

19980155

厚生科学研究費

長寿科学総合研究事業

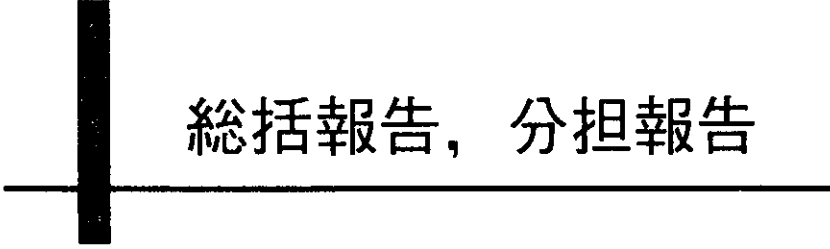
霊長類を用いた老人病モデルの開発と長寿科学
研究基盤高度化に関する研究

平成 10 年度 研究成果報告書

平成 11 年 3 月

班 長 吉 川 泰 弘

東京大学大学院農学生命科学研究科



総括報告，分担報告

総括研究報告書

霊長類を用いた老人病モデルの開発と長寿科学研究基盤高度化に関する研究

吉川泰弘（東京大学大学院 農学生命科学研究科 教授）

研究要旨

霊長類を用いた老人病モデル研究の各領域において従来の自然発症モデルの研究を進めると同時に、新たに実験的老人病モデルを開発する試みが始まった。またこれまで懸案であった老齢個体の学習、記憶能力の評価系の開発や行動・性格に関連する遺伝子の系統解析など新しい分野の研究を包括出来、研究が一層充実した。加齢個体で見られるDP細胞の機能ヘルパー、キラーの両活性を有しており、ヒトに近縁な霊長類の免疫戦略を理解する上で非常に興味深い。

またエイジングファームの維持と各個体のデータ解析がスタートし、正常老化個体のデータが集積されるようになったので、より広範で客観的な比較が可能になった。

- 吉川泰弘（東大大学院農学生命科学研究科教授）
- 鳥居隆三（滋賀医科大助教授）
- 中村紳一郎（日獣大助手）
- 小山正高（日本女子大助教授）
- 鈴木通弘（予防衛生協会科長）
- 吉田高志（国立感染研主任研究官）
- 寺尾恵治（国立感染研室長）
- 国枝哲夫（岡山大助教授）
- 村山美穂（岐阜大助手）

A. 研究目的

21世紀の超高齢化社会を迎え、高齢者の健康維持に関わる問題が厚生行政の主要な課題となってきている。このうち重要な老人病はその病因が複雑で少なくとも加齢に伴う生体機能の減退、遺伝的素因、環境因

子、個体の病歴などが複雑に関連する疾病である。従ってこうした老人病の発症機序を解析したり、早期診断、安全で有効な治療法を確立するためにはサル類のような長寿の実験動物を用いた疾患モデルの開発が必要である。

本研究班は医学実験用に繁殖された、生年月日・家系・既往歴の明らかな育成サル類を用いて、通常用いられる齧歯類モデルでは発現しにくい霊長類に特有な老人病についてサル類を対象として自然例、実験例で研究を進め、適切な疾患動物モデルの開発およびモデル動物の病態評価系の開発、発病メカニズムの解析を行うことを目的としている。

モデル疾患としては高度に発達した霊長類の中枢神経系に認められる老人斑の特

性、老齢個体の学習能力評価、性格に関連する遺伝子の多様性、マカカ属サル類以上に発現しているLp(a)蛋白を中心とした高脂血症や粥状動脈硬化症、昼行性動物である霊長類の老齢個体に見られる網膜黄斑変性症及び緑内障モデル、2足歩行と骨のリモデリングを特徴とする霊長類の骨粗鬆症である。

またカニクイザルの免疫特性とマイクロサテライト法を用いたカニクイザルの遺伝子連鎖解析、老齢ザルのデータベースとエイジングファームを基礎とした研究基盤の高度化を進めることも目的としている。

B. C. 研究方法と結果

1) 老人斑と学習機能の評価：

中村らは老人斑の形成機序をカニクイザルの脳を用いてヒトと比較しながら研究している。老人斑の主成分であるA β の分子種(A β 40、A β 42/43)に関する解析を終え、家族性アルツハイマー病の主要遺伝子であるプレセニリン(P5)のサル脳での発現と老人斑との関連を解析し、C末端が老人斑と関連する事を明らかにした。また胎児脳から老齢ザルの脳までのP5-1の発現を免疫組織学的に解析し、分化、加齢に伴うP5-1のN末端、C末端の発現を生化学的に神経細胞の各分画について検索した。その結果P5は加齢に伴い発現が増加し、C末端はミクロゾーム分画に強く発現する事が明らかにされた。

他方、小山らはカニクイザルの高次神経機能を評価するシステムの開発研究を行った。一般的に行われている学習機能を評価するWGTA法では課題を遂行する特定の個体の選別あるいは課題を理解するための

長期間の訓練が必要であり、老齢個体の学習能力をスクリーニングするには適していなかった。他方独自に開発した指迷路試験は試験前訓練を必要とせず、若齢個体と老齢個体の学習能力を評価できることが明らかになった。指迷路試験では現在加齢による差は見られていない。

II) 性格行動と老人病関連遺伝子の検索：

遺伝子型の行動や性格に与える影響、高齢化に伴う変化に与える影響を明らかにする目的で、村山らは性格行動に関連する可能性のある脳内神経伝達物質であるドーパミンやセロトニンの受容体遺伝子について霊長類の系統発生的研究を進めている。原猿類から類人猿までの様々な種で性格遺伝子多型の存在を調査した。その結果霊長類の多数の種において多型の存在が認められ、モデル動物としての応用が期待できることを示した。また国枝らは老人病と関連する遺伝子を明らかにする目的で、カニクイザルの染色体連鎖地図の作成を進めておりヒト11染色体のマイクロサテライトDNA用プライマーを用いてカニクイザルのマイクロサテライトDNAタイピングを行ってきた。今年度はさらにヒト第2、第11、第21染色体上について検討し、それぞれ48、62、12マイクロサテライトマーカーについて、カニクイザルの対応するマイクロサテライトDNAを検索した。その結果31、38、9のプライマーが単一の断片として増幅され有効であった。さらにそれぞれ18、21、6の断片で個体間多型のあることが明らかになった。

III)実験モデルの開発研究：

マカカ属以上の動物のみが遺伝子を有しているLp(a)蛋白を中心として研究を進め、Lp(a)がヒトと同様分子多型があり両親の遺伝子型が共発現すること、分子量と血清中の濃度は逆相関すること、発現がサイトカインやインシュリンの影響を受けることを示した。鳥居らは高コレステロール食を投与したニホンザルモデルを用いて実験的粥状動脈硬化症の発生と経過を、独自に開発したサル用血管内視鏡で観察することに成功した。また一度出来た粥状動脈硬化症は高コレステロール食を中止しても、容易には回復しないことを明らかにした。

他方、鈴木らは網膜黄斑部の加齢性変性症について研究を進め、老齡カニクイザルの加齢性網膜黄斑変性がヒトのそれに類似していること、また若年性遺伝性網膜黄斑変性家系があることを発見している。本年度はさらに実験的緑内障のモデル作成をすすめ、サル類での眼圧測定法の評価を行った。また1歳齡から28歳齡の個体について、眼圧がわずかに上昇していることを明らかにした。また吉田らは若齡群や骨成長が停止し最高骨量期をすぎた雌カニクイザルについて卵巣摘出を行い、実験的骨粗鬆症モデルについて骨量に及ぼす影響と骨代謝について調べている。若齡と成熟群では特性が異なり成熟群では卵巣摘出後骨量は3ヶ月で有意に減少した。また4ヶ月以降骨形成マーカーが有意な増加を呈し骨代謝が促進されたことを示唆した。

VI)マカカ属サル類の免疫特性：

寺尾、吉川らは加齢に伴いカニクイザルで

末梢血中に胸腺外で分化したCD4CD8両陽性(DP)細胞が出現すること、この細胞の表現型がメモリーT細胞であることを明らかにしてきた。本年度はこのDP細胞がヘルパー活性とキラー活性の両方を有していること、90%以上がFas抗原を発現しているがリガンドによるアポトーシスの感受性は低いこと、INF-r、パーフォリン、グランザイムBのmRNA発現があることを明らかにした。

D. 考察

老人斑形成機序については、形態学的検索以外に生化学的解析方法が確立出来たので、ELISAやWB法と形態との関連、Aβの分子種やPSのN末端、C末端の脳脊髄液を用いた早期診断法の開発等に有効かもしれない。またサル類の老人斑形成の関連する遺伝子のクローニングを進めており、個体への遺伝子導入でモデルが出来れば、さらに診断、治療法開発に有効であろう。

これまで懸案であった老齡個体の学習、記憶能力の評価系の開発や行動・性格に関連する遺伝子の系統解析など新しい分野の研究を包括出来たので、加齢性老人斑の研究とこの種の研究が一層有機的に推進されることと思われる。特に指迷路試験は記憶学習課題の普遍的試験として、ヒトの幼児発達学あるいは痴呆症の評価への転用も可能かもしれない。

加齢に伴い出現するCD4CD8両陽性(DP)細胞は、非胸腺由来の休止期メモリーT細胞に属し、かつヘルパー活性もキラー活性も有していることが明らかになった。加齢個体で見られるDP細胞はチンパンジーを含めた系統解析が必要であるが、

ヒトに近縁な霊長類の免疫戦略が独自の方向性を持っているとしたら生物学的に非常に興味深い。ヒトではこうしたマーカーを持った胸腺退縮後のT細胞は検出されていないので免疫機能の系統発生学上興味ある問題である。

このほか実験モデルではLp(a)蛋白の遺伝子発現制御はヒトの材料が利用できないこと、霊長類以外の動物では遺伝子が欠損していることを考えると、カニクイザルの初代培養肝細胞系は代謝機能を含めてさらに有効利用を試みる事が出来る。またマイクロサテライトDNA技術や遺伝子のシンテニーを利用して遺伝性網膜黄斑変性症の遺伝子を同定し、加齢性黄斑変性症の発病機序の解明、治療法の開発に利用出来る。サル類の卵巣摘出による骨粗鬆症モデルはげっ歯類やイヌの骨量減少とは異なり、低カルシウム食の付加なしに骨量減少を誘発するので、閉経後のヒトの骨粗鬆症モデルとして治療薬の有効性、安全性評価系として期待できる。

また55頭のエイジングファームの維持と各個体のデータ解析がスタートした、病態モデルの解析には正常老化個体のデータが必要であり、エイジングファームから得られるデータにより解析基盤の充実とより広範で客観的な比較が可能になりつつある。さらにヒトの正常老化との比較も可能になると思われる。

E. 結論

霊長類を用いた老人病モデル研究の各領域において従来の自然発症モデルの研究を進めると同時に、新たに実験的老人病モデルを開発する試みが始まった。これまでに得

られたデータを利用して実験モデルの研究が一層スピーディに推進されることが期待される。また懸案であった老齢個体の学習、記憶能力の評価系の開発や行動・性格に関連する遺伝子の系統解析など新しい分野の研究を加え、研究が一層有機的に推進されると思われる。エイジングファームの維持と各個体のデータ解析がスタートし、病態モデルの解析に必要な正常老化個体のデータが得られるようになり、解析基盤の充実とより広範で客観的な比較が可能になりつつある。

F. 研究発表

カニクイザルにおけるアルツハイマー病に関連する病変の病理組織学的研究、中村紳一朗、木村展之、中山裕之、小野文子、榊原一兵、土井邦雄、吉川泰弘 霊長類研究、14、83-87、1998

霊長類を用いた老人病モデルの開発研究—研究プロジェクトの経緯とその展開— 吉川泰弘 霊長類研究、14、77-81、1998

医薬品開発における実験用霊長類の有用性について 吉川泰弘 オベリスク 3、2-3、1998

カニクイザルのPS-1発現の年齢に伴う変化

日本獣医畜産大学・獣医病理学教室・中村紳一朗

アルツハイマー病の主病変である老人斑および脳血管アミロイド症は生化学的にアミロイドβ蛋白(Aβ)から構成されている。このAβが脳内に沈着し、さらにこれらの病変を形成するに至るまでに、様々な因子が関与していることが推測されている。一つはapolipoprotein E (apoE)で、In vitroでAβと共存することによって、Aβの自己凝集能を促進することが知られている。さらに最近、presenilin-1蛋白(PS-1)がAβの沈着の促進に深く関わっていると考えられている。いくつか存在するAβの分子種の中でも初期沈着に深く関わると考えられているAβ42は、PS-1の強制発現細胞を用いたIn vitroの実験系、トランスジェニックマウスを用いたIn vivoの実験系で、その分泌の上昇が確認されている。

PS-1は脳内では主に神経細胞で発現しており、オルガネラの膜に7~9カ所の貫通領域をもつ蛋白と考えられている。この全長蛋白は第6~7貫通領域内に存在する親水性ドメインの一部で、N末端部分とC末端部分の2カ所に限定分解されると考えられている。しかし、PS-1の全長、N末端およびC末端の局在の年齢に伴う変化を詳細に調べた研究はこれまでにない。またPS-1の免疫染色の結果は使用した抗体の間で差が見られている。

そこで本研究では、本多らによって作製され、また生化学的性状が明らかにされているN12(PS-1の全長、N末端を認識)とM5(C末端を特異的に認識)を用いた免疫組織学的検索を行った。さらに局在を詳細に検索するため、ショ糖勾配法を用いて脳組織をマイクロゾーム、核、ミトコンドリア、ミエリン、シナプトゾーム、サイトゾルの6分画に分離し、N12とM5によるウェスタンブロッティングを行った。

材料と方法

動物：国立感染症研究所筑波医学実験用霊長類センターから得られた、年齢の異なる胎仔から35歳までのカニクイザル(*Macaca fascicularis*)計16例を用いた。そのうち11例を病理組織学および免疫組織化学的検索、5例をウェスタンブロッティングに用いた。

病理組織学的検索：大脳組織の10%中性緩衝ホルマリン、パラフィン包埋材料を用いて、4μm切片を作成し、病理組織学的検索としてHE、過ヨウ素酸メセナミン銀染色(PAM)およびアルカリコンゴレッド染色を行った。

免疫組織化学的検索：一次抗体としてウサギポリクローナル抗体N12(PS-1の全長、N末端を認識)およびM5(C末端を特異的に認識)を用いた。これらをSABC法(DAKO)によって染色した。

ウェスタンブロッティング：前頭葉、扁桃核を含む側頭葉、海馬を含む側頭葉、後頭葉および小脳から得た新鮮凍結組織をショ糖勾配法によってマイクロゾーム、核、ミトコンドリア、ミエリン、シナプトゾーム、サイトゾルの6分画に分離した。それぞれのタンパク濃度を定量的後、すべての分画のタンパク量を一定にして、SDS-PAGEで電気泳動を行った。泳動されたタンパクをゲルからPVDF膜(Millipore)に転写し、N12とM5を一次抗体とする免疫反応を行った後、ECL化学発光(Amersham)で特異反応を検出した。

結果

病理組織学的検索：PAM染色では11例中の4例(22歳以上)に老人斑を認めた。4例すべてに成熟型老人斑を認め、1例(26歳)に瀰漫型老人斑を認めた。

免疫組織化学的検索：

N12；胎仔以外の2-35歳の動物の脳において、N12は多くの部位の神経細胞を染色し、細胞質内は顆粒状であった。神経網および白質も微弱な陽性像を認めた。それらのうち、大脳新皮質の免疫染色像は年齢によって異なっていた。若齢または中年齢動物で新皮質中層（IIIからIV層）の神経細胞が染色されたのに対し、老齢動物では全層の神経細胞が染色された。胎仔の脳では上皮板の細胞の細胞質内が陽性を示した。

M5；胎仔以外の2-35歳の動物の脳において、M5は多くの部位の神経細胞を染色し、細胞質内は顆粒状であった。また神経網および白質にも強い顆粒状の陽性像を認めた。大脳新皮質の陽性像はN12とは異なり、加齢に伴う局在の差は認められなかった。さらに老齢動物に観察された成熟型老人斑の腫大神経突起が染色された。胎仔の脳では上皮板の細胞の細胞質内だけでなく細胞間の線維状の構造物も陽性を示した。

ウェスタンブロットング：

N12；N12は49kDの全長PS-1と27kDのN末端PS-1を検出した。両バンドともに採材部位による差は認められなかった。

27kDのN末端PS-1は、抽出された分画の中でもマイクロゾームにもっとも強いバンドが出現し、核、シナプトゾームの順に強かった。核分画のバンドは年齢とともに強くなっていた。一方、ミエリン、サイトゾルおよびミトコンドリアでは特異バンドは検出されなかった。

49kDの全長PS-1のバンドの強さは、全体的に27kDのN末端よりも弱かった。また年齢に伴う変化、部位の間での差はほとんど認められなかった。16歳と32歳の動物の核およびマイクロゾーム分画にやや強いバンドが認められた。

M5；M5は19kDのC末端PS-1を特異的に検出した。採材部位による差は認められなかった。

19kDのC末端PS-1のバンドはマイクロゾームで最も強く、次に核およびシナプトゾームが強かった。マイクロゾームの発現は年齢と関係なく同等であったが、核およびシナプトゾームは高齢の動物ほどその発現が強くなっていた。

考察：

PS-1の局在に関する免疫組織化学的検索は主にヒトまたは齧歯類で行われてきた。最近、アカゲザル、ネズミキツネザルなど霊長類のPS-1の局在に関する報告も知られている。これらは神経細胞における局在という点ですべて一致しているが、その他の細胞での局在、または老人斑および神経原線維変化といった病変での局在については使用した抗体の間で結果が異なっている。

以上の点を改善するために、生化学的性状の明らかな抗体、N12とM5を用いた免疫組織化学的検索を行った。また様々な種の霊長類で老人斑が確認されているにも関わらず、これまでの検索では老人斑を持つ動物での検索は行われていないので、老人斑を持つ動物を用いた検索も行った。さらにこれらの局在を生化学的にも証明するために、ショ糖勾配法によって脳をいくつかの分画に分離した後に、ウェスタンブロットを行った。

免疫組織化学的検索とウェスタンブロットの結果をあわせ、次のようなことが明らかになった。1) N12は全長とN末端PS-1を検出するが、ウェスタンブロットで検出されたのがほとんどN末端PS-1であったため、免疫染色における陽性像の多くはN末端PS-1の局在を示していること、2) 両抗体ともに免疫染色では神経細胞の細胞質を顆粒状に染色し、この染色性はウェスタンブロットのマイクロゾームの反応性と一致する、およびM5の神経網および白質の染色性はウェスタンブロットのシナ

プトゾームの分画の反応性と一致すること、3) 全長、NおよびC末端は胎仔から高齢動物のすべての個体に発現しているタンパクで、特にC末端は免疫組織学的に老人斑にも出現すること、加齢に伴いシナプトゾームでの発現が増えることから加齢性病変の形成に深く関わる因子であること、などが考えられた。

PS-1のノックアウトマウスまたは強制発現細胞を用いたIn vitroの実験系では、老人斑形成において分子種となるべくA β 42が非常に増加することが明らかになっている。今回の我々の検索ではこれまでに報告されているA β の前駆体タンパク (APP) の局在とPS-1の局在とが一致していることが明らかになった。老人斑ではその腫大神経突起にC末端を確認しており、PS-1のC末端が特に老人斑形成と深く関わっていることが推測された。

今後は全長、NおよびC末端のそれぞれが担う役割を様々な手法から明らかにしていくつもりである。

研究業績：

論文発表：

1. Kiatipattanasakul W, Nakayama H, Nakamura S, and Doi K. Lectin histochemistry in the aged dog brain. *Acta Neuropathol.* 1998. 95: 261-268.
2. 中村紳一郎、木村展之、中山裕之、小野文子、榊原一兵、土井邦雄、吉川泰弘. カニクイザルにおけるアルツハイマー病に関連する病変の病理組織学的研究. *霊長類研究.* 1998. 14: 83-87.
3. Nakamura S, Nakayama H, Goto N, Ono F, Sakakibara I, and Yoshikawa Y. Histopathological studies on senile plaques and cerebral amyloidoses in aged cynomolgus monkeys. *J. Med. Primatol.* 1998. 27: 244-252.
4. Nakayama H, Katayama K, Ikawa A, Miyawaki K, Shinozuka J, Uetsuka K, Nakamura S, Kimura N, Yoshikawa Y, Doi K. Cerebral amyloid angiopathy in an aged great spotted woodpecker. *Neurobiol. Aging* (in press).
5. Yamawaki H, Sato K, Hori M, Ozaki H, Nakamura S, Nakayama H, Doi K, Karaki H. Impairment of endothelium-dependent relaxation by a long-term PDGF-treatment in organ-cultured rabbit mesenteric artery. *Am. J. Physiol.* (in press)

学会発表：

1. 木村展之、中村紳一郎、中山裕之、高島明彦、本多俊幸、土井邦雄、吉川泰弘. カニクイザルのpresenilin-1蛋白質の局在に関する研究. 第125回日本獣医学会. 宇都宮. 1998年4月.
2. 中村紳一郎、中山裕之、ウィジット・K、谷吉朗、土井邦雄、吉川泰弘. 各種動物のアミロイドに認められた、アポリポ蛋白Eの共沈着. 第125回日本獣医学会. 宇都宮. 1998年4月.
3. 木村展之、中村紳一郎、中山裕之、高島明彦、本多俊幸、土井邦雄、吉川泰弘. カニクイザルのpresenilin-1蛋白局在に関する病理組織学的研究. 第39回日本神経病理学会. 博多. 1998年5月.
4. 中村紳一郎、木村展之、小野文子、榊原一兵、寺尾恵治、吉川泰弘. サル類に認められる脳アミロイド症. 第15回日本霊長類学会. 岡山. 1998年6月.
5. 中村紳一郎、小野文子、寺尾恵治、高橋公正、吉川泰弘. プリオン蛋白(PrP)欠損マウス由来の抗モノクローナル抗体を用いたリスザル実験的的海綿状脳症の免疫組織化学的研究. 第126回日本獣医学会. 江別. 1998年8月.
6. Nakayama H, Katayama K, Ikawa A, Miyawaki K, Shinozuka J, Uetsuka

K, Nakamura S, Kimura N, Ishida K, Yoshikawa Y, Doi K. Cerebral amyloid angiopathy in an aged great spotted woodpecker. American College of Veterinary Pathologists 49th Annual Meeting. St. Louis, Missouri. 1998. Nov.

7. 木村展之、中村紳一朗、成島悦雄、原樹子、七里茂美、齊藤和夫、野瀬修央、林貴子、後藤直彰、吉川泰弘. ローランドゴリラ脳に見られた老人斑について. 第127回日本獣医学会. 相模原. 1999年4月.

8. 佐村英里子、松野佐好子、木村展之、中村紳一朗、玉岡晃、庄司進一、中山裕之、土井邦夫、吉川泰弘. 老齡犬脳におけるamyloid b protein分子種の解析. 第127回日本獣医学会. 相模原. 1999年4月.

霊長類を用いた老人病モデルの開発と長寿科学研究基盤高度化に関する研究

分担課題：高次脳機能障害モデルに関する研究

分担研究者：小 山 高 正（日本女子大学・人間社会学部）

1. 研究目的と実施方法

本研究では、高齢者のモデルとして老齢カニクイザルをとりあげ、中枢神経機能の加齢変化を多面的に解析する。具体的には、WGTAの装置を用い、遅延反応実験、遅延非見本合わせ実験などを行い、さらに指迷路を用いて老齢ザルの脳の高次機能を検討することを目的としている。特にわれわれは、Rappらの行った一連の実験(1989-1996)を参考に、遂行されるのに必要な脳部位が特定されているような課題を用いて、老齢カニクイザルの学習課題習得および空間的作業記憶能力を調査するとともに、それらの能力と指迷路で測定された結果を比較することによって、老齢ザルの高次脳機能を測定するためのより簡便なシステムを開発しようとしている。

(1) 実験1：WGTAによる老齢ザルの記憶能力の調査

1.被験体：雌カニクイザル6頭

(年齢：老齢群 23-27 歳齢 3・非老齢群 12-13 歳齢 3)

2.装置：実験室に運び入れた実験用飼育ケージ4個とWGTAおよびビデオカメラ

3.手続き：

①Delayed Response

(a)Basic Training(基礎訓練・90%以上の正答率に達するまで続ける。1日20試行)

・上記(a)の実験場面をビデオカメラで録画、16の行動項目を4つのカテゴリーに分け(課題に対する正アプローチ,誤アプローチ,正誤迷っている,実験に関心のない状態)、各カテゴリーごとの累積時間を解析した。

(b)Delayed Response(遅延反応課題・1~30秒の遅延時間を導入した。1日20試行。期間は12日間)

・上記(b)の遅延期間の場面をビデオカメラで録画、10の行動項目を3つのカテゴリーに分け(正刺激に対する手がかり的行動,誤刺激に対する手がかり的行動,刺激に対する手がかり的行動とは無関係の行動)、各カテゴリーごとの累積時間を解析した。

②Nonmatching-to-Position

Nonmatching-to-Position(場所型非見本合わせ課題・90%以上の正答率に達するまで続ける。1日20試行)

・上記(a)の選択反応時のプリファレンス(位置偏好・Position Preference)率について解析した。(呈示される正刺激の位置に関わらず左右どちらかの位置にのみ反応する割合をプリファレンス率とし、「左正位置の正答率(上限50%) - 右正位置の正答率(上限50%)」で算出した)

(2) 実験2：改良型指迷路による空間認知能力テスト

1.被験体：雌カニクイザル11頭(年齢7歳齢)

2.装置：飼育ケージにとりつけられた改良型指迷路および8mmビデオカメラ

指迷路は高さ(右、左)×横幅×奥行きが144,179×244×37mmの亚克力板製であり、装置前面と背面には透明亚克力板を、側面と上下部および4段の各迷路床面には白色亚克力板を用いた。迷路部は高さ×横幅×奥行きが33×178×30mmであり、床面両端に縦横が30×25mmの開口部を設けた。開口部の一方は正解側であり、もう一方はエラー側であった。エラーボックスは35×56×30mmであり、エラーボックス前面には白色塩化プラスチック製の板を内側から張り付けた。これは、被験体からエラーボックス内の報酬に接触できないようにするためである。

3.手続き：

実験は、馴化、課題1(1段目から報酬を落として取り出す)、課題2(2段目から1段目に報酬を落としさらに下へ落として取り出す)、課題3(3→2→1で報酬を取り出す)、課題4(4→3→2→1

で報酬を取り出す)、ランダムテスト(課題1~4をランダムな順番で行う)と行った。

1 試行は実験者が報酬を装置内に置いてから被験体はその報酬を得るまでとし、2分経過しても装置、報酬に触れない場合は無反応でその試行を中止した。各課題の基準達成は、連続10試行における正試行率が90%である。ランダムは、各段8試行計32試行行った。

2. 研究成果

1.WGTAによる老齢ザルの記憶能力の調査の結果と考察

(1) Delayed Response の正答率と習得までの行動解析

①Basic Training の習得までに要した試行数

基準達成までの平均試行数は老齢群 80 試行,非老齢群 160 試行で老齢群の方が少なかった。

②Basic Training の行動解析

初期の段階において、老齢群は、課題に対する正アプローチ行動が全行動時間の 57.6%, 実験に関心のない状態の行動が 4.8%出現したのに対し、非老齢群は、課題に対する正アプローチ行動が 11.0%, 実験に関心のない状態の行動が 66.3%と対称的であった。誤アプローチ行動と正誤迷っている行動については両群の顕著な差は見られなかった。

③Delayed Response の正答率

この課題の成績は年齢群の差よりも、個体差の方が顕著であった。老齢であってもいずれの遅延時間においても高い正答率を示す個体もあり、また逆に非老齢であっても成績の低い個体もいた。成績下位の2頭(老齢1非老齢1)は遅延5秒以上になると急激に正答率が低下する特徴が見られた。

④Delayed Response の行動解析

遅延期間中の行動については、年齢別よりも成績別(上位の老齢1非老齢1・下位の老齢1非老齢1)の間で顕著な差が認められた。正刺激に対する手がかり的行動の出現率は、遅延1秒においては上位群で95.0%,下位群で85.6%であり、一方で遅延5秒以上の場合では上位群で80.3%,下位群で49.5%と大きく差がついた。

(2) Nonmatching-to-Position 習得過程と行動解析

①Nonmatching-to-Position の習得までに要した試行数

基準達成までの平均試行数は老齢群 840 試行,非老齢群の平均試行数は 1090 試行で、Basic Trainingと同様に老齢群の方が少なかった。

②Nonmatching-to-Position の行動解析

選択反応時のプリファレンス率が±15%以上の数値が±5%以内の変動で20日以上連続して算出された期間をプリファレンス期間とした。自力で課題を習得した個体(老齢2非老齢1)についてプリファレンス期間が見られた。プリファレンス期間とその前後の試行数について老齢と非老齢で比較したところ、プリファレンス期間に入るまでの試行数は非老齢個体が2倍以上多く、プリファレンス期間とその後の基準達成までの試行数に大きな差はなかった。

プリファレンス期間が見られなかった非老齢1頭については、1100試行を超えても自力で基準に達することはなかったが、任意にプリファレンスを起こすような矯正試行挿入後、速やかに習得した。

2. 改良型指迷路による空間認知能力テストの結果と考察

(1) 各課題の学習曲線

個体、課題によって基準達成に要した試行数にばらつきがあったため、ヴィンセント曲線で表した。課題1は試行開始時から80%の正試行率を示し、4課題中もっとも容易であった。課題2は、試行開始時の正試行率が20%であり、チャンスレベル(50%)を越える時点は総試行数に対する80%付近であった。課題2は非常に困難であったことを示している。それに比し、課題3は試行開始時の正試行率が60%から開始していて容易であったと思われる。課題4は、課題1と同じ正試行率から始まり、途中落ち込みはあったが、常にチャンスレベルを越えた正試行率で上下した。

(2) ランダムテスト

迷路部1段から4段までのどの段から試行を開始しても誤りなく遂行することができるか、試行をランダムな順序でどの段からも開始して調べた。その結果、全ての被験体が正試行率90%以上であり、平均95.7%で遂行できた。

3. 老齡ザルの学習課題習得能力および行動的特徴の検討

(Basic Training と Nonmatching-to-Position の結果から)

Basic Training と Nonmatching-to-Position における基準に達するまでの試行数は、老齡個体が非老齡個体よりも少なかった。老齡個体の学習能力は非老齡よりも劣っている、というこれまでの一般的見解は今回の結果には当てはまらないといえる。

では老齡が速く課題を習得できた要因はどこにあるのか。これまでは成績の数値のみにその要因を求めがちで、学習成績の「個体差」が何に起因するのかを行動的発現の視点から検討した研究はなかった。学習曲線の結果からだけではこれまでと同様に大きな違いを見出すことはできない。そこで今回は課題習得中の個体の行動解析を行い、成績と行動の関連について検討した。

Basic Training の行動解析の結果、老齡群は初期の段階から刺激に関心のない状態の行動は少なく、一貫して正しいアプローチ行動をとることが特徴であるといえる。実験に対する行動は安定していて、学習成績にもそれがよく反映されている。新しい状況への対応もスムーズで、早い段階から学習課題そのものを理解していると考えられる。対して非老齡群は初期の段階では刺激に関心のない状態の行動が多く、それが数日続くことが特徴である。

以上のことから、早い時期から実験に集中している状態で課題に関心を向けており、課題習得への正しい方法を取り続けることで早く習得するに至るといえる老齡像と、最初の段階では実験場面への順応度が低く課題に集中しない状態で、したがって課題の理解が遅く成績も安定しにくいゆえに達成に時間がかかるという非老齡像を描くことができよう。そのような行動パターンが Basic Training の課題習得能力として測定したものに反映された一つの側面であると考えられる。

Basic Training は最初の課題であるということから「実験場面への順応力」は大きな意味を持つといえる。一方、Nonmatching-to-Position は実験開始から既に2カ月以上経過した後の課題である。そこでこの課題が位置刺激の課題であることに注目し、個体のプリファレンスの傾向から課題習得への戦略を分析しようと試みた。4頭のうち矯正試行を入れずに基準に達成した3頭には、いずれも自発的なプリファレンス期間が見られたことや、1100 試行目でも基準に達しなかった個体についても、意図的にプリファレンスを起こさせるような構造の矯正試行を挿入した後は速やかに達成基準に至ったことから、プリファレンス期間というものが Nonmatching-to-Position を習得する上で非常に有効な戦略であると考えられる。試行開始からプリファレンス期間に入るまでの試行数には、老齡の2頭（速い習得）・非老齡の1頭（遅い習得）の間に2倍以上の差が認められたことから、習得までにかかる試行数の差は自発的にプリファレンス期間に入るまでの試行数の差であるといえる。つまり非老齡は本格的なプリファレンス期間に入るまでの試行錯誤の期間が老齡よりも長い。そもそもプリファレンスを起こせば、課題に悩まされることもなく50%の割合で確実に報酬を手に入れることができる。そのような「賢さ」は、やはり老齡個体の年の功というべきであろうか。

以上のことから、老齡個体は早い段階から自分なりの戦略を確立し一貫してそれを行うことでやがて課題そのものを理解して、少ない試行数で習得に至ると考えられる。対して非老齡個体は自分なりの戦略を確立するまでに変更などを経て時間を要し、結果的に習得までに多くに試行数をかけていることがわかった。

4. 老齡ザルの学習課題習得能力および行動的特徴の検討

Delayed Response の結果から、老齡ザルの記憶能力に関する個体差は大きく、これまでの研究でも様々な形で報告されてきた (Rapp,1992;1994)。今回測定した記憶能力にも年齢的要素よりも個体差が大きく反映されたといえる。

遅延期間のスクリーンの向こうで個体がどのような行動をとっているのか。成績の違いには、行動面でも明確なパターンがあるのか。記憶課題の成績差の原因を探るため、遅延期間中の被験体の行動について解析を行った。

観察された行動のうち手がかり的行動について正答率と照会してみると、どの個体についてもその二つが連動していることがわかる。すなわち4頭とも遅延1秒の手がかり的行動の出現率が高く正答率も高い。一方、遅延5秒以上の場合では成績下位の2頭の出現率と正答率ともに低下している。この結果から観察された手がかり的行動が「記憶するため」に重要であると推察できる。したがって特に遅延時間が長い場合において「手がかり」を上手に使うことができたか否か、が DR の成績差の重要な要因であることが明らかになった。そのようなものの獲得の段階がこの課題には含まれていることを本実験の結果から指摘することができる。また今回の結果は、記憶保持を老齡が特有の方法で行っているという

ことよりも、老齢個体でも全体で共通した方法を維持していることが記憶能力の維持につながっていることを示している。つまり劣化した何らかの能力を補うような行動的戦略は、今回は見いだせなかったということである。

3. 研究発表

<著書・論文>

小山高正、寺尾恵治、「老齢ザルの心理・社会的ストレスに対する反応特性」『霊長類研究』14(2)：109～114 ページ、1998年（平成10年）8月

<学会活動>

1)Kubo, N., Koyama, T., Kawasaki, K., Tsuchida, J., Sankai, T., Terao, K., Yoshikawa, Y., "Learning and memory ability and behavioral characteristics in aged monkeys (m. fascicularis)." The 17th Congress of the Inter-national Primato-logical Society (マダガスカル、1998年（平成10年）8月)

2)Tsuchida, J., Kawasaki, K., Sankai, T., Kubo, N., Terao, K., Koyama, T., Makino, J., Yoshikawa, Y., "An analysis of finger maze learning in cynomolgus monkeys." The 17th Congress of the Inter-national Primato-logical Society. (マダガスカル、1998年（平成10年）8月)

3) Kawasaki, K., Sankai, T., Terao, K., Koyama, T., Makino, J., Yoshikawa, Y., "Unique video image pro-cessing systems for behavior analysis of monkeys and rats." The 17th Congress of the Inter-national Primato-logical Society. (マダガスカル、1998年（平成10年）8月)

4)久保南海子、川崎勝義、小山高正、「老齢ザル特有の学習戦略はあるのか？：課題習得課程の行動解析から」日本心理学会第62回大会（東京学芸大・1998年（平成10年）10月）

性格遺伝子と老齡ザルの行動特性

分担研究者 村山美穂（岐阜大学農学部）

研究要旨： 高齡による痴呆症などの中枢神経系の機能変化には個体差が大きく、個人の本来の性格との関連も無視できない。本研究では、性格に関連する脳内神経伝達物質関連遺伝子の型が行動や性格に与える影響、高齡化に伴う変化に与える影響を明らかにし、これら性格遺伝子の型を調べることにより、痴呆症などの予防や治療の効果を上げることを目指している。本年度は、霊長類の様々な種において、性格遺伝子多型の存在を調査した結果、霊長類の多数の種において多型の存在が認められ、モデル動物としての応用が期待できることが示唆された。

A. 研究目的

現代における社会生活の複雑化に伴い、強いストレスから精神のバランスを崩す人が増えている。特に米国では、不安神経症を改善するプロザックなどの脳内薬品が既に市販されており、精神の病に侵されている人たちは潜在的に多いと思われる。性格や気質には環境などの後天的な要因も存在するが、遺伝的に決定されている部分も大きい。脳内神経伝達物質の量や感受性には個体差があり、それらが性格や気質の形成に重要な役割を果たすことが明らかになってきた。1996年には、新奇性を好む性格に関連する性格遺伝子として、脳内神経伝達物質、ドーパミンのD4受容体遺伝子内の反復配列多型が初めて報告された。その後、不安を感じやすい性格と、セロトニントランスポーター遺伝子の多型との関連も報告されている。

高齡による痴呆症などの中枢神経系の機能変化には個体差が大きく、個人の本

来の性格との関連も無視できない。また高齡化に伴い新奇性を好まなくなるなどの現象から、ドーパミン受容体遺伝子との関連も予想される。これらの性格関連遺伝子の作用が明らかになれば、遺伝子型を調べることにより、痴呆症などの予防や治療の効果を上げることが期待できる。

マウスドーパミンレセプターの相同領域には、ヒトのような多型部位は存在しないことから、脳の研究においては、マウス、ラットなどの実験動物だけでは不十分なことは明白である。長寿科学プロジェクトでは、ヒトと同様、複雑な脳を持つサル類を用いて、痴呆症のモデル開発を目指しており、性格関連遺伝子の作用についても、行動解析や遺伝子解析などの様々な分野からの総合的かつユニークな研究が可能になるとと思われる。本研究では、サルにもヒトのような性格遺伝子の多型は存在するのかを調べ、存在するならば行動や性格に与える影響、高齡化に伴う変化に与える影響を調べ、ヒ

トの老齡モデル動物としてのサル類の位置づけを明らかにすることを目的としている。

B. 研究方法

ドーパミンD4レセプターやセロトニントランスポーターの遺伝子には、遺伝子内あるいはプロモーター領域に反復配列多型が存在する。この多型は、反復配列を含む領域のPCR増幅と電気泳動により、産物の長さの違いとして検出することができる。

ドーパミンD4レセプターでは、細胞内領域に、48塩基（16アミノ酸）を単位とした反復数2~10回の各型が存在し、7回以上の長い型を持つヒトは、TPQ性格テストで新奇性を好む傾向（Novelty seeking）において高得点を示すとの報告がある。またセロトニントランスポーターでは、プロモーター領域の20~22塩基を単位とした反復数16回（長）、14回（短）の2つの型が大多数を占め、短い型のヒトはセロトニントランスポーター遺伝子の発現量が少なく、性格テストで不安を感じやすい傾向（Anxiety）において高得点を示すとの報告がある。京都

大学霊長類研究所の竹中修教授より供与されたDNAを用い、これらの遺伝子の多型領域について、PCR増幅し、塩基配列を決定、比較することにより、霊長類の種内、種間多型について調査した。

C. 研究結果

表1に、ドーパミンD4レセプター多型について、霊長類各種におけるこれまでの報告と本研究での結果をまとめた。反復配列単位の原型に相当する塩基配列が、霊長類に近縁種であるツパイにおいて存在し、原猿の段階で重複が起こり、真猿類でさらに多様な反復数が出現した経緯が明らかになった。

表2に、セロトニントランスポーター多型について、霊長類各種における結果をまとめた。原猿類ではヒトのプライマーによるPCR増幅が困難であったので、調査できなかった。非ヒト霊長類では、ヒトに比べて長い型が多く見つかった。塩基配列の解析により、こうした長い型は反復単位の重複によるものであることが明らかになった。重複箇所はそれぞれの種によって違っていた。

D. 考察

反復数の増減と霊長類進化：ドーパミンD4レセプター遺伝子、セロトニントランスポーター遺伝子の反復領域は、非ヒト霊長類においても存在した。非ヒト霊長類では、ドーパミンD4レセプター遺伝子はヒトよりも短く、セロトニントランスポーター遺伝子はヒトよりも長い傾向にあった。これら遺伝子に関連する性格が非ヒト霊長類にも当てはまるとすると、ヒトは好奇心が強く、心配性になるように進化したといえるかもしれない。これらの遺伝子型の違いが、ヒト以外の霊長類でも性格に関連しているかどうか、今後の課題である。

種内多型の存在：本研究と文献の結果をあわせると、ドーパミンD4レセプターでは12種の非ヒト霊長類において、型判定の結果が明らかになっている。種によってはサンプルの入手が困難なため、調査頭数にばらつきがあるものの、ロリス、ヒヒ、リスザル、テナガザル、オランウータン、ゴリラの7種において、種内多型が認められた。セロトニントランスポーターでは5種の非ヒト霊長類において型判定の結果が明らかになっている。アカゲザル、テナガザル、オランウータン、ゴリラの4種において、種内多型が認められた。種内多型の存在は、この遺伝子がこれらの種において、ヒトの性格のように、何らかの脳機能の個体差に関連している可能性を示唆するものである。

今後の展望：筑波霊長類センターに

において飼養されているカニクイザルにおいて多型を発見できれば、霊長類における性格との関連、老年性疾患との関連において多方向の研究が展開できる。ドーパミンD4レセプターの多型は、カニクイザル15頭の調査では明らかになっていないが、同じオナガザル科のヒヒでは多型が報告されている。またセロトニントランスポーターについては、同じマカク属のアカゲザルにおいて多型が報告されている。今後カニクイザルの調査頭数を増やして多型性の有無を調査し、脳・神経系の構造と機能解析グループとの協力に基づき、学習能力、新奇性探求傾向、不安症傾向などを定量化する指標を開発し、遺伝子型の違いと行動・性格傾向の関連、および老齢ザルにおいて高齢化に伴う行動・性格傾向の変化に与える遺伝子型の影響を調査したいと考えている。

ドーパミンD4レセプターおよびセロトニントランスポーター以外の遺伝子にも、性格と関連する可能性が示唆されているものがある。対象を他の脳内神経伝達物質関連遺伝子にも広げてさらに調査する。また、性格・行動関連遺伝子を含む老人病関連遺伝子を効率よく研究するためには、詳細なヒトーサル比較ゲノム連鎖地図の構築が必要である。遺伝子解析グループとの協力に基づき、霊長類のマイクロサテライトマーカーの整備を行う計画である。

E. 結論

遺伝子の多型が行動や性格に与える

影響、高齢化に伴う変化に与える影響を明らかにするために、霊長類において、ヒトの性格遺伝子多型の存在を調査した結果、霊長類の多数の種において多型の存在が認められ、モデル動物としての応用が期待できることが示唆された。

F. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Inoue-Murayama, M., Takenaka, O., and Murayama, Y.: Origin and divergence of tandem repeats of primate D4 dopamine receptor genes. *Primates* 39: 217-224, 1998.
- 2) Ikura, S., Terao, K., Matsuzaki, I., Inoue-Murayama, M., and Murayama, Y.: U5 monoclonal antibody identifies a novel lymphocyte surface antigen preferentially expressed in human circulating natural killer cells with high cytotoxic activity. *Immunology* 96: 485-490, 1999.

- 3) 井上(村山)美穂・竹中修：遺伝子から見た霊長類の社会行動の進化。科学 69 (4): 393-397, 1999.

2. 学会発表

- 1) 井上-村山美穂、新美陽子、竹中修、村山裕一：テナガザルにおけるドーパミン D4 受容体多型 第 14 回日本霊長類学会大会、岡山理科大学、1998.
- 2) M. Inoue-Murayama, A. Nomura, H. Ide, K. Kimura, K. Tatsuda, H. Takahashi, Y. Nagamine, H. Hanada, T. Takeda, M. Tsudzuki, and S. Ito: Application of chicken microsatellite markers to Japanese quail and Chinese painted quail. XXVI International Conference on Animal Genetics, New Zealand, 1998.
- 3) 野村篤志、木村薫、井手宏美、高橋秀彰、長嶺慶隆、武田隆夫、龍田健、松田洋一、水谷誠、伊藤慎一、井上(村山)美穂：ウズラにおける DNA 多型性マーカーの開発 第 95 会日本畜産学会大会、東京農業大学、1999.

表1 ドーパミンD4受容体遺伝子の反復配列数

分類	種名	調査頭数	反復配列数
食虫目	ツバイ	3	1
霊長目 原猿亜目	ロリス	2	1,2
	ガラゴ	2	2
	レムール	3	2
真猿亜目 オナガザル科	* ヒヒ	7	4,5
	ニホンザル	30	5
	カニクイザル	15	5
オマキザル科	* リスザル	2	5,7,9
テナガザル科	テナガザル	75	4,5,6,7,8
オランウータン科	* オランウータン	2	4,5,6
	* ゴリラ	2	5,6
	* チンパンジー	5	5
ヒト科	* ヒト		2,3,4,5,6,7,8,9,10

*はLivak et al. (1995)、他は本研究のデータによる。

表2 セロトニントランスポーター遺伝子の反復配列数

分類	種名	調査頭数	反復配列数
真猿亜目 オナガザル科	* アカゲザル	154	22,23
テナガザル科	テナガザル	74	15,16,17,21,23
オランウータン科	オランウータン	8	18,20
	ゴリラ	14	16,17,18
	* チンパンジー	2	18
	チンパンジー	16	17,5
ヒト科	* ヒト		14,16,(18,20)

*はLesch et al. (1997)、他は本研究のデータによる。

ヒトの20回型は本研究による日本人集団のデータでは約1%であった。
Lesch et al. (1997)でも18、20回型は稀とされている。

ニホンザルを用いた動脈硬化症モデルの作出に関する研究

鳥居 隆三 (滋賀医科大学医学部附属動物実験施設)

加齢性代謝疾患モデルの一つとして、コレステロール負荷による動脈硬化症の病態モデルをニホンザルで作出することを目的に検討を加えた。オス、ニホンザルに2%コレステロール食を投与することによって、約1~2ヶ月後から血中脂質は、Total cholesterol、LDL-cholesterolの増加、HDL-cholesterolの低下など、ヒトの動脈硬化症と同様の推移を示すことが明らかになった。一方、血管内視鏡によって大動脈内腔を観察した結果、コレステロール食投与前は平滑で弾性に富んでいたのに対して、コレステロール食投与後4ヶ月目には腎動脈、上腸間膜動脈、腹腔動脈等の主要分岐起始部や腰動脈起始部に黄白色の隆起したアテロームを認めた。これらの成績から、2%コレステロール食を与えることによりニホンザルで、動脈硬化症のモデル動物を作出出来ることが確認できた。

さらにアテローム形成が確実に認められた時点でコレステロール食から普通食投与に変えた結果、Total cholesterol値は4ヶ月後にはコレステロール食投与前の値にまで低下したが、血管内腔のアテロームはこの4ヶ月目においては退宿像は認められず、むしろ動脈硬化性病変は周囲の大動脈壁にまでさらに進展し、8~10ヶ月後においても血管内腔は改善がなされていないことを確認した。

キーワード: ニホンザル、動脈硬化症、血管内視鏡、コレステロール

A. 研究目的

動脈硬化に起因する脳、心・血管病変は悪性新生物や免疫不全に起因する疾患と並び、近年増加の一途をたどり、21世紀の高齢化社会に向かいその機序と治療法の確立への要求は医療上大きな問題となっている。欧米に始まる大規模疫学調査は、動脈硬化の危険因子として血中コレステロール値の高値が高血圧、喫煙、耐糖能低下などよりも重要な因子であることを示唆し、動物実験における病理組織学的研究、脂質生化学的研究がそれを支持してきた。しかしながら血中コレス

テロール低下療法が動脈硬化病変の進展を抑制しうるか否かについては未だ結論が出ていない。また、従来からのコレステロール負荷による動脈硬化病変の作成実験で得られた成績は、屠殺後の摘出血管による各個体間での比較観察であるため、コントロール像が無く、生体内での病変の進展を継時的に観察したものではない。即ち、生体内で病変の進展にコレステロールがどのように関与しているか検討するためには、動脈硬化性病変の推移を同一個体について肉眼的に観察することが望まれる。

そこで、ヒトに最も近似する霊長類を用いたコレステロール負荷による動脈硬化症の病態モデルを作成するとともに、独