

NC/NgaTndCrlj マウスを実験モデルとして使用するアトピー 性皮膚炎症状の発症プロトコール

2005 年 4 月

2006 年 1 月改定

2009 年 9 月改定

2010 年 9 月改定

日本チャールス・リバー株式会社

ピクリルクロライドによるアトピー性皮膚炎発症プロトコール

1. Picryl Chloride の調整等

- 免疫用
Picryl Chloride (2, 4, 6-trinitrochlorobenzene)(東京化成工業, C0307)
エタノール 4, アセトン 1 の割合で混合した溶液に 5%の濃度で溶解。
- 連続チャレンジ
食用オリーブ油(Filippo Berio)を用いて加温しながら 0.8~1.0%で溶解。
- バリカンで刈った胸・腹部さらにフットパッドに、免疫溶液 150 μ l をマイクロピペッターを使用し塗布。
四日目より一週間ごとの連続塗布を開始する。
- 塗布部位は耳と背部皮膚。塗布量は塗布範囲に依存する。

2. Picryl Chloride の精製・再結晶化法

- 全ての器具は、アセトン・エタノール・蒸留水を通した清潔なものを使用し、操作は遮光条件下で行って下さい。
 1. Picryl Chloride 5g をコニカルフラスコに入れます。
 2. これに 100%エタノールを 40ml 加え、フラスコをゆっくり暖め静かに混合しながら Picryl Chloride を溶解します。この時決して急速に加熱したり、激しくミキシングしないで下さい。
 3. 溶液が黄色になったら加熱を止め、氷温の蒸留水を 10ml 加えて下さい。
 4. フラスコを素早く氷中に入れ、アルミホイルなどで遮光しながらそのまま 2 時間以上静置します。Picryl Chloride の結晶化は蒸留水添加後すぐに始まります。
 5. 上清を注意深くガラス濾過器(ポアサイズ: 20~30 μ m)に通し、上に残った結晶を集めます。沈査は廃棄します。
 6. 集めた結晶を 50%エタノール 200ml に懸濁し、数分間静置します。
 7. これを 100%エタノールで洗浄したガラス濾過器に通し、上に残った結晶を集めます。沈査は廃棄します。
 8. 得られた結晶を濾紙の上に置き、結晶が内側に入るよう濾紙を折り曲げます。
 9. 濾紙をアルミホイルなどで被って遮光し、室温で翌朝まで乾燥させます。

3. 解説とご注意

- 本資料をご使用される研究者の皆様へ
 - ① 実験目的に応じて「皮膚炎」に関し、次の区分をご判断の上モデルをお選び下さい。
 1. アトピー性皮膚炎モデル : 発症症状を継続させる事ができ、戻りません。
 2. アレルギー性皮膚炎モデル: 発症症状が継続できず短期であり、戻ります。

※ NC/NgaTndCrlj は、アトピー性の皮膚炎モデルです。『CRJ Letters Vol.11 No.1, July 1998, アトピー性皮膚炎モデルとしての NC/Nga マウスの有用性』をご参照下さい。

② NC/NgaTndCrlj マウスでも皮膚炎の発症に個体差がございます。

1. NC マウスは Conventional 環境下で飼育すると皮膚炎を自然発症させる事ができます。
2. SPF 環境下で飼育された NC/NgaTndCrlj マウスは自然発症しません。

※ NC/NgaTndCrlj は本プロトコールでアトピー性皮膚炎を 100%発症させる事ができます。

③ 本プロトコールご使用のための解説

1. Picryl Chloride の精製は、きれいな免疫反応を誘導するために実施します。
2. 免疫用の Picryl Chloride 溶液は、紫外線を受ける事で失活しますのでご注意ください(アルミホイル等での遮光をお勧め致します)。
3. 食用オリーブ油は、上級品より一般品をお勧めします。
4. 局所塗布する場合、バリカンで剃毛しますが、実験の前日に実施する事をお勧めします。
5. 実験対象部位にマイクロピペットで塗布しますが、ピペットで滴下した後、ピペットのチップの腹でなぞる様に拡げて下さい。また、研究者が測定対象とする部位に塗布してください。
6. 塗布した場所をマウスが舐めます。防止できませんが、実験に影響はありません。

※ 4~5 週齢での塗布後、死亡したとの報告を受けた事がございます。6 週齢以上での実験をお勧め致します。

7. 症状のスコアは、4 段階での評価をお勧めします。

1) Non, 2) Mild, 3) Moderate, 4) Severe

④ NC/NgaTndCrlj マウスについて

1. アトピー性皮膚炎は症候群であり、様々な要因と指標を解析中です。
NC/NgaTndCrlj は、その中でヒトの場合に見られる指標の一つとして IgE が高くなり、かつ皮膚組織変化が酷似するモデルです。
2. ファイティングをし易い系統ですが、雄では特にその傾向が強くなります。群分けする場合、輸送箱単位で収容する事をお勧めします。
3. ケージや床敷の種類による発症度合いの変化は経験しておりません。
4. 本方法を使用した場合、雌雄ともに 100%発症させる事ができました。

本プロトコールは、東京農工大学保健管理センター所長
東京農工大学大学院農学研究院動物生命科学部門
農学部獣医学科獣医分子病態治療学研究室
教授 松田 浩珍 先生にご監修頂きました。心より感謝致します。