCR 反応液とディスクを未精製のまま PCR テンプレートとし用いることで目的の遺伝子増幅を行うことができる (図 2)¹¹⁾。Amp-FTA 法は、DNA 精製をおこなう必要が無いので非常に効率よく内在遺伝子や外来性遺伝子のジェノタイピングが可能である。NBRP-Rat では 2018 年 9 月までに寄託されているミュータント系統ラットや遺伝子改変ラット 3 万検体以上のジェノタイピングを Amp-FTA 法を用いて実施してきた⁹⁾。

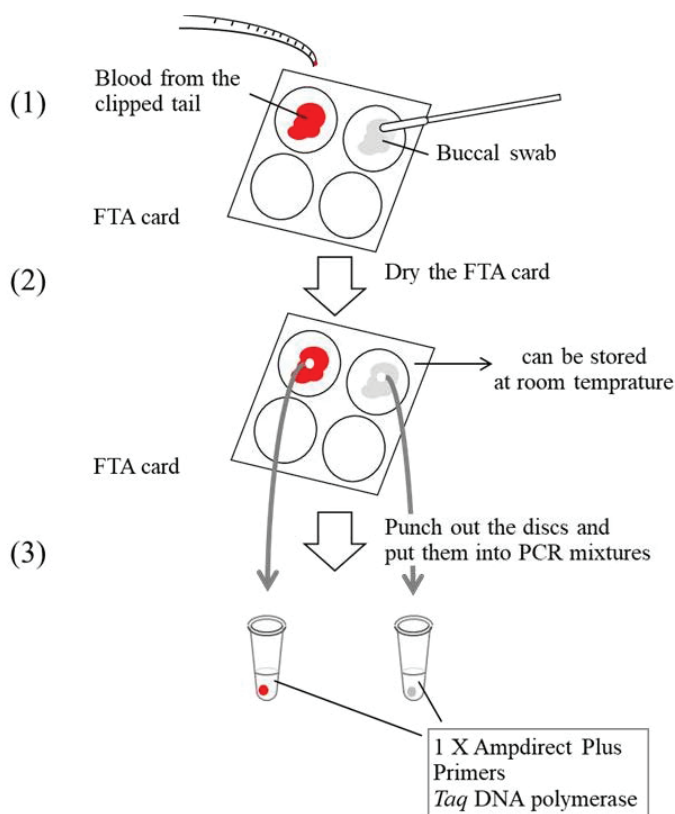


図 2 Amp-FTA 法の概略図¹¹⁾

7. Slc:Wistar クローズドコロニーラットと F344 近交系ラットとの遺伝的類似性の解明について

クローズドコロニーラットである Slc:Wistar ラットは、日本エスエルシー株式会社が生産、販売しているが、他の Wistar ラットに比べ小型であることが特徴である。さらに Slc:Wistar ラットの成長曲線、自然発症腫瘍の発症形質、免疫応答性および生化学的形質が F344 近交系ラットと類似していることが指摘されている¹²⁾。また、市販クローズドコロニーラットを対象にラットで既に報告されている癌、肥満、白内障、糸球体腎炎、糖尿病などの病態に関連する 13 個の原因遺伝子の変異と、細胞小器官輸送、情報伝達や求心路遮断

などの相同性にも関連することが知られている 3 個の毛色変異を調べた研究において Slc:Wistar では、調査した遺伝子のうち 9 遺伝子座が F344 同様にホモ接合体に固定しており、さらに、この 9 遺伝子座における Slc:Wistar と F344 の対立遺伝子の遺伝子型すべてが一致していることが報告されている¹³⁾。このことから Slc:Wistar ラットと F344 ラットの遺伝的類似性が推定された。しかしながら、これまで Slc:Wistar ラットの詳細な遺伝的特徴は明らかにされていなかった。そこで、NBRP-Rat で行われている近交系ラットの遺伝的モニタリング方法を応用し、27 個の SSLP マーカーを用いて Slc:Wistar ラットを含む、市販の 5 種類の Wistar クローズドコロニーラット群と F344 近交系ラットとの遺伝的プロファイルの比較を行った。それぞれマーカーの遺伝子座における対立遺伝子の遺伝子型を、PCR 産物のサイズが小さい順に *a*、*b*、*c*、*d* と名付けた。クローズドコロニーラットについては、各遺伝子座の対立遺伝子の頻度を求めた (図 3)。

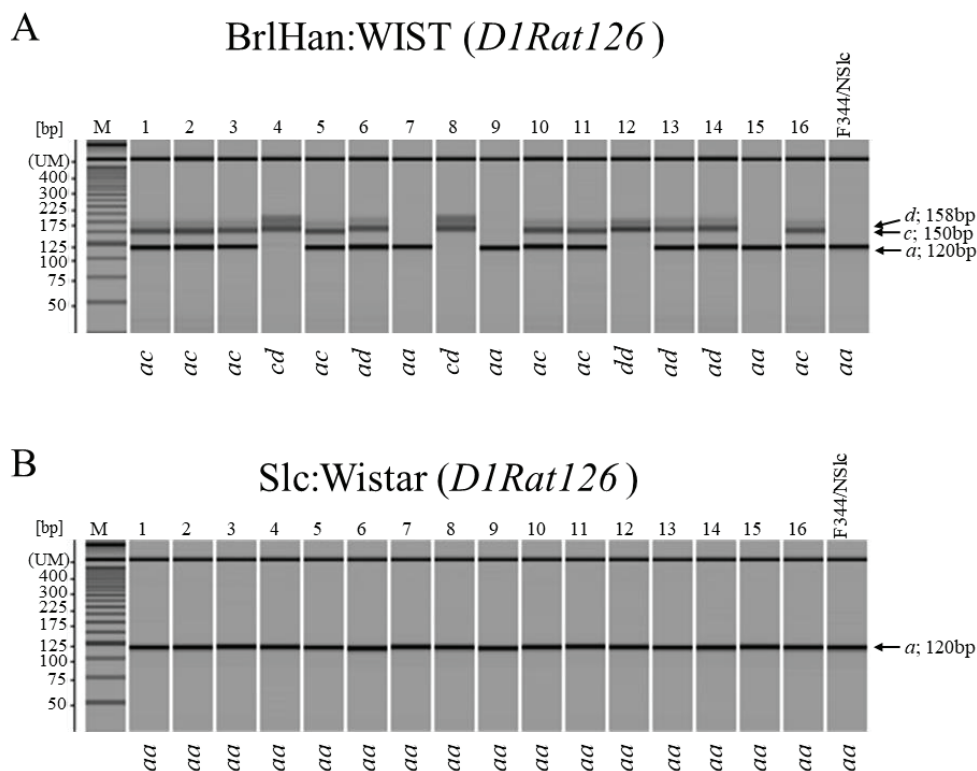


図 3 BrlHan:WIST と Slc:Wistar クローズドコロニーラットの PCR 産物と遺伝子型の代表的な遺伝子座 *D1Rat126* のゲルイメージ¹⁴⁾

その結果、Slc:Wistar ラットは 27 個の遺伝子座の内、23 個の遺伝子座が単一の対立遺伝子に固定化されており、その割合は 85%であった。また、その単一の対立遺伝子に固定化された遺伝子座の割合は、他の Wistar クローズドコロニーラットと比較して非常に高いことが明らかとなった。さらに、Slc:Wistar の固定化された 23 個の全ての遺伝子座の遺伝子型は、F344 近交系ラットと全て一致していた。それに加えて、Slc:Wistar ラットの 4 個の固定化されていない遺伝子座の対立遺伝子の頻度も、それぞれ F344 近交系ラットの特定の対立遺伝子に偏っていた (図 4)。このことより Slc:Wistar と F344 系統の遺伝的類似性が明らかとなり、Slc:Wistar を用いる際は、注意が必要であることが示唆された¹⁴⁾。以前より、Wistar ラット以外のクローズドコロニーラットにおいても異なる繁殖業者や生産場所毎にコロニーの形質などの特徴が異なることが指摘されてきたが、遺伝的特徴については詳細に調べられてなかった^{15)、16)、17)}。今後は、近交系ラットのみならず、クローズドコロニーラットにおいても SSLP マーカーを用いた遺伝的モニタリングが重要であると思われる。

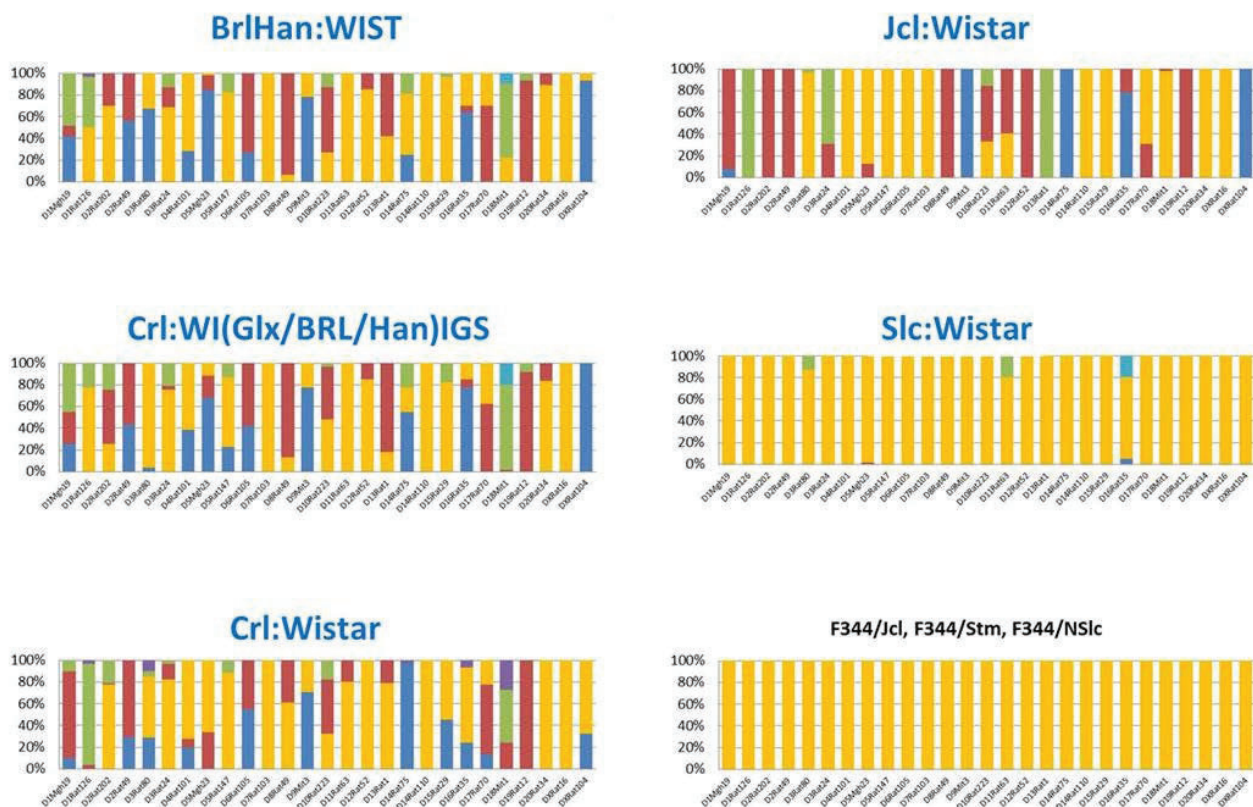


図4 Wistar アウトブリード集団と F344 近交系ラットの 27 の SSLP マーカーの各対立遺伝子の分布図¹⁴⁾
それぞれの集団の各遺伝子座の対立遺伝子の遺伝子頻度を示した。F344/Jcl、F344/NSlc と F344/Stm で一致していた同一対立遺伝子を黄色で表した。その他の対立遺伝子は、赤色、青色、緑色、紫色で表した。

8. おわりに

実験用ラットの遺伝的品質管理における技術改良について述べた。今回紹介した Amp-FTA 法は、DNA 抽出、精製の過程が不要となり、迅速、簡便なジェノタイピングが可能である。この方法の応用範囲は医学、獣医学、農学（食品、畜産、畜産、園芸等）など、PCR によるジェノタイピングを行う領域すべてにおいて応用可能であると考えられる。さらに、SSLP マーカーを用いた遺伝的プロファイル解析は、近交系ラットのみならず、クローズドコロニーラットの遺伝的品質管理にも重要な役割を果たすと期待され、今後、さらに実験用ラットを用いた研究の発展に寄与するものと考えられる。

参考文献

- 1) Silver, L.M. Mouse genetics concepts and applications. *Oxford University press*. pp.1-194. (1995)
- 2) Chia, R., Achilli, F., Festing, M.F., Fisher, E.M. The origins and uses of mouse outbred stocks. *Nature Genetics* 37 (2005) 1181-1186.
- 3) Festing, F.W.M., Totman, P. Polyvalent strain-specific alloantisera as tools for routine genetic quality control of inbred and congenic strains of rats and mice. *Laboratory Animals* 14 (1980) 173-177.
- 4) Fathey, J.R., Katoh, H., Malcolm, R., Perez, A.V. The case for genetic monitoring of mice and rats used in biomedical research. *Mammalian Genome* 24 (2013) 89-94.
- 5) 芹川忠夫. 実験用ネズミの起源と汎用化への道のり. *ファルマシア* 49: 769-773. (2013)
- 6) 真下知士、直井国子、庫本高志、芹川忠夫. 実験用ラットの有用性-ナショナルバイオリソースプロジェクト「ラット」. *遺伝*. 59: 79-84. (2005)
- 7) Kahan, B., Auerbach, R., Alter, B.J., Batch, F.H. Histocompatibility and isoenzyme differences

in commercially supplied "BALB/c" mice. *Science* 23 (1982) 379-381.

- 8) 村松正實、木南凌 監修. ヒトの分子遺伝学 第2版. メディカル・サイエンス・インターナショナル. 298-299. (2001)
- 9) Kuramoto, T., Nakanishi, S., Yamasaki, K. *et al.* Genetic quality control of the rat strains at the national bio resource project - rat. *Interdisciplinary Bio Central* 2 (2010) 1-8.
- 10) Nitzki, F., Kruger, A., Reifenberg, K., *et al.* Identification of a genetic contamination in a commercial mouse strain using two panels of polymorphic markers. *Laboratory animals* 41 (2007) 218-228.
- 11) Nakanishi, S., Kuramoto, T., Serikawa, T. Simple genotyping method using Ampdirect® Plus and FTA® technologies: application to the identification of transgenic animals and their routine genetic monitoring. *Laboratory Animal Research* 25 (2009) 75-78.
- 12) Tayama, K., Fujii, T., Hiraga, K. Comparison of characteristics between F344 and Slc:Wistar rats-Slc:Wistar rats cannot be distinguished from the F344 strain. *Jikken Dobutsu* 35 (1986) 65-76.
- 13) Kuramoto, T., Nakanishi, S., Serikawa, T. Functional polymorphisms in inbred rat strains and their allele frequencies in commercially available outbred stocks. *Physiological Genomics* 33 (2008) 205-211.
- 14) Nakanishi, S., Serikawa, T., Kuramoto, T. Slc:Wistar outbred rats show close genetic similarity with F344 inbred rats. *Experimental Animals* 64 (2015) 25-29.
- 15) Yamada, J., Nikaido, H., Matsumoto, S. Genetic variability within and between outbred Wistar strains of rats. *Jikken Dobutsu* 28 (1979) 259-265.
- 16) William, F., Mac, Kenzie., F. M. Garner. Comparison of neoplasms in six sources of rats. *Journal of the National Cancer Institute* 50 (1973) 1243-1257.
- 17) Nakanishi, S., Kuramoto, T., Kashiwazaki, N., Yokoi, N. Genetic profiling of two phenotypically distinct outbred rats derived from a colony of the Zucker fatty rats maintained at the Tokyo Medical University. *Experimental Animals* 66 (2016) 91-98.