

東京農工大学 農学部 教授
松田 浩珍 先生 監修

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
日本チャールス・リバー株式会社

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 (FilippoBerio)を用いて 0.8 - 1.0% で溶解(加温しながら)。

◎ 局所塗布法

バリカンで刈った胸部、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
て塗布。

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
を融解します。
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 すばやくフラスコを氷中に入れ、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 注意深く上清をガラス濾過器(ポアサイズ: 20-30 μ m)に通し、上に残った結晶を集めます。
沈渣は捨てます。
- ⑥ 集めた結晶を 200ml の 50%エタノールに懸濁し、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。
沈渣は捨てます。
- ⑧ 集めた結晶を 200ml の 50%エタノールに懸濁し、数分間静置します。
- ⑨ 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。
沈渣は捨てます。
- ⑩ 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。
- ⑪ 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。

〈本資料をご使用される研究者への解説とご注意〉

- ① 皮膚炎という時に実験目的に応じて次の区分を判断され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ことが出来、戻りません。
 - 2) アレルギー性皮膚炎モデル: 発症症状が継続出来ず短期であり、戻ります。
※ NC/NgaTndCrj は、アトピー性皮膚炎モデルです。
(CRJ Letter No.1 Vol.1『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/NgaTndCrj マウスでも皮膚炎の発症に個体差があります。
 - 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ことができます。
 - 2) SPF環境下で飼育された NC/NgaTndCrj マウスは自然発症しません。
※ NC/NgaTndCrjマウスは、本プロトコールでアトピー性皮膚炎を100%発症させることが出来ます。

- ③ 本プロトコールご使用の為の解説
 - 1) Picryl Chloride の精製は、きれいな免疫反応を誘導する為に実施します。
 - 2) 免疫用の Picryl Chloride の溶液は、紫外線を受けることで失活します。
くれぐれもご注意ください。アルミホイル等で遮光することをお勧めします。
 - 3) 食用オリーブオイルは、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ことをお勧めします。
 - 5) 実験対象部位にマイクロピペットで塗布しますが、この時に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拵げて下さい。
 - 6) 塗布する部位は、研究者が測定対象とする場所に塗布して下さい。
 - 7) 塗布した場所をマウスが舐めます。防止は出来ませんが実験には影響しません。
注: 4・5週齢での塗布後、死亡したとの報告を受けたことがあります。6週齢以上での実験をお勧めします。
 - 8) Itchingに関しては、2分間の肉眼観察でスコアを採取します。
但し、採取する研究者の個人差が出ることは否めません。
出来れば、画像解析による擦過行動定量化システム(SCLABA、ノベルテック社、神戸)を利用されることをお勧めします。
 - 9) 症状のスコアは、4段階の評価をお勧めします。
i) None ii) Mild iii) Moderate iv) Severe

- ④ NC/NgaTndCrj 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明中です。
NC/NgaTndCrjは、その中で、ヒトの場合に見られる指標の一つとしてのIgEが高くなり、且つ皮膚組織変化が酷似するモデルです。
 - 2) 雄は特にファイティングします。群分けする際には輸送箱単位で収容する事をお勧めします。
匹数調整で他の輸送箱の個体を混在させない様にお勧めします。
 - 3) ケージや床敷の種類で発症の度合いが変化した経験は有しておりません。
 - 4) 本方法を使用した場合、雌雄とも100%発症させる事が出来ました。

以上