Establishment of a New Hereditary-cataract Mouse (CSM) Strain Derived from SENCAR Mouse

Tsuyoshi SATO, Tatsuya MIYAI, Isamu AKAIKE, Mamoru TOGASHI
Misao KOJIMA and Michio OKAMOTO

*Drug Development Laboratories, CHUGAI Pharmaceutical Co., Ltd.
Takada 3-41-8, Toshima-ku, Tokyo 171, Japan*

(Received 28 October 1987/Accepted 1 May 1988)

A mouse representing a new hereditary-cataract strain was found in a mouse colony and a new line was established strain CSM. These mice were investigated genetically, histologically and biochemically. The results suggested that this cataract was apparently inherited through two recessive autosomal genes. Histologically the denucleation process of lens fibers was abnormal and small vacuoles appeared in the equatorial region of the lens cortex at 12 days. Biochemically, insoluble protein and sodium increased in the lens with age.

SENCAR 系マウスに見いだされた遺伝性白内障モデル (CSM 系) について

佐藤 毅 司・宮井 達也・赤池 勇
富樫 守・小島 操・岡本 道生

中外製薬(株)開発研究所実験動物センター

SENCAR 系マウスは, Boutwell, Slagaらにより樹立された皮膚癌好発系のアルビノ・マウスである。起源は“Rockland all purpose mice”よりジメチルベンツアントラセン (DMBA) とクロトン油の2段階発癌法によりパピローマ好発系として選抜育種された STS (skin tumor susceptible) 系マウスで, その後, 繁殖率改善のため, DMBA と TPA (12-O-tetradecanoylphorbol-13-acetate) による皮膚癌誘発の感受性の高いことを確認された CD-1(ICR Charles River)系の雌と交配し, 選抜されたのが SENCAR 系マウスである。その後も繁殖率の低下を避けるため, 兄妹交配による近交化を避け, クローズドコロニーとして維持されてきている [12]。

現在 SENCAR 系マウスの大規模なコロニーは, Oak Ridge 国立研究所にあり, 当研究所には, 1981年に東京大学医科学研究所(黒木教授)を介して導入された。導入後は, 特に皮膚癌好発という特質にはこだわらず, クローズドコロニーとして維持されてきたことにより隠されている遺伝子の発現も期待して兄妹交配を行った。この過程で1ペアより巨大結腸症(Mega colon)が発症し, これについては遺伝性のものであることが確認され, 当研究所で MSM 系と命名され, 現在 F 10 代に至っている。

白内障は, SENCAR 系の F 4 代で一部の個体に見いだされ, その後, 発症個体の選抜交配により症状の固定

を試み、選抜交配開始後F 5代目で全例に白内障が発症するようになり、CSM 系と命名した。

マウスにおける遺伝性白内障の報告は、老人性白内障のモデルである Emory マウス[10]、若年性白内障のモデルである Nakano-cataract マウス（以下 Cac マウス）[2, 4, 5, 6, 9]等を始めとしていくつか知られている。また、ヒトでは先天性白内障は、小児視覚障害の4大原因の一つであり、疫学・先天異常学・遺伝学・小児医学等それぞれの立場で研究が進められてきた。しかしながら、先天性白内障の原因は未だ明らかではなく、発症時期も出生時より思春期にわたり幅広く、水晶体の混濁の部位、程度、形状等も様々である。このように白内障の病態そのものが一定ではなく、病因解明を行うには、種々の白内障モデルを用いた検討が、今後とも重要と考え、この系統（以下、CSM 系マウス）の育種を試み、発症状況、水晶体の生化学的変化、病理学的変化、遺伝様式等について検討したので報告する。

材料および方法

1. 供試動物および飼育条件：CSM, IV CS, DBA/2系マウスの3系統を使用した。動物室は、温度 $24 \pm 2^{\circ}\text{C}$ 、湿度50～60%、換気回数12～15回/hr.で、照明時間は、5時点灯、19時消灯の14時間照明とした。動物は、ポリカーボネイト製マウスケージで飼育し、飼料（CA-1・日本クレア）および飲料水（水道水と井水の混合水）は自由摂取とした。

2. 水晶体の観察および写真撮影：散瞳剤（ミドリンP®, 参天製薬）の点眼約20分後に、アルビノマウスは肉眼により、有色マウスは、暗室内で眼底カメラ（コーワRC-2眼底カメラ）を用いて両眼を観察し必要に応じて写真撮影を行った。

3. グレード分けおよび進行状況の判定：水晶体の混濁部分の大きさから、発症状態を以下の4段階に分けた。

グレード0；未発症

グレード1；水晶体の混濁1/3まで

グレード2；水晶体の混濁1/3から2/3まで

グレード3；水晶体の混濁2/3以上

白内障の進行状況は、CSM 系マウス26匹の両眼について肉眼的に観察し、観察日齢は、25日齢および30日齢、以後10日毎に130日齢まで継続的行った。

4. 組織学的検査：グレード別病変については、それぞれ2ないし3匹の発症例の眼球を採取し、10%リン酸緩衝ホルマリンで固定後、パラフィン包埋を行い、 $5\mu\text{m}$

の切片を作成し、ヘマトキシリン・エオジン（H-E）染色後、組織学的検査を行った。

白内障初期病変の観察は、CSM 系マウスの6および12日齢各2匹、対照として同じアルビノマウスであるIV CS 系マウスの6日齢2匹、12日齢1匹より材料を採取した。エーテル屠殺後、頭皮を除去し、頭部を1週間10%リン酸緩衝ホルマリン溶液に、浸漬固定後、脱灰液（5% EDTA 液、 $\text{ph. } 6.5 \sim 7$ ）に3日間浸し、カルシウムを除去した。その後、常法によりパラフィン包埋を行い、 $5\mu\text{m}$ の切片を作成後、H-E 染色を行い、組織学的観察を行った。

5. 生化学的検査：CSM 系マウスの1, 2, 3, 5, 8, 12週齢の雌（6～10匹）より眼球を採取し水晶体を取り出し、重量測定後、凍結乾燥機により24時間乾燥処置を施し、その後重量を再測定し、乾燥前後の重量の差を水分含量とした。

水溶性蛋白含量、不溶性蛋白含量、 Na^+ 、 K^+ 量は、同じく1, 2, 3, 5, 8, 12週齢の雄（5～14匹）の水晶体を用い、水溶性蛋白含量、不溶性蛋白含量は、Lowry法により、 Na^+ 、 K^+ 量は、炎光光度計（日立775-A型）により測定した。

6. 交配実験：白内障発症の遺伝様式を検討するため、アルビノマウスであるIV CS 系マウスおよび有色マウスであるDBA/2系マウスとの間で、交配実験を行い、白内障の有無は、それぞれ下記の日齢または月齢で検査し、最終的な判定を行った。

(IV CS $\times$ CSM) F 1 60日齢

[(IV CS $\times$ CSM) F 1 $\times$ CSM] 60日齢

(DBA/2 $\times$ CSM) F 1 7～9カ月齢

[(DBA/2 $\times$ CSM) F 1 $\times$ CSM] 7～9カ月齢

IV CS 系との交配では、産仔はすべてアルビノとなるため、肉眼で判定可能であったが、DBA/2 系との交配では有色眼となり、肉眼での判定が困難であったため、水晶体を取り出し、実体顕微鏡下で検査し判定した。

成 績

CSM 系は、開眼（12日齢）後、比較的早期に水晶体の混濁が認められる。Fig. 1に、兄妹交配を始めてからの1家系を示した。F 4代までは、白内障を発症しない個体あるいは片眼にしか発症しない個体も見られたが、F 5代以後は、8週齢までにはほぼ全例が、両眼に白内障を発症するようになった。しかしながら、症状は左右対称には現れず、両眼の間に差がみられ、混濁の程度、形

Fig. 1. Part of the pedigree of cataract mouse (CSM)

Table 1. Grade distribution of cataract from 25 days to 130 days

Grade	Age (days)			
	25	50	100	130
0	11.5(%)	7.7	5.8	5.8
1	59.6	40.4	26.9	25.0
2	25.0	25.0	19.2	11.5
3	3.8	26.9	48.1	57.7

n=52

状も様々で、こうした傾向は兄妹交配を継続しても収束しなかった。

25日齢から130日齢における白内障のグレード別成績を Table 1 に示した。最初の観察日である25日齢では、グレード0～3と様々であり、個体別にみても左右のバラツキがかなり大きい。白内障としては軽度のグレード1が59.6%と過半数を占めた。その後50日、100日齢と加齢に伴い白内障のグレードは進行し、最終観察日である130日齢では、グレード1は25.0%に減少し、替わって最も重度であるグレード3が57.7%と著しく増加した。このように全体としては加齢に伴い白内障病変は進行する傾向にあったが、検査した52例の眼球のうち25日齢でグレード1と判定されたまま、その後の病変の進行が見られず、130日齢に至ってもグレード1と判定されたものが10例(19.2%)認められた。

典型的な白内障の肉眼所見を Fig. 2 に示した。

組織学的な変化としては、Fig. 3 に示したように、

Fig. 2. Gross appearance of cataract in this mouse strain

赤道部から伸長していく水晶体線維の核が、IV CS 系マウスでは水晶体中心部に向かうに連れて明瞭な核濃縮像を示した後、脱核していくのに対し、CSM 系マウスでは、核の円形均質化までは類似の経過を示すが、その後、明瞭な核濃縮像を示さず好酸性円形物質となり、エオジン好性の水晶体線維の中へ埋もれていくような像として捉えられた。このため、CSM 系に比べて IV CS 系マウスの方が、水晶体中心近くまで核クロマチンと思われる好塩基性顆粒が散在しているのが観察された。

12日齢以後では、場所は一定ではないが Fig. 4 に示すような赤道部前後の皮質部浅層で小空胞の発生がみられ、こうした小空胞は IV CS 系でも僅かに見られるものの、CSM 系でより強く集中的に認められた。

グレード3以上の水晶体では、固有の構造は失われ、水晶体線維は、互いの境界が不明瞭になり、全体に均質無構造となった不定形物質中に、空胞あるいは核ないし細胞の崩壊物と思われる好塩基性顆粒が散在的に認められ、多くの例では、水晶体核の後極側からの脱出像も認

normal

cataract

Fig. 3. Equatorial region of lens cortex
Nuclei of lens fibers showing early disappearance
in cataract mouse

Fig. 4. Small vacuoles in lens cortex of cataract
mouse

められた。

生化学的な検討では、含水量は成長に伴い増加したものの、水分比でみると減少傾向が認められた。水晶体蛋白については、3週齢までは水溶性蛋白が増加し、不溶

Fig. 5. Soluble and insoluble protein in lens of
cataract mouse

Fig. 6. Levels of sodium and potassium in lens
of cataract mouse

性蛋白には余り変化は見られなかったが、5週齢以後、水溶性蛋白の減少、不溶性蛋白の軽度な増加が見られた (Fig. 5)。

Na⁺, K⁺ 量は、5週齢まで減少傾向を示したが、Na⁺ は8~12週齢にかけて増加し、12週齢では Na⁺, K⁺ の値がほぼ同程度となった (Fig. 6)。

Table 2 は、遺伝様式の検討のために行った交配実験の成績を示したものであるが、今までに殆ど若齢時の白内障の発症が見られていない IV CS 系、DBA/2 系マウスとの交配 F1 では、白内障個体は1例も出現しなかったが、それぞれの F1 を CSM 系に戻し交配したところ、どちらの交配においても、それぞれ 10/46 (21.7%), 26/90 (28.9%) と約 1/4 例が白内障を発症した。これらの白内障の発症頻度についてはこれまで性差は認

Table 2. Segregation of cataract upon crossing between CSM and another inbred mouse strain

Cross	No. of pairs	Phenotype of offspring obs. (exp.)		Total	X ²	P
		normal	cataract			
(IVCS×CSM) F 1	6	46	0	46		
(DBA/2 Csk×CSM) F 1	6	37	0	37		
[(IVCS×CSM) F 1×CSM]	4	36(34.5)	10(11.5)	46	0.26	>0.5
[(DBA/2Csk×CSM) F 1×CSM]	10	64(67.5)	26(22.5)	90	0.73	>0.3

められていない。

考 察

白内障は、水晶体構成タンパクである水溶性の α -クリスタリンが変性し、不溶性アルブミノイド等に変化することによって起こる水晶体の混濁である。ヒトでは、先天性白内障の他、成人病の一つである糖尿病に併発する糖尿病性白内障、高齢化社会の進行に伴い増加している老人性白内障などが問題となっている。

白内障のモデル動物としては、ラットなどを用いた実験的なガラクトース白内障や、マウス、ラットを主とした先天性白内障モデルの系統が幾つか報告されている[1, 3, 13, 16, 18]。

今回我々が検討した、CSM 系の白内障の発症時期については、肉眼的には既に開眼時(12日齢)に、水晶体の後極側と思われる部位に点状の白濁が認められている。しかしながらこの白濁は、左右両側に同時に発生するものではなく、その進行状態も個体によって異なり、最初からグレード3の混濁を示すものやグレード1のまま推移するものなど様々である。こうした傾向は、他の遺伝性白内障モデルでも報告されており、白内障発症の原因が遺伝子のみにより規定されているものではないことを示していると思われる。

組織学的には、生後6日齢で水晶体線維の核の脱核状態にIVCS系マウスとの間で差が見られ、IVCS系では、核濃縮を起こした後、核クロマチンと思われる好塩基性顆粒が、比較的深部まで認められるのに対し、CSM系では、核の円形化の後、好塩基性は失われ好酸性の円形物質となっていた。こうした脱核過程の異常は、他の白内障マウスでも報告されており、Cacマウスでは、核膜の破壊が生じにくいため、水晶体深部まで細胞核の残存が認められている。この他、Phillyマウスで、核弓部の核の増数あるいは消失の遅れが認められており[4,

15], Cad, Emoryマウスでは核数の減少あるいは消失の早まりが報告されている[3, 10]。CSM系の場合には、光顕レベルでは、核クロマチンの消失の早まりと思われる像が得られているが、核膜の名残と思われる好酸性小体は、かなり水晶体深部まで認められるため、現時点では、脱核異常が認められるということとどめておくのが正確かと思われる。12日齢以後に認められた、皮質部浅層に形成された空胞は、Emoryマウスの報告[14]に示されているものと類似していた。

生化学的な検討結果からは、加齢に伴って水晶体中の不溶性蛋白、 Na^+ の増加などが認められたが、Cacマウスで報告されているほど著しい変化ではなかった。不溶性蛋白は、白内障の進行に連れ増加することが知られているが[11]、CSM系の成績を見る限りでは、余り大きな変化ではなく、 Na^+ についてはCac, Cts系マウス等で白内障の進行とともに増加し、本来高 K^+ 、低 Na^+ である水晶体が高 Na^+ 、低 K^+ になることが報告されている[8, 9]。CSM系では Na^+ 、 K^+ の逆転現象は見られなかったが、12週齢で Na^+ 、 K^+ 量がほぼ同程度となった。また水分含量の変化は、Cacマウスとは異なり、ほぼ正常マウスの範囲内にあり、これらの成績からCSM系の白内障発症機序はCacマウスで報告されているものとは異なっているものと思われた。

マウスの白内障モデルとしては、Cacマウスが最もよく研究されており、白内障の原因物質として、水晶体内に Na-K ATPase の阻害物質(ペプチド)の存在が確認されている[7, 9]。この阻害物質により Na-K イオンの能動輸送系に異常が起こり、水晶体内に Na^+ 、 Ca^{2+} が増加しこれに伴い、含水量の増加、SH化合物の減少、水晶体線維の膨化等が起こり、水晶体の混濁に至ると考えられている。

この他の白内障モデルとしては、Shrivelled (Cat^{Fr})が比較的よく調べられており、Zwann et al. [19, 20]は、水晶体核の核濃縮像に注目し、これが水晶体線維の

変性につながる変化と考えている。また DDI 系マウスにみられている白内障の観察では、電顕により通常では 6 カ月齢以後に認められる、後皮質水晶体線維から水晶体包に伸びる絨突起の形成 [17] が白内障マウスでは、1 カ月から認められたとしている。さらに宇賀 [18] らは、遺伝的素因として、このマウスは水晶体上皮の viability が微弱で、上皮が発生初期に過剰に分裂を繰り返して viability を消耗したため、本来、後皮質に出現するはずの加齢性変化が後皮質に到達する以前の早期に上皮側で発現したという仮説を提唱している。

この他にも、いくつかの白内障モデルマウスが報告されているが、その多くは形態学的な観察にとどまっており、白内障の発症原因まで研究が進んでいるものは少ない。

CSM 系の遺伝子支配については、Table 2 に示したとおり、IV CS, DBA/2 系との F1 では全く発症例がなく、F1 と CSM 系とのバッククロスでそれぞれ 21.7%, 28.9% と約 1/4 の個体に発症が見られ、これらの成績は 2 個の劣性遺伝子が関与していると考えた時の期待値とそれほど矛盾しないものと思われた。しかしながら CSM 系マウスは、まだ系統確立途上であり、遺伝子の固定は不十分と思われる、また遺伝子が 2 個以上の場合の遺伝様式の解明には、一層詳細な交配実験が必要と思われる。

白内障マウス系統として Cac, Philly などは劣性単一遺伝子に支配されており、Cat^{Fr}, Emory などは優性単一遺伝子に支配されている。また Cad は、優性致死遺伝子と劣性遺伝子の二重支配を受けていることが報告されている。以上に報告したように、CSM 系マウスは、遺伝性白内障を若齢で発症し、脱核異常、空胞形成等については、Emory マウス等の報告に見られるものと類似の点もあるが、症状、遺伝様式などの点で他の白内障マウスと異なり、新しい白内障モデルマウスとして有用と思われる。

要 約

当研究所で維持している SENCAR 系マウスの中から、白内障を発症する個体が見いだされ、選抜交配の結果、新たな系統 (CSM 系) として確立された。この系統について、遺伝学的、組織学的、生化学的検討を加えた。遺伝学的には、二つの劣性遺伝子が関与していると思われる成績が得られた。組織学的には、水晶体線維の脱核過程に異常が認められ、12 日齢以後の個体で、水晶体赤道部前後に小空胞の発生がみられた。生化学的には、加齢に伴う Na⁺ の増加、不溶性蛋白の増加などが認めら

れた。

文 献

- [1] Beasley, A. B. (1963). Inheritance and development of a lens abnormality in the mouse, *J. Morph.*, **112**, 1-7.
- [2] Brown, E. R., Nakano, T., and Vankin, G. L. (1970). Early development of an inherited cataract in mice, *Exp. Animals*, **19**, 95-100.
- [3] Davidorf, F. and Eglitis, I. (1966). A study of a hereditary cataract in the mouse, *J. Morph.*, **119**, 89-100.
- [4] Hamai, Y., Fukui, H. N., and Kuwabara, T. (1974). Morphology of hereditary mouse cataract, *Exp. Eye Res.*, **18**, 537-546.
- [5] Iwata, S. and Kinoshita, J. H. (1971). Mechanism of development of hereditary cataract in mice, *Invest. Ophthalmol.*, **10**, 504-512.
- [6] 岩田修造 (1978). 遺伝性白内障マウス (その 1), 臨眼, **32**, 344-348.
- [7] 岩田修造 (1978). 遺伝性白内障マウス (その 2), 臨眼, **32**, 474-478.
- [8] 岩田修造 (1982). 白内障に関する諸問題, 日眼会誌, **86**, 109-133.
- [9] Kinoshita, J. H. (1976). 白内障発生に関する生化学的考察, 日眼会誌, **80**, 78-87.
- [10] Kuck, J. F. R., Kuwabara, T., and Kuck, K. D. (1981/1982). The Emory mouse cataract: an animal model for human senile cataract. *Current Eye Res.*, **1**, 643-649.
- [11] Kuck, J. F. R. and Kuck, K. D. (1983). The Emory mouse cataract: Loss of soluble protein, glutathione, protein sulfhydryl and other changes. *Exp. Eye Res.*, **36**, 351-362.
- [12] 黒木登志夫 (1982). SENCAR マウス, 代謝 (臨時増刊号 癌 '82), **19**, 1101-1107.
- [13] 大島 寛・吉田豊彦・狗田忠義 (1968). マウスの小眼症をとともう遺伝的白内障について, 実験動物, **17**, 91-96.
- [14] 滝沢淳子・葉 隆一・石 樹 敏・佐々木一之 (1985). EMORY マウス白内障の形態学的研究, あたらしい眼科, **2**, 1269-1271.
- [15] Uga, S., Kador, P. F., and Kuwabara, T. (1980). Cytological study of Philly mouse cataract. *Exp. Eye Res.*, **30**, 79-92.
- [16] 宇賀茂三・小原真樹夫・石川 哲 (1981). 優性遺伝性マウス (Cts 系) 白内障の成因に関する形態学的研究, 日眼会誌, **85**, 53-64.
- [17] 宇賀茂三・小原真樹夫・石川 哲 (1982). マウス水晶体の加齢に関する形態学的研究, 日眼会誌, **86**, 223-230.
- [18] 宇賀茂三・小原真樹夫・Bensaoula, T., 石川 哲・中野健司 (1984). DDI 系マウス白内障の発生機序に関する形態学的研究, あたらしい眼科, **1**, 88-93.
- [19] Zwann, J. and Williams, R. M. (1962). Morphogenesis of the eye lens in a mouse strain with hereditary cataract. *J. Exp. Zool.*, **169**, 407-421.
- [20] Zwann, J. and Williams, R. M. (1969). Cataract and abnormal proliferation of the lens epithelium in mice carrying the Cat^{Fr} gene. *Exp. Eye Res.*, **8**, 161-167.