

Slc:Wistar クローズドコロニーラットおよび **Zucker fatty** 由来クローズドコロニーラットの遺伝的プロファイル解析に関する研究

Study of genetic profiling of the Slc:Wistar outbred rats
and the Zucker fatty-derived outbred rats

中西 聡

目次

略号	3
緒言	5
第 1 章 Slc:Wistar クローズドコロニーラットと F344 近交系ラットの遺伝的な類似性の解明	13
緒言	14
材料と方法	17
結果	19
考察	21
第 2 章 東京医科大学で維持されていた 1 つの Zucker fatty ラットコロニーに由来する表現型が異なる 2 つのクローズドコロニーラットの遺伝的プロファイル解析	25
緒言	26
材料と方法	28
結果	31
考察	33
第 3 章 PCR 阻害物質を中和する PCR 緩衝液 Ampdirect Plus と FTA カードを組み合わせた簡便なジェノタイピング法 (Amp-FTA 法) の開発	36
緒言	37
材料と方法	40
結果	44
考察	46
総括および結論	51
謝辞	55

引用文献	56
付表	64
付図	74
Summary	95

略号

a : Agouti (アグーチ遺伝子座)

Alb : Analbuminemia (無アルブミン血症遺伝子座)

Amp : Ampdirect[®] plus (PCR 緩衝液)

A : Nonagouti (非アグーチ遺伝子)

b : Brown (ラット茶色の毛色遺伝子)

bp : Base pairs (塩基対)

BRL : Biological resource laboratories (生物資源研究所)

c : Albino (アルビノ遺伝子座)

Cblb : Casitas B-lineage lymphoma b (癌原遺伝子 Cbl-b)

Cckar1 : Cholecystokinin A receptor 1 (コレシストキニン A 受容体 1)

Cd36 : Cluster of differentiation 36 molecule (表面抗原分類 36 分子)

Cdkn1a : Cyclin-dependent kinase inhibitor 1A (サイクリン依存性キナーゼ阻害因子 1a)

Ct : Threshold cycle (閾値サイクル数)

DNA : Deoxyribonucleic acid (核酸)

fa : fatty (脂肪過多症)

FTA : Flinders technology associates card (FTA カード)

Han : Hannover (ハノーバー)

Ian5 : Immune associated nucleotide 4 like 1 (免疫関連ヌクレオチド 4)

IGS : International genetic standardization (IGS プログラム)

Kb : Kilo base (1000 塩基)

Lepr : Leptin receptor (レプチン受容体遺伝子)

Lss : Lanosterol synthase (ラノステロール合成酵素)

Mb : Mega base (100 万塩基)

Mrs2 : MRS2 magnesium transporter (MRS2 マグネシウムトランスポーター)

NBRP-Rat : National bio resource project-rat (ナショナルバイオリソースプロジェクト「ラット」)

n : Number (数)

neo : Neomycin-resistant (ネオマイシン耐性遺伝子)

ng : Nanogram (ナノグラム)

Ocif : Osteoclastogenesis inhibitory factor (破骨細胞形成抑制因子遺伝子)

PCR : Polymerase chain reaction (ポリメラーゼ連鎖反応)

RNA : Ribonucleic acid (リボ核酸)

RFLP : Restriction fragment length polymorphism (制限酵素断片長多型)

RGD : Rat genome database (ラットゲノムデータベース)

r : Ruby (ルビー遺伝子)

SNPs : Single nucleotide polymorphisms (一塩基変異多型)

SPF : Specific pathogen free (特定病原体除去)

SSLP : Simple sequence length polymorphism (単純配列長多型)

UV : Ultraviolet (紫外線)

Taq : *Thermus aquaticus* (Taq ポリメラーゼ)

V : Volt (電圧)

VNTR : Variable number of tandem repeat (タンDEM反復)

緒言

実験動物としてのラットは、ドブネズミ（学名 *Rattus norvegicus*, 英名 *Norway rat*）を馴化したものであり、同じクマネズミ属に含まれるクマネズミ（学名 *Rattus rattus*, 英名 *black rat*）とは異なる[Hayashi et al., 1979]。このラットは、雌雄の成熟体重が 300～600 g で、ヒトが片手で持つことができる大きさであり、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。ラットの妊娠期間は、20 日から 23 日で、産子数は通常 4 から 10 頭である。分類学的には、ヒトと同じ哺乳類（Mammalia）のうちの齧歯目（Rodentia）に属し、栄養、代謝および生理学上の生物的特徴がヒトと類似している点が多い。そのため、医学、薬理学、毒性学、生物学、栄養学、行動、心理学、免疫学あるいは腫瘍学などの幅広い分野での実験動物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[Mashimo et al., 2005; Yagami et al., 2010]。

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[Silver, 1995]。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[Silver, 1995]。更に、個体間の遺伝的相似度を示す血縁係数も 100%に近い場合、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[Silver, 1995]。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[Chia et al., 2005]。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[Festing and Totman, 1980; Fathey et al., 2013]。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。

ラットは、1850 年頃からヨーロッパで学術研究に用いられるようになった[Philippeaux, 1856; Savory, 1863; Crampe, 1885; Lindsey, 1979; 芹川, 2013]。1892 年には、スイスの神経病理学者であった Meyer A.が、ヨーロッパから米国にアルビノラットを持ち込んで、シカゴ大学の Donaldson H. H.ら米国の神経科学者にラットを使った神経システムの研究の有用性を説いたとされる[Cheryl, 2005]。1906 年に Donaldson は、シカゴ大学からフィラデルフィアの Wistar 研究所へ赴任した際、アルビノラットを導入した。そして、同一形質を持つラットを使用した実験を行うためにアルビノラットの標準化に取り組んだ[Donaldson, 1925]。Wistar 研究所では、クローズドコロニーの Wistar ラットとは別に、King H. D.によって近交系である Wistar King Albino 系統 (PA もしくは WKA ラット) を樹立した [Lindsey, 1979]。Wistar 研究所を由来とする非近交系のアルビノラットは、1912 年から Wistar 研究所から他の研究機関へ供給が開始された。現在、利用可能な実験用のラット系統 (近交系、クローズドコロニー) の多くは、この研究所を起源とする Wistar ラットに由来している [Abbott, 2004]。現在では、Wistar 研究所由来のラットは世界中に広がり、多くの Wistar ラットコロニーが存在し、様々な繁殖業者から入手することができるが、繁殖業者ごとに違う特徴を持つことが知られている[Sasaki et al., 2006; Yamada et al., 1979]。この他にもクローズドコロニーラットである Sprague-Dawley ラットや Long-Evans ラット、近交系ラットである BN (Brown Norway) ラット、F344

(Fischer344) ラット、AUG (August) ラット、COP (Copenhagen) ラットなどが開発されてきた [Lindsey, 1979; 芹川, 2013] (Fig. 1)。

わが国においては、1938 年以降に米国からクローズドコロニーラットとして Wistar ラット、Sprague-Dawley ラット、Long-Evans ラットや Zucker ラットなどが導入された。近交系としては F344 ラット、BN ラット、自然発症 I 型糖尿病モデル BB ラット [Chappel and Chappel, 1982]、および網膜変性モデルの RCS ラットなどが導入されている [Lindsey, 1979; Zhang et al., 2009]。このような近交系ラットは世界中に 300 系統以上樹立維持されており、その中にはわが国で開発されたヒトの病態に類似したヒト疾患モデルラットとして脳神経疾患 [Kitada et al., 2000]、高血圧 [Okamoto and Aoki, 1963]、糖尿病 [Yokoi et al., 2002; Yokoi et al., 2013]、肥満 [Watanabe et al., 2005]、がん [Ushijima et al., 2000]、てんかん [Serikawa et al., 1991]あるいは代謝異常 [Mechaly et al., 1998]など系統が多数含まれている (Table 1) [芹川, 2004; Atanur et al., 2013]。わが国では、ナショナルバイオリソースプロジェクト「ラット」(NBRP-Rat)において、このような様々な近交系ラット系統の収集、保存、提供、微生物的・遺伝的品質保証、系統データの充実と公開が行われている [Serikawa, 2004; 真下ら, 2005; Mashimo et al., 2006; Serikawa et al., 2009]。

しかし、クローズドコロニーにおいては、コロニー内の個体ごとに遺伝子組成が異なることや後代によって遺伝子頻度が変化することから、その遺伝的特徴が明らかにされてこなかった [Yamada et al., 1979; William et al., 1973; Chia et al., 2005]。Slc:Wistar クローズドコロニーラットと近交系 F344 ラットを用いた研究が多数報告されており、Slc:Wistar ラットと F344 ラット系統の様々な表現形質が類似していることが知られるが、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 [Maekawa et al., 1983; Tayama et al., 1986; Yagami et al., 1991; Sasaki et al., 2006]。また、肥満モデルである Slc:Zucker (Slc:ZF) ラットと肥満および糖尿病発症モデルである Hos:ZFDM-*Lepr*^{fa}

(Hos:ZFDM) ラットは、ともに東京医科大学で維持されていた同じ Zucker fatty (ZF) ラットコロニーを由来とするクローズドコロニーラットである。両者は由来が同じであるため遺伝的背景は非常に類似すると考えられており、これまで、表現型の比較を行った研究は報告されているが、詳細な遺伝的な比較は行われていなかった[Yokoi et al., 2013; Ghani et al., 2015]。

近年の研究では、内在性および外来性を問わず特定の遺伝子を標的とした研究も多く行われるようになってきており、単に同一の系統として維持されているラットでも、それを供給する繁殖業者や維持機関ごとに異なる遺伝的多型が混在していることも危惧されている。遺伝現象を DNA や RNA などの分子レベルで解明しようとする研究にこのラットが使用されているのであれば、用いるラットの遺伝的な品質管理は、非常に重要な基本事項となる。厳密な遺伝的な品質管理が実施されたラットを使用すれば、研究目的に応じた、使い分けが容易になり、再現性および信頼性のある結果が得られることが期待できる。そのため、実験動物を供給する繁殖業者およびバイオバンクにおいては、研究者の実験の再現性および信頼性を得るために、その実験動物の品質を確保し、安定した供給を行える体制を整える必要がある。

それぞれの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[Kahan et al., 1982]。このような意味から、保存している遺伝資源が遺伝的汚染によって、その特性が歪められることのないように、繁殖業者およびバイオバンクにおいては遺伝多型マーカーを用いて厳重な遺伝的品質管理

がなされなければならない[Yamada et al., 1982]。そのためには、適正な遺伝多型マーカーを選んでジェノタイピングを行い遺伝的プロファイル解析によって遺伝的特徴を明らかにすることが重要である。しかし、遺伝多型の検査は多様な方法があり、すべての方法を実施することは労力的あるいは効率的にも困難である。そのため、ラットを維持し、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、正確、迅速、簡便なジェノタイピング法の確立が最重要課題である。

このように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[Silver, 1995]。次に、定期的にプロファイルを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[Festing and Totman, 1980; Fathey et al., 2013]。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は、その開発の時期に基づき、第 1 世代から第 4 世代までに分類できる。

第 1 世代の遺伝多型マーカーとしての毛色遺伝マーカーや生化学的遺伝マーカーがあげられる。毛色遺伝マーカーは、アルビノ、頭巾班、野生色など系統ごとの毛色の多型に基づくものである。また、生化学的遺伝マーカーは、動物の組織抽出液、血液、尿、涙液などを試料として、そのサンプル中の酵素を含めたタンパク質の近交系間の多型に基づくものである[村松・小南(監), 2001]。第 2 世代の遺伝多型マーカーとしての RFLP (restriction fragment length polymorphism) は、ゲノム DNA を特定の DNA の特異的塩基配列を認識して、その部位を切断する制限酵素を用いて消化後、アガロースを用いて電気泳動を行い、特定の DNA 断片とハイブリダイスさせて、近交系間の多型を判定する

方法である[村松・小南（監）, 2001]。VNTR（variable number of tandem repeat）は、ゲノムに散在する繰り返し配列特異的 DNA プローブを用いて、近交系間におけるこの繰り返し数の違いに基づく対立遺伝子の多型を調べる方法である[村松・小南（監）, 2001]。第3世代の遺伝多型マーカーとしての SSLP（simple sequence length polymorphism）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。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。現在までに、多くの SSLP マーカーがラットの全染色体上にマッピングされている[村松・小南（監）, 2001]。第4世代の遺伝多型マーカーとしての SNPs（single nucleotide polymorphisms）マーカーは、対立遺伝子および介在配列における 1 塩基置換の違いであり、SNP は 300 bp から 1000 bp に 1 個の割合でゲノム上に広く分布している。それゆえ、ゲノム上の特定領域の詳細な連鎖解析に利用できる[村松・小南（監）, 2001]。

本研究の目的は、遺伝的プロファイル解析に有用な遺伝多型マーカーを用いてラットの遺伝的特徴を明らかにすることであり、さらに、遺伝的品質管理に適した迅速で簡便なジェノタイピング法についての技術開発を行うことである。第1章では、第3世代の遺伝多型マーカーである SSLP マーカーをクローズドコロニーラットの遺伝的プロファイル解析に適応し、その有用性を検討した。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（浜松）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[Tayama et al., 1986]。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。そこで本章では、多型性に富む第3世代の遺伝多

型マーカーである SSLP マーカーを用いて Slc:Wistar ラットと F344 ラットの遺伝的プロファイル解析を行った。同時に、遺伝的プロファイルを作成するために選定したゲノム全域に散在する 27 個の SSLP マーカーについてその有用性を検討した。

第 2 章では、第 1 章同様、第 3 世代の遺伝多型マーカーである SSLP マーカーを用いて東京医科大学で維持されていた 1 つの ZF ラットコロニーに由来する表現型の異なる 2 つのクローズドコロニーラットの遺伝的プロファイル解析を行った。ZF ラットはレプチン受容体 (*Lepr*) の単一劣性突然変異 (*fatty, fa*) を有する肥満モデル動物である。これまで、東京医科大学で維持されていた ZF ラットコロニーを起源として、日本エスエルシー株式会社に導入され維持されている Slc:ZF ラットと星野試験動物飼育所（茨城）に導入され肥満・糖尿病を発症する系統として分離された Hos:ZFDM ラット[Yokoi et al., 2013]の 2 系統のクローズドコロニーが確立されている。これまで、Slc:ZF ラットと Hos:ZFDM ラットは同じコロニーに由来するため遺伝的背景が類似すると考えられてきたが、これまで詳細な遺伝的な比較が行われてこなかった。そこで本章では、はじめに、Slc:ZF ラットと Hos:ZFDM ラットの遺伝的プロファイルを作成するために、第 1 章で選定した 27 個の SSLP マーカーを用いてゲノム DNA 抽出を必要としない迅速で簡易なジェノタイピングシステムにて遺伝的プロファイルを作成した。次に、これら 2 つのラットコロニーの遺伝的特徴を明らかにするために、Slc:ZF ラットと Hos:ZFDM ラットと同様、東京医科大学で維持されていた ZF ラットコロニーを由来とし近交化された KZF ラット系統と KZC ラット系統の遺伝的プロファイルを比較した。最後に、染色体上の分散状態を考慮して Y 染色体を除く全ての常染色体と X 染色体上に各 3~4 個の

SSLP マーカーを選択し、合計 72 個の SSLP マーカーを加えてより詳細な遺伝的プロファイル解析を行った。

第 3 章では、第 1 章と第 2 章で実施した遺伝的プロファイル解析など生体サンプルの遺伝子型判定を迅速かつ簡便に行う方法の開発とその応用について検討を行った。本章では、PCR 阻害物質を中和する PCR 緩衝液 Ampdirect Plus と Flinders technology associates (FTA) カードを組み合わせたゲノム DNA 抽出を必要としない迅速で簡易なジェノタイプリング法である Ampdirect Plus-FTA (Amp-FTA) 法の開発を試みた。また、外来性遺伝子の検出、第 3 世代の遺伝多型マーカーである SSLP マーカーと第 4 世代の遺伝多型マーカーである SNPs を用いて内在性遺伝子の検出について検討を行った。さらに、試料の採材方法や室温にて長期保存した場合の PCR に及ぼす影響についても検討を行った。

第 1 章 Slc:Wistar クローズドコロニーラットと F344 近交系ラットの遺伝的な類似性の解明

緒言

Wistar ラットとは、1900 年代初頭、米国フィラデルフィアの Wistar 研究所において実験用に繁殖されていたアルビノのクローズドコロニーラットに由来する。現在、利用可能な実験用のラット系統（近交系、クローズドコロニー）の多くは、この研究所を起源とする Wistar ラットに由来している [Abbott, 2004]。Wistar 研究所由来のラットは世界中に広がり、現在では、世界中に多くの Wistar ラットコロニーが存在し、様々な繁殖業者から入手することができる。Wistar ラットは、繁殖業者毎に違う特徴を持つことが知られているが、同じ Wistar ラットという名前と呼ばれている [Sasaki et al., 2006; Yamada et al., 1979]。

Slc:Wistar ラット（以後、Slc:Wistar と略する）は、1968 年、東京大学医科学研究所から日本エスエルシー株式会社に導入され、以後、同社で生産、販売されている。Slc:Wistar は、早熟で性質温順、体は他の Wistar ラットに比べて比較的小型であり、長期試験において高い生存率などの特徴がみられ、毒性学、発癌試験、一般薬理学、生物医学的研究に広く使われている [Maekawa et al., 1983; Watanabe et al., 1997]。

F344（Fischer344）ラットは、米国の Croker cancer reserch の M.R.Curtis がラットを用いた腫瘍誘発の研究を行うために 1919 年に繁殖業者から購入した数ペアのラットから作出した近交系のアルビノラットに由来する。F344 ラットは、比較的小型であり、寿命が長く、毒性試験、発癌試験や薬理試験等の分野で幅広く使用されている [Maekawa et al., 1983; Tayama et al., 1986; Yagami et al., 1991; Sasaki et al., 2006]。

Slc:Wistar の様々な表現形質は、F344 近交系ラットに極めて類似していることが知られており、Slc:Wistar と F344/DuCrI/CrIj の成長曲線および生存率の割合は、雌雄いずれ

においても両系統間で類似しているという[Tayama et al. 1986]。そして、自然発生腫瘍の発症臓器および組織学的所見は、Slc:Wistar と F344/DuCrIcrIj との間で類似している [Maekawa et al., 1983]。さらに、Slc:Wistar に自然発症した白血病組織の F344/NSlc への可移植性 [Yagami et al., 1991]、F344/DuCrIcrIj に自然発症した膀胱癌の Slc:Wistar への可移植性、および F344/DuCrIcrIj あるいは F344/NSlc と Slc:Wistar との間で移植皮膚片の生着性が認められている [Tayama et al., 1986]。また、肝臓におけるモノアミン酸化酵素 B 阻害薬に対する酵素活性の特異性が、Slc:Wistar と F344/DuCrIcrIj とでは同様であったと報告されている [Sasaki et al., 2006]。このように、Slc:Wistar 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は、F344 近交系ラットと類似していることが指摘されてきた。

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 (Table 2) 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いる (Table 3)。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を見出した [Kuramoto et al., 2008]。これらのことから Slc:Wistar は F344 近交系ラットの遺伝的背景が類似していると推定された。

そこで、本研究では Slc:Wistar の遺伝的プロファイルを作成するため、ラットの Y 染色体を除く全常染色体と X 染色体上に存在する多型性に富む 27 個の SSLP マーカーを選定してジェノタイピングを行い Slc:Wistar コロニーにおける各対立遺伝子の遺伝子頻

度を算出した。比較対照には、他のクローズドコロニーに属する Wistar ラットを 4 コロニーと近交系 F344 ラットを 4 系統用いた。

材料と方法

ゲノム DNA の抽出

クローズドコロニーに属する Wistar ラットは、市販の 5 種類のクローズドコロニーラット群を用いた。その内分けは以下の通りである。Crl:WI (Glx/BRL/Han) IGS (31 頭)、Crlj:Wistar (31 頭) は日本チャールス・リバー社 (横浜) から購入した。BrlHan:WIST (32 頭)、Jcl:Wistar (32 頭) は日本クレア株式会社 (東京) から購入した。Slc:Wistar (31 頭) は日本エスエルシー株式会社より購入した。いずれのクローズドコロニーラット群にも、同腹の個体が含まれないことを条件とした。ラットから切断した尾端から DNA 自動分離装置 PI-200 (倉敷紡績、大阪) よりゲノム DNA の抽出を行った。F344/NSlc、F344/DuCrlCrj、F344/Stm および F344/Jcl のゲノム DNA は NBRP-Rat から提供を受けた [Serikawa et al., 2009]。動物の飼育や実験手続きは京都大学動物実験委員会の承認を得て実施した。

27 個の SSLP マーカーを用いたジェノタイピング

Rat genome database (RGD) に登録されているラット SSLP マーカーの中から、ラット系統間で高い多型率、PCR 産物の系統間サイズ差および染色上の分散状態を考慮して 27 個の SSLP マーカーを選択した。(Fig. 2)。それぞれのマーカーはラット系統間において多型性が高く、近交系ラット 179 系統を調べた結果では、各マーカーにおいて平均 13.9 ± 3.5 個の対立遺伝子が検出されている [Mashimo et al., 2006]。この内、20 個の SSLP マーカーは、NBRP-Rat における遺伝的モニタリング検査に使用しているものである [Kuramoto et al., 2010]。さらに 7 個の SSLP マーカーを追加して、ラットの Y 染色体を

除く全常染色体と X 染色体を検査対象とした。PCR 緩衝液は、1×NH₄ 緩衝液、4mM の dNTPs、1.5mM の MgCl₂、0.2 μM のプライマーセットと 0.4 units の BIO Taq™ Hot Start DNA polymerase (Bioline, London, UK) で調製した。ゲノム DNA をテンプレートとして用いた。PCR 装置はサーマルサイクラー PC-808 (ASTEC、糟屋) を用いた。PCR の反応条件は、熱変性 94 度、30 秒間、1 サイクルの後に、熱変性 (94 度、30 秒間)、アニーリング (60 度、1 分間)、伸長反応 (72 度、45 秒間) の 3 段階からなる反応を 35 サイクル実施した。PCR 後の産物を、MultiNA マイクロチップ電気泳動システム (島津製作所、京都) により、DNA-500 キットを用いて解析を行った。この装置での分離能は、5% (25-100 bp)、5% (100-500 bp) であり、サイズの正確さは ±5 bp (25-100 bp)、±5 bp (100-500 bp) である。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。

結果

Slc:Wistar クローズドコロニーラットの遺伝的均一性について

すべての SSLP マーカーで、特異的な PCR 産物が増幅された。その PCR 産物のサイズ差を基にして対立遺伝子を決定し、それぞれの遺伝子座における対立遺伝子の頻度を集計した (Fig. 3)。特定の遺伝子座に単一の対立遺伝子のみが検出される場合、この遺伝子座は固定していると判断した。固定した遺伝子座の数は、次の通りである。

BrlHan:WIST は 4 遺伝子座 (15%)、CrI:WI (Glx/BRL/Han) IGS は 5 遺伝子座 (19%)、CrIj:Wistar は 6 遺伝子座 (23%)、Jcl:Wistar は 18 遺伝子座 (67%) であった (Fig. 4-1)。

そして、Slc:Wistar は 23 遺伝子座 (85%) であり、Slc:Wistar ラット集団の固定化されていない 4 遺伝子座は、特定の対立遺伝子が優位に占めていた (Fig. 4-2)。Slc:Wistar は他の Wistar クローズドコロニーラットと比較して、特定の対立遺伝子に固定化された遺伝子座の割合が高いことが判明した。

Slc:Wistar クローズドコロニーラットと F344 近交系ラットの遺伝的類似性について

以前より、Slc:Wistar ラットと F344 近交系ラットの遺伝的背景が非常に類似していることが報告されていた [Maekawa et al., 1983; Tayama et al., 1986; Yagami et al., 1991; Sasaki et al., 2006]。そこで、単一の対立遺伝子に固定化された Slc:Wistar ラットの各遺伝子座の遺伝子型について F344 近交系ラットの対立遺伝子と比較を行った。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/NSlc、F344/Stm、F344/Jcl 近交系ラットと全て一致しており、F344/DuCrI:CrIj とは 1 つの遺伝子座 (*DXRat16*) のみが違っていた。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

座は、それぞれ F344 近交系ラットの特定の対立遺伝子に偏っており、その頻度は約 80% に達していた。さらに、9 個の病態関連変異の遺伝子座についての対立遺伝子の比較成績を加えると [Kuramoto et al., 2008]、36 個の遺伝子座の内、32 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 89%であった。これらの固定化した遺伝子型は、F344 ラットと同一であった。以上より、Slc:Wistar と F344 近交系ラットのゲノムは、極めて類似していると推察された。

考察

研究目的に最適なラットを選択するためには、個々のラット系統の遺伝的特徴が明らかにされていることが大切である。本研究では、27個の SSLP マーカーを用いて Slc:Wistar ラットの遺伝的特徴を明らかにし、他の Wistar クローズドコロニーラットならびに F344 近交系ラットと比較した結果、Slc:Wistar 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。Slc:Wistar の単一の対立遺伝子に固定化された 23 個の遺伝子座の遺伝子型は、F344/Jcl、F344/NSlc、および F344/Stm と一致していた。また、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 6 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にも関連することが知られている 3 個の毛色変異について、Slc:Wistar コロニー内の各対立遺伝子の頻度を調べた結果、すべて遺伝子座が単一の対立遺伝子に固定化されており、その遺伝子型は F344 近交系ラットと同一であった [Kuarmoto et al., 2008]。本研究結果から、Slc:Wistar は遺伝的に固定化している傾向があり、Slc:Wistar と F344 近交系ラットの遺伝的特徴に類似性が高いことが確かめられた。

BrlHan:WIST ラットは、ドイツの Wistar Hannover に由来し Central Institute for Laboratory Animal Breeding (IBM) にて維持されていた。1989 年にスイスの RCC 社 (Fullinsdorf) に導入され、その後、日本クレア株式会社に導入されている (日本クレア株式会社総合カタログ)。Crl:WI (Glx/BRL/Han) IGS ラットも Wistar Hannover に由来する。RCC 社由来から Wistar Hannover ラット由来として Glaxo Wellcome 社へ供給さ

れた。そして、1996 年に英国チャールス・リバーに導入され、1997 年には米国チャールス・リバーへ移動された。その後、2007 年に日本チャールス・リバー社に導入された（日本チャールス・リバー株式会社 2014 総合カタログ）。Crlj:Wistar ラットは、1947 年に米国の Wistar 研究所から英国チャールス・リバーに導入された。そして、1975 年に米国チャールス・リバーへ移動し 1981 年に日本チャールス・リバー社に導入された（日本チャールス・リバー株式会社 2014 総合カタログ）。Jcl:Wistar ラットは、1970 年に英国の Carworth Fame より日本クレア株式会社に導入された（日本クレア株式会社総合カタログ）。これらすべての系統は遺伝的多様性を維持するためにランダム交配か循環交配を行って維持されている。従って、本研究の結果より、各 Wistar ラットの固定化された遺伝子座の割合は、各コロニーの由来と導入時期の違いにより遺伝的特徴が異なっていたので、固定化された遺伝子座の割合が異なったのではないかと推測できた。

Slc:Wistar ラットは 1968 年に東京大学医学研究所から導入され、4 つのグループによる循環交配によって繁殖維持されてきた。そして、生産集団内で 3~4 回繁殖させた後、その中から発育が良く健康なラットを次世代の雄ラットと雌ラットとして選択している（日本エスエルシー株式会社繁殖管理基準 2011）。これまで、他の集団や系統が Slc:Wistar 集団に導入されることがなかったとすれば、なぜ、Slc:Wistar ラットが F344 近交系ラットと遺伝的に非常に類似しているか疑問である。不測の交雑による遺伝的汚染、遺伝的浮動などが原因として考えられる [Silver, 1995]。F344 近交系との不測の交雑による遺伝的汚染が原因であれば、現在の Slc:Wistar の遺伝的背景は F344 と Slc:Wistar とのモザイク状になっていると推定される。むしろ、東京大学医科学研究所から日本エスエルシー株式会社に導入された時に、すでに Slc:Wistar ラットと F344 近交系ラット

の遺伝的プロファイルが非常に似ていた可能性が高い。あるいは、子宮切断術による微生物学的清浄化の過程を含めて、導入時における系統の取り違いによる可能性も考えられる。

1990 年代に行われた大規模な SSLP マーカーの開発以前は、ラットの遺伝多型マーカーは、ほんの僅かしか利用することができなかった [Serikawa et al., 1992]。従って、系統の導入当時に Slc:Wistar と F344 近交系ラットの表現型の類似性が指摘されていても、Slc:Wistar ラットの詳細な遺伝的プロファイルを作成することはできなかった [Tayama et al., 1986]。本研究によって、27 個の SSLP マーカーを使って、Slc:Wistar と F344 近交系ラットの遺伝的プロファイルが極めて似ていることが判明した。しかし、Slc:Wistar ラットの遺伝子座が全て固定しているのではなく、近交系ラットあるいは F344 系統とも異なる。

クローズドコロニーラットは、近交系と比べて遺伝的ヘテロ性が高いだけでなく、生産効率が良く安価なうえ、体が大きい、早熟で寿命が長い、性成熟が早い、新生児の死亡率が低い、病気に強いなどの形質を示すので、医薬品等の毒性試験、医学、農薬、食品添加物等の安全性試験やがん原発試験ほか様々な分野でモデル動物として多く利用されている。遺伝的ヘテロ性が高いクローズドコロニーラットを使用して実験を行う場合、個体間ではデータに誤差が生じるため、使用頭数を多くしてデータの信頼性を高める必要がある。また、クローズドコロニーの遺伝子座毎の対立遺伝子頻度などの遺伝的特徴は時間と共に変化する傾向があることを考慮することが重要である [Chia et al., 2005]。

本研究で明らかとなった Slc:Wistar ラットと F344 系統の遺伝的類似性を考慮すると、F344 系統と異なる系統として Slc:Wistar を比較実験に使用することは避けるべきである。

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 [Yamada et al., 1979; William et al., 1973]。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ける遺伝的モニタリングが重要であると思われる。

本章で選定した 27 個の SSLP マーカーは、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プロファイル解析に有効であることが示された。Slc:Wistar ラットの遺伝的特徴を調査した結果、Slc:Wistar ラットと F344 近交系ラットの遺伝的類似性が確認できた。従って、Slc:Wistar ラットを用いる場合は、F344 近交系ラットとの表現形質と遺伝的類似性を十分に考慮する必要があると考えられた。

第 2 章 東京医科大学で維持されていた 1 つの Zucker fatty ラットコロニーに由来する表現型が異なる 2 つのクローズドコロニーラットの遺伝的プロファイル解析

緒言

Zucker fatty (ZF) ラットは、1961 年 Zucker らによってアルビノ 13C 系ラットと黒色 M 系ラットの交雑種 13M 系から突然変異体として発見された肥満モデルラットである[Zucker and Zucker, 1961]。ZF ラットは、肥満に関連する原因遺伝子が同定されており、第 5 染色体上のレプチン受容体 (*Lepr*) の単一劣性突然変異 (*fatty*, *fa*) を有するクローズドコロニーラットであり、変異対立遺伝子のホモ型個体 (*fa/fa*) は生後 3 週齢頃から肥満を呈し、多食、高脂血症、高インスリン血症などヒトの肥満と類似した形質を示す。通常、雌雄とも肥満を示すホモ型個体 (*fa/fa*) は不妊であり、ヘテロ型個体 (*fa/+*) により繁殖が行われる。ZF ラットコロニーを由来とする Crl:ZUC-*Lepr^{fa}*[Frisbee, 2005], Hos:ZFDM (Hos:ZFDM-*Lepr^{fa}*) [Yokoi et al., 2013], Kwl:Zucker[Isozaki et al., 1999], Slc:ZF (Slc:Zucker) [Yokoi et al., 2013]などのクローズドコロニーラットや ZDF (Zucker diabetic fatty) ラット[Peterson et al., 1990]などの近交系ラットが確立されてきた。

その中で、Slc:ZF ラットと Hos:ZFDM ラットはともに東京医科大学で維持されていた 1 つの ZF ラットコロニーを由来とする。Slc:ZF ラットコロニーは、1996 年に東京医科大学から日本エスエルシー株式会社へ導入され肥満モデルとして確立された。一方、1992 年に東京医科大学から星野試験動物飼育所へ導入された ZF ラットコロニーの中から糖尿病を発症するラットが見出された。*fa/fa* ホモ個体の雄に繁殖性を有することから、血糖値を選抜基準として *fa/+*ヘテロの雌との選抜交配により、20 週齢前後でほぼすべての *fa/fa* ホモ個体の雄が糖尿病を発症するコロニーとして Hos:ZFDM を確立した[Yokoi et al., 2013]。Hos:ZFDM の *fa/fa* ホモ型個体には繁殖性があることが注目すべき表現型である。Slc:ZF ラットと Hos:ZFDM ラットは、東京医科大で近交化が進んだ段階で日本エスエルシーと星野試験動物飼育所へ導入され、両者の遺伝的背景は非常に類似すると考えられてきたが、これまで詳細な遺伝的な比較が行われていなかった。そこで、

2つのクローズドコロニーラットの遺伝的プロファイル解析により表現型相違の原因を探索できるのではないかと考えられた。

ラットの正確、迅速、簡便なジェノタイピング法として、PCR 阻害物質を中和する PCR 緩衝液である Ampdirect Plus と FTA カードを組み合わせることにより、FTA カードに採取した末梢血をそのままテンプレートに使用して PCR 増幅することができる Ampdirect Plus-FTA (Amp-FTA) 法が開発されている[Nakanishi et al., 2009]。マイクロサテライトマーカー (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であり、ゲノム上に散在し、繰り返し回数は系統毎に相違がある。PCR と電気泳動により SSLP マーカーを用いた遺伝的プロファイルにより得られた情報から、遺伝子地図の作成[Serikawa et al., 1992]、遺伝解析[Hilbert et al., 1991]、複数の系統の遺伝的モニタリング検査[Mashimo et al., 2006]やクローズドコロニーラットの遺伝プロファイルを明らかにするのに利用することができる[Nakanishi et al., 2015]。

本研究は、東京医科大学で維持されていた ZF コロニーに由来する Slc:ZF ラットと Hos:ZFDM ラットの表現型の相違の原因を探索するための遺伝的プロファイル解析を行った。はじめに、Slc:ZF ラットと Hos:ZFDM ラットの遺伝的プロファイルを作成するために、第 1 章で選定した遺伝的プロファイルに有用な 27 個の SSLP マーカーを用いてゲノム DNA 抽出を必要としない迅速で簡易な Amp-FTA 法にてジェノタイピングを行った。次に、これら 2 系統の遺伝的特徴を明らかにするために、東京医科大学で維持されていた ZF ラットコロニーを由来とする KZF ラット系統と KZC ラット系統の遺伝的プロファイルを比較した。最後に、染色体上の分散状態を考慮して Y 染色体を除く全ての常染色体と X 染色体上に各 3~4 個の SSLP マーカーを選択し、合計 72 個の SSLP マーカーを加えてより詳細な遺伝的プロファイル解析を行った。

材料と方法

動物

Hos:ZFDM ラットの雌 30 頭 (*fa/fa* 9 頭、*fa/+* 16 頭、*+/+* 5 頭) については星野飼育動物飼育所から神戸大学へ提供された。Slc:ZF ラットの雌 30 頭 (*fa/fa* 8 頭、*fa/+* 18 頭、*+/+* 4 頭) については日本エスエルシー株式会社から神戸大学へ提供された。動物の飼育や実験手続きは神戸大学動物実験委員会の承認を受けて神戸大学の動物実験ガイドラインに従って行われた。また、動物実験の手続きは京都大学動物実験委員会の承認を得て実施した。

FTA カードによるゲノムのサンプリング

イソフルランによる吸引麻酔下で尾端約 0.5~1mm を切開後、切開面を FTA カード (GE ヘルスケア・ジャパン、横浜) にこすりつけるように血液を採取した。採血後、傷口を滅菌済み脱脂綿で圧迫して止血した。血液を塗布した FTA カードは、室温で約 1 時間放置して乾燥させた。神戸大学で血液を採取した FTA カードはすべて京都大学へ搬入された。

ゲノム DNA の抽出

FTA カードに採取した血液サンプルのコントロールとして、Slc:ZF ラットと Hos:ZFDM ラット各雌 30 頭から切断した尾端から DNA 自動分離装置 PI-200 (倉敷紡績) によりゲノム DNA の抽出を行った。Slc:ZF ラットと Slc:ZF ラットのゲノム DNA は神戸大学から京都大学へ搬入された。KZF (KZ-*Lepr^{fa}*/Tky、NBRP Rat No.0032) ラット系

統と KZC (KZC/Tky、NBRP Rat No.0028) ラット系統のゲノム DNA はナショナルバイオリソースプロジェクト「ラット」(NBRP-Rat) から提供を受けた。

Amp-FTA 法を用いたジェノタイピング

SSLP マーカー27 個を用いて、Slc:ZF ラット、Hos:ZFDM ラット、KZF ラットおよび KZC ラットの Y 染色体を除くすべての染色体上についてジェノタイピングを実施した (Fig. 5)。FTA カード上に採取した血液塗布部分箇所を、マウスの個体識別に使用する耳パンチ (夏目製作所、東京) を用いて直径約 1.5 mm のディスクとなるように打ち抜いた。1×Ampdirect Plus (島津製作所)、0.2 μ M のプライマーと 0.4 units の BIO TaqTM Hot Start DNA polymerase (Bioline) で調製した 15 μ l の PCR 緩衝液中に血液を塗布した 1.5 mm の FTA カードディスクを投入して、そのまま PCR 増幅用のテンプレートとして用いた。PCR 装置はサーマルサイクラーPC-808 (ASTEC) を用いた。PCR の反応条件は、熱変性 (94 度、30 秒間)、1 サイクルの後に、熱変性 (94 度、30 秒間)、アニーリング (60 度、1 分間)、伸長反応 (72 度、1 分間) の 3 段階からなる反応を 40 サイクル実施した。

PCR 後の産物を、MultiNA マイクロチップ電気泳動システム (島津製作所) により、DNA-500 キットを用いて解析を行った。装置分離能は、5% (25-100 bp)、5% (100-500 bp) であり、サイズの正確さは ± 5 bp (25-100 bp)、 ± 5 bp (100-500 bp) である。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 と名付けた (Fig. 6)。

系統樹解析

東京医科大学で維持されていた2つのクローズドコロニーSlc:ZFとHos:ZFDMラットと2つの近交系KZFとKZCラットにおける27個のSSLPマーカに対するジェノタイピングデータを対立遺伝子型に変換した。その結果は、parallel Editor ソフト GENETYX ver.10（東京）を用いて解析を行った（Table 4）。また、GENETXYを用いて無根系統樹を描いた。

99 個の SSLP マーカーを用いた遺伝的プロファイル解析

前述した27個のSSLPマーカに加えて、72個のSSLPマーカを加えて（Table 5）Slc:ZF（n=30）とHos:ZFDM（n=30）ラットのジェノタイピングを行った。

結果

Slc:ZF ラットと Hos:ZFDM ラットの遺伝的プロファイル比較

Slc:ZF ラットと Hos:ZFDM ラットこれら両クローズドラットコロニーの遺伝的背景における類似性を明らかにするため、Amp-FTA 法と 27 個の SSLP マーカーを用いて遺伝的プロファイル解析を行った。すべてのマーカーにおいて特異的で明確な PCR 産物が得られた。PCR 産物のサイズ差を基にして対立遺伝子を決定し、それぞれの遺伝子座における 30 頭の対立遺伝子頻度を集計した。特定の遺伝子座に単一の対立遺伝子のみが検出される場合、この遺伝子座は固定していると判断した。固定した遺伝子座の数は次の通りである、Hos:ZFDM は 26 遺伝子座 (96%)、Slc:ZF は 24 遺伝子座 (89%) であった。Hos:ZFDM と Slc:ZF の間で異なる対立遺伝子は 9 遺伝子座 (33%) であった (Fig. 7A)。この結果より、両ラットコロニーは同じラットコロニーを起源とするにも関わらず両ラットコロニーの遺伝的背景がかなり異なることが明らかとなった

東京医科大学で維持されていた 2 つのクローズドコロニー Slc:ZF と Hos:ZFDM ラットと 2 つの近交系 KZF と KZC ラットの系統樹解析

次に、Slc:ZF と Hos:ZFDM の遺伝的特徴を明らかにするために、同じ東京医科大学で維持されていた ZF ラットコロニーを起源とする 2 つの近交系 KZF と KZC ラット系統の 27 個の SSLP マーカーによる遺伝的プロファイルと比較した (Fig. 7B)。Slc:ZF ラットは 24 遺伝子座において KZF ラット系統と同じ対立遺伝子を有しており、系統関係が非常に似ていることが示された。Hos:ZFDM ラットは KZF ラット系統と 8 遺伝子座 (30%) において異なる対立遺伝子を有していた。Slc:ZF ラットと Hos:ZFDM ラットは 9 遺伝子

座(33%)において異なる対立遺伝子を有していた。KZC ラット系統と比較すると Slc:ZF ラットは7座(25%)において異なる対立遺伝子を有し、Hos:ZFDM ラットは6遺伝子座(23%)において異なる対立遺伝子を有していた。KZC ラットを基準とした場合、KZC と Slc:ZF ラットの遺伝的距離および KZC と Hos:ZFDM の遺伝的距離はほぼ等しいことが示唆された (Fig. 8)。

SSLP マーカー99 個を用いた Slc:ZF と Hos:ZFDM の遺伝的プロファイル解析

Slc:ZF ラットと Hos:ZFDM ラットの遺伝的背景の違いを明確にするため72個の SSLP マーカーを加えて(合計 99 個の SSLP マーカー) 詳細な遺伝的プロファイル解析を行った。99 個の SSLP マーカーの内、固定化された遺伝子座は、Slc:ZF は93 遺伝子座(94%)、Hos:ZFDM は 98 遺伝子座 (99%) であった (Fig. 9)。Slc:ZF と Hos:ZFDM の間では、27 個の SSLP マーカーでは 9 個の遺伝子座 (33%)、72 個の SSLP マーカーでは 20 個の遺伝子座 (28%) であり 99 個の SSLP の内 29 個の遺伝子座 (29%) で異なる対立遺伝子をもつことが明らかとなった。この結果より、両コロニーはそれぞれ近交化が進んでいること、両コロニーの遺伝的背景がかなり異なることが明らかになった。

考察

本研究において、東京医科大学で維持されていた ZF ラットコロニーを由来とする Slc:ZF と Hos:ZFDM の遺伝的プロファイルを、SSLP マーカーを用いて検討した。調べた遺伝子座において、Slc:ZF と Hos:ZFDM は共に 90%以上の遺伝子座で特定の対立遺伝子に固定していた。また、両コロニーの遺伝的背景は非常に類似すると想定したが、実際には、異なる対立遺伝子を有する遺伝子座が約 30%であり、両コロニーの遺伝的背景が異なることが明らかとなった。このことから、両コロニーは東京医科大で維持されていたときにすでにコロニーの分離と固定化が進んでいたことが考えられる。

Slc:ZF ラットコロニーと Hos:ZFDM ラットコロニーは共に東京医科大学で維持されていた ZF ラットコロニーを起源とする。さらに、同じく東京医科大学で維持されていた ZF ラットコロニーを起源とする KZF ラット系統[Zhao et al., 2010]と ZKC ラット系統[Ishibashi et al., 1989]が確立されてきた。KZF ラットは *fa* 変異を保持して肥満を示す近交系統として確立され[Zhao et al., 2010]、Slc:ZF ラットの肥満を示す表現型と類似している。ZKC ラットは常染色体上劣性の *reelin* (*Reln*) 遺伝子変異により極度の運動失調と脳の細胞構築異常を示し、*fa* 変異を取り除いて近交系として確立された[Yokoi et al., 2000; Yokoi et al., 2003]。これら 4 種類のラットの表現型は異なるが、いずれも同じ ZF ラットコロニーを起源とすることから、遺伝的プロファイルが類似していると考えられていた。

しかしながら、本研究により、これらの遺伝的プロファイルが異なることが明らかになった。この研究結果から、起源となった東京医科大学で維持されていた ZF ラットコロニーはかなり遺伝的多様性に富んでいたのではないかと考えられた。同様に、京都大

学で維持されていた Wistar ラットコロニーから分離、選抜育種によって確立された自然発症高血圧（SHR）ラットと対照系統である WKY ラットは、京都大学から近交化確立前に異なる時期に様々な研究機関へ寄贈されており亜系統が多く存在するが、亜系統間での遺伝的背景の相違割合が SHR では 6～29%、WKY では 2～32%と遺伝的プロファイルがかなり異なることが知られている[Mashimo et al., 2006; Zhang-James et al., 2013]。

Slc:ZF ラットと Hos:ZFDM ラットの遺伝的プロファイルの違いは、両者の表現型の相違を説明する上で重要な手がかりを与えるものであると考えられる。Slc:ZF ラットは肥満のみを示し、一方、Hos:ZFDM ラットは肥満と 2 型糖尿病を示す[Yokoi et al., 2013]。Hos:ZFDM ラットの *fa/fa* ホモ型の雄には繁殖能力があるが、Slc:ZF ラットでは見られない[Yokoi et al., 2013]。Hos:ZFDM ラットは雄の繁殖性と高血糖を指標として選抜交配により確立されてきた [Yokoi et al., 2013]、このことより繁殖性と 2 型糖尿病に関連する対立遺伝子の近傍が固定化されたと考えられた。この 2 つクローズドコロニーラットの間で異なるゲノム領域内に 2 型糖尿病の発症と繁殖性に関連する候補遺伝子領域が含まれているのではないかと考えられた。

Slc:ZF と Hos:ZFDM の間では異なる対立遺伝子を持つ遺伝子座が 29 個存在し、そのうち 16 遺伝子座を含む領域に糖尿病や関連する量的形質座位（Quantitative trait locus : QTL）が多く存在する（Table 6）。これらの遺伝子座や原因遺伝子は Hos:ZFDM の糖尿病発症に関与している可能性が示唆された。今後、ZDF ラットなど別の ZF ラットコロニーを由来する ZF ラットと Slc:ZF と Hos:ZFDM の遺伝的プロファイルの比較は、2 型糖尿病発症と繁殖性に関連する遺伝子領域の解明に役立つと考えられる。Slc:ZF ラットと Hos:ZFDM ラットは共に近交化が進んでいるので表現型においても再現性が高い。

事実、Hos:ZFDM ラットの *fa/fa* ホモ型の雄は 100% 糖尿病を発症する[Yokoi et al., 2013]。

Slc:ZF ラットコロニーと Hos:ZFDM ラットコロニー共に近交化が進み特定のアレルに固定している割合が高いことから、両コロニーを用いた交配実験を行うことで 2 型糖尿病発症と繁殖性に関連するゲノム領域を明らかにできる可能性が考えられた。

表現型の特徴が異なる Slc:ZF ラットと Hos:ZFDM ラットはともに東京医科大学で維持されていた ZF ラットコロニーを起源するにもかかわらず、SSLP マーカーを用いた遺伝的プロファイル解析の結果、いずれも近交化が進み約 30% の遺伝的相違が認められた。本研究で行った、Slc:ZF ラットと Hos:ZFDM ラットの遺伝的プロファイル解析は、糖尿病発症や繁殖性に関連するゲノム領域を明らかにするために有用であると考えられた。

第3章 PCR 阻害物質を中和する PCR 緩衝液 Ampdirect Plus と FTA カードを組み合わせた簡便なジェノタイピング法 Ampdirect Plus-FTA (Amp-FTA) 法の開発

緒言

実験動物としてのラットやマウスに求められる遺伝的な品質管理とは、維持している群に対して PCR による遺伝多型マーカーを用いた遺伝的プロファイルを作成することから始まる。次に、定期的にプロファイルを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動物を供給する体制が整えられることができる [Mashimo et al., 2006]。また、遺伝子改変動物やミュータント系統においては、標的遺伝子や特定の対立遺伝子のジェノタイピングを行うことが必要不可欠である [Fathey et al., 2013]。遺伝多型の検査は多様な方法があり、すべての方法を実施することは労力的あるいは効率的にも困難である。そのため、ラットやマウスを維持し、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、正確、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 [Nitzki et al., 2007]。

通常、PCR を用いて DNA 解析を行うためには、マウスやラットの組織中には、PCR を阻害する物質であるタンパク質や糖などが多く含まれているため、フェノール・クロロホルム法によりゲノム DNA を精製する必要がある [Serikawa et al., 1992]。しかし、このゲノム DNA 抽出作業には、多くの工程があり、煩雑である。そのため、この作業の効率化と時間の短縮化を図るために、ゲノム DNA の抽出は一部では機械による自動化が進められている。しかし、その機器は高価なうえ、使用する有機溶剤は人体に有害であり、さらに定められた廃液処理が求められる。また、抽出したゲノム DNA は酵素などによる分解を防ぐために、冷蔵庫などの保管機器が必要である。また、病原性微生物は主に動物から動物への直接的伝播のほか、血液や糞尿を介して伝播することがあるので、採材時の操作手順や生体試料の管理には細心の注意が必要である。一旦、病原性微生物が繁殖コロニーに持ち込まれると、コロニー全体へ感染が拡大する危険性がある。

特に、免疫不全を伴う遺伝子改変動物では、飼育環境の微生物統御の差異により免疫応答性などの形質に差異が生じる可能性がある。そのため、実験動物を病原性微生物汚染から守ることは、実験の精度と再現性を高めるためには重要である[Kuramoto et al., 2010]。さらに、「動物の愛護および管理に関する法律」や「実験動物の飼養保管並びに苦痛の軽減に関する基準」において、出来る限り実験動物に苦痛を与えない方法で行うことに努めなければならないとあり、動物の福祉を考慮した動物実験法の改善が求められている。

近年では、血液中のタンパク質、糖や抗凝固剤などの PCR 阻害物質を抑制する働きがある PCR 緩衝液として Ampdirect Plus(島津製作所)が開発されている。Ampdirect Plus はマウスやラットの血液を採取した濾紙そのものを、一切の DNA 精製操作なしで PCR テンプレートとして用いることができ、非常に「迅速・簡便」にジェノタイピングができる。しかし、血液を採取した濾紙を室温で保存することは困難である。また、濾紙を介した微生物病原体の拡散が懸念される。

一方、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) が開発されている。この 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。DNA は FTA カード上に固定化され、タンパク質は変性する。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、室温での DNA の長期保管ができる。感染性病原体なども失活されるためサンプルの安全な取り扱いが可能となり、実験者へのバイオセーフティーが確保できる。しかも血液や糞尿を介した微生物汚染を防ぐことができ「安全」である。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 3 回、TE-1 (10 mM Tris, 0.1 mM EDTA) 緩衝液による洗浄を 2 回行うように推奨されている。

本研究では、第 1 章と第 2 章で実施した遺伝的プロファイル解析など生体サンプルの遺伝子型判定を迅速かつ簡便に行う方法の開発とその応用について検討を行った。まず、Ampdirect Plus と FTA カードの利点を組み合わせた、ゲノム DNA 抽出を必要としない迅速で、簡易なジェノタイピングシステム Ampdirect Plus-FTA (Amp-FTA) 法の確立を目指した。つぎに、動物に対して非侵襲的な生体試料として唾液や口腔粘膜スワブ試料のサンプリング方法について Amp-FTA 法に応用できないか検討を行った。そして、FTA カードに採取したラットの末梢血試料と濾紙に採取したラットの末梢血試料を室温での長期保存が PCR 産物におよぼす影響について検証した。さらに、リアルタイム PCR で、DNA と RNA からなる SNP 特異的なキメラプローブと RNase H の組み合わせにより第 4 世代の SNPs の判定を行う CycleavePCR 法[Yabutani et al., 2009]に Amp-FTA 法が適応できないか検討を行った。

材料と方法

動物

Ocif 遺伝子と *Neo* 遺伝子を両方持つヘテロ型のノックアウトマウス OCIF/Jcl (骨粗鬆症モデル) は、日本クレア株式会社 [Mizuno et al., 1998] から、また、近交系マウス BALB/cCrSlc、C57BL/6CrSlc、C3H/HeSlc および DBA/2CrSlc の 4 系統は、日本エスエルシー株式会社から購入した。RPCI-23 BAC ベクターを導入したトランスジェニックマウスは京都大学医学研究科附属動物実験施設によって自家生産した。ミュータントラットの *KZ-Lepr^{fa}/Tky* (肥満モデル)、*DMY/Kyo* (中枢神経系ミエリン疾患モデル)、および *KAD/Kyo* (大腸発癌モデル) の 3 系統はナショナルバイオリソースプロジェクト「ラット」(NBRP-Rat) から提供を受けた。動物の飼育や実験手続きは京都大学動物実験委員会の承認を得て実施した。

血液の採取

ラットおよびマウスは、イソフルラン (アボットジャパン、東京) を実験小動物ガス麻酔器システム (DS ファーマバイオメディカル、大阪) にて気化させ混合気濃度 2% で麻酔した。麻酔下で尾端を 0.5~1.0 mm 程度切開し、切開面を FTA カードあるいは滅菌済み濾紙に擦りつけるようにして、ごく少量 (約 3 μ L) の血液を採取した。採血後には、傷口を滅菌済みの脱脂綿で圧迫して止血を行った。血液を塗布した FTA カードは、室温で約 1 時間、乾燥させた。コントロールとしてラットおよびマウスの尾端からフェノール・クロロホルム法によりゲノム DNA 抽出を行った

DMY/Kyo ラットの血液を採取した FTA カードを 2004 年 12 月から 2015 年 3 月までの期間、同じく *DMY/Kyo* ラットの血液を採取した濾紙を 2005 年 6 月から 2015 年 3 月までの期間、室温で保管して PCR 産物に及ぼす影響を見た。

唾液と口腔スワブの採取

マウスの下顎骨の切歯の歯肉に染み出ている唾液をマイクロピペット又は自家作製した唾液採取専用器具を用いて採取した (Fig. 10)。口腔スワブの採取は、マウスをしっかり手に保定後、予め赤色 106 号で着色をした滅菌水で湿らしておいた先端径 2 mm の滅菌済みの細い綿棒を用いて口腔内を掻き取った。採取後、すぐに FTA カードのサークル内に綿棒の先端を擦り付けるよう強く押し付けた (Fig. 11)。FTA カードは、室温で約 1 時間、乾燥させた。

未精製の FTA カードを用いたトランスジェニックマウスの外来性遺伝子のジェノタイピングおよびラットとマウスの内在性遺伝子のジェノタイピング

FTA カード上の血液、唾液および口腔スワブを採取した箇所を、それぞれマウスの個体識別に使用する耳パンチ (夏目製作所) を用いて直径約 1.5 mm のディスクとなるように打ち抜いた。Ampdirect Plus の PCR 緩衝液は、1×Ampdirect Plus (島津製作所)、0.2 μM のプライマーと 0.4 units の NovaTM Taq Hot Start DNA polymerase (Merck KGaA, Darmstadt, Germany) で調製した。標準的な PCR 緩衝液は、1×NH₄ 緩衝液、4mM の dNTPs、1.5mM の MgCl₂、0.2 μM のプライマーと 0.4 units の BIO TaqTM Hot Start DNA polymerase (Bioline) で調製した。PCR 緩衝液中に生体試料を塗布した未精製の FTA カードディスクを投入して、そのまま PCR 増幅用のテンプレートとして用いた。脾臓から抽出したゲノム DNA 100 ng を陽性対照試料として使用した。

OCIF/Jcl マウスの *Ocif* 遺伝子の野生型対立遺伝子を判定するプライマーと薬剤耐性 *Neo* 遺伝子のプライマーを作製した。また、未精製の FTA カードを用いたラットとマウスの内在性遺伝子のジェノタイピングには、KZ-*Lep^{fa}*/Tky ラット系統の *Lep^{fa}* 対立遺伝子を判定するプライマー、DMY/Kyo ラット系統の *Mrs2^{dmy}* 対立遺伝子を判定するプライマー、自家生産のトランスジェニックマウスの外来性遺伝子 RPCI-23 BAC を判定

するプライマーを、それぞれ作製した (Table 7)。さらに、近交系マウス BALB/cCrSlc、C57BL/6CrSlc、C3H/HeSlc、および DBA/2CrSlc の対立遺伝子の多型の判定には、マウスの SSLP マーカーである *D7Nds5* と *D9Mit303* を用いた (Table 7)。

PCR 装置はサーマルサイクラー PC-808 (ASTEC) を用いた。PCR の反応条件は、熱変性 94°C、30 秒間、1 サイクルの後に、熱変性 (94 度、30 秒間)、アニーリング (60 度、1 分間)、伸長反応 (72 度、1 分間) の 3 段階からなる反応を 35 サイクルあるいは 40 サイクル実施した。*Lepr^{fa}* 対立遺伝子の判定には、PCR 後、制限酵素 *MspI* を加えた後、37 度で 3 時間保温を行い、標的の特異配列を切断した。*Mrs2^{dmy}* 対立遺伝子の判定には、PCR 後、制限酵素 *AciI* を加えた後、37 度で 3 時間保温を行い、標的の特異配列を切断した。0.5×TBE 緩衝液にアガロース (ナカライテスク、京都) を加えて 4% アガロースゲルを作製した。PCR にて増幅された PCR 産物 10μl にローディングバッファーを 3μl 加えてアガロースゲルにアプライした。電圧 300V、30 分間、電気泳動を行った。電気泳動後、エチジウムブロマイド (ナカライテスク) で染色した後、UV サンプル撮影装置 FAS-III (東洋紡、大阪) を用いて DNA バンドを観察した。

CycleavePCR による SNPs の判定

KAD/Kyo の血液を FTA カードに採取し、耳パンチを用いて一部を直径約 1.5 mm のディスクに打ち抜き、PCR 緩衝液に投入して PCR 増幅用のテンプレートとして用いた。陽性対照として、KAD/Kyo ラットの脾臓から抽出したゲノム DNA 100 ng を PCR 増幅用のテンプレートとして使用した。リアルタイム PCR で増幅する標的配列は、KAD/Kyo ラットの *Apc* 遺伝子の点変異を含んだ 167 bp であり、タカラバイオの Double-Dye プローブ合成サービスにて、プローブとプライマーを作製した (Table 8)。

CycleavePCR Core Kit (タカラバイオ、草津) を用いて反応液を調製した。

PCR 反応の最適化のため、CycleavePCR Core Kit の PCR 緩衝液に、1×Ampdirect Plus を 0～90%の範囲で 10%ずつ増量して調製をおこない、PCR 増幅産物がある一定量に達したとき、蛍光を検出できる閾値と増幅曲線が交わる点：Ct 値 (Threshold cycle) を濃度の違いによって比較した。プローブの蛍光検出には、Thermal Cycler Dice Real Time System (タカラバイオ) を用いた。PCR の反応条件は、熱変性 94 度、30 秒間、1 サイクルの後に、熱変性 (94 度、5 秒間)、アニーリング (55 度、10 秒間)、伸長反応 (72 度、20 秒間) の 3 段階からなる反応を 50 サイクル実施した。

結果

未精製の FTA カードを用いたトランスジェニックマウスの外来性の *Ocif* 遺伝子と *Neo* 遺伝子の判定

ゲノム DNA をテンプレートに用いた場合、Ampdirect Plus と標準的な PCR 試薬とも *Ocif* 遺伝子と *Neo* 遺伝子の両方のアレルを効率よく増幅することが確認できた。 FTA カードに採取したノックアウトマウス *OCIF/Jcl* マウスの未精製の血液試料をテンプレートに用いて PCR を行った場合、Ampdirect Plus では *Ocif* 遺伝子と *Neo* 遺伝子の両方のアレルを効率よく増幅することを確認できたが、標準的な PCR 試薬では両遺伝子の PCR 産物の増幅は確認できなかった。ゲノム DNA と未精製の血液試料から増幅した両方のアレルの PCR 産物のサイズに差異はなかった (Fig. 12)。

未精製の FTA カードを用いた *KZ-Lepr^{fa}/Tky* ラットの *Lepr^{fa}* の対立遺伝子の判定

Fig. 13 で示すように、レーン 1～5 は、FTA カードに塗布した *KZ-Lepr^{fa}/Tky* ラットの未精製の血液試料から PCR 増幅をおこない、*Lepr^{fa}* の対立遺伝子と野生型の対立遺伝子を明瞭に判定することができた。コントロールとして予め遺伝子型が明らかな個体のゲノム DNA (レーン 6～8) を用いて PCR 増幅を行った場合と同様の結果であり、第 4 世代の遺伝多型マーカーである SNPs マーカーを正確に判別することができた。

唾液試料、口腔スワブ試料を用いた SSLP マーカーによる近交系マウスの対立遺伝子の多型とトランスジェニックマウスの外来性遺伝子の判定

マウスの SSLP マーカーである *D7Nds5* と *D9Mit303* を用いた近交系マウス BALB/cCrSlc、C57BL/6CrSlc、C3H/HeSlc、および DBA/2CrSlc の対立遺伝子の多型の判定では、FTA カードに採取したマウスの未精製の唾液試料および未精製の口腔内スワブ試料から未精製の血液と同一のバンドを確認することができた。しかし、PCR サイクル

が 35 回の場合、未精製の唾液試料と口腔スワブ試料のバンドは未精製の血液試料に比べて薄かった (Fig.14A)。

トランスジェニックマウスの外来遺伝子の判定試験では、目的のバンドを確認できない唾液試料が散見された (Fig. 14B)。未精製の口腔内スワブ試料では、PCR サイクルが 35 回に比べ 40 回の方が鮮明なバンドを確認することができた (Fig. 15)。

長期室温保存した血液試料を用いた DMY/Kyo ラットの *Mrs2^{dmy}* の対立遺伝子の判定

室温で 2004 年 12 月から 2015 年 3 月まで DMY/Kyo ラットの血液試料を FTA カードに塗布して保管をした場合、*Mrs2^{dmy}* のミュータントホモ型、ヘテロおよび野生型のそれぞれの対立遺伝子を明瞭に判定することができた。一方、室温で 2005 年 6 月から 2015 年 3 月まで DMY/Kyo ラットの血液試料を濾紙に塗布して保管した場合、*Mrs2^{dmy}* のミュータントホモ型、ヘテロ型および野生型のそれぞれの対立遺伝子を明瞭に判定することはできなかった (Fig. 16)。

未精製の FTA カードを用いた CycleavePCR による SNPs の判定

血液試料を塗布した未精製の FTA カードをテンプレートとし、CycleavePCR Core Kit に Ampdirect Plus を 0~20% 含む PCR 反応液を用いた場合、PCR の増幅が見られず、それぞれのプローブの蛍光を検出することができなかった。しかし、30~90% 含む PCR 反応液を用いた場合、それぞれのプローブの蛍光が良好に検出でき、ホモ型、ヘテロ型および野生型の遺伝子型を明確に判別できた (Fig. 17)。この結果は、PCR ダイレクトシーケンス法により得られた結果と一致していた。PCR 増幅産物がある一定量に達したとき、蛍光を検出できる閾値と増幅曲線が交わる点：Ct 値 (Threshold Cycle) の平均値 (n=3) を比較した場合、CycleavePCR Core Kit に Ampdirect Plus を 50% 含有した PCR 緩衝液を用いた場合が 30.3 回と最も少ないサイクル数であった (Fig. 18)。

考察

Ampdirect Plus と FTA カードを組み合わせることにより、様々なジェノタイピング方法について検討を行った。まず、FTA カードに塗布した未精製の血液と口腔スワブをそのままテンプレートとして使用して、第 3 世代の遺伝多型マーカーである SSLP マーカーや外因性遺伝子を検出するマーカーを用いて PCR 増幅することができることを確認した。また、PCR 産物は、直接制限酵素や PCR ダイレクトシーケンスにも応用することができた。血液を濾紙と FTA カードにそれぞれ採取、室温にて長期保存した場合の PCR 産物に及ぼす影響について確認した。さらに、Amp-FTA 法と CycleavePCR 法を組み合わせることで、未精製の血液試料を用いて第 4 世代の遺伝多型マーカーである SNPs マーカーを用いて各対立遺伝子に由来する PCR 産物をリアルタイムに定量化することができた。

Amp-FTA 法を用いた、マウスやラットにおけるジェノタイピングを行う場合、血液を FTA カードに採取する方法で正確、迅速、簡便に行うことが可能であった。未精製血液試料を用いたマウスおよびラットの内在性および外来性遺伝子のジェノタイピングの結果より、Ampdirect Plus と FTA カードを組み合わせることにより、FTA カードに塗布した未精製の血液試料を何らかの処理も行わず、そのままテンプレートとして使用して PCR 増幅することが可能であった。また、その PCR 産物は、直接制限酵素にも応用することができた。このことより Ampdirect Plus は、FTA カード上の血液と変性したタンパク質および FTA カード上の薬品を中和することができることが明らかとなった。しかし、FTA カード上の特定の箇所には大量の血液を染み込ませた箇所をテンプレートとして用いても PCR の増幅が見られないことも認められたので、血液採取時は、過剰に血液を付け過ぎないように注意が必要である。血液を付け過ぎた場合には、血液に含まれている PCR 阻害物質が Ampdirect Plus により十分に中和されていないことが考えら

れるので、PCR 緩衝液中の組成量が同じようになるように、Ampdirect Plus、プライマーおよび Taq ポリメラーゼを加えて PCR 緩衝液の総量を増やすことが推奨される。

一方、ジェノタイピング用の採取血液に代わる生体試料として、唾液 [Irwin et al., 1996]、糞便 [Broome et al., 1999]、毛 [Schmitteckert et al., 1999]、直腸の上皮細胞 [Lahm et al., 1998]や口腔粘膜 [Meldgaard et al., 2004]などが検討されている。本研究では、これらの中で、直接 FTA カードにサンプリングできる試料の候補として唾液と口腔粘膜剥離スワブを検討した。マウスやラットの唾液を採取するには下顎前歯の歯肉あたりからしみ出した唾液を採取したが、コットン綿棒では唾液がすべて吸収されてしまい FTA カードに塗布することが難しい。そこで、短冊状の FTA カードを綿棒の先端に取り付けることで直接採取を試みたが、採取している間に唾液を採取した FTA カードをかじられるなど、複数回の PCR を行うための十分な量を採取することができなかった。一方、Fig. 14 で示す様に、Amp-FTA 法により、口腔スワブ試料より SSLP マーカーを用いた近交系マウスの対立遺伝子の多型と外来遺伝子を PCR により増幅し判定することが可能であった。口腔スワブの採取は、ラットやマウスの首から背中にかけての弛んだ皮を親指と人差し指でしっかり掴み体が垂直になるように保定することで確実にサンプリングを実施することができた。綿棒の先端を着色した滅菌水で予め湿らしておくことにより比較的簡単に採取することができた。また、動物に麻酔をかける必要がなく血液を採取するよりも作業が簡単であった。さらに、複数回の PCR を行うための十分な量を採取することができた。PCR サイクルが 35 回では口腔スワブからの PCR 産物のバンドは血液試料に比べて薄かったが、サイクル数を 40 回にすると明瞭なバンドが得られた。このことより口腔スワブは血液に比べ、サンプル中に含まれているゲノム DNA 量が少ないことが考えられた。FTA カードを用いた口腔スワブはヒトでは標準的なサンプリング方法として実用化されているが、マウスやラットの口腔スワブは血液採取に比

べて、サンプルに含まれるゲノム DNA 量が少ないので、PCR サイクルを増やす必要がある。

ヒトの法医学研究では、FTA カード上に固定化された血液は少なくとも 16 年は室温で安定して保管することができるという報告がある[Rahikainen et al., 2016]。本研究においても、長期間室温で保管した FTA カードに採取した血液試料を使って、DMY/Kyo ラットの *Mrs2* 遺伝子の遺伝子型を判定することができたが、一方、滅菌済み濾紙に採取した血液試料を長期間室温で保管したものをテンプレートとして用いた場合は DMY/Kyo ラットの *Mrs2* 遺伝子の遺伝子型判定ができなかった。このことから、濾紙に採取した血液を室温で保管を行った場合、血液中に含まれていたゲノム DNA が分解されてしまったことが考えられるが、FTA カードに固定化された血液中のゲノム DNA は、長期室温で保管を行ったとしても微生物、酵素やラジカルなどによる DNA の分解が保護され、繰り返し再現性の高いジェノタイピングを行うことができることが示された。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[Nitzki et al., 2007]、FTA カードでゲノム DNA を室温で長期保存しておくことは非常に有用であると考えられる。

本研究で開発した Amp-FTA 法と CycleavePCR 法を組み合わせる方法で、未精製の血液試料を用いて各対立遺伝子に由来する PCR 産物をリアルタイム PCR によって定量化することも可能であった。PCR 増幅産物がある一定量に達したときのサイクル数である Ct 値で比較した場合、Ampdirect Plus を 50% 含有した PCR 緩衝液の Ct 値が最少であった。このことから、Ampdirect Plus を 50% 含む PCR 緩衝液を調製するのが最適であると考えられる。通常、SYBR などの蛍光色素を使ったリアルタイム PCR では、鋳型 DNA 濃度の違いが増幅曲線に大きく影響を及ぼすことが知られており、絶対定量や相対定量を行う場合、鋳型 DNA の濃度を揃えることが重要である[Yuan et al., 2007]。しかし、CycleavePCR で SNP を判定する方法では、鋳型 DNA の濃度による結果への影響は少な

いと考えられる。CycleavePCR では、あらかじめ蛍光標識の異なる野生型、変異型配列特異的な DNA-RNA キメラプローブを用いており、増幅産物中の相補的な配列とハイブリッドを形成した後に RNase H により RNA 部分で切断されることにより蛍光を発するので、非常に特異性が高い[Yabutani et al., 2009]。この方法では、遺伝子判定に要する時間は、PCR を行っている時間にほぼ等しく、極めて短時間に遺伝子判定を行うことができる。さらに、その精度もシーケンス法と同様であったことから、Amp-FTA 法と CycleavePCR 法を組み合わせたリアルタイム PCR は、第 4 世代の遺伝多型マーカーである SNPs の遺伝子判定において、非常に有用なジェノタイピングシステムであると考えられる。

本研究で開発した Amp-FTA 法は、実験動物のジェノタイピング法として以下の点で優れている (Fig. 19)。1 点目は、正確、迅速、簡便な遺伝検査を行うことができる。DNA テンプレートは、FTA カード上の血液を採取した部分をディスク状にくり抜くだけであり、非常に簡便である。そのうえ、DNA を抽出するための特別な薬品や技術が不要であり、DNA を抽出するための時間を要さない。また、リアルタイム PCR を用いた SNP 解析にも応用できることから非常に短時間に結果を得ることが可能となる。FTA カード上に保存された DNA は、室温で長期間安定して保存することができるので、繰り返し再現性の高いジェノタイピングを行うことができる。2 点目は、有害なクロロホルムやフェノールなどの薬品を使用しないので作業者にとって安全であり、無駄な廃液が出ないので環境に優しい。3 点目は、血液や尿に含まれる病原体の宿主の細胞も FTA カード上では細胞を破壊して不活化できるので、実験用マウスやラットの繁殖コロニー内での微生物汚染の拡大防止の観点から望ましい。4 点目は、口腔スワブの材料においてもこの手法を応用することができる。しかし、マウスやラットの口腔スワブは血液採取に比べて、サンプルに含まれるゲノム DNA 量が少ないので、PCR サイクルを増やす必要がある。

本研究では、遺伝的プロファイル解析など生体サンプルの遺伝子型判定を迅速かつ簡便に行う方法として AmpFTA 法の開発を行った。Amp-FTA 法は、正確、迅速、簡易、高い再現性に加えて、微生物汚染の軽減、作業の安全性向上にも繋がり、ラットおよびマウスの遺伝的な品質管理において優れている。さらに、Amp-FTA 法によるジェノタイピングは、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。

実際に、この Amp-FTA 法は、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できるので多検体を処理する場合に極めて優れおり、京都大学が代表機関をつとめる NBRP-Rat においてラット系統の遺伝的な品質管理に応用されている [Kuramoto et al., 2010]。NBRP-Rat では 2015 年 1 月までに、Amp-FTA 法により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、合計 29,624 検体分のジェノタイピングを実施している

総括および結論

実験動物としてのラットは、栄養、代謝および生理学上の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、免疫学あるいは腫瘍学などの幅広い分野での実験動物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。実験用ラットは、これまでに選抜育種、他系統との交雑や遺伝子改変技術の進歩によって、研究目的に応じて様々なヒトの病態に類似したト疾患モデルラット系統が開発されてきた。ラットを研究者へ供給する繁殖業者やバイオバンクにおいては、その遺伝的な品質管理をするためには、特定の遺伝子のジェノタイピングや遺伝多型マーカーを用いた遺伝的モニタリングシステムの構築は必須である。しかし、ジェノタイピングには多様な方法があり、すべての方法を実施することは労力的あるいは効率的にも困難である。そのため、正確、迅速、簡便で効率的なジェノタイピング法の確立が最重要課題である。また、研究目的にあった遺伝的特徴を持ったラットを研究に用いることが求められるので、ジェノタイピングにより遺伝的プロファイル解析を行いその遺伝的な特性を明らかにすることが重要である。本研究では、ラットの遺伝的な特徴についての検討とラットの遺伝的な品質管理に関する技術開発を行った。

緒言では、実験動物としてのラットについて、その確立までの歴史、遺伝的な制御の違いによる形質の特性、さらには、その遺伝的な品質管理の重要性について総説した。

第1章では、市販のクローズドコロニーである Slc:Wistar ラットの様々な表現形質が、F344 近交系ラットに極めて類似している問題について検討した。本研究では、Slc:Wistar ラットの遺伝特性を明確にするために、従来の DNA 抽出法と非常に多型性に富む第3世代の27個の SSLP マーカーを用いて Slc:Wistar ラットの遺伝子型を決定し、各対立遺伝子の頻度を算出した。そして、Wistar ラットならびに F344 近交系ラットと比較した。本章で選定した第3世代の27個の SSLP マーカー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プロファイル解析に有効であることが示された。27 個の

SSLP マーカーはそれぞれ、ラット系統間において多型性が高く、近交系ラット 179 系統を調べた結果では、各マーカーにおいて平均 13.9 ± 3.5 個の対立遺伝子が検出されている [Mashimo et al., 2006]。この内、20 個の SSLP マーカーは、NBRP-Rat における遺伝的モニタリング検査に使用しているものであり、2006 年から 2015 年 1 月までの期間、174 系統 2584 検体に対して遺伝的モニタリングを実施し、すべての系統に遺伝的汚染は認められてない。さらに、7 個の SSLP マーカーを追加して、ラットの Y 染色体を除く全常染色体と X 染色体を検査対象としたことで、より遺伝的プロファイル解析の信頼性が高くなったと考えられる。Slc:Wistar ラットでは、27 個のマーカーのうち 23 個のマーカー（85%）において、単一の対立遺伝子のみが検出され、遺伝子座が固定していると考えられた。そして、それらの遺伝子型は F344 ラットの遺伝子型と同一であった。以上の結果から、Slc:Wistar ラットと F344 近交系ラットとの遺伝的類似性が確認されたことから、Slc:Wistar ラットを用いる際は、F344 近交系との遺伝的類似性を十分に考慮する必要があることが結論づけられた。

第 2 章において、東京医科大学で維持されていた ZF ラットコロニーを由来とする肥満を示す Slc:ZF ラットコロニーと肥満、糖尿病を示す Hos:ZFDM ラットコロニーの表現型の相違を調べるため遺伝的プロファイル解析を行った。本研究では、第 1 章で選定した遺伝的プロファイル解析に有用な第 3 世代の 27 個の SSLP マーカーを用いて Slc:ZF ラットと Hos:ZFDM ラットの遺伝的プロファイル解析を第 3 章で開発した迅速、簡便なジェノタイピング法である Amp-FTA 法で行った。そして、同じ東京医科大学で維持されていた ZF ラットコロニーを起源とする KZF 近交系ラットと KZC 近交系ラットの遺伝的プロファイルと比較した。さらに 72 個の SSLP マーカーを用いて Slc:ZF ラットと Hos:ZFDM ラットの詳細な遺伝的プロファイル解析を行った。2 つのクローズドコロ

ニーラットは、共に約 90%の遺伝子座が特定の対立遺伝子に固定していた。また、両コロニーは同じコロニーを起源とするにもかかわらず異なる対立遺伝子を有する遺伝子座が約 30%であり、これが、2つのクローズドコロニーラットの表現型の相違の基盤となっていると考えられた。本研究で行った、Slc:ZF ラットと Hos:ZFDM ラットの遺伝的プロファイル解析は、2 型糖尿病の発症と繁殖性に関連する遺伝的要因を明らかにするのに貢献できると結論づけられた。

第 3 章では、実験動物としてのラット維持群の遺伝的な品質管理のモニタリングに用いるジェノタイピングシステムとして、PCR 阻害物質を中和する PCR 緩衝液 Ampdirect Plus と DNA 抽出、保存用カードである FTA カードの長所を組み合わせた正確、迅速、簡便なジェノタイピング法（Amp-FTA 法）の開発を行った。Amp-FTA 法では、FTA カードに採取したごく少量の血液を未精製のままディスクとして打ち抜き PCR テンプレートとして使って PCR 増幅を行うことが可能である。PCR 産物は、直接制限酵素、PCR ダイレクトシーケンスおよび定量 PCR に応用することができた。さらに、FTA カードに採取した血液を 10 年間室温で保存してもジェノタイピングが可能である。また、マウスやラットにおいて非侵襲的な口腔スワブ由来のサンプルにおいても PCR 増幅が可能である。Amp-FTA 法によるジェノタイピングは、正確、迅速、簡易、高い再現性に加えて、微生物汚染の軽減、作業の安全性向上にも繋がり、ラットおよびマウスの遺伝的な品質管理において優れている。さらに、Amp-FTA 法によるジェノタイピングは、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。

本研究は、研究目的にあった遺伝的特徴を持ったラットを研究に用いることの重要性を示し、今後、さらにラットを用いた研究の発展に寄与するものであると考えられる。

本研究の一部は、以下に発表した。

1. Nakanishi, S., Serikawa, T., Kuramoto, T. 2015. Slc:Wistar outbred rats show close genetic similarity with F344 inbred rats. *Experimental Animals* 64 :25-29.
2. Nakanishi, S., Kuramoto, T., Kashiwazaki, N., Yokoi, N. 2016. 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* 66:91-98.
3. Nakanishi, S., Kuramoto, T., Serikawa, T. 2009. 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(1) :75-78.

謝辞

本研究をまとめるにあたり、多大な御指導と御助言を賜りました麻布大学獣医学部 阪口雅弘教授、麻布大学獣医学部 柏崎直巳教授に深く謝辞を表します。また、本論文作成に際し種々のご助言を頂いた京都大学 芹川忠夫名誉教授、京都大学大学院医学研究科 庫本高志准教授、神戸大学大学院医学研究科 横井伯英准教授に深謝いたします。

最後に本研究の遂行に際し、多大なご助言を頂きました京都大学大学院医学研究科附属動物実験施設の皆様に深く感謝いたします。

引用文献

- Abbott, A. 2004. Laboratory animals: The renaissance rat. *Nature* 428: 464-466.
- Atanur, SS., Diaz, AG., Maratou, K. *et al.* 2013. Genome sequencing reveals loci under artificial selection that underlie disease phenotypes in the laboratory rat. *Cell* 154: 481-483.
- Broome, R.L., Zhou, Q., Smith, A., Hahn, N., Matsui, S.M., and Omary, M.B. 1999. Non-invasive transgenic mouse genotyping using stool analysis. *Federation of European Biochemical Societies Letters* 462:159-160.
- Chappel, C.I., Chappel, W.R. 1982. The discovery and development of BB rat colony. An animal model of spontaneous diabetes mellitus. *Metabolism* 32 (Suppl 1) :8.
- Cheryl, A.L. 2005. The legacy of Adolf Meyer's comparative approach: Worcester rats and the strange birth of the animal model. *Integrative Physiological and Behavioral Science* 40: 161-181.
- Chia, R., Achilli, F., Festing, M.F., Fisher, E.M. 2005. The origins and uses of mouse outbred stocks. *Nature Genetics* 37:1181-1186.
- Crampe, H. 1885. Zuchtversuche mit zahmen Wanderratten. *Landwirthschaftliche Jahrbücher* 14:539-619.
- Donaldson, H.H. 1915. The rat data and reference table. *Memoirs of the Wistar Institute of Anatomy and Biology*.
- Donaldson, H.H. 1925. Research at the wistar institute, 1905-1925. *Science* 61: 480-483.
- Fathey, J.R., Katoh, H., Malcolm, R., Perez, A.V. 2013. The case for genetic monitoring of mice and rats used in biomedical research. *Mammalian Genome* 24:89-94.

- Festing, F.W.M., Totman, P. 1980. Polyvalent strain-specific alloantisera as tools for routine genetic quality control of inbred and congenic strains of rats and mice. *Laboratory Animals* 14:173-177.
- Frisbee, J.C. 2005. Hypertension-independent microvascular rarefaction in the obese Zucker rat model of the metabolic syndrome. *Microcirculation* 12: 383-392.
- Gheni, G., Yokoi, N., Beppu, M. *et al.* 2015. Characterization of the prediabetic state in a novel rat model of type 2 diabetes, the ZFDM Rat. *Journal of Diabetes Research* 2015: 261418.
- Hayashi, J.I., Yonekawa, H., Gotoh, O., Tagashira, Y., Moriwaki, K., Yoshida, T.H. 1979. Evolutionary aspects of variant types of rat mitochondrial DNA'S. *Biochimica et Biophysica Acta* 564: 202-211.
- Hilbert, P., Lindpaintner, K., Beckmann, J.S. *et al.* 1991. Chromosomal mapping of two genetic loci associated with blood-pressure regulation in hereditary hypertensive rats. *Nature* 353: 521–529.
- Irwin, H., Moffatt, R.j., Pinket, C.A. 1996. Identification of transgenic mice by PCR analysis of saline. *Nature Biotechnology* 14: 1146-1148.
- Ishibashi, K., Komeda, K., Sekiguchi, F., Kanazawa, Y. 1989. Creeping: a new mutant rat with neurological disease. *Laboratory Animal Science* 39: 132-136.
- Isozaki, O., Tsushima, T., Miyakawa, M., Nozoe Y., Demura, H., Seki H. 1999. Growth hormone directly inhibits leptin gene expression in visceral fat tissue in fatty Zucker rats. *Journal of Endocrinology* 161: 511-516.
- Kahan, B., Auerbach, R., Alter, B.J., Batch, F.H. 1982. Histocompatibility and isoenzyme differences in commercially supplied "BALB/c" mice. *Science* 23: 379-381.

- Kitada, K., Akimitsu, T., Shigematsu, Y. *et al.* 2000. Accumulation of N-acetyl-L-aspartate in the brain of the tremor rat, a mutant exhibiting absence-like seizure and spongiform degeneration in the central nervous system. *Journal of Neurochemistry* 74: 2512-2519.
- Kuramoto, T., Nakanishi, S., Serikawa, T. 2008. Functional polymorphisms in inbred rat strains and their allele frequencies in commercially available outbred stocks. *Physiological Genomics* 33: 205-211.
- Kuramoto, T., Nakanishi, S., Yamasaki, K. *et al.* 2010. Genetic quality control of the rat strains at the national bio resource project - rat. *Interdisciplinary Bio Central* 2: 1-8.
- Lahm, H., Hoefflich, A., Rieger, N., Wanke, R., Wolf, E. 1998. Identification of transgenic mice by direct PCR analysis of lysates of epithelial cell obtained from the inner surface of the rectum. *Transgenic Research* 7: 131-134.
- Lindsey, J.R. 1979. In the Laboratory Rat Volume 1 : Biology and Diseases. Academic Press, New York, pp. 1-36.
- Maekawa, A., Onodera, H., Tanigawa, H. *et al.* 1983. Neoplastic and non-neoplastic lesions in aging Slc: Wistar rats. *Journal of Toxicological Sciences* 8: 279-290.
- Mashimo, T., Voigt, B., Kuramoto, T., Serikawa, T. 2005. Rat phenome project: the untapped potential of existing rat strains. *Journal of Applied Physiology* 98: 371-379.
- Mashimo, T., Voigt, B., Tsurumi, T. *et al.* 2006. A set of highly informative rat simple sequence length polymorphism (SSLP) markers and genetically defined rat strains. *BMC Genetics* 7: 19.
- Mechaly, I., Macari, F., Lautier, C., Serrano, J.J., Cros, G., Grigorescu, F. 1998. Identification and sequence analysis of arginine vasopressin mRNA in normal and Brattleboro rat aortic tissue. *European journal of Endocrinology* 139:123-126.

- Meldgaard, M., Bollen, P.J., Finsen, B. 2004. Non-invasive method for sampling and extraction of mouse DNA for PCR. *Laboratory Animals* 38: 413-417.
- Mizuno, A., Amizuka, N., Irie, K. *et al.* 1998. Severe osteoporosis in mice lacking osteoclastogenesis inhibitory factor/osteoprotegerin. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 247:610-615.
- Nakanishi, S., Kuramoto, T., Serikawa, T. 2009. Simple genotyping method using Ampdirect® Plus and FTA® technologies: application to the identification of transgenic animals and their routine genetic monitoring. *Laboratory Animal Research* 25:75-78.
- Nakanishi, S., Serikawa, T., Kuramoto, T. 2015. Slc:Wistar outbred rats show close genetic similarity with F344 inbred rats. *Experimental Animals* 64: 25-29.
- Nakanishi, S., Kuramoto, T., Kashiwazaki, N., Yokoi, N. 2016. 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: 91-98.
- Nitzki, F., Kruger, A., Reifenberg, K., *et al.* 2007. Identification of a genetic contamination in a commercial mouse strain using two panels of polymorphic markers. *Laboratory animals* 41: 218-228.
- Okamoto, K., Aoki, K. 1963. Development of a strain of spontaneously hypertensive rats. *Japanese Circulation Journal* 27:282-93.
- Peterson, R.G., Shaw, M.W., Neel, M.A., Little, L.A. Eichberg, J. 1990. Zucker diabetic fatty rat as a model for non-insulin dependent diabetes mellitus. *Institute for Laboratory Animal Research Journal* 32: 16–19.
- Philippeaux, J.M. 1856 Note sur l'extirpation des capsules surrenales chez les rats albinos (Mus rattus) . *Revue des Travaux de l'Académie des Sciences Morales et Politiques et Comptes Rendus de ses Séance* 43: 904-906.

- Rahikainen, A.L., Palo, J.U., De Leeuw, W., Budowle, B., Sajantila, A. 2016. DNA quality and quantity from up to 16 years old post-mortem blood stored on FTA cards. *Forensic Science International* 261: 148–153.
- Sasaki, T., Masubuchi, A., Yamamura, M. *et al.* 2006. Rat strain differences in stereospecific 2-oxidation of RS-8359, a reversible and selective MAO-A inhibitor, by aldehyde oxidase. *Biopharm Drug Dispos* 27: 247-255.
- Savory, WS. 1863. Experiments on food; its destination and uses. *Lancet* 1:381-383
- Schmitteckert, E.M., Prokop, C.M., and Hedrich, H.J.1999.DNA detection in hair of transgenic mice-a simple technique minimizing the distress on the animals. *Laboratory Animals* 33:385-389.
- Serikawa, T. 2004. Colourful history of Japan's rat resources. *Nature* 429:15.
- Serikawa, T., Kuramoto, T., Hilbert, P. *et al.* 1992. Rat gene mapping using PCR-analyzed microsatellites. *Genetics* 131: 701-721.
- Serikawa, T., Mashimo, T., Takizawa, A. *et al.* 2009. National bioresource project-rat and related activities. *Experimental Animals* 58: 333-341.
- Serikawa, T., Yamada, J., Ujihara, H., Ohno, Y., Sasa, M., Takaori, S. 1991.Ontogeny of absence-like and tonic seizures in the spontaneously epileptic rat. *Laboratory Animals* 25: 216-221.
- Shimoyama, M., De Pons J., Hayman, G.T. *et al.* 2015. The rat genome database 2015: genomic, phenotypic and environmental variations and disease. *Nucleic Acids Research* 43: D743-D750.
- Silver, L.M. 1995. Mouse genetics concepts and applications. *Oxford University press*. pp.1-194.

- Tayama, K., Fujii, T., Hiraga, K. 1986. Comparison of characteristics between F344 and Slc:Wistar rats-Slc:Wistar rats cannot be distinguished from the F344 strain. *Jikken Dobutsu* 35: 65-76.
- Tong, C., Li, P., Wu, N.L., Yan, Y., Ying, Q.L. 2010. Production of p53 gene knockout rats by homologous recombination in embryonic stem cells. *Nature* 467: 211-213.
- Ushijima, T., Yamamoto, M., Suzui, M. *et al.* 2000. Chromosomal mapping of genes controlling development, histological grade, depth of invasion, and size of rat stomach carcinomas. *Cancer Research* 60:1092-1096.
- Watanabe, H., Fujimoto, N., Masaoka, Y., Ohtaki, M., Ito, A. 1997. Strain differences in the induction of intestinal metaplasia by X-irradiation in rats. *Journal of Gastroenterology* 32: 295-299.
- Watanabe, T.K., Suzuki, M., Yamasaki Y. *et al.* 2005. Mutated G-protein-coupled receptor GPR10 is responsible for the hyperphagia/dyslipidaemia/obesity locus of Dmo1 in the OLETF rat. *Clinical and Experimental Pharmacology & Physiology* 32: 355–366.
- William, F., Mac, Kenzie., F. M. Garner. 1973. Comparison of neoplasms in six sources of rats. *Journal of the National Cancer Institute* 50: 1243-1257.
- Yabutani, M., Agata, N., and Ohta, M. 2009. A new rapid and sensitive detection method for cereulide-producing *Bacillus cereus* using a cycleave real-time PCR. *Letters in Applied Microbiology* 48: 698-704.
- Yagami, K., Mashimo, T., Sekiguchi, F., Sugiyama, F., Yamamura, K., and Serikawa, T. 2010. Survey of live laboratory animals reared in Japan 2009. *Experimental Animals* 59: 531-535.
- Yagami, K., Sugiyama, Y., Sugiyama, F. 1991. Spontaneous leukemia occurring in aged Slc: Wistar rats and its transplantation into rats. *Jikken Dobutsu* 40: 407-410.

- Yamada, J., Natori, T., Matsumoto, K., Sasaki, T., Yoshida, H. 1982. Changes of WKA strain symbols. *Rat News Letter* 10: 37.
- Yamada, J., Nikaido, H., Matsumoto, S. 1979. Genetic variability within and between outbred Wistar strains of rats. *Jikken Dobutsu* 28: 259-265
- Yokoi, N., Hoshino, M., Hidaka, S. *et al.* 2013. A novel rat model of type 2 diabetes: the Zucker fatty diabetes mellitus ZFDM rat. *Journal of Diabetes Research* 2013:103731.
- Yokoi, N., Komeda, K., Wang, H.Y. *et al.* 2002. Cblb is a major susceptibility gene for rat type 1 diabetes mellitus. *Nature Genetics* 31:391-394, 2002.
- Yokoi, N., Namae, M., Wang, H.Y. *et al.* 2003. Rat neurological disease creeping is caused by a mutation in the reelin gene. *Molecular Brain Research* 112:1-7.
- Yokoi, N., Shimizu, S., Ishibashi, K. *et al.* 2000. Genetic mapping of the rat mutation *creeping* and evaluation of its positional candidate gene *reelin*. *Mammalian Genome* 11: 111-114.
- Yuan, J.S., Burris, J., Stewart, N.R., Mentewab, A., Stewart, C.N.Jr. 2007. Statistical tools for transgene copy number estimation based on real-time PCR. *BMC Bioinformatics* 8 (Suppl 7): S6
- Zhang-James, Y., Middleton, F.A., Faraone, S.V. 2013. Genetic architecture of Wistar-Kyoto rat and spontaneously hypertensive rat substrains from different sources. *Physiological Genomics* 45: 528-538.
- Zhang, M., Mo, X., Fang, Y. *et al.* 2009. Rescue of photoreceptors by BDNF gene transfer using in vivo electroporation in the RCS rat of retinitis pigmentosa. *Current Eye Research* 34:791-799.
- Zhao, L.C., Zhang, X.D., Liao, S.X., Gao, H.C., Wang, H.Y., Lin DH. 2010. A metabonomic comparison of urinary changes in Zucker and GK rats. *Journal of Biomedicine and Biotechnology* 2010:431894.

Zucker, L. M., Zucker, T. F. 1961. Fatty, a new mutation in the rat. *Journal of Heredity* 52: 275–278.

芹川忠夫. 2004. ラットのゲノム全塩基配列解読とわが国のラットリソース. 蛋白質核酸酵素 49: 2139-2148.

芹川忠夫. 2013. 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

真下知士、直井国子、庫本高志、芹川忠夫. 2005. 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.

村松正實、木南凌 監修. 2001. 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 PP.298-299

Table 1 日本で開発された疾患モデルラット（一部）

疾患	系統名	由来
高血圧	SHR (Spontaneously Hypertensive rat)	Wistar ラット
	SHRSP (Stroke-prone Hypertensive rat)	Wistar ラット
糖尿病	GK (Goto-Kakizaki rat)	Wistar ラット
	WBN/Kob (Wistar Bonn Kobori rat)	Wistar ラット
	OLETEF (Otsuka Long-Evans Tokushima Fatty rat)	Long-Evans ラット
	LETL (Long-Evans Tokushima Lean rat)	Long-Evans ラット
	KDP (Komeda Diabetes-Prone rat)	Long-Evans ラット
	SDT (Spontaneously Diabetic Torii rat)	Sprague-Dawley ラット
てんかん	TRM (Tremor rat) (カナバン病モデル)	Wistar ラット
	SER (Spontaneously Epileptic rat)	Wistar ラット
	HER (Hotaka Epileptic rat)	Wistar ラット
	WER (Wakayama Epileptic rat)	Wistar ラット
ウイルソン病	LEC (Long-Evans Cinnamon rat)	Long-Evans ラット
高ビリルビン尿症	EHBR (Eisai Hyperbilirubinuria rat)	Sprague-Dawley ラット
高コレステロール血症	ExHC (Exogenously Hypercholesterolemic rat)	Sprague-Dawley ラット
好酸球増多症	MES (Matsumoto Eosinophilia Shinshu rat)	Sprague-Dawley ラット
矮小症	KMI (Komeda Minature rat Ishikawa)	Wistar ラット
無毛症	HWY (Hairless Wistar Yagi rat)	Wistar ラット
	KHR (Kaken Hairless rat)	Wistar ラット
白内障	UPL (UPL Hereditary Cataract rat)	Sprague-Dawley ラット
エナメル質形成不全症	AMI (Amelogenesis Imperfecta rat)	Wistar ラット
	AI (Amelogenesis Imperfecta rat)	Sprague-Dawley ラット
多発性嚢胞腎症	PCK (Polycystic Kidney rat)	Sprague-Dawley ラット
体温調整不全	FOK/Ncu (Furuyama's and Ohara's rat)	Wistar ラット
学習能低下	HAA (Hatano High-Avoidance rat)	Sprague-Dawley ラット
	LAA (Hatano Low-Avoidance rat)	Sprague-Dawley ラット
情動行動異常	THE (Tsukuba High-Emotional rat)	Wistar ラット
	TLE (Tsukuba Low-Emotional rat)	Wistar ラット
神経失調症	DOP (Dilute-Opisthotonus rat)	Wistar ラット
遺伝性腎癌	BHD (Birt-Hogg-Dubé rat)	Sprague-Dawley ラット

Table 2 ラットの病態に関連する 13 個の遺伝子と 3 個の毛色遺伝子の変異

Penotype	Causative Gene	Type of Mutation	Representative strains	Origin*	Reference
<i>Nonagouti (a)</i>	<i>A</i>	19-bp deletion in exon 2	ACI, DA		Kuramoto T. 2001.
<i>Analbuminemia</i>	<i>Alb</i>	7-bp deletion at splicing donor site in intron H	NAR	Jcl:SD	Esumi H. 1983.
<i>Insulin dependent diabetes mellitus</i> <i>KDP QTL 1 (Iddm/kdp1)</i>	<i>Cblb</i>	nonsense mutation at codon 455 (R455X)	KDP	Long Evans	Yokoi N. 2002.
<i>Cholecystokinin A receptor</i>	<i>Cckar1</i>	6.8-kb deletion spanning the promoter region, exon1 and exon2	OLETF	Long Evans	Takiguchi S. 1997.
<i>QTL for insulin resistance, defective fatty acid metabolism and hypertriglyceridaemia in SHR</i>	<i>Cd36</i>	deletion spanning the region between exon4 of Cd36 and exon 5 of Cd36-ps2	SHR/Crl	Kyo:Wistar	Glazier AM. 2002. Gotada T. 1999.
<i>Prostate cancer susceptibility 2 (Pcs2)</i>	<i>Cdkn1a</i>	119-bp insertion in the promoter region	BUF		Yamashita S. 2005.
<i>ULP rat cataract (Uca)</i>	<i>Cox50</i>	missense mutation at codon 340 (R340W)	UPL	Crj:SD	Yamashita S. 2002.
<i>Crescentic glomerulonephritis 1 (Crng1)</i>	<i>Fcgr3</i>	gene duplication	LEW, BN, IS		Aitman TJ. 2006.
<i>Cataract SCR 2 (Cats2)</i>	<i>Fdft1</i>	missense mutation at codon 588 (I588K)	SCR	SHR x fatty	Mori M. 2006.
<i>Diabetes Mellitus OLETF QTL 1 (Dmo1)</i>	<i>Gpr10</i>	point mutation at translation initiation codon	OLETF	Long Evans	Watanabe TK. 2005.
<i>Lymphopenia (Lyp)</i>	<i>Ian5/Gimap5</i>	1-bp deletion resulting in frameshift	BBDP	Wistar Furth	MacMurray AJ. 2002.
<i>Cataract SCR 1 lethal (Cats1^l)</i>	<i>Lss</i>	12-bp deletion in exon 15	SCR	SHR x fatty	Mori M. 2006.
<i>Cataract SCR 1 (Cats1), R481Q</i>	<i>Lss</i>	missense mutation at codon 481 (R481Q)	SCR	SHR x fatty	Mori M. 2006.
<i>Cataract SCR 1 (Cats1), D182N</i>	<i>Lss</i>	missense mutation at codon 139 (D139N)	SCR	SHR x fatty	Mori M. 2006.
<i>Pink-eyed dilution (p)</i>	<i>P/Oca2</i>	deletion spanning exon 17 and exon 18	RCS, KHR		Kuramoto T. 2005.
<i>Ruby (r)</i>	<i>Rab38</i>	point mutation at translation initiation codon	TM, LE/Stm, LEC, FH	Long Evans	Oiso N. 2004.

* 最初に変異が生じたと思われるラットコロニー

[引用 : Kuramoto, T. *et al.* 2008. *Physiol Genomics*33: 205-211. Table 1]

Table 3 繁殖業者で入手可能なクローズドコロニーにおける病態に関連する変異の対立遺伝子頻度の割合

Outbred stock	No. of rats	A		Cdkn1a		Fcgr3-rs*		Fdfl		Gp10		Lss D139		Lss R481		P		Rab38	
		wild	nonagouti	wild	insertion	wild	duplication	ATA	AAA	ATG	ATA			b	a	wild	del	ATG	ATA
		+	a	A	B	b	ab	A	S	B	O	A	S	A	S	+	p	+	r
CrI:WI(Glx/BRL/Han)IGS	31	0.84	0.16	0.82	0.18	0.13	0.87	1.00	0.00	0.23	0.77	0.02	0.98	0.02	0.98	0.42	0.58	1.00	0.00
CrIj:Wistar	31	0.61	0.39	0.61	0.39	0.03	0.97	1.00	0.00	0.21	0.79	0.79	0.21	0.79	0.21	1.00	0.00	1.00	0.00
Jcl:Wistar	32	0.06	0.94	0.72	0.28	0.78	0.22	1.00	0.00	0.94	0.06	0.61	0.39	0.61	0.39	0.00	1.00	1.00	0.00
Slc:Wistar	32	0.00	1.00	0.00	1.00	0.00	1.00	1.00	0.00	1.00	0.00	1.00	0.00	1.00	0.00	1.00	0.00	1.00	0.00
BrlHan:WIST	32	0.64	0.36	0.72	0.28	0.09	0.91	1.00	0.00	0.45	0.55	0.00	1.00	0.00	1.00	0.67	0.33	1.00	0.00
CrIj:CD(SD)	31	0.00	1.00	0.31	0.69	0.00	1.00	1.00	0.00	0.31	0.69	0.32	0.68	0.32	0.68	1.00	0.00	1.00	0.00
CrI:CD(SD)IGS	31	0.10	0.90	0.60	0.40	0.00	1.00	1.00	0.00	0.63	0.37	0.58	0.42	0.58	0.42	1.00	0.00	1.00	0.00
Jcl:SD	32	0.00	1.00	0.48	0.52	0.00	1.00	1.00	0.00	0.02	0.98	0.44	0.56	0.31	0.69	0.95	0.05	1.00	0.00
Slc:SD	32	0.00	1.00	0.48	0.52	0.00	1.00	1.00	0.00	1.00	0.00	1.00	0.00	1.00	0.00	1.00	0.00	1.00	0.00
Iar:Long-Evans	30	0.00	1.00	1.00	0.00	0.23	0.77	1.00	0.00	0.00	1.00	0.37	0.63	0.33	0.67	1.00	0.00	1.00	0.00
Kwl:Long-Evans	30	0.00	1.00	0.00	1.00	1.00	0.00	1.00	0.00	0.00	1.00	1.00	0.00	1.00	0.00	1.00	0.00	1.00	0.00

* 標準的な PCR では、Fcgr3-rs 遺伝子座の挿入された対立遺伝子がホモ接合体なのかヘテロ接合体なのか区別が出来ないので、対立遺伝子頻度を決定することが出来なかった。[引用： Kuramoto, T. *et al.* 2008. *Physiol Genomics*33: 205-211. Table 5]

Table 4 27 個 of SSLP マーカーでのアレル頻度

Stock name	No of Rats	Type of allele ¹	<i>D1Mgh19</i>	<i>D1Rat126</i>	<i>D2Rat202</i>	<i>D2Rat49</i>	<i>D3Rat80</i>	<i>D3Rat24</i>	<i>D4Rat101</i>	<i>D5Rat147</i>	<i>D5Mgh23</i>	<i>D6Rat105</i>	<i>D7Rat103</i>	<i>D8Rat49</i>	<i>D9Mit3</i>
Hos:ZFDM	30	a	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00
		b	-	-	-	-	0.00	-	-	-	-	-	-	-	0.00
		c	-	-	-	-	0.00	-	-	-	-	-	-	-	-
Slc:ZF	30	a	1.00	1.00	1.00	1.00	0.97	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	0.00
		b	-	-	-	-	0.03	-	-	-	-	-	-	-	1.00
		c	-	-	-	-	0.00	-	-	-	-	-	-	-	-
KZC/Tky strain	1		<i>a</i>	<i>a</i>	<i>a</i>	<i>a</i>	<i>c</i>	<i>a</i>	<i>a</i>	<i>a</i>	<i>a</i>	<i>a</i>	<i>a</i>	<i>a</i>	<i>a</i>
KZF/Tky strain	1		<i>a</i>	<i>a</i>	<i>a</i>	<i>a</i>	<i>a</i>	<i>a</i>	<i>a</i>	<i>a</i>	<i>a</i>	<i>a</i>	<i>a</i>	<i>a</i>	<i>b</i>

Stock name	No of Rats	Type of allele ¹	<i>D10Rat223</i>	<i>D11Rat63</i>	<i>D12Rat52</i>	<i>D13Rat1</i>	<i>D14Rat75</i>	<i>D14Rat110</i>	<i>D15Rat29</i>	<i>D16Rat35</i>	<i>D17Rat70</i>	<i>D18Mit1</i>	<i>D19Rat12</i>	<i>D20Rat34</i>	<i>DXRat16</i>	<i>DXRat104</i>
Hos:ZFDM	30	a	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	0.95	0.00	1.00	1.00	0.00
		b	-	0.00	0.00	-	-	-	-	0.00	0.00	0.05	1.00	0.00	-	1.00
		c	-	0.00	-	-	-	-	-	0.00	-	-	-	-	-	-
Slc:ZF	30	a	1.00	0.00	0.00	1.00	1.00	1.00	1.00	0.68	1.00	1.00	1.00	0.00	1.00	1.00
		b	-	0.95	1.00	-	-	-	-	0.27	0.00	0.00	0.00	1.00	-	0.00
		c	-	0.05	-	-	-	-	-	0.05	-	-	-	-	-	-
KZC/Tky strain	1		<i>a</i>	<i>a</i>	<i>a</i>	<i>a</i>	<i>a</i>	<i>a</i>	<i>a</i>	<i>b</i>	<i>b</i>	<i>a</i>	<i>a</i>	<i>b</i>	<i>a</i>	<i>b</i>
KZF/Tky strain	1		<i>a</i>	<i>b</i>	<i>b</i>	<i>a</i>	<i>a</i>	<i>a</i>	<i>a</i>	<i>b</i>	<i>a</i>	<i>a</i>	<i>a</i>	<i>b</i>	<i>a</i>	<i>a</i>

1, 各遺伝子座の対立遺伝子の遺伝子型は、PCR 産物のサイズの小さい順に *a*、*b*、*c* と名付けた。

Table 5 99 個の SSLP マーカーのリスト

No.	SSLP_SYMBOL	Physical Position (bp)		Forward Primer (5'→3')	Reverse Primer (5'→3')
1	<i>D1Rat410</i>	92492865	92493016	AGTGTCTTGTCCGCGAGTC	ACCCTGCGTGGTGCTTCTAG
2	<i>D1Rat270</i>	136616460	136616701	AAACACTCTGTGGGCAAAAGG	GGCAATTTGCAAGATGACCT
3	D1Mgh19	169303713	169303909	TGTGCTGTTCATAACCCCAA	TGGTGAGACAGAGATGCTG
4	<i>D1Mit4</i>	-	-	CAGTCAGAACAAATGGTGCTCA	AAAGAAAGATGAAGTGCACGC
5	<i>D1Rat208</i>	215445861	215,446,089	CACAAATTTGGCTTGGTTTTC	TTCTGTCTTTGTTTGCTTGC
6	<i>D1Rat70</i>	224635116	224635232	GACTGATCTCTGCCCTCCAC	GGAGCCCCAGTATCCTCTC
7	<i>D1Rat452</i>	274443023	274443228	AGAACACGCCATATGCATTG	CTCAGTCTGTACACTCTTGCTG
8	D1Rat126	284682354	284682483	TGCATCCACACACACAAATG	GGGTTGTGGAAGCAATCAAG
9	<i>D2Rat189</i>	14564017	14564153	GAGGGGAAGGAAGGATTTTG	TGTGCAACTTTTGTGTTGTTG
10	<i>D2Rat194</i>	47825961	47826135	TAATTGCAACAGGTCAGGCG	GAGTGGATTTGAGAGCAGCTG
11	D2Rat202	70871440	70871600	TGGCTTAGCATATCTCAGCA	CGCCACGCTCATTAAATTT
12	<i>D2Rat256</i>	165068839	165069062	TCGCTTTTGAGCTGAAAATGT	TCCTAATATGGCTCCAGGTAGCA
13	D2Rat49	224467722	224467852	CTTATTGTATTACATGTGCACGC	ATCCCTGGTGAGGGGAAAAGT
14	<i>D2Rat118</i>	239931503	239931716	CCTCATGAGTCTCTCCCAT	TGACCTAACCCAGGTGGGTA
15	<i>D2Rat250</i>	275530772	275530953	GTCCCTCTCTGTCCCTCTC	GAAGTCTGAACGCTCATGCA
16	<i>D3Rat56</i>	2612834	2613030	CTTGGACTTGACCTGCCACT	AGTGAAGCCCTCTTTTGGGG
17	D3Rat80	41713824	41714034	TTGTTTTGTAAATTGGATGCTCA	AGGAGTGTGACGCAATTCAT
18	<i>D3Rat130</i>	55227530	55227748	CAGTATCCCAGCCCTTCAAA	CCTCAGAGAGTTGCCAAAATC
19	D3Rat24	108753156	108753299	GCCATGATATTGCACCATGA	GACAAGGTTCTTGATAGTCTCTCA
20	<i>D3Rat157</i>	135204992	135,205,144	TGTTCAAACCTCAATCTGGAAA	TTGTCCACAGAAAGAGGCAATG
21	<i>D3Rat148</i>	152786076	152786289	CTGAGCTGGGAAGTCTCTG	CTGAGTGTGAAACAAAGCG
22	D4Rat101	47442336	47,442,522	TGGTATGACTATCCAGTGACA	TGGATGAAGCTCTGTAAATGCA
23	<i>D4Arb7</i>	79578581	79578874	ACCAACTTTGACTTCCAACAGC	GAAAAACCATCCTCTGACTTCC
24	<i>D4Arb15</i>	154307464	154307678	TACCACCAATCTTTTCCACAGC	GTTCAACTATTGATGTCTGGG
25	<i>D4Mit20</i>	154427762	154427984	GTATCCATTGCCCATAGCCT	AAATCAGATTGGCTTGGAAAA
26	<i>D5Rat68</i>	88284126	88284347	TGGGCTTGATTCAAGATGGT	TTGAGGGAATCATACATTTTGTG
27	D5Rat147	89056339	89056511	AAGCACCTTAAAAACAAGAGTTGA	TTACTGGCACAGGCAGACAG
28	D5Mgh23	117961364	117961491	CTTCAATCGCCAGATCATT	GGCTTGGGTGGGAGTAGAG
29	<i>D5Rat83</i>	128010597	128,010,765	ACTTGAAACAGGGAGATGG	GGTCTTCAGGATGGCAATGT
30	<i>D5Rat41</i>	158816587	158816715	AAAAGCATGTCCCATCATC	CTGTGGTCTGGGTGAGGTCT
31	<i>D5Rat106</i>	160193152	160193361	TTACTGGCTGTTTGCTTTAGCA	TGAAAGTTTCCCTTAAATGGGTG
32	D6Rat105	29783979	29784197	GCATGAGGCAGAGCCAATTA	GCCAGTTTGCTTCACTTTC
33	<i>D6Arb5</i>	46824567	46824726	CACCTATAGACCCTTCAGGA	CAACCAAGGCTGATTGCCAGA
34	<i>D6Rat14</i>	110287982	110,288,178	GGCATTAGAGAAACAGACCAAG	CGTGTGCTCCAGTAGAGGT
35	<i>D6Rat160</i>	122700475	122700838	CCAGGGCTGCTATCCATTTA	GGGCTATCTGTATACCAAGATTCTG
36	<i>D7Mgh11</i>	3124185	3124321	GGAGCATCCAGATAACCCCAA	CTGGACAACACAGTAAGATTTTGC
37	<i>D7Rat66</i>	3173043	3173271	CTGAGTTCAATCCCTGGAC	GAGGCCAGTGGTATGGAAAA
38	<i>D7Rat195</i>	28120395	28120665	TCCGGACCTACCTGTATGA	CACAAAGTGAAGACTTATGTGCG
39	D7Rat103	47909781	47910011	CTGGTGCTTTTGGGTCTGTT	GTGTCAAAGTGTGGGGATCC
40	<i>D7Rat135</i>	111453751	111453911	CCAGTTTCAATCTACTGCTCCA	GGAAACCAAGGAAGAAGTAGCA
41	<i>D7Rat128</i>	124236483	124,236,725	GCTTCTGGGGCACCTATACT	TTAAGGCCCTTGCAGATTT
42	D8Rat49	-	-	GCTCCAAAACTTGTGACATTTTAAA	CAGTGCAGAGTTCTGACCTCA
43	<i>D8Rat36</i>	57006784	57006953	ACAGGCCACATTTCTTTTG	ATGGGCACCTCCTGAGTAGC
44	<i>D8Mgh7</i>	62249161	62249381	TGAAGAGATTTTACTGGGTAGCTCC	TGGACCAGGCAAGTTCTCTT
45	<i>D8Rat16</i>	100780886	100781055	TTTTAAATTGCTGTTGATTGGTT	TCTGCACTTTAAACAAGGTGTGA
46	<i>D9Rat79</i>	15427242	15427460	ACCCAGATAAATGCCAGGTG	CTCAGCAGGTAGGGCTTTTG
47	<i>D9Rat132</i>	16772634	16772781	CCTCTGACCTTCCAAGCAC	AAAAATTGCAGGTGTCAGGT
48	<i>D9Rat60</i>	52896774	52896896	CAGGCATTAAGATCCTGGGTT	CTATGTTTGATGTATATGTGTGTG
49	D9Mit3	63077375	63077544	TGAGACTTGATTCTACTCTCCC	CTATCCCTGTCTCTGTCTACCA
50	<i>D9Rat110</i>	102147849	102148004	TGGGTGCTTAATTTTGTGTTT	GCTCTCAACCCATCCAACTTT
51	<i>D10Rat198</i>	14751779	14751992	TTCTGTCTAAGGGGACAGCTA	AAGGGCAAAGTTTCAGCAAGA
52	<i>D10Rat121</i>	16679402	16679582	CCCACAAACATGTGCATATACA	CTAAGATTCCGGAGAGTGGG
53	D10Rat223	42643535	42643778	ATGGGAGTGTGTTGGCTTTGT	ATGGTACCTCCACATTGGA
54	<i>D10Rat193</i>	74001821	74002046	TAGGAGGGGCTGTGAGTGAG	TTCTCTTAACCCCAATCCCCA
55	<i>D10Rat93</i>	80787958	80788180	TCTGACATAAGGTCACTTTGGAGA	TGCCTTAAGCAGAAATGCAATT
56	<i>D11Rat97</i>	38650211	38650338	AAAAGTCCCCCAGATAGCT	AAACCAGGGGTAAAGAGAGGG
57	<i>D11Rat6</i>	49765505	49765656	TCTGGGGATTGAAAGATGC	GTGCAGCCATACCAATCAAA
58	D11Rat63	72160297	72160499	GGCAGGCAATCAAACAAGTAA	CACAAGGCCCTGGTTTCTAT
59	<i>D11Mgh3</i>	72739687	72739854	GGAGCTGAAATACGAGAGAAATAA	GTCTGTGCTGGCTGTGCAT
60	<i>D11Rat92</i>	83216448	83216574	GCATACCTACAAACATACGAGC	ATGGCTGTGGTCTAGTTGCC
61	<i>D12Arb13</i>	10334114	10334345	CAGAAATGGTCAAGCTGTGC	GATCAGCTTGTAGTGAGGGCT
62	D12Rat52	42709520	42709664	CACCTGATGTGTCCAACAGAA	ATTACTGCTCTTTTCTCTTACA
63	<i>D12Rat25</i>	46759803	46759942	TTCTAGCACACACAGGCTGG	AGTGAGCTTTCTGCCACCTC
64	<i>D13Rat7</i>	19518130	19518331	CACAGATTACAGGCAAAATAAAA	TGTGAAAAAATGGAGCCATG
65	D13Rat1	29679984	29680295	AAAGCATCCATCAAACAGCC	CTTTTCTTTTACTTCCAAGCAA
66	<i>D13Rat192</i>	109040421	109040616	TGCTGAGCACTAACGGAAATG	GATGTCTGCACTTCCCCAAA
67	<i>D13Mit15</i>	107546551	107546758	CCTCAAGATAAATCTTCAGTAGGC	CCACACAAACAGAAAGCCA
68	<i>D14Rat1</i>	4830815	4830956	CAGTCCCTGGGTTTTCACAT	CTCCAAGACACAAAACGATCA
69	D14Rat75	12357955	12358217	TGACCCCTCAGTGTCAAATTC	GCACACTGCAGTGAGACAAAA
70	<i>D14Rat94</i>	88669660	88669930	TGCAGAGAGGGAGTGACATG	GAAAAGGTTTCTCACCGTTGC
71	D14Rat110	110119134	110119451	AACATTGTCTTGCTTAGCCTCA	CTCCACCCACACACCACG
72	<i>D15Rat81</i>	31735664	31735809	TCATGACCATTCTGCAATCC	GTGGTAGGGGTTTCCAACAC
73	<i>D15Rat8</i>	49830650	49830893	TGATTTTGACATGGTTTCTTCC	ACATGGGAGAGACAACTGGG
74	<i>D15Rat43</i>	48886921	48887099	GAGGAATGGGTACGATGTT	TTTGGAAACAAAGTGGGCT
75	D15Rat29	99127682	99127850	AGAGGTGATGCCAAGTGCTT	TGACCTATTTGCAATTTGCA
76	<i>D16Rat81</i>	16872419	16872565	GGCCACATGTGATGTATA	GAGCCTTAGCACAGTGGCTT

Table 5 (続き)

No.	SSLP_SYMBOL	Physical Position (bp)		Forward Primer (5'→3')	Reverse Primer (5'→3')
77	D16Rat35	17347173	17347419	CCAAATCAGGGGCATAAACA	GGGAAATGTGAACCTGAGA
78	<i>D16Mgh9</i>	26650677	26650925	GTGAATGTGCATTTCATGCCT	TGCTGGCACTAACTGAGCAG
79	<i>D16Rat67</i>	49742828	49,743,047	TGTCACCTACCTGTGGCAGC	GGCATAAGATGAGGCTAACGA
80	<i>D17Mgh10</i>	-	-	ACACACATATGGGAACCTTTCCC	AGGCAGTACCATCAGGGTTG
81	D17Rat70	17752672	17752867	ACCAACAGCACACATGCAAG	TGGGACCTTCTCCATTGTTT
82	<i>D17Arb4</i>	37268920	37269463	TGAGGTCTCATTGGGAAGTTGG	TTTTGTTAGGGCAATACAGGG
83	<i>D17Rat65</i>	88435111	88435496	TGCCAGTCTTTTCAATGTGG	GGGTAAGGACAAGGTTCTCTGA
84	D18Mit1	79625026	79625183	GCGGTACAGAAAGAAAGAGAGA	AGAGTGTGGCCATAAAAGACA
85	<i>D18Rat96</i>	40541457	40541699	GCAGATCTCTCTCCACAGC	TGGACATCTCAATGGACCT
86	<i>D18Arb6</i>	61757020	61757227	GTCCAATCTCACCGTCAATACC	CAGAAACACATGTAATCCAGC
87	<i>D18Rat12</i>	71072135	71072368	TTACTCACTGCCCCACAACA	TGAGGTCTGCTACAGTGGC
88	<i>D19Rat47</i>	24433921	24,434,182	ACTCTGCAATTGGAATTGGG	AATGGCAAGCTCCACAGAAT
89	D19Rat12	34533970	34534180	AGCCCATGTGCAACAGAGAAA	CATCCTGACATCCATTCTCT
90	<i>D19Rat29</i>	43887287	43887472	TGTGTTAATCCAAGGATGGGA	ACAGGAGGGTCAGAAAGCTCA
91	<i>D20Rat41</i>	6118659	6118863	AGTCCTCTTCTGGCTCCAT	TGGGACGATGTGCATATCC
92	<i>D20Rat43</i>	34674602	34674857	AGGAAGTTGAGATCAGGGCA	GATTTGGCTTCTGCTCTCCA
93	D20Rat34	29787562	2978770	GTCCCTCCCAACCTCAGTTT	TGAGACATGTCCCAAAACCAA
94	<i>D20Arb10</i>	54571986	54572255	CCAAGACACTTAGTGCTATG	GCATACCTTGGAACTGTTC
95	<i>DXRat44</i>	13098741	13098973	TAAGTGTGCCCAATAAGG	CTGGGTCTGCTCTGATGCT
96	<i>DXRat75</i>	15630508	15630682	TGAAGTCTCCATGGATGCTG	ACCAAGGGACATTGCAGAAA
97	<i>DXMgh7</i>	119539148	119539365	AACTCCAGTTCCAGGGGACT	TGGAAGCAGAAAGCCAGTTT
98	DXRat16	67459352	67,459,477	TTCCCTTTCTCTATCACATTCTCA	TTGTTTCTGCGACTGCTGTT
99	DXRat104	141249429	141249576	TGCTCTCAGTGATCCATAGGC	TGCCAAACATATCCATGTAAAA

SSLP マーカーの物理的位置 (bp) は、Baylor College of Medicine Human Genome Sequencing Center および Rat Genome Sequencing Consortium (RGSC) によって提供されている Rat genome assembly:Rnor_5.0.を参考にした。Primer 配列は、ラットゲノムデータベース 2015 に基づいている[Shimoyama, 2015]。系統樹解析に用いた 27 個の SSLP マーカーは太字で示した。

Table 6 Hos:ZFDM と Slc:ZF の間で多型のある領域に含まれる糖尿病に関連する QTLs のリスト

No.	SSLP Symbol	Chr.	QTL Symbol	Name	Trait	Sub Trait
1	<i>D1Rat70</i>	1	Niddm35	Non-insulin dependent diabetes mellitus QTL 35	blood insulin amount	serum insulin level
			Niddm36	Non-insulin dependent diabetes mellitus QTL 36	insulin secretion trait	calculated pancreatic islet insulin release measurement
			Niddm43	Non-insulin dependent diabetes mellitus QTL 43	blood glucose amount	blood glucose level
			Niddm67	Non-insulin dependent diabetes mellitus QTL 67	blood glucose amount	blood glucose level area under curve (AUC)
			Niddm68	Non-insulin dependent diabetes mellitus QTL 68	blood glucose amount	blood glucose level area under curve (AUC)
			Niddm69	Non-insulin dependent diabetes mellitus QTL 69	blood insulin amount	plasma insulin level
			Niddm70	Non-insulin dependent diabetes mellitus QTL 70	blood insulin amount	plasma insulin level
2	<i>D1Rat452</i>	1	Bw116	Body weight QTL 116	abdominal adipose amount	abdominal fat weight
			Niddm24	Non-insulin dependent diabetes mellitus QTL 24	blood glucose amount	blood glucose level area under curve (AUC)
			Niddm43	Non-insulin dependent diabetes mellitus QTL 43	blood glucose amount	blood glucose level
			Niddm57	Non-insulin dependent diabetes mellitus QTL 57	body mass	body weight
			Niddm58	Non-insulin dependent diabetes mellitus QTL 58	body mass	body weight
			Niddm59	Non-insulin dependent diabetes mellitus QTL 59	body mass	body weight
			Niddm67	Non-insulin dependent diabetes mellitus QTL 67	blood glucose amount	blood glucose level area under curve (AUC)
			Niddm68	Non-insulin dependent diabetes mellitus QTL 68	blood glucose amount	blood glucose level area under curve (AUC)
			Niddm69	Non-insulin dependent diabetes mellitus QTL 69	blood insulin amount	plasma insulin level
			Stl31	Serum triglyceride level QTL 31	blood triglyceride amount	plasma triglyceride level

Table 6 (続き)

No.	SSLP Symbol	Chr.	QTL Symbol	Name	Trait	Sub Trait
3	<i>D3Rat130</i>	3	Bw117	Body weight QTL 117	abdominal fat pad mass	abdominal fat pad weight to body weight ratio
4	<i>D3Rat148</i>	3	Niddm39	Non-insulin dependent diabetes mellitus QTL 39	blood glucose amount	blood glucose level
5	<i>D5Rat41</i>	5	Niddm30	Non-insulin dependent diabetes mellitus QTL 30	blood glucose amount	blood glucose level area under curve (AUC)
6	<i>D9Rat60</i>	9	Niddm26	Non-insulin dependent diabetes mellitus QTL 26	blood glucose amount	blood glucose level area under curve (AUC)
7	<i>D9Mit3</i>	9	Niddm26	Non-insulin dependent diabetes mellitus QTL 26	blood glucose amount	blood glucose level area under curve (AUC)
8	<i>D10Rat93</i>	10	Niddm3	Non-insulin dependent diabetes mellitus QTL 3	blood glucose amount	blood glucose level
9	<i>D11Rat63</i>	11	Niddm22	Non-insulin dependent diabetes mellitus QTL 22	blood glucose amount	plasma glucose level
			Niddm50	Non-insulin dependent diabetes mellitus QTL 50	blood glucose amount	plasma glucose level
10	<i>D11Mgh3</i>	11	Niddm22	Non-insulin dependent diabetes mellitus QTL 22	blood glucose amount	plasma glucose level
			Niddm50	Non-insulin dependent diabetes mellitus QTL 50	blood glucose amount	plasma glucose level
11	<i>D11Rat92</i>	11	Niddm22	Non-insulin dependent diabetes mellitus QTL 22	blood glucose amount	plasma glucose level
12	<i>D12Rat52</i>	12	Bw120	Body weight QTL 120	body mass	body mass index (BMI)
			Niddm27	Non-insulin dependent diabetes mellitus QTL 27	blood glucose amount	blood glucose level
13	<i>D16Rat35</i>	16	Niddm6	Non-insulin dependent diabetes mellitus QTL 6	blood glucose amount	plasma glucose level
14	<i>D19Rat12</i>	19	Niddm38	Non-insulin dependent diabetes mellitus QTL 38	blood glucose amount	blood glucose level
15	<i>DXMgh7</i>	X	Niddm27	Non-insulin dependent diabetes mellitus QTL 27	blood glucose amount	blood glucose level
16	<i>DXRat104</i>	X	Insul4	Insulin level QTL 4	blood insulin amount	serum insulin level

QTLs の情報は、Rat Genome Database 2015 [Shimoyama, 2015]に基づいている。

Table 7 内在性遺伝子および外来性遺伝子を検出するためのプライマーリスト

Gene symbol	Forward primer		Reverse primer		Strain
	name	Sequence (5' > 3')	name	Sequence (5' > 3')	
<i>Lepr^{fa}</i>	<i>rObn</i> -8	TATGGAAGTCACAGATGATGG	<i>rObn</i> -11	CTTACGATTGTAGAATTCTCTAA	KZ- <i>Lepr^{fa}</i> /Tky
<i>Mrs2^{dmy}</i>	<i>rMrs</i> 2l-31	AAAGTTTGACAAAGAAGGAAACG	<i>rMrs</i> 2l-32	GGGGATGGAGGGCTATGTAA	DMY/Kyo
<i>Neo</i>	NEOP189F	GCTGCATACGCTTGATCCGGCTAC	NEOP544R	TAAAGCACGAGGAAGCGGTCAGCC	OCIF/Jcl
<i>Ocif</i>	<i>Ocif</i> _Ex2_F1	TCCTGGCACCTACCTAAAACAGCAC	<i>Ocif</i> _Ex2_R1	GCTAACGCCCTTCCTCACACTCAC	OCIF/Jcl
pBACe3.6	RPCI-23-F	CAACTCAATCGACAGCTGGA	RPCI-23-R	GGCTTTGTTTGCCGTAATGT	RPCI-23 C57BL/6J
<i>Klk1b3</i>	<i>D7Nds5</i> -F	CTCCACATGTGTATGTGTATG	<i>D7Nds5</i> -R	ATGGAGGCCGAAGAAAGAATC	BALB/c、C57BL/6、C3H/He、DBA/2
<i>D9Mit303</i>	<i>D9Mit303</i> -F	TGAAAGTGGTTCTCTGACCTCA	<i>D9Mit303</i> -R	CTGCACTGTTTCAAATACACTGG	BALB/c、C57BL/6、C3H/He、DBA/2

Table 8 CycleavePCR 用のプライマーとプローブ

Gene symbol	name	Sequence (5' > 3')	name	Sequence (5' > 3')	Strain
<i>Apc^{mkyo}</i>	Apc_SNP-F	ATCCATCTGTTCAGGCAGGT	Apc_SNP-R	GTGTTACGCTTCCAGGTTC	KAD/Kyo
	Mutant probe	Eclipse/aggccct(a)aa/ROX	Wild probe	Eclipse/gccctc(a)aag/FAM	

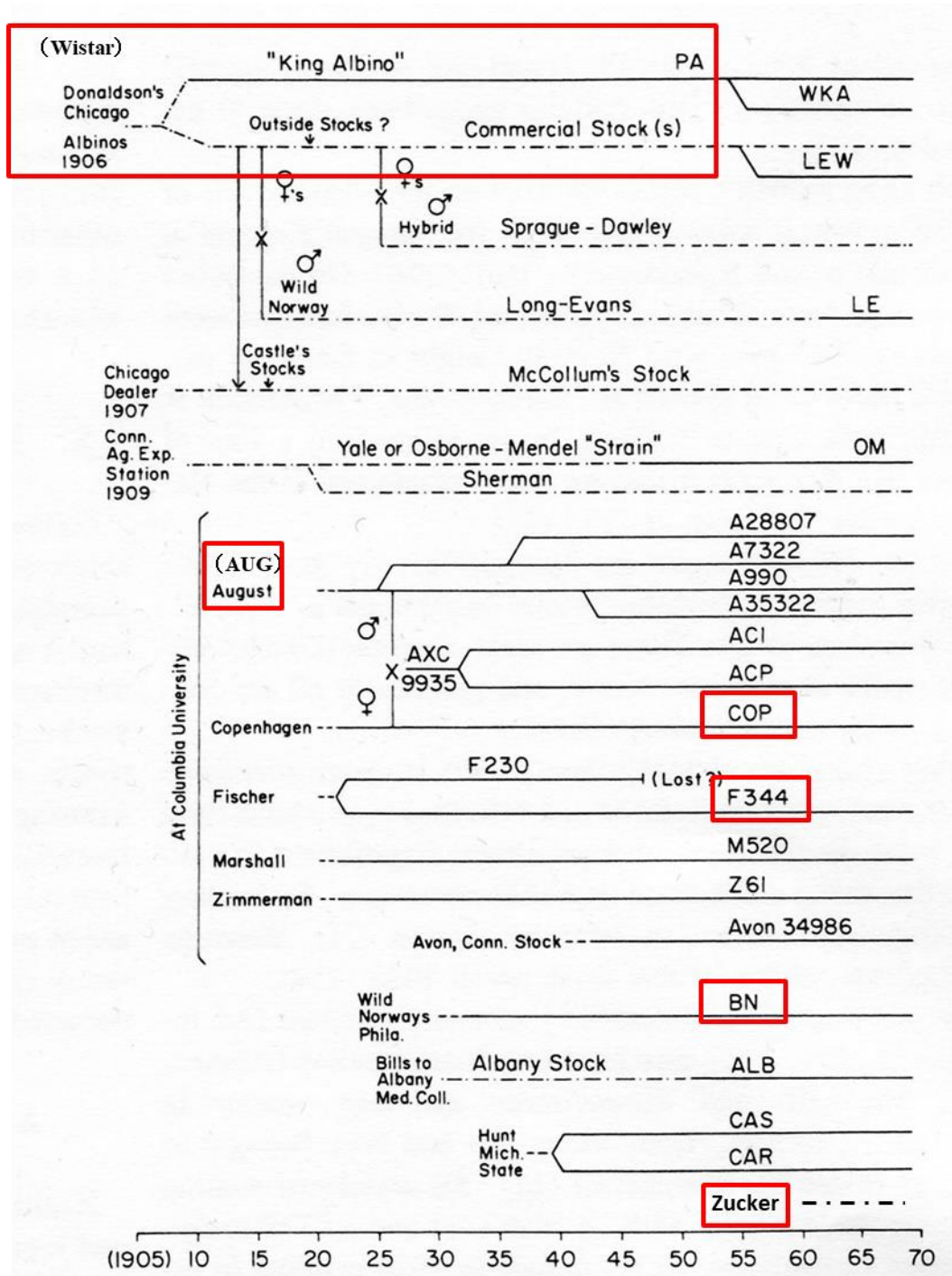


Fig. 1 ラットの主要なクローズドコロニーと近交系系統の系譜

破線は兄妹交配の開始を表わしている。実線は近交系。破線と実線の組み合わせはクローズドコロニーを表わしている。 [引用 : Lindsey, J.R. 1979. Historical foundations. pp.

1-36. In: The Laboratory Rat Volume I, Fig. 40]

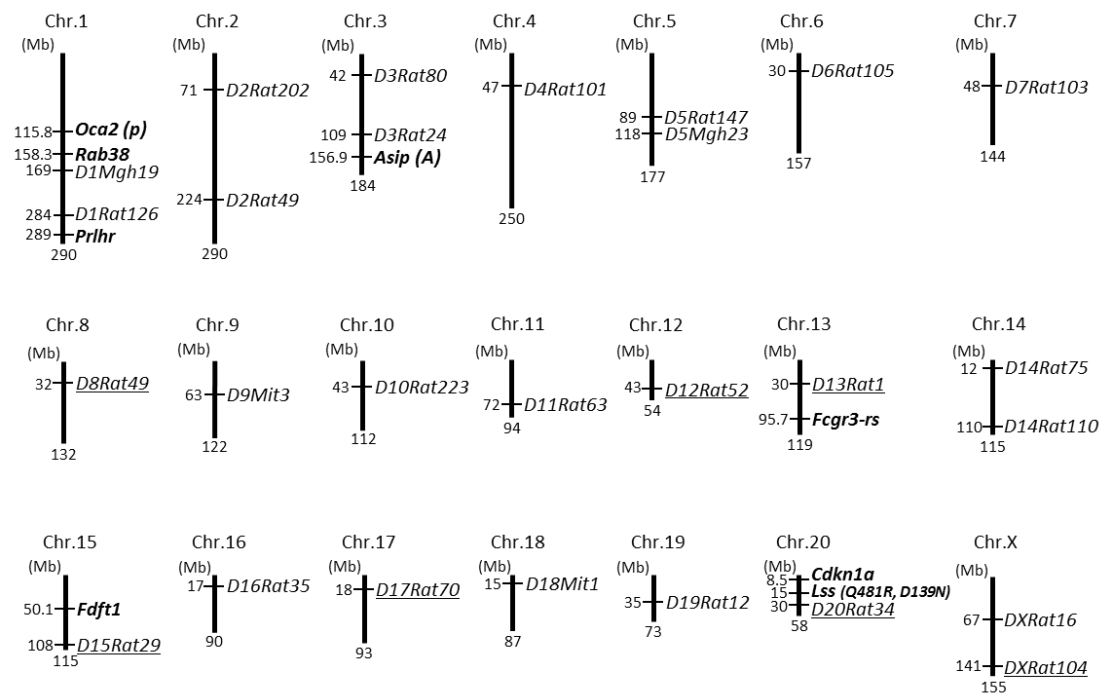


Fig. 2 ラットゲノム上の 27 の SSLP マーカーと 9 の機能多型遺伝子座の位置

20 の SSLP マーカーは、NBRP-Rat においてラットの遺伝的モニタリング検査でいつも使用している。新たに選択した 7 の SSLP マーカーは下線を引いた。9 の機能多型の遺伝子座は太文字で表した。マーカーの物理的位置と染色体の大きさは、genome assembly: Rnor_5.0.を参考にした。

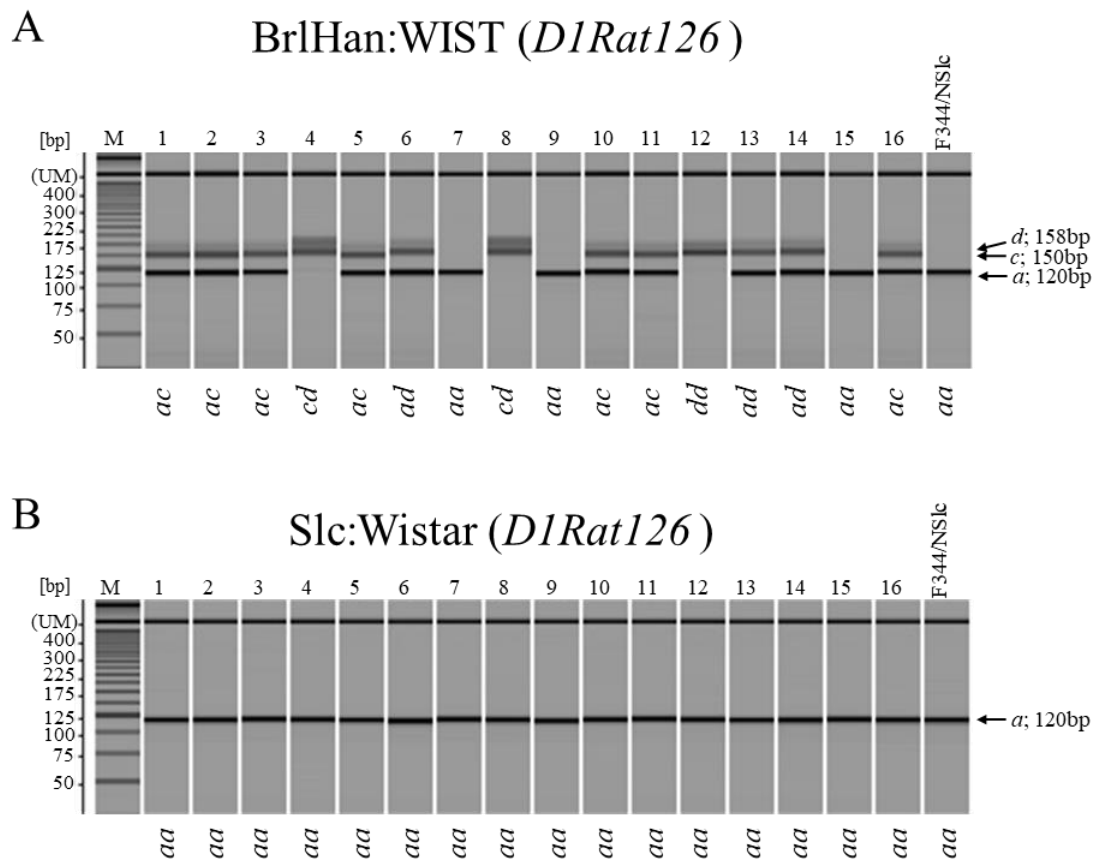


Fig. 3 BrlHan:WIST と Slc:Wistar クローズドコロニーラットの PCR 産物と遺伝子型の代表的な遺伝子座 *D1Rat126* のゲルイメージ

16 の BrlHan:WIST クローズドコロニーラット (A) と 16 の Slc:Wistar クローズドコロニーラット (B) の PCR 産物を示している。対立遺伝子型は、PCR 産物の大きさに基づいて決定した。*D1Rat126* の遺伝子座では、3 種類の違った PCR 産物を検出した。最も小さい (120bp)、中間 (150bp)、最も大きい (158bp) それぞれを順に対立遺伝子 *a*、*c*、*d* と名付けた。*b* (140bp) の対立遺伝子型は、BrlHan:WIST ラットでは観察することができなかった。16 の Slc:Wistar ラットすべてが *a* ホモ型であった。M は、25-bp DNA ladder である。

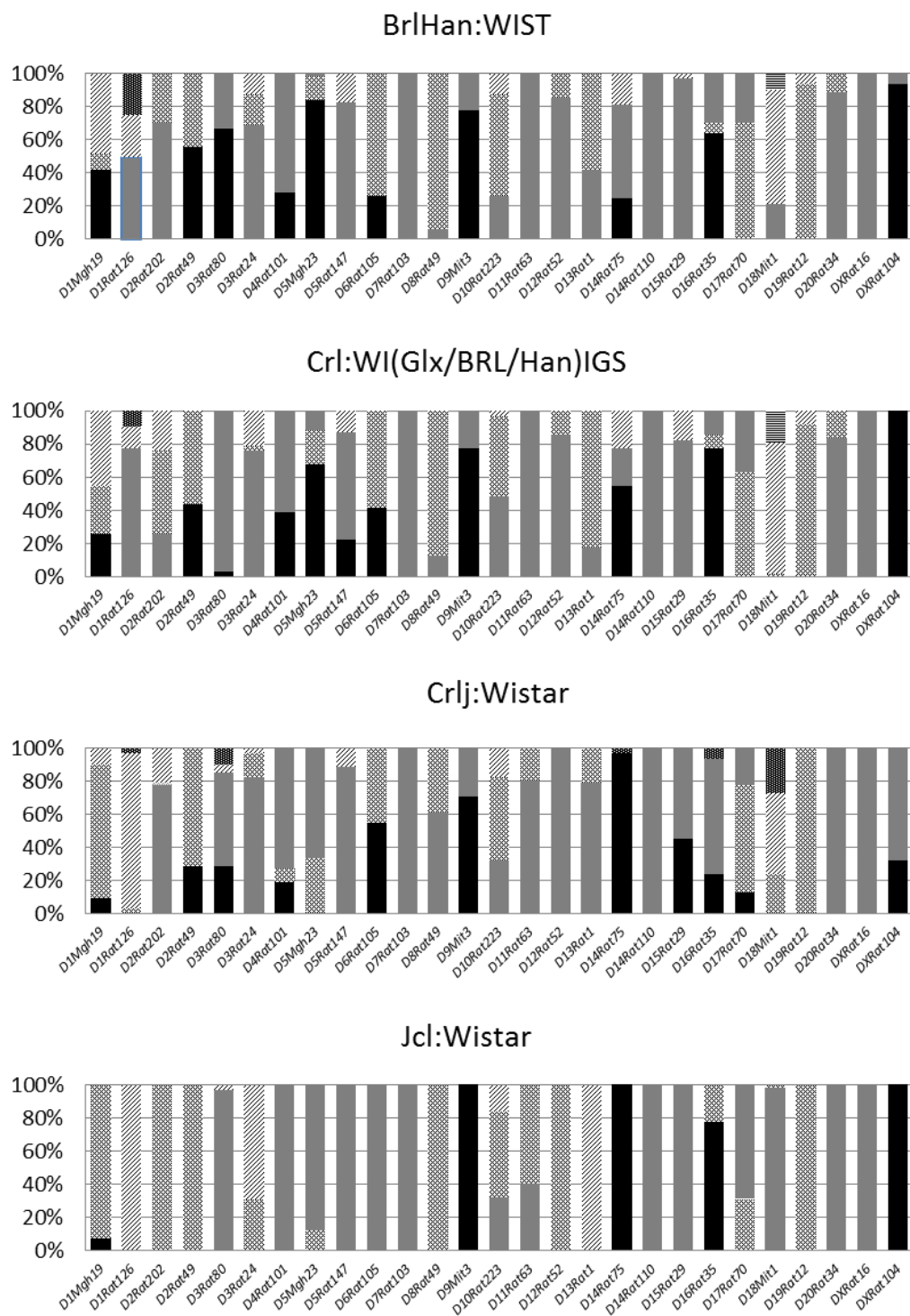


Fig. 4-1 Wistar クローズドコロニーラット集団と F344 近交系ラットの 27 の SSLP マーカーの各対立遺伝子の分布図

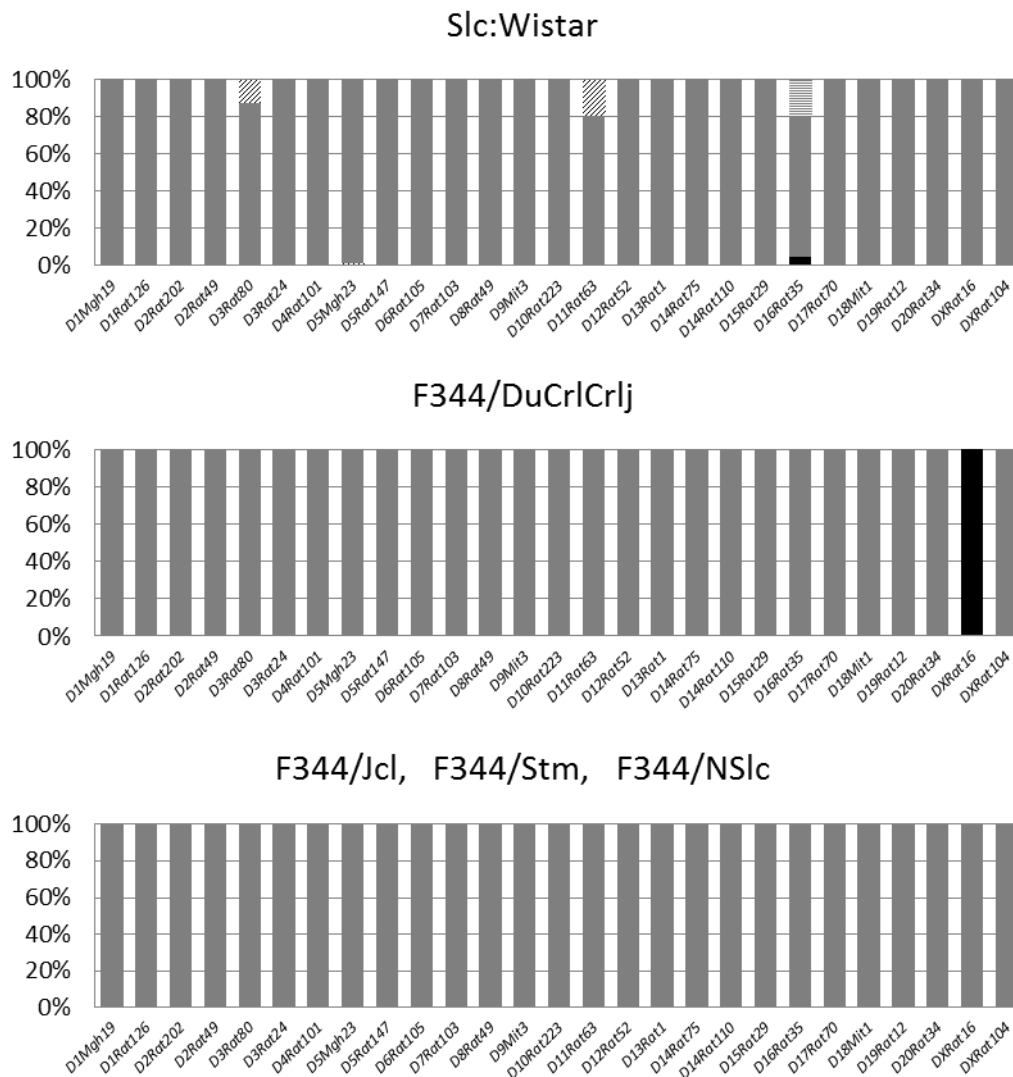


Fig. 4-2 Wistar クローズドコロニーラット集団と F344 近交系ラットの 27 の SSLP マーカーの各対立遺伝子の分布図（続き）

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灰色 ■ で表した。その他の対立遺伝子は、陰影 ■■ 、斜線 ■■■ 、タイル状 ■■■■ 、黒塗り ■■■■■ で表した。Slc:Wistar の単一对立遺伝子に固定化された遺伝子座は、全て F344 近交系ラットの対立遺伝子と一致していた。固定化されていない遺伝子座において最も割合の多い対立遺伝子は、F344 近交系の対立遺伝子と一致していた。

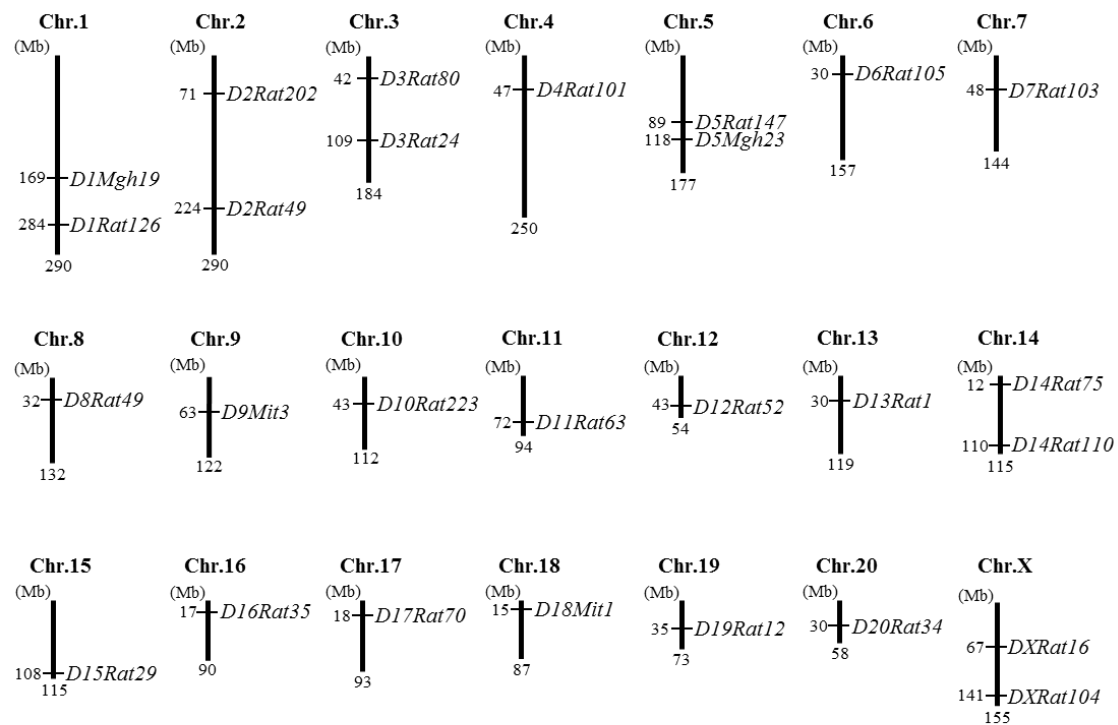


Fig. 5 27 の SSLP マーカーのラットゲノム上の位置

27 の SSLP マーカーを選択した。マーカーの物理的位置と染色体の大きさは、Rat genome assembly: Rnor_5.0.を参考にした。

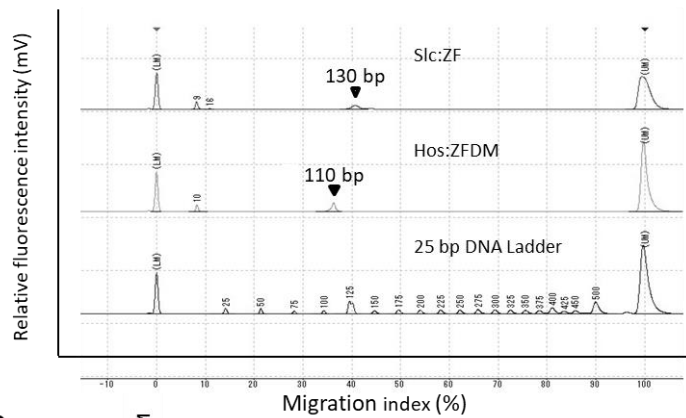
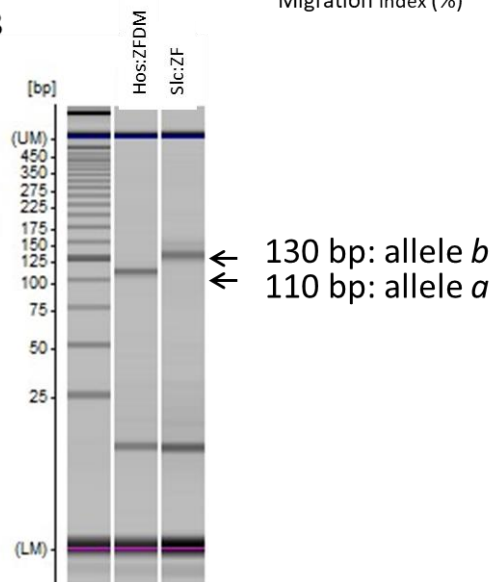
A**B**

Fig. 6 MultiNA マイクロチップ電気泳動システムを使ったジェノタイピング

A, PCR 産物の代表的な電気泳動による分離

代表的な SSLP マーカー (*D20Rat34*) の結果。電気泳動の結果は、25bp DNA ladder によるサイズ検量線と 2 つの標準マーカー (LM, lower maker; UM, upper marker) によって、電気泳動分離の補正が行われた。

B, 代表的な PCR 産物のゲルイメージ

代表的な SSLP マーカー (*D20Rat34*) の結果。この遺伝子座では、2 種類の違った PCR 産物を検出した。小さい断片 (110bp) と大きい断片 (130bp) をそれぞれ順に対立遺伝子 *a*、*b* とした。

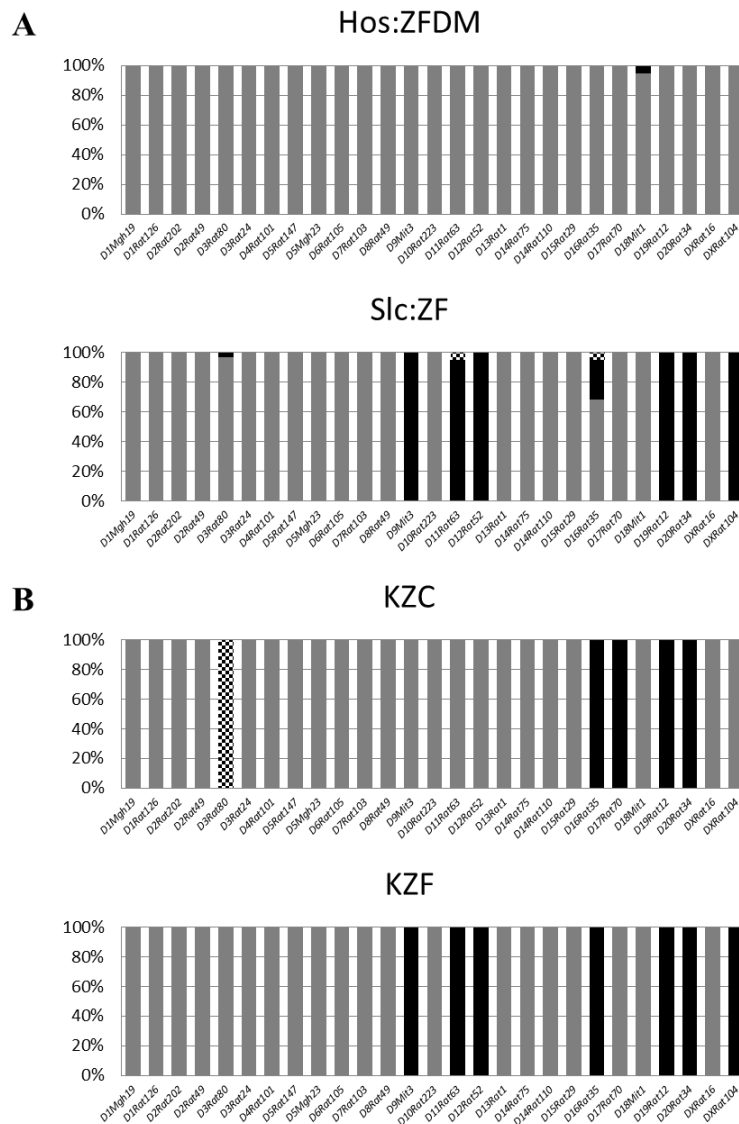


Fig. 7 起源を同じくする 2 つのクローズドラットコロニーと 2 つの近交系ラット系統の遺伝的プロファイル

A, Hos:ZFDM と Slc:ZF における 27 の SSLP マーカーの各対立遺伝子の分布図

各遺伝子座で Hos:ZFDM において主要な対立遺伝子を灰色 ■ で表した。他の対立遺伝子をタイル状 ■、黒塗り ■ で表した。

B, 近交系 KZF と KZC における 27 の SSLP マーカーの各対立遺伝子の分布図

各遺伝子座で Hos:ZFDM において主要な対立遺伝子と一致した対立遺伝子を灰色 ■ で表した。他の対立遺伝子をタイル状 ■、黒塗り ■ で表した。

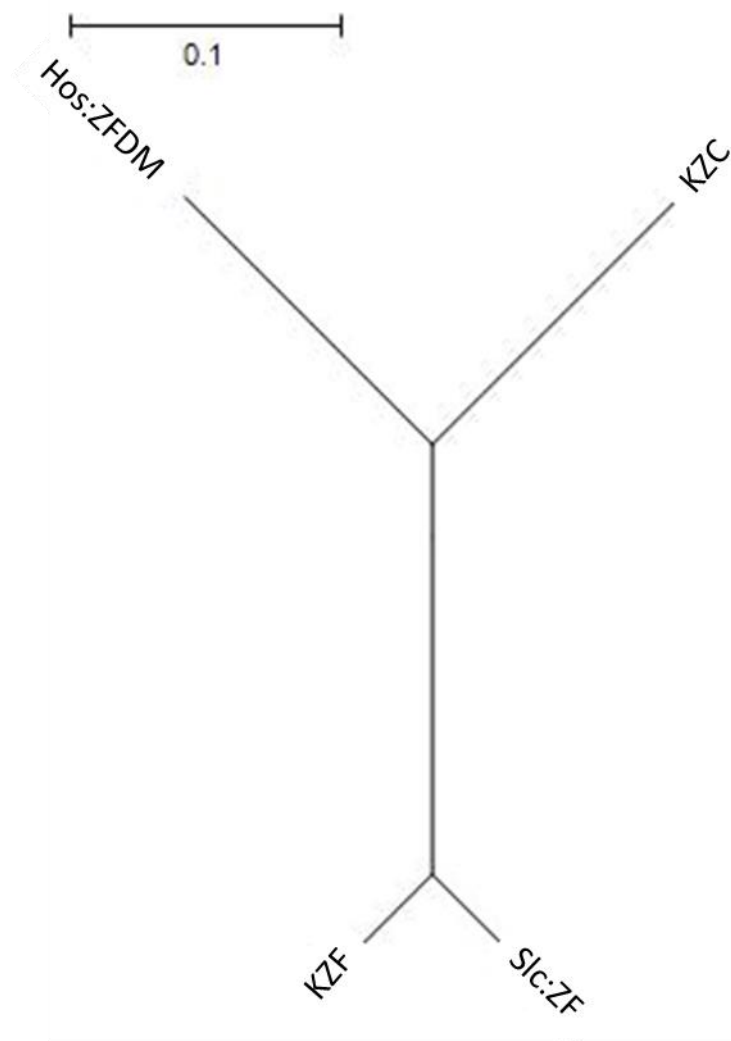


Fig. 8 起源を同じくする2つのクローズドラットコロニーと2つの近交系ラット系統の系統樹解析

GENETXY の解析ソフト UPGMA を用いて無根系統樹を描いた。

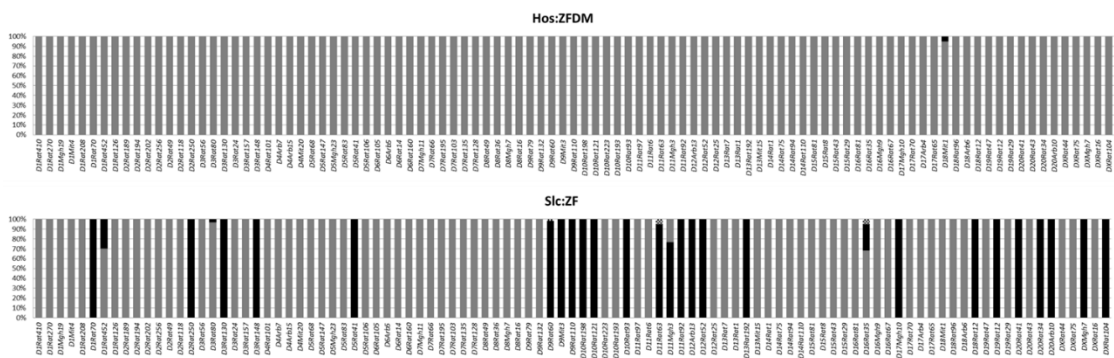


Fig. 9 99 個の SSLP マーカーを用いた Slc:ZF と Hos:ZFDM の詳細な遺伝的プロファイル解析

Hos:ZFDM と Slc:ZF における 99 の SSLP マーカーの各対立遺伝子の分布図。各遺伝子座で Hos:ZFDM において主要な対立遺伝子を灰色 ■ で表した。他の対立遺伝子をタイル状 ■■、黒塗り ■ で表した。

A



B

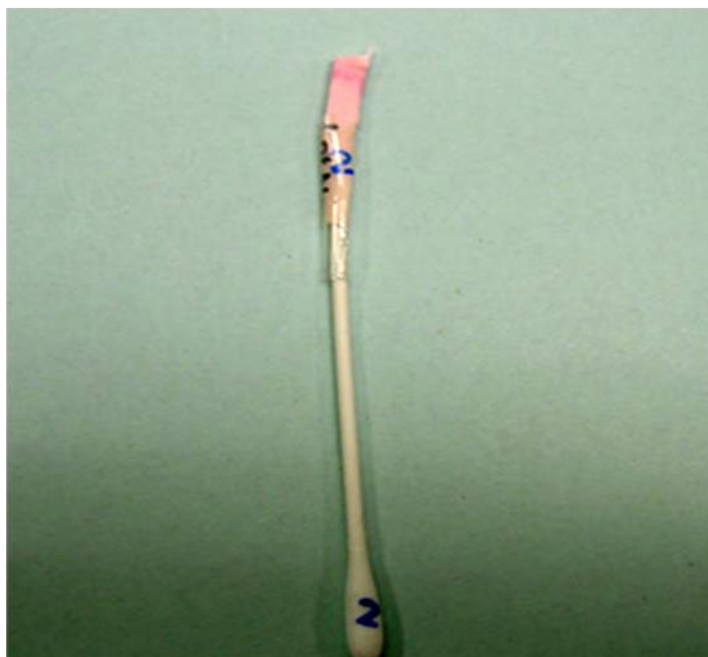


Fig. 10 唾液のサンプリング方法

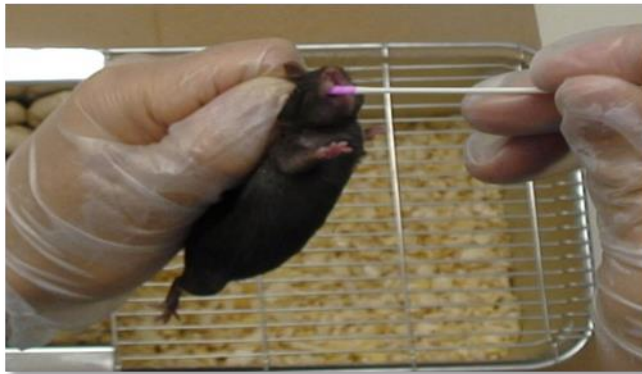
A, マウスの下顎骨の切歯の歯肉あたりに染み出ている唾液を唾液採取用具にて採取した。

B, 採取後の唾液採取用具。

A



B



C

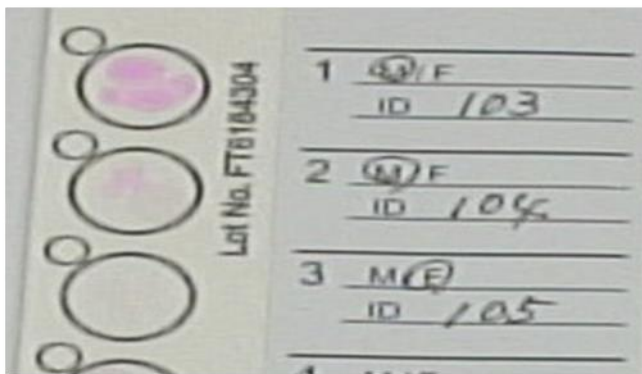


Fig. 11 口腔スワブのサンプリング方法

A, 綿棒（先端 2mm）を滅菌水で湿らせる。

B, 動物をしっかり保定する。 綿棒で頬内側を掻き取る。

C, FTA カードに塗布する。

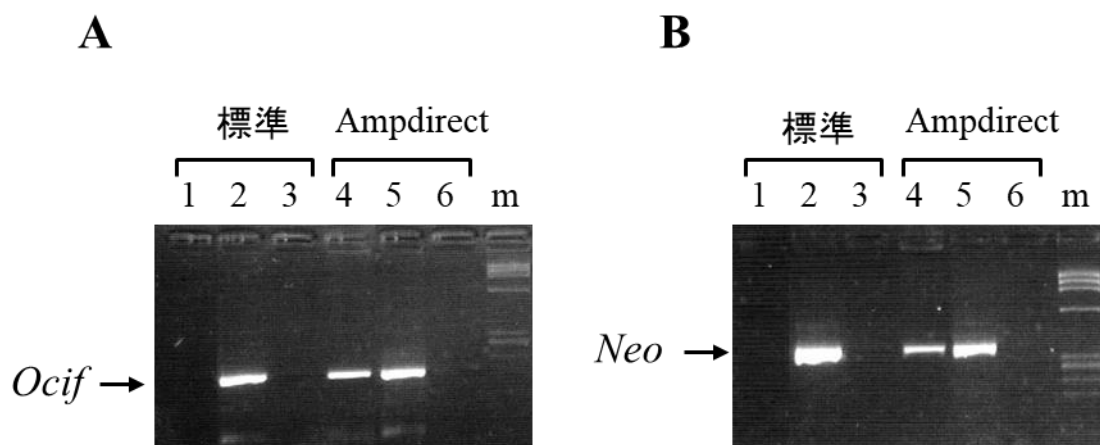


Fig. 12 FTA カードに採取した未精製血液を用いた PCR 産物泳動結果

Ocif 遺伝子 (A) と *Neo* 遺伝子 (B) それぞれヘテロ型 (+/-) の個体から血液を採取して FTA カードに塗布した後、血液部分をディスクとして打ち抜き未精製のまま PCR テンプレートとして使用した。PCR 試薬は、標準的な PCR 試薬と Ampdirect Plus を使用した。*Ocif* 遺伝子と *Neo* 遺伝子は Ampdirect Plus 試薬を使って別々に増幅反応を行った。レーン 1 と 4 : FTA カードに採取した未精製の血液、レーン 2 と 5 : マウスの尾からフェノール・クロロホルム法によって抽出したゲノム DNA (ポジティブコントロール)、レーン 3 と 6 : 水 (ネガティブコントロール) を使用した。m : サイズマーカー ϕ X174-*Hae* III digest。 *Ocif* 遺伝子ノックアウトマウス OCIF/Jcl は、日本クレア株式会社から購入した。

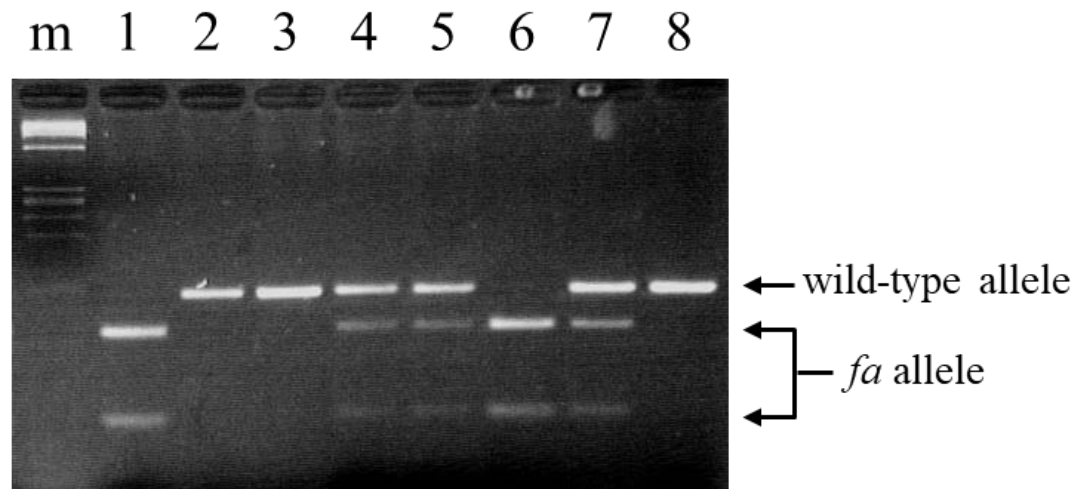


Fig. 13 Amp-FTA 法によるラットの fatty (fa) 変異の遺伝子型判定

レーン 1～5 は、KZ-*Lepr*^{fa}/Tky ラットの血液を FTA カードに採取し未精製のまま Ampdirect Plus を使用して PCR を行った。レーン 6～8 は、予め遺伝子型が明らかなゲノム DNA を使用した。PCR 後、変異部分を判断するため、制限酵素 *Msp*I を直接 PCR 産物に加えた。その後、37°C で 3 時間保温した。レーン 1：変異型ホモ型 (*fa/fa*)、レーン 2 と 3：野生型 (+/+), レーン 4 と 5：ヘテロ型 (*fa*/+), レーン 6：変異型ホモ型 (*fa/fa*)、レーン 7：ヘテロ型 (*fa*/+), レーン 8：野生型 (+/+). m：サイズマーカー ϕ X174-*Hae* III digest. KZ-*Lepr*^{fa}/Tky ラットは NBRP-Rat から提供を受けた。

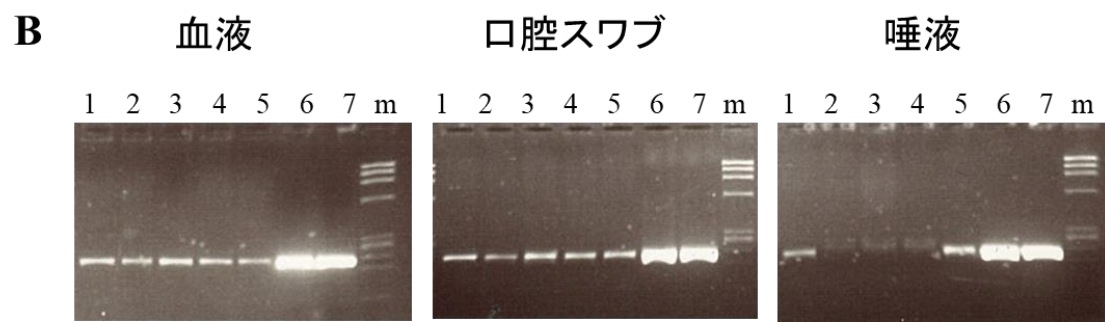
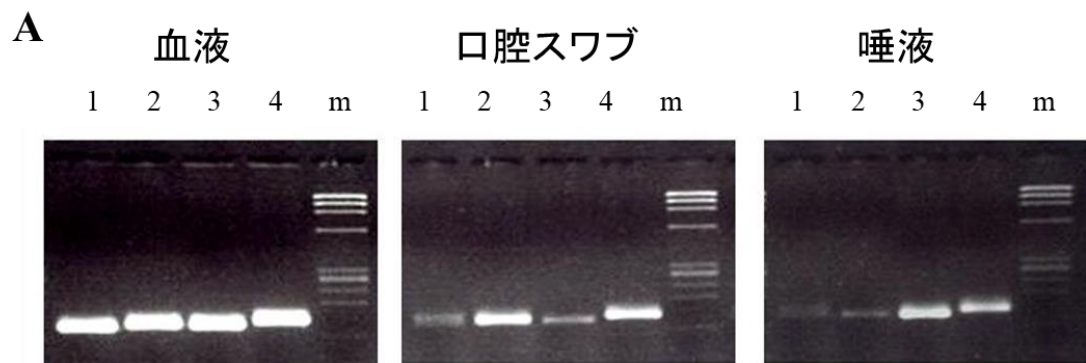


Fig. 14 血液、口腔スワブ、唾液をテンプレートにした PCR 産物泳動結果

A, SSLP マーカーを用いた近交系マウスのジェノタイピング。近交系マウスから血液、口腔スワブ、唾液を FTA カードに採取した。プライマーはマウスの SSLP マーカー *D7Nds5* を使用した。血液にくらべ口腔スワブ、唾液ともバンドの濃さは薄かった。レーン 1 : BALB/c、レーン 2 : C57BL/6、レーン 3 : C3H/He、レーン 4 : DBA/2、**m** : サイズマーカー ϕ X174-*Hae* III digest。

B, トランスジェニックマウスのジェノタイピング。レーン 1~5 : トランスジーンを持つマウスの血液、口腔スワブ、唾液を FTA カードに採取した。トランスジーンを検出するプライマーを使用した。唾液では、明瞭に判定できないバンドが見られた。レーン 6~7 : トランスジーンを持つマウスのゲノム DNA、**m** : サイズマーカー ϕ X174-*Hae* III digest。

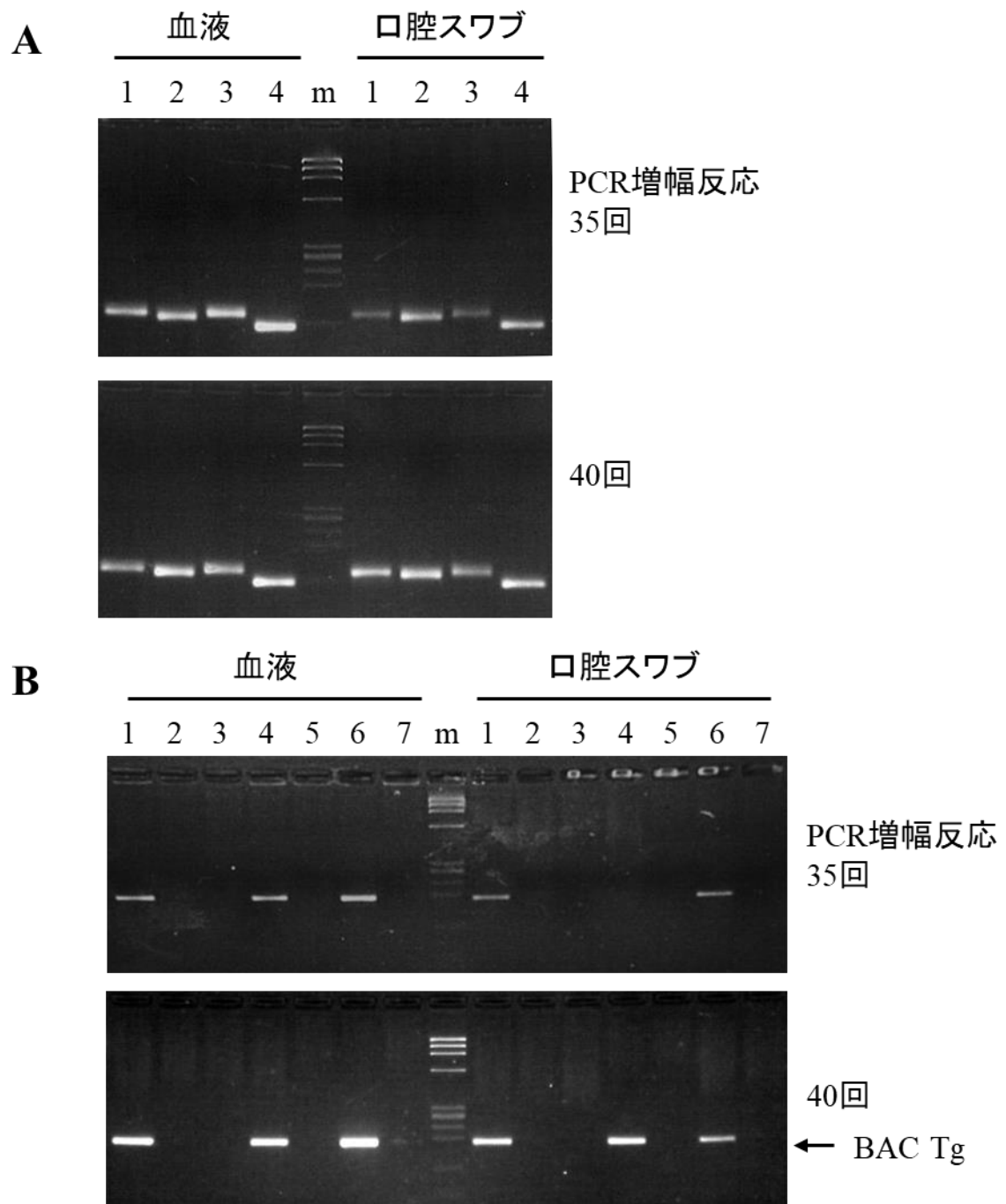


Fig. 15 口腔スワブを用いた Amp-FTA 法による PCR 産物泳動結果

A, SSLP マーカー (*D9Mit30*) による近交系マウスの遺伝子型判定。PCR サイクルを 40 回にすることで口腔スワブを用いた PCR 産物のバンドも明瞭となり血液を用いたものと同じバンドのパターンを確認できた。レーン 1 : BALB/cCrSlc、レーン 2 :

C57BL/6CrSlc、レーン 3:C3H/HeSlc、レーン 4:DBA/2CrSlc、m: サイズマーカーφX174-*Hae* III digest。すべてのマウス系統は、日本エスエルシー株式会社から購入した。

B, BAC 導入遺伝子のスクリーニング。 PCR サイクルを 40 回にすることで口腔スワブを用いた PCR 産物のバンドも明瞭となった。RPCI-23 BAC ベクターを導入したトランスジェニックマウスを使用した。レーン 1~5 : Tg ホモ型の雄と C57BL/6 の雌との交配で得られた産仔、レーン 6 : Tg ホモ型 (ポジティブコントロール)、レーン 7 : C57BL/6 (ネガティブコントロール)。

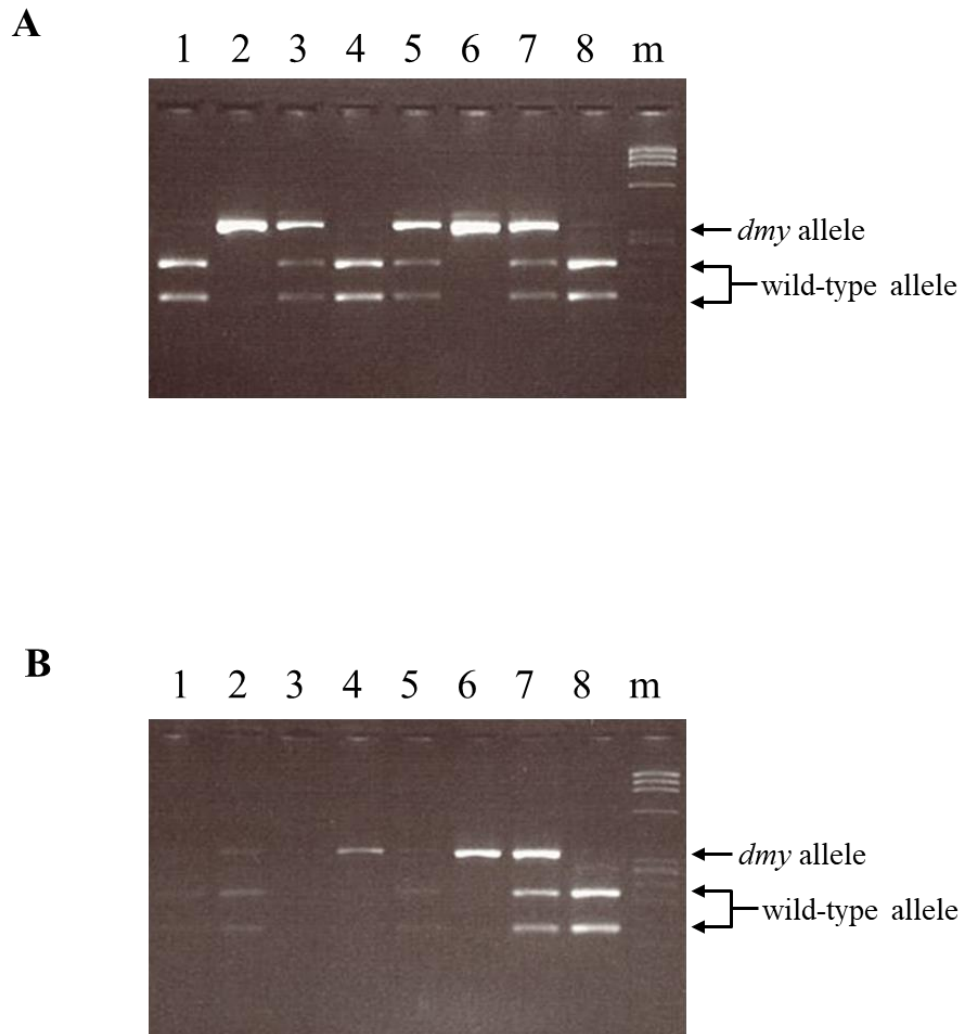


Fig. 16 室温で長期保存した血液を用いた **DMY/Kyo** ラットの *Mrs2^{dmy}* 遺伝子変異の遺伝子型判定

A, 2004 年 12 月から 2015 年 3 月まで室温で保管した FTA カードに採取した血液。*Mrs2^{dmy}* のミュータントホモ型、ヘテロ型、野生型のそれぞれのアレルを明瞭に判定することができた。

m : サイズマーカー ϕ X174-*Hae* III digest。

B, 2005 年 6 月から 2015 年 3 月まで室温で保管した濾紙に採取した血液。*Mrs2^{dmy}* の遺伝子型を明瞭に判定することができなかった。

m : サイズマーカー ϕ X174-*Hae* III digest。

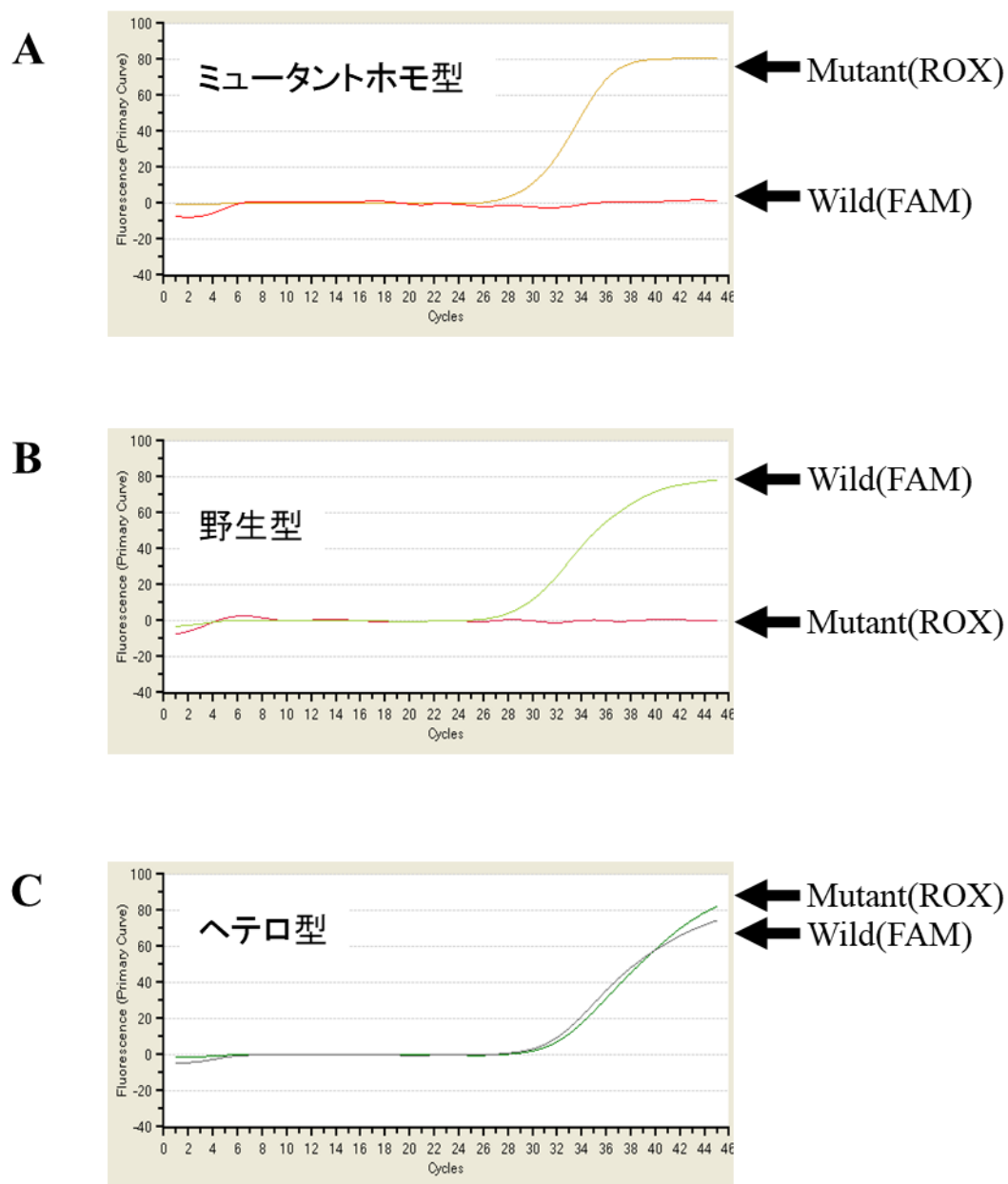


Fig. 17 Amp-FTA 法と CycleavePCR による KAD/Kyo ラットの *Apc* 遺伝子変異の遺伝子型判定

ミュータント型 (A)、野生型 (B)、ヘテロ型 (C) の個体から採取した血液を採取した未精製 FTA カードをテンプレートに用いて qPCR を行った。上段では、ミュータントプローブに由来する ROX の蛍光のみ検出できた。中段では、野生型プローブに由来する FAM の蛍光のみが検出できた。下段では、ROX と FAM の両方を検出できた。何れの遺伝子型もダイレクトシーケンスの結果と一致した結果を得ることができた。

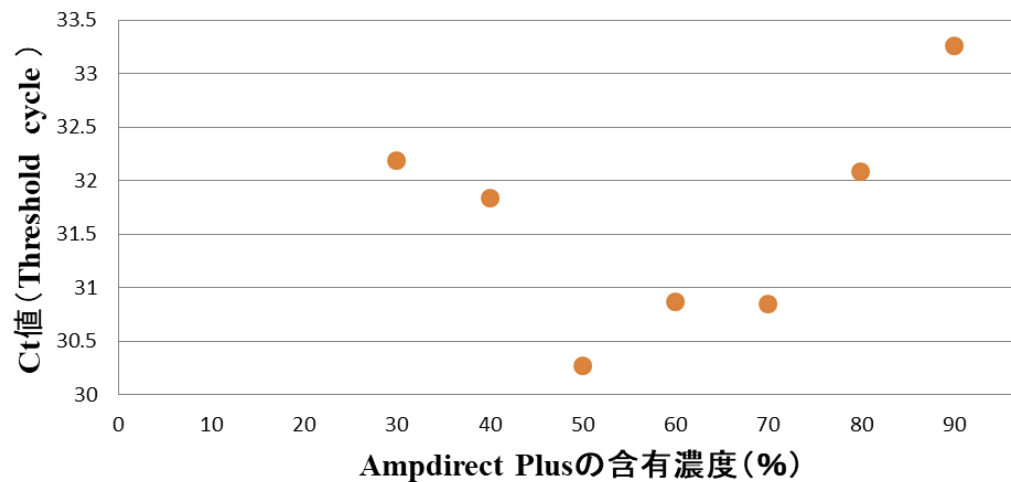


Fig. 18 Ampdirect Plus の含有量の違いによる Ct 値平均値の比較

CycleavePCR Core Kit の PCR 緩衝液に、Ampdirect Plus を 0～90%の範囲で 10%ずつ増量して調製をおこない、PCR 増幅産物がある一定量に達したとき、蛍光を検出できる閾値と増幅曲線が交わる点：Ct 値 (Threshold Cycle) の平均値 (n=3) を比較した。0%～20%含む PCR 反応液を用いた場合、PCR の増幅が見られず、それぞれのプローブの蛍光を検出することができなかった。30%～90%含む PCR 反応液を用いた場合、それぞれのプローブの蛍光が良好に検出できた。

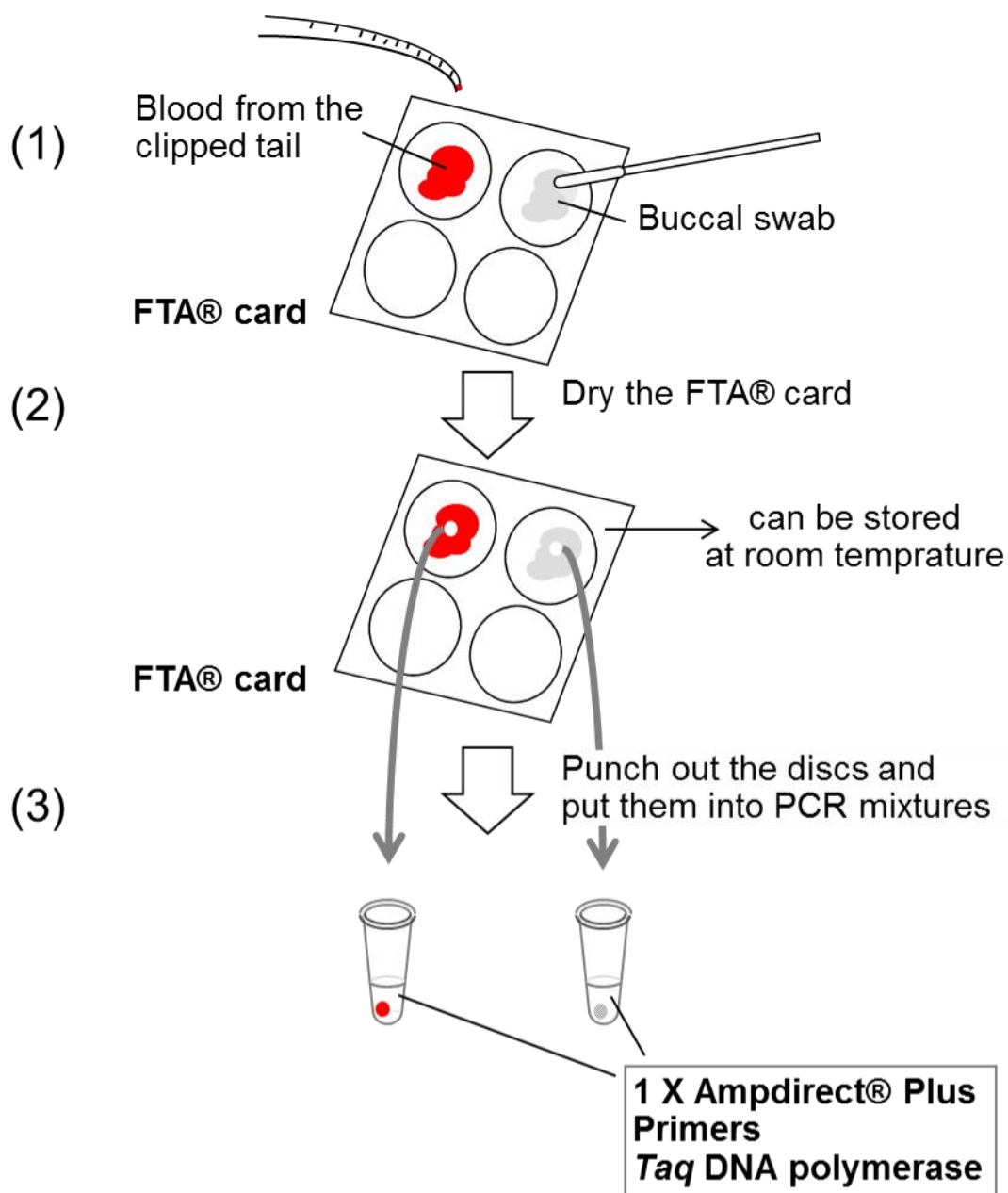


Fig. 19 Amp-FTA 法の概略図

(1) 尾の先端からごく少量の血液を FTA カード上に塗布する。または、口腔スワブを FTA カード上に塗りつける。(2) FTA カードを乾燥させる。DNA は FTA カード上に固定化され室温で少なくとも 17 年間は室温で保存できる。(3) 打ち抜いたディスクを直接 PCR 試薬に入れる。

Summary

The laboratory rat (*Rattus norvegicus*) is an indispensable tool for developing experimental medicines and drugs. The rat plays an important role as laboratory animal in various research fields, such as physiology, pharmacology, neurosciences, genetics, and medical sciences. It is used extensively as a model organism for studying normal and disease processes in humans. This is primarily due to our extensive knowledge of rat physiology and more than 300 rat models that mimic human diseases. Rats are key tools for drug efficacy and toxicity prior to performing human clinical trials. It is essential to establish a genetic control system, which enables fast and reliable genotyping methods to ensure good colony management. Additionally, it is important to know the genetic characteristics of the rats to use in experimental studies so that the most suitable rats for particular experimental purpose can be selected. The aim of this study was to clarify the genetic characteristics of the Slc:Wistar outbred rats and the Zucker fatty-derived outbred rats and to develop a simple genotyping method for the genetic quality control.

Chapter 1

Although Slc:Wistar rats are widely used in biomedical research as outbred rats, close similarities in growth curve, survival rate, immunological, and biochemical phenotypes between the Slc:Wistar rats and F344 inbred rats have been reported. In addition, we previously found that the nine genetic variations were fixed in the Slc:Wistar rats and genotypes of them were identical with those of F344 rats. In this study, we examined the genetic characteristics of the Slc:Wistar rats with 27 SSLP markers and compared it with those of Wistar stocks available in Japan or F344 strains. Among 27 SSLP loci, twenty-three (85%) were fixed in the Slc:Wistar rats, which was the highest among other Wistar stocks. The fixed 23 loci showed identical

genotypes with those of F344 rats. Even in the unfixed loci, the predominant allele types, of which allele frequencies reached about 80 %, were identical with those of F344 rats. By adding the nine genetic variations examined previously, a total of 32 (89%) out of 36 loci were fixed and identical between the Slc:Wistar and F344 rats. These findings indicated the low genetic variation of the Slc:Wistar rats and the high genetic similarity between the Slc:Wistar and F344 inbred rats. Probably, the seed stock might have very similar genetic background with F344 rats and has been transferred as Wistar outbred rats. This study demonstrates the importance of the characterization of outbred rats and makes us pay ample attention to the genetic characteristics of the Slc:Wistar rats for the proper use of them.

Chapter 2

The Zucker fatty (ZF) rat is an outbred rat and a well-known model of obesity without diabetes, harboring a missense mutation (fatty, abbreviated as *fa*) in the leptin receptor gene (*Lepr*). Slc:Zucker (Slc:ZF) outbred rats exhibit obesity while Hos:ZFDM-*Lepr*^{*fa*} (Hos:ZFDM) outbred rats exhibit obesity and type 2 diabetes. Both outbred rats have been derived from an outbred ZF rat colony maintained at the Tokyo Medical University. So far, genetic profiles of these outbred rats remain unknown. Here, we applied a simple genotyping method using Ampdirect reagents and FTA cards (Amp-FTA) in combination with simple sequence length polymorphisms (SSLP) markers to determine genetic profiles of Slc:ZF and Hos:ZFDM rats. Among 27 SSLP marker loci, 24 loci (89%) were fixed for specific alleles at each locus in Slc:ZF rats and 26 loci (96%) were fixed in Hos:ZFDM rats, respectively. This indicates the low genetic heterogeneity in both colonies of outbred rats. Nine loci (33 %) showed different alleles between the two outbred rats, suggesting considerably different genetic profiles between the two outbred rats in spite of their same origin. Additional analysis using 72 SSLP markers further supported these results and

clarified the profiles in detail. This study revealed that genetic profiles of the Slc:ZF and Hos:ZFDM outbred rats are different for about 30% of the SSLP marker loci, which is the underlying basis for the phenotypic difference between the two outbred rats.

Chapter 3

To develop a simple genotyping method, the Amp-FTA method has been developed by combining the advantages of the Ampdirect Plus and FTA card. This method allowed the direct PCR amplification of DNA from unpurified blood immobilized on the FTA card. PCR templates were prepared only by punching out the disc from the FTA card, which lead to a foolproof way of genotyping. The PCR products obtained were subjected to downstream analyses such as restriction enzyme treatment and direct sequencing. The Amp-FTA method was applicable to buccal swabs collected by simple technique minimizing distress to animals. Therefore, the Amp-FTA method is ideal for the genotyping and genetic monitoring of laboratory rats.

This study clarified genetic characteristics of the Slc:Wistar outbred rats and the Zucker fatty-derived outbred rats and further developed a simple genotyping method for genetic monitoring of the rat. In conclusion, this study demonstrated the importance of paying ample attention to genetic characteristics of rats for their proper use.