

**Fig. 6.** Immunohistochemical detection of keratinocyte markers on skin of 18.5 dpc embryos. (A) Periderm of normal embryos stained for K6. (B) Periderm of *fsn<sup>Jic</sup>* homozygous embryos stained for K6. (C) Non-cornified epidermis and stratum spinosum of normal embryos stained for K1. (D) Non-cornified epidermis and stratum spinosum of *fsn<sup>Jic</sup>* homozygous embryos stained for K1. (E) Epidermis and stratum basale of normal embryo stained for K14. (F) Epidermis and stratum basale of *fsn<sup>Jic</sup>* homozygous embryo stained for K14.

ties as seen in Fig. 4.

Expressions of *Hbb-bhl* (hemoglobin Z, beta-like embryonic chain) and *Hbb-b1* (hemoglobin, beta adult major chain) genes were studied using RNA extracted from livers of 14.5 dpc embryos in order to observe maturity of erythrocytes [8] in *fsn<sup>Jic</sup>* homozygous embryos. Both genes were expressed in livers of normal and *fsn<sup>Jic</sup>* homozygous embryos (data not shown). It was demonstrated in this study that erythrocytes of *fsn<sup>Jic</sup>* homozygous embryos matured with incomplete enucleation. It is evident that RBC of *fsn<sup>Jic</sup>* homozygotes may fail to enucleate after switching from primitive hematopoiesis to definitive hematopoiesis, but the mechanisms of enucleation are still not well understood. Kawane *et al.* [7] reported that definitive erythropoiesis requires DNase II secreted from macrophages at the site of definitive erythropoiesis in the mouse fetal liver.

Although the relation between DNase II and *fsn* genes is not known, the *fsn* mutation may be useful in studies of the mechanism of enucleation in RBC.

Transplantation of bone marrow cells obtained from adult *fsn* homozygotes to normal recipient mice resulted in skin lesions and abnormal blood cells. Abnormal phenotypes in skin of *fsn* homozygotes at the postnatal stage have been explained by immunological defects [12, 18]. These results suggest that pleiotropisms observed in *fsn* homozygotes are caused by functional defects of hematopoietic progenitor cells [14, 17]. However, in this study we observed time differences in the appearance of abnormal phenotypes of blood and skin of *fsn<sup>Jic</sup>* homozygous embryos, therefore, it is possible that abnormal phenotypes observed in various tissues and organs of *fsn* homozygotes are caused by *fsn* gene dysfunction occurring not only in hematopoietic progenitor cells but also in various tissues and organs at different developmental stages.

White *et al.* [17] reported that the hereditary erythroblastic anemia (*hea*) mutation is an allele of the *fsn* locus. The *hea* mutation arose spontaneously in the CFO strain at the Central Institute for Experimental Animals (Kawasaki, Japan) [13]. Three *fsn* mutations, *fsn*, *fsn<sup>Jic</sup>* and *hea*, which were independently discovered, should be useful for etiological studies of anemia and skin disorders.

#### Acknowledgments

The authors wish to thank Drs. Satoshi Baba and Yasuhisa Naito (Hamamatsu University School of Medicine) for helpful discussions during the course of this work.

#### References

1. Beamer, W.G., Maltais, L., and Bernestein, S. 1986. Disturbed iron metabolism in flaky skin (*fsn*) mutant mice. *The Jackson Lab. Ann. Report* 1986; 92.
2. Beamer, W.G., Pelsue, S.C., Shultz, L.D., Sundberg, J.P., and Barker, J.E. 1995. The flaky skin (*fsn*) mutation in mice: map location and description of the anemia. *Blood* 86: 3220-3226.
3. Endo, F., Katoh, H., Yamamoto, S., and Matsuda, I. 1991. A murine model for type III tyrosinemia: lack of immunologically detectable 4-hydroxyphenylpyruvic acid dioxygenase enzyme protein in a novel mouse strain with hypertyrosinemia. *Am. J. Hum. Genet.* 48: 704-709.

4. Endo, F., Awata, H., Katoh, H., and Matsuda, I. 1995. A nonsense mutation in the 4-hydroxyphenylpyruvic acid dioxygenase gene (*Hpd*) causes skipping of the constitutive exon and hypertyrosinemia in mouse strain III. *Genomics* 25: 164–169.
5. Katoh, H. 1989. Animal models derived from the ICR for human disease (in Japanese). *Medical Immunology* 17: 353–361.
6. Katoh, H., Endo, F., Suzuki, K., and Matsuda, I. 1991. Hereditary hypertyrosinemia mouse. *Mouse Genome* 89: 572.
7. Kawane, K., Fukuyama, H., Kondoh, G., Takeda, J., Ohsawa, Y., Uchiyama, Y., and Nagata, S. 2001. Requirement of DNase II for definitive erythropoiesis in the mouse fetal liver. *Science* 292: 1546–1549.
8. Keller, G., Kennedy, M., Papayannopoulou, T., and Wiles, M.V. 1993. Hematopoietic commitment during embryonic stem cell differentiation in culture. *Mol. Cell Biol.* 13: 473–486.
9. Makino, S., Kunimoto, K., Muraoka, Y., Mizushima, Y., Katagiri, K., and Tochino, Y. 1980. Breeding of a non-obese, diabetic strain of mice. *Jikken Dobutsu*. 29: 1–13.
10. Mazzalupo, S. and Coulombe, P.A. 2001. A reporter transgene based on a human keratin 6 gene promoter is specifically expressed in the periderm of mouse embryos. *Mech. Dev.* 100: 65–69.
11. Pelsue, S.C., Schweitzer, P.A., Beamer, W.G., and Shultz, L.D. 1995. Mapping of the flaky skin (*fsn*) mutation on distal mouse chromosome 17. *Mamm. Genome* 6: 758.
12. Pelsue, S.C., Schweitzer, P.A., Schweitzer, I.B., Christianson, S.W., Gott, B., Sundberg, J.P., Beamer, W.G., and Shultz, L.D. 1998. Lymphadenopathy, elevated serum IgE levels, autoimmunity, and mast cell accumulation in flaky skin mutant mice. *Eur. J. Immunol.* 28: 1379–1388.
13. Shimizu, K., Keino, H., Ogasawara, N., and Esaki, K. 1983. Hereditary erythroblastic anaemia in the laboratory mouse. *Lab. Anim.* 17: 198–202.
14. Sundberg, J.P., Boggess, D., Sundberg, B.A., Beamer, W.G., and Shultz, L.D. 1993. Epidermal dendritic cell populations in the flaky skin mutant mouse. *Immunol. Invest.* 22: 389–401.
15. Sundberg, J.P., Boggess, D., Shultz, L., and Beamer, W.G. 1994. The flaky skin (*fsn*) mutation. pp. 253–268. In: (Sundberg J eds) *Handbook of Mouse Mutations with Skin and Hair Abnormalities*. Ann Arbor, MI, CRC Press,
16. Takabayashi, S., Sasaoka, Y., Yamashita, M., Tokumoto, T., Ishikawa, K., and Noguchi, M. 2001. Novel growth factor supporting survival of murine primordial germ cells: evidence from conditioned medium of *ter* fetal gonadal somatic cells. *Mol. Reprod. Dev.* 60: 384–396.
17. White, R.A., McNulty, S.G., Roman, S., Garg, U., Wirtz, E., Kohlbrecher, D., Nsumu, N.N., Pinson, D., Gaedigk, R., Blackmore, K., Copple, A., Rasul, S., Watanabe, M., and Shimizu, K. 2004. Chromosomal localization, hematological characterization, and iron metabolism of the hereditary erythroblastic anemia (*hea*) mutant mouse. *Blood* 104: 1511–1518.
18. Withington, S., Maltby-Askari, E., Welner, R., Parker, R., and Pelsue, S.C. 2002. Antinuclear autoantibodies in flaky skin (*fsn*) mutant mice. *Autoimmunity* 35: 175–181.

—Note—

## Microsatellite Genotyping for Genetic Quality Testing Using Sperm Cells in the Mouse

Hideki KATOH, Sayaka YOSHINO, Yumiko INUI,  
Sayaka HONDA, and Shuji TAKABAYASHI

*Institute for Experimental Animals, Hamamatsu University School of Medicine 1–20–1  
Handayama, Hamamatsu, Shizuoka 431-3192, Japan*

**Abstract:** We attempted to determine the number of sperm cells required for genotyping of one microsatellite marker. The crude genomic DNA extracted from about 760 or more sperm cells gave sufficient quantity of PCR product using a 20  $\mu$ l-scale PCR. We also studied the effects of non-ionic detergents on extraction of crude sperm genomic DNA. PCR products amplified with the crude sperm genomic DNA extracted using the lysis buffer supplemented with non-ionic detergents showed much clear bands. In conclusion, our results suggest that a small part of the frozen sperm, which is less than 1/10 of the original volume (10  $\mu$ l), provides sufficient quantity of template DNA for genetic quality testing.

**Key words:** genetic quality testing, non-ionic detergents, sperm genomic DNA

Genetic resource banks of the mouse have recently been established worldwide and seven facilities are members of the International Mouse Strain Resources (IMSR, <http://www.informatics.jax.org/imsr/index.jsp>) at the beginning of 2005. Their role is important in terms of preserving valuable genetic resources such as spontaneous mutations, chemically induced mutations and genetically engineered mutations. Whittingham mentioned the importance of the role of embryo banks 30 years ago [23]. Since 1972, cryopreservation has been mainly performed with 2-cell and 8-cell embryos in the mouse [7, 13, 22, 24]. Recently, advanced techniques for cryopreservation of mouse embryos [2, 16] and mouse sperm [8–10, 17, 19] have been developed. They have been applied to preserve not only inbred strains but also genetically engineered mice [11, 15]

and wild mice [12]. There are several processes in cryopreservation: collection of materials (sperm and embryos), preservation of the materials in reservoirs (straws for sperm and cryotubes for embryos), and recovery of the preserved materials to produce live animals. In each process, there is the possibility of mistaking or mishandling of the reservoir itself, the reservoir label and mouse individuals. These would cause genetic contaminations of mouse strains. Genetic quality testing should be implemented in order to assure genetic quality of sperm and embryos preserved in each resource bank. We reported genetic quality testing systems for rat cultured cells preserved in the Japanese Cell Research Bank (BCRB) [3] and early stage embryos of the mouse [4]. Recently, we attempted to establish a genetic quality testing system for sperm

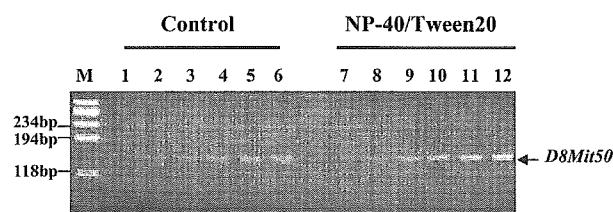
---

(Received 18 March 2005 / Accepted 17 May 2005)

Address corresponding: H. Katoh, Institute for Experimental Animals, Hamamatsu University School of Medicine, 1–20–1 Handayama, Hamamatsu, Shizuoka 431-3192, Japan

cells of the mouse. In this paper, we describe the result of preparation of crude genomic DNA from a small number of sperm cells and that of microsatellite genotyping using crude genomic DNA as template DNA in PCR.

Two epididymides of a Jcl:ICR male mouse (CLEA Japan, Tokyo, Japan) were collected in 100  $\mu$ l of the R18S3 medium [20] and were prepared in a culture plate (NUNCLON™, NUNC™, Denmark). They were gently homogenized with forceps and the sperm cells were suspended in the medium with tapping. Ten microliters of the sperm cell suspension was plugged in a plastic straw. Six straws from one male mouse were prepared and preserved in liquid nitrogen. After thawing, the sperm cell suspension was diluted in TYH medium [21], then the number of sperm cells was counted using a hemacytometer. Six different numbers of sperm cells were prepared as follows: a)  $9.5 \times 10^2$ , b)  $1.9 \times 10^3$ , c)  $3.8 \times 10^3$ , d)  $7.6 \times 10^3$ , e)  $1.52 \times 10^4$  and f)  $3.04 \times 10^4$ . The number of sperm cells was determined based on the quantity (>10 ng) of template DNA used in a 20  $\mu$ l-scale PCR and the quantity (3 pg) of genomic DNA of one sperm cell (Fuji film, [http://www.fujifilm.co.jp/bio/nai\\_appli/pdf/guide\\_05j.pdf](http://www.fujifilm.co.jp/bio/nai_appli/pdf/guide_05j.pdf); ISOGEN, <http://www.nippongene.jp/pages/products/extraction/isogen/gen07.html>). The tubes containing the counted sperm cells prepared as described above were centrifuged at 15,000 rpm for 10 min to remove the medium. Ten microliters of the lysis buffer (1  $\times$  PCR reaction buffer containing proteinase K (PK) (Roche, Germany) at a concentration of 0.4  $\mu$ g/ $\mu$ l) were added to the sperm cells. Simultaneously, 10  $\mu$ l of the lysis buffer supplemented with 0.1% (W/V) gelatin (type B) (Sigma, St. Louis, MO, USA), 0.45% (V/V) Nonidet® P-40 (NP-40) (NACALAI, Kyoto, Japan) and 0.45% (V/V) Tween 20 (Sigma, SL, USA) were added to the same numbers of the sperm cells prepared in other tubes in order to study the effect of non-ionic detergents on extraction of crude sperm genomic DNA [5, 18]. The tubes containing the sperm cells were incubated at 55°C for one hour with shaking, and then inactivation of PK was performed at 95°C for 10 min. Five microsatellite markers, *D3Mit54*, *D5Mit18*, *D6Mit15*, *D7Mit77* and *D8Mit50*, were used for microsatellite genotyping. Their primers were purchased from Invitrogen (CA, USA). A 20  $\mu$ l-scale PCR containing 1  $\mu$ l of the crude genomic DNA extracted as described above was per-

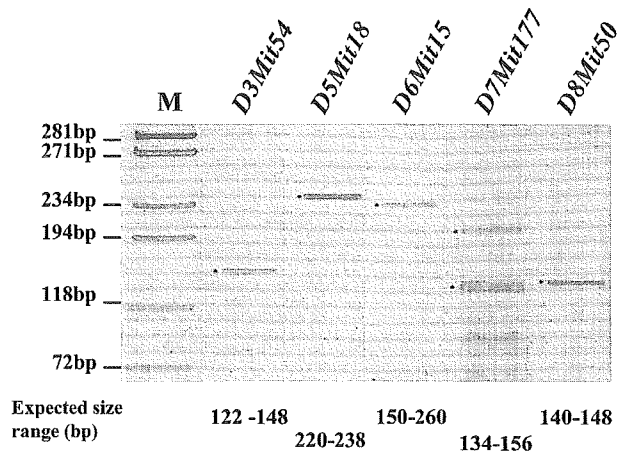


**Fig. 1.** Effects of the non-ionic detergents, NP-40 and Tween 20, on extraction of crude genomic DNA from mouse sperm cells. No. sperm cells were 95 (lanes 1 and 7), 190 (lanes 2 and 8), 380 (lanes 3 and 9), 760 (lanes 4 and 10), 1,520 (lanes 5 and 11), and 3,040 (lanes 6 and 12). The PCR products were electrophoresed on the same gel. M: DNA size marker ( $\phi$ X174 *Hae*III digest).

formed using a thermal cycler (Zymoreactor II, ATTO, Tokyo, Japan) as described elsewhere [4]. Ten microliters of the PCR product amplified using the crude genomic DNA from about 2,000 sperm cells were electrophoresed using a 3% agarose gel containing SYBR® gold (Eugene, OR, USA) and the results were photographed under a transilluminator (FAS-3, TOYOBO, Osaka, Japan). Five microliters of the PCR products were electrophoresed using a 15% polyacrylamide gel using an electrophoresis apparatus (ATTO, Tokyo, Japan) [14] and then the gel was stained using the silver staining method [1].

We attempted to determine the number of sperm cells required for microsatellite genotyping using crude sperm genomic DNA. Figure 1 (left) shows PCR products of the *D8Mit50* marker amplified using 1  $\mu$ l of the crude genomic DNA from the different number of sperm cells treated with 10  $\mu$ l of the lysis buffer (1  $\times$  PCR reaction buffer supplemented with PK). As the number of sperm cells increased, the density of the PCR product became higher. The minimum number of sperm cells required to detect one microsatellite marker was estimated to be 760 (=  $7,600 \times 1/10$ ) as observed in lane 4. It is said that the quantity of template DNA in the 20  $\mu$ l-scale PCR is 10 ng or more. Assuming that the quantity of genomic DNA of one sperm cell is 3 pg, then 10 ng are equivalent to about 3,300 sperm cells. As shown in Fig. 1 (lanes 4–6), the PCR product of one microsatellite marker was detected using 760 or more sperm cells.

We studied the effects of two non-ionic detergents, NP-40 and Tween 20, on extraction of crude sperm genomic DNA. As shown in Fig. 1 (right), PCR products (lanes 9–12) amplified using the crude genomic



**Fig. 2.** Results of genotyping of five microsatellite markers performed using the crude sperm genomic DNA treated with the non-ionic detergents. PCR products electrophoresed on a polyacrylamide gel were stained by the silver staining method. M: DNA size marker ( $\phi$ X174 *Hae*III digest).

DNA extracted by treatment with the lysis buffer supplemented with two non-ionic detergents were much clearer than those (lanes 1–6) amplified using extractions by treatment with only the lysis buffer. These results indicate that non-ionic detergents are effective for extraction of crude sperm genomic DNA. The genotyping method used in this study is simple, and it may be unsatisfactory because of the small quantity of PCR product compared with the PCR product amplified using genomic DNA from liver cells. Lawyer *et al.* reported that the non-ionic detergents, NP-40 and Tween 20, are effective for extraction of crude genomic DNA [5]. We confirmed their effectiveness as shown in Fig. 1 (right). In addition, we showed that silver staining is effective for detecting small quantities of PCR product. In the case of small quantities of template DNA or a small number of sperm cells, the nested PCR may be useful [3, 6].

We performed genotyping of five microsatellite markers using the crude sperm genomic DNA extracted by treatment with lysis buffer supplemented with two non-ionic detergents. The half volumes of the PCR product used for the SYBR<sup>®</sup> gold staining were electrophoresed and stained by the silver staining method. As shown in Fig. 2, the PCR products of the five microsatellite markers were clearly detected and each PCR product was observed in the range of the expected size, except a 200-bp product of *D7Mit77* which may be a new allele

existing in the ICR colony.

In conclusion, microsatellite genotyping using the crude sperm genomic DNA was successfully performed. The volume of sperm suspension plugged in a plastic straw is small (10  $\mu$ l). However, a considerable number of sperm cells (estimated to be about  $10^5/\mu$ l) are contained in the sperm suspension. Since it is desirable that genetic quality testing is performed using the sperm used for *in vitro* fertilization, it is strongly recommended that the sperm cells remaining after *in vitro* fertilization are used for microsatellite genotyping. Accuracy and effectiveness of genotyping is important for genetic monitoring as a genetic quality test. In the present study, we selected five microsatellite markers that were the same markers as those used for microsatellite genotyping of early stage embryos. As mentioned in a previous paper, it is the reason that they are effective in differentiating 15 common inbred strains of the mouse and compose a critical subset [4]. Mouse strains have been maintained as live animals so far. However, when the cryopreservation and *in vitro* fertilization techniques have been developed, strain maintenance and shipment will be performed by embryos and sperm of the mouse. Therefore, it will be necessary to perform genetic quality testing not only for individual mice but also for embryos and sperm. Finally, we have demonstrated that the microsatellite genotyping method described in the present paper provides a powerful tool for genetic monitoring of sperm cells in mouse genetic resource banks.

#### Acknowledgments

This study was supported by a grant-in-aid for scientific research on priority areas from the Ministry of Education, Culture, Sports, Science and Technology of Japan and a grant from the Ministry of Health, Labour and Welfare of Japan.

#### References

1. Goldman, D., Sedman, S.A., and Ebert, M.H. 1981. *Science* 211: 1437–1438.
2. Kasai, M., Komi, J.H., Takakamo, A., Tsuderu, H., and Machida, T. 1990. *J Reprod. Fertil.* 89: 91–97.
3. Katoh, H., Muguruma, K., Watanabe, Y., Ishikawa, S., Ebukuro, M., Nomura, T., Nakagawa, Y., and Tanaka, N. 1997. *Transplant. P.* 29: 1709–1712.

4. Katoh, H., Oda, K., Hioki, K., and Muguruma, K. 2003. *Exp. Anim.* 52: 397–400.
5. Lawyer, F.C., Stoffel, S., Saiki, R.K., Myambo, K., Drummond, R., and Gelfand, D.H. 1989. *J. Biol. Chem.* 264: 6427–6437.
6. Naito, E., Dewa, K., Yamanouchi, H., and Kominami, R. 1992. *J. Forensic Sci.* 37: 396–403.
7. Nakagata, N. 1989. *J. Reprod. Fert.* 87: 479–483.
8. Nakagata, N. and Takeshima, T. 1992. *Theriogenology* 37: 1283–1291.
9. Nakagata, N. 1993. *J. Reprod. Fert.* 99: 77–80.
10. Nakagata, N. 1995. *Exp. Anim.* 44: 1–8.
11. Nakagata, N. 1996. *Lab. Anim. Sci.* 46: 236–238.
12. Nakagata, N., Ueda, S., Yamanouchi, K., Okamoto, K., Matsuda, Y., Tsuchiya, T., Nishimura, M., Oda, S., Koyasu, K., Azuma, S., and Toyoda, Y. 1995. *Theriogenology* 43: 635–643.
13. Nakao, K., Nakagata, N., and Katsuki, M. 1997. *Exp. Anim.* 46: 231–234.
14. Ogita, Z. and Markert, C.L. 1979. *Anal. Biochem.* 99: 233–241.
15. Okamoto, M., Nakagata, N., Ueda, O., Kamada, N., and Suzuki, H. 1998. *J. Mamm. Ova. Res.* 15: 77–80.
16. Rall, W.F. and Fahy, G.M. 1985. *Nature* 313: 573–575.
17. Rapatz, G.L. 1975. Final report submitted to the National Institute on Mental Health on Contract No. 278-75-0009 (DBBR).
18. Saiki, R.K., Bugawan, T.L., Horn, G.T., Mullis, K.B., and Erlich, H.A. 1986. *Nature* 324: 163–166.
19. Tada, N., Sato, N., Yamamoto, Y., Mizorogi, T., Kasai, K., and Ogawa, S. 1990. *J. Reprod. Fertil.* 89: 511–516.
20. Takeshima, T., Nakagata, N., and Ogawa, S. 1991. *Jikken Dobutsu.* 40: 493–497.
21. Toyoda, Y., Yokoyama, M., and Hosi, T. 1971. *Jpn. J. Anim. Reprod.* 16: 147–151.
22. Whittingham, D.G., Leibo, S.P., and Mazur, P. 1972. *Science* 178: 411–414.
23. Whittingham, D.G. 1974. *Genetics* 78: 395–402.
24. Whittingham, D.G., Wood, M., Farrant, J., Lee, H., and Halsey, J.A. 1979. *J. Reprod. Fertil.* 56: 11–21.

## Russell と Burch が提唱した dramatype とは

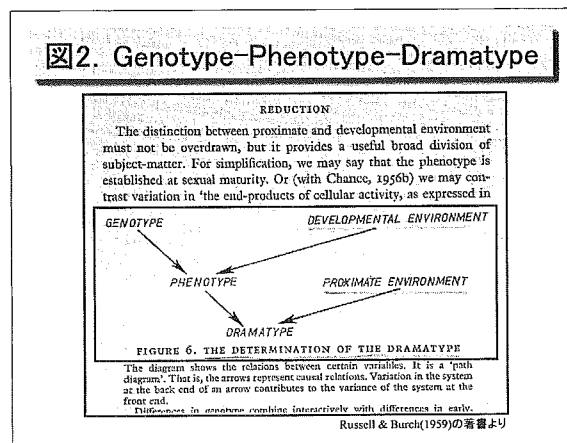
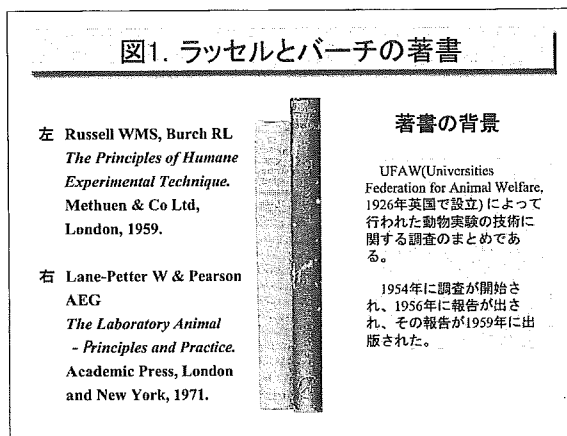
浜松医科大学医学部附属動物実験施設 加藤秀樹

ラッセルとバーチ (Russell と Burch) は、現在国際的に評価されている動物福祉に関する 3R (Replacement, Reduction および Refinement) を提唱した科学者としてよく知られている。期せずして、このシンポジウムで取り上げるドラマタイプ (dramatype) もまた彼らが提唱したものであり、Reduction の章で述べられている。

シンポジウムに先立ち、私がまず「Russell と Burch が提唱した dramatype とは」という題で話をします。おおよその内容は次のとおりである。まず、dramatype ということばについて歴史を踏まえて説明する。続いて、「Genotype-Phenotype-Dramatype」(以下、G-P-D と記述する) がわが国の実験動物科学にもたらした重要な点についてまとめ、さらに、G-P-D という概念に対して現在加えるべき要因として genetic environment (遺伝環境), time environment (時間環境) および technology environment (技術環境) があることを述べ、最後にまとめとして、「Dramatype」という用語を今後どのように扱うべきかについて私見を述べる。

### 1. Genotype-Phenotype-Dramatype (G-P-D) が書かれている著書について

図1 (左) は1959年に出版されたRussell と Burch の著書で、この本のReductionの章にG-P-Dの記述がある。この本が存在する背景は、著者がその著書の中で述べているように、UFAW (Universities Federation for Animal Welfare. 1926年に設立) の依頼によって、1954年に動物実験の技術に関する調査を開始、1956年に出版された報告書が1959年に著書として出版されたということである。図1 (右) は1971年にイギリスで発行されたLane-Peter と Person の著書で、私が調べた外国の実験動物関連図書の中でRussell と Burch のG-P-Dを引用してい



る唯一の本である。

### 2. Genotype-Phenotype-Dramatype の提唱と実験動物科学における課題

Russell と Burch はReduction という章の中でG-P-Dを唱えた (図2)。すなわち、发育環境とGenotypeがPhenotypeを作り、DramatypeはそのPhenotypeに対して近隣環境が加わって作られるとしている。Russell と Burchはこの図の説明の中で実験動物科学上2つの重要な記述をしている。第1点は、「First,

we must control the phenotype」で、Phenotype をコントロールしなければならないということ、第2点は「Second, we must control the environmental conditions」で、環境条件をコントロールしなければならないということである。また、Russell と Burch は動物実験および実験動物に関して次の3点が重要であると記述した。第1に、動物実験は工業・商業における生産工程と同様に考えるべきで、合理的でなければならないということである。第2に、動物実験倫理、動物福祉を考えなければならないということであり、使用動物数の減少も含まれる。そして、第3に、実験の再現性について動物実験を監視すること「Monitor the experiment」である。

ジャクソン研究所のスタッフが1966年に発行した「Biology of the Laboratory Mouse」に Russell と Burch のG-P-Dと同じような考え方が提唱されている(図3)。遺伝子型と生物環境と物理環境の総合として形質(character)があるというのがその主旨であり、臭い、温度などをPhysical environment(物理環境)、発育環境(母体環境)を生物環境(Biological environment)、そして、動物の遺伝子型をGenetic constitutions of individualと呼んで説明している。Characterは遺伝学辞典ではtraitで置きかえられることから、ここではドラマタイプと同じ意味で使われている。この本が出版された当時の遺伝学の認識は、遺伝子と種々の要因が重なった結果として形質があると考えたようである。

### 3. Genotype-Phenotype-Dramatype に対する

#### わが国での認識と実験動物科学の発展

わが国でG-P-Dを紹介あるいはそれを引用している主な著書としては、まず1960年に出版された安東(洪次)・野村(達次)の著書がある。その中でGenotype-Phenotype-Dramatypeを遺伝子型、表現型、演出型と訳した。次に、1970年に出版された実験動物学総論(朝倉書店)の序文で田嶋嘉雄がドラマタイプを詳しく紹介した。また、同書の「実験動物の遺伝形質」を執筆した近藤恭司もドラマタイプと遺伝子型の関係について記述している。

田嶋はその著書の中でRussell と Burch が提唱した実験動物および動物実験に関するさまざまな事柄のうち、特に環境統御について発展的な考え、詳細な記述を行っている(図4)。わが国における実

図3. 遺伝子型+生物環境+物理環境=形質

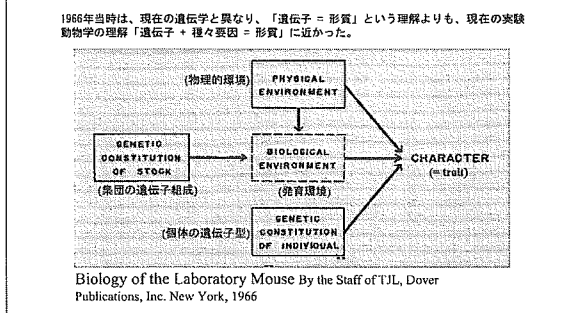
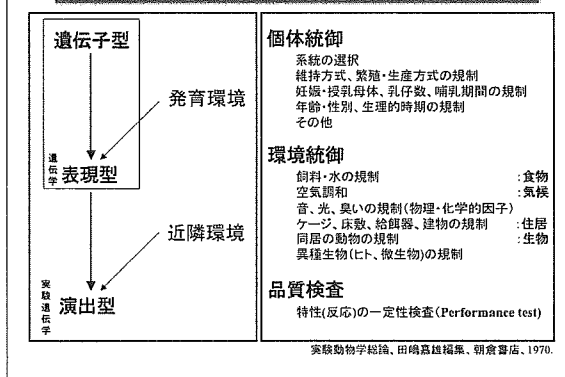


図4. 田嶋によるドラマタイプの解説



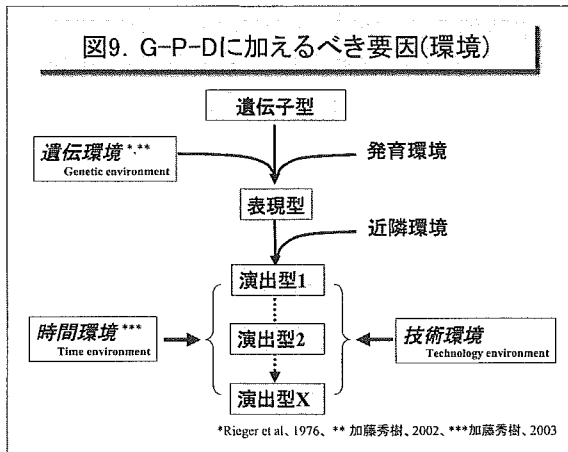
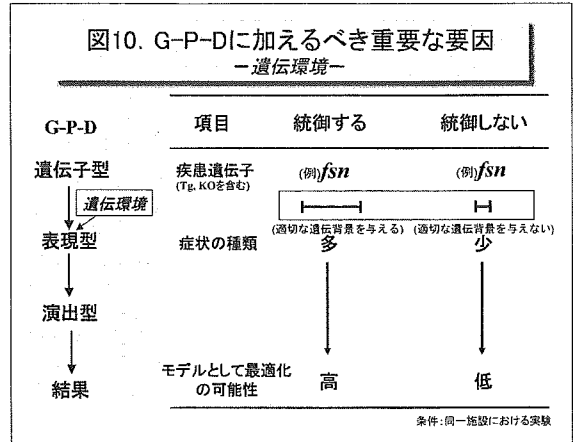
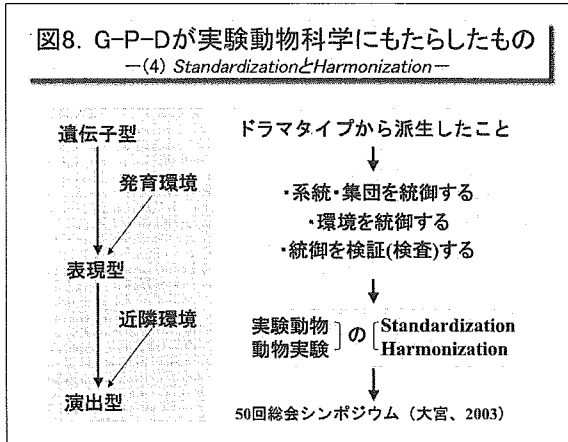
験動物科学は、国内外の多くの研究者による概念の創造とそこから生み出された技術と実践によって培われ、独自の発展を遂げたとと言える。それらは、以下の4項目にまとめられる。

#### (1) 遺伝的統御

まず、図5左の遺伝子型、表現型、演出型および(実験)結果と遺伝的統御の関係を考えてみる。遺伝子型は、統御された場合と統御されない場合とに分けられ、図では前者を狭いバーで、後者を広いバーで示している。広いということはさまざまな遺伝子に多型が見られ、それに伴って個体毎に遺伝的な違いが見られ、表現型の幅の広さ(大)に反映される。統御しない場合として、時間と共に遺伝的な要因(遺伝子頻度や遺伝子構成)が変化することも考える。逆に、統御した場合には、例えば近交系に代表されるように個体間の遺伝的差が小さくなり、表現型の幅の狭さ(小)に反映される。動物実験はこれらの個体を使って行われるので、これから行う動物実験に用いる系統が統御されている







**図11. 遺伝性疾患とドラマタイプ**  
 —疾患遺伝子の発現における遺伝背景の効果—

例: *fsn*<sup>J</sup> 遺伝子 (乾癬Psoriasisのモデル)

系統	Acanthosis	Hyper-granulosis	Ortho-keratosis	Para-keratosis	Intra-corneal micro-abscess	Dilated dermal capillaries	Dermal inflammation
A/J	S	Mi	S	F	F	Y	Mo-S
BALB/cByJ (N7)	Mo	S	Mo	R	R	Y	Mi-Mo
A/J x BALB/cByJ	Mo-S	Mi	S	F	F	Y	Mo-S
C57BL/6J (N6)	S	Mo	S	F	F	Y	Mo

S: Severe, Mo: Moderate, Mi: Mild, F: Focal, R: Rare, Y: Yes, Mo-S: Mild to Moderate

(Sundberg JP et al, 1994)

宮で開催された第50回日本実験動物学会総会では学会主催のシンポジウムとしてクローズドコロニーラットが取り上げられたが、開催の趣旨はまさしくStandardizationとHarmonizationにあった。

4. G-P-Dに加えるべき重要な要因 (第3, 第4, 第5の環境)

RussellとBurchが1959年にG-P-Dを発表してから約50年が経とうとしている。現在に至るまで、サイエンスの1分野としての実験動物科学の発展に伴って、彼らが提唱した概念ならびにそこに横たわる問題点がある程度整理され、解決されてきた。そこでもう一度RussellとBurchのG-P-Dに立ち返って整理してみた時、第3, 第4, 第5の環境要因が存在すると考えられる。図9に全体の関係を示したので、これを参照して、G-P-Dに加えるべき要因について理解を深めていただきたい。

(1) 遺伝環境 (遺伝背景) (第3の環境)

遺伝環境 (背景) を統御しないということは、図10右に示したように図5の遺伝的統御の場合とは逆に表現型の幅が小さいままということである。いくつかの異なる近交系を使ってコンジュニック系統を作出すれば、症状を重くしたり、軽くしたりと人為的に変化させることができる。つまり、適切な遺伝背景を与えることによって、より適切な疾患モデルを作製することが可能であるということである。この1例を以下に紹介する。

Sundbergら(1994)は、ヒト乾癬(Psoriasis)のモデル動物としてflaky skinを報告した。彼らは、図11に示したように「*fsn*<sup>J</sup>」遺伝子の系統を変えることにより症状が変わることを示した。我々も、新たに見出したflaky skinマウスについて現在研究を進めており、遺伝背景を変えることにより症状が変わることを観察している。

なお、「Glossary of Genetics and Cytenetics」(1976年)では、「Genetic environmentとGenetic backgroundは同義語」とされている。

#### (2) 時間環境 (第4の環境)

極端に考えた場合、演出型(動物個体)は、今と次の瞬間、そして次の瞬間、変化をしていると見る必要がある。変化を招いている要因は、近隣環境と個体そのものの変化(成長、加齢)である。ただ、近隣環境は統御できる(一定にできる)可能性が高いので、時間環境は成長あるいは加齢と言えるのではないかと考える。

#### (3) 技術環境 (第5の環境)

第5の環境は技術環境である。実験動物あるいは動物実験には関連するさまざまな技術がある。それら技術の違いは、何かしらの形で演出型(実験動物)に現れると考えるべきである。そして、技術環境は、実験動物や動物実験において使われる技術だけではなく、それを使って生み出される物(製品)も包括される。先に述べたスタンダーダイゼーションやハーモナイゼーションが重要であることは、すべて演出型(実験動物)に影響するからである。従って、実験動物、動物実験に直接関係する技術環境の議論が一個人、一企業、一国の好みあるいは選択だけの問題でないことを私たちは特に認識する必要がある。

### 5. さいごに

Dramatypeは、実験動物科学における用語としてわが国では良く知られている。しかし、わが国以外でこの用語ならびにその意味が認識されているとは言えず残念なことである。

なぜDramatypeという言葉が他国において普及しなかったのか。現在の遺伝学の見解は、元々Phenotypeは環境の影響を受けたそのものを指しているということである。Phenotype 1に起こる事象をPhenotype 2とするとDramatypeという用語を使う必要がないと主張する人もいるであろうし、GenotypeとPhenotypeは何かしらの実態(遺伝子や表現あるいは症状)と結びつくが、Dramatypeということばには根ざすもの(実態)がないとも考える人もいる。

しかし、環境については種類とその影響の強さを考えなければならないし、さらに、例えば複数の施設間で比較することも考えなければならない。実際にDramatypeによって説明される現象が存在することは確かであり、科学的にも証明される。Dramatypeという言葉を実験動物学用語として認めなければならないことは確かである。

Dramatypeの存在によって(あるいは、RussellとBurchが提唱した3RのうちのReductionによって)、わが国では実験動物科学における重要な概念および方法(技術)が生み出され、実践されてきたことに間違いはない。概念を作り出すことは、それを実践するよりもはるかに難しい。半世紀にわたり、実験動物科学において多くの実践の機会を与えてくれたイギリスの科学者RussellとBurchに敬意と感謝の意を表したい。

### 文 献

- ・ Lane-Petter, W. and Pearson, A. E. G. 1971. The laboratory animal-principles and practice. Academic press. London, New York.
- ・ Rieger, R., Michaelis, A., Green. M. M. 1976. Glossary of genetics and cytogenetics (4<sup>th</sup> edition), Sringer-Verlag, Berlin, Heidelberg, New York.
- ・ Russell, W. M. S and Burch, R. L. 1959. The principles of humane experimental techniques. Mathuen & Co Ltd. London.
- ・ Sundberg, J. P., Boggess, D., Shultz, L., Beamer, W. G. 1994. The flaky skin (*fsn*) mutation, in Sundberg J (ed): Handbook of Mouse Mutations with Skin and Hair Abnormalities. Ann Arbor, MI, CRC Press, pp 253-268.
- ・ The Jackson Laboratory. 1966. Biology of the Laboratory Mouse. Dover Publications, New York.
- ・ 安東洪次, 野村達次. 1960. 医学研究と実験動物. 朝倉書店.
- ・ 加藤秀樹. 2002. 系統と遺伝子(ゲノム). アニテックス. 13, 285-290.
- ・ 加藤秀樹. 2003. 遺伝的モニタリング. 医学のあゆみ. 204, 221-224.
- ・ 近藤恭司. 1970. 2. 実験動物の遺伝形質. 実験動物学—総論—(田嶋嘉雄編). 31-105, 朝倉書店
- ・ 田嶋嘉雄. 1970. 1. 序論. 実験動物学—総論—(田嶋嘉雄編). 1-30, 朝倉書店.