

Fig. 6 : Correlation between intraocular pressures determined with SCHIOTZ and KEELER.

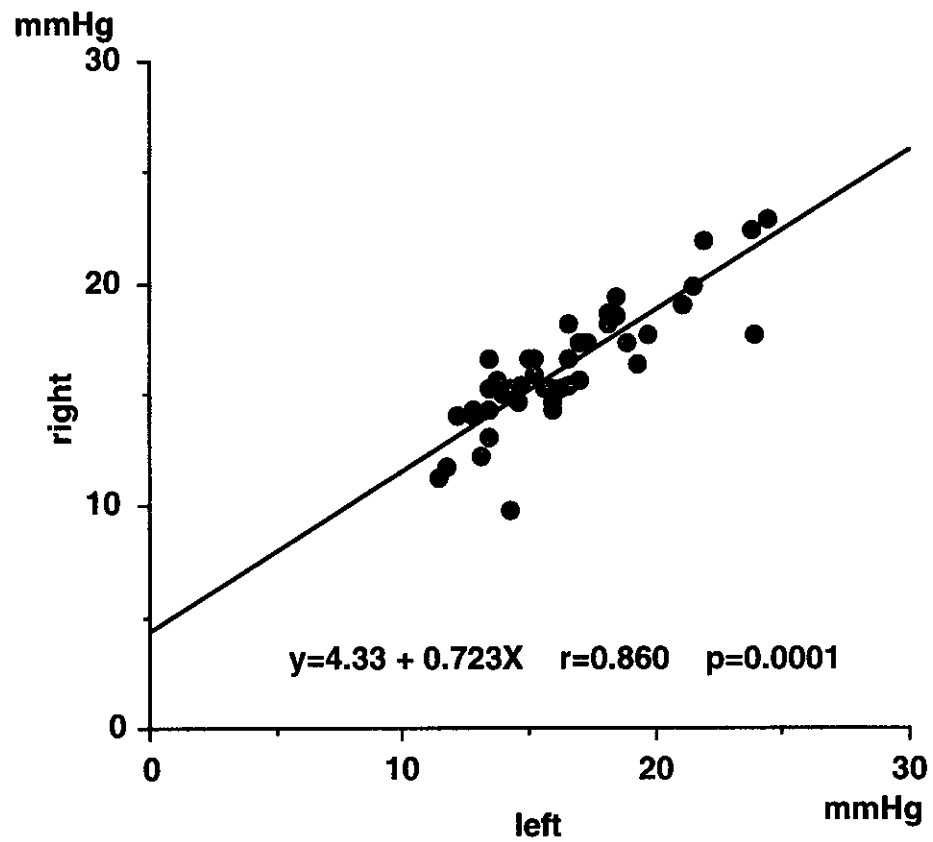


Fig. 7 : Correlation between intraocular pressures in the right and the left eye of the same individual determined with SCHIOTZ.

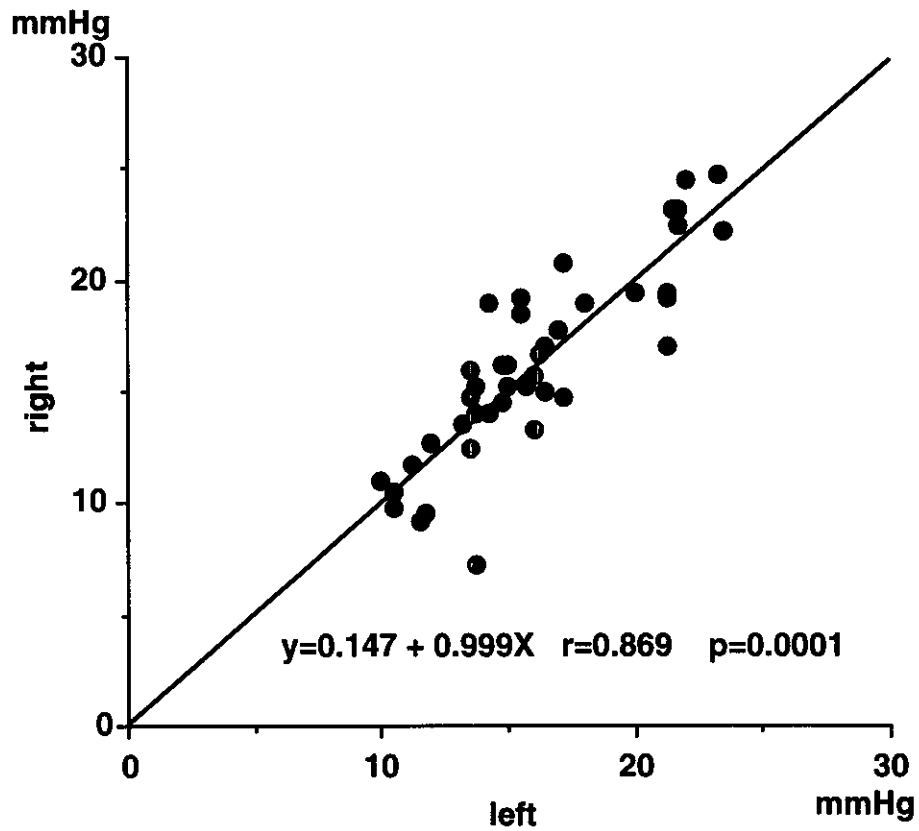


Fig. 8 : Correlation between intraocular pressures in the right and the left eye of the same individual determined with TONO-PEN.

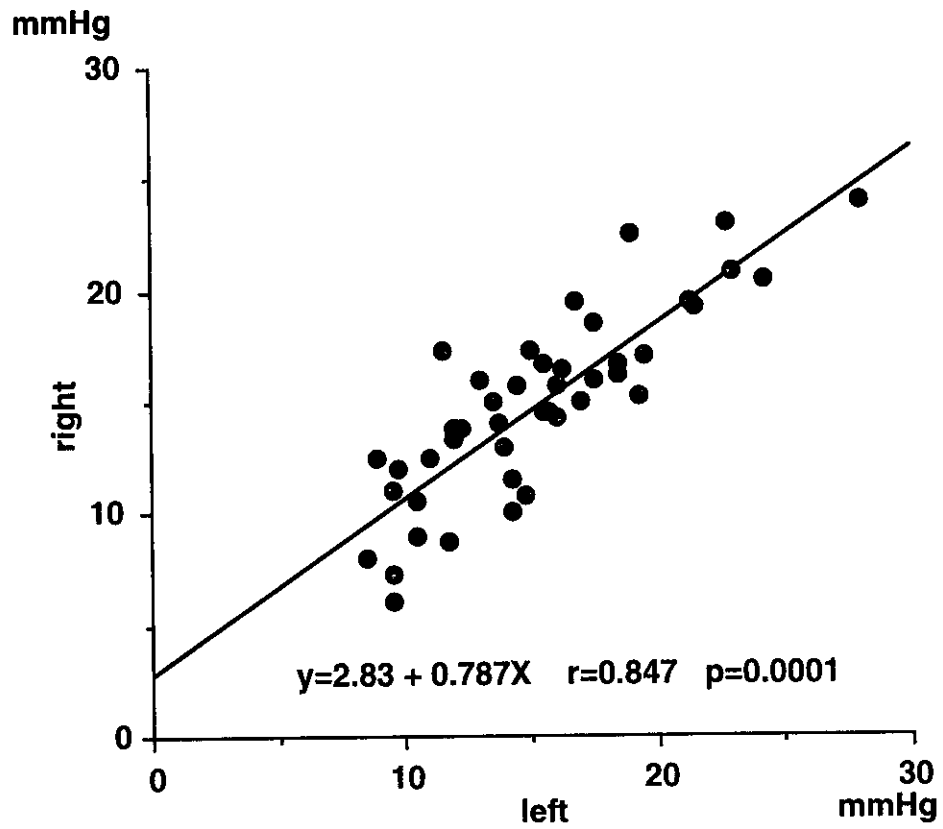


Fig. 9 : Correlation between intraocular pressures in the right and the left eye of the same individual determined with KEELER.

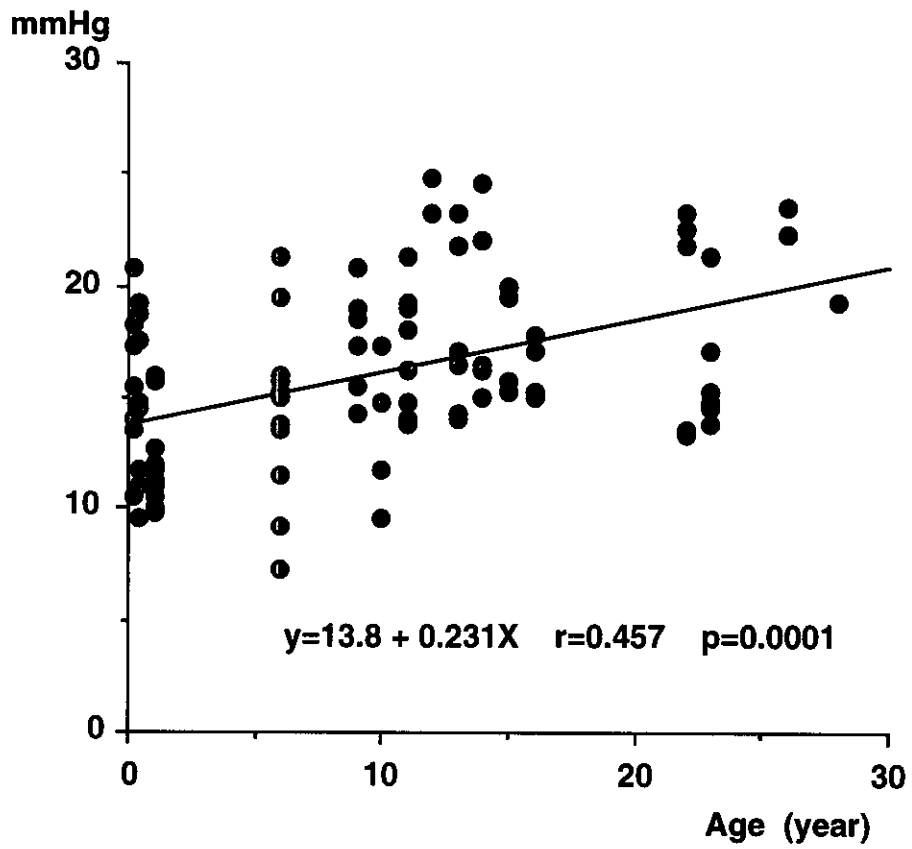


Fig. 10 : Age-related change of intraocular pressures determined with TONO-PEN in laboratory-bred cynomolgus monkeys .

骨粗鬆症動物モデルについての検討
研究者 吉田高志 国立感染症研究所
筑波医学実験用霊長類センター

研究要旨 卵巣摘出（OVX）による閉経後骨粗鬆症動物モデルが現在抱えている問題点について解析を行った。そしてカニクイザルを対象としてその問題点を克服するための方法について検討を加えた。さらに、老齢カニクイザルの骨標本についてその標準像を得るべく検討を加えた。

A. 研究目的

閉経後骨粗鬆症の動物による実験モデルとして、各種の動物種を対象として研究が実施されている。我々も約 15 歳齢のカニクイザルで卵巣摘出（OVX）を行い骨量の低下を実証するとともに、各骨代謝マーカー（骨吸収および骨形成マーカー）の変動について検討を行ってきた。しかし、同じカニクイザルを対象としていても卵巣摘出によって骨量が低下しないという報告もある。さらにアカゲザルやヒヒのみならずビーグル犬やヒツジでも卵巣摘出が実施されているが、卵巣摘出後、顕著な骨量の減少が報告されている例もあれば、影響は認められていないとする報告もあり、同一の動物種を用いていても成績は一致していない。これらの不一致の原因について明らかにすべく、国内においてカニクイザルで卵巣摘出を実施しており、かつ霊長類センターと協力関係に有る二つの研究機関と共同し、卵巣摘出時の個体の年齢と骨との関係について調査を行なうべく情報の収集に努めた。また、カニクイザルでの加齢に伴う骨の変化についての標準像を作成するための活動をおこなった。

B. 研究方法

1) 卵巣摘出時の年齢と骨量の変化との関係の解析

同一の機種（2 波長 X 線骨密度測定装置、Lunar DPX- α ）を用いて卵巣摘出後のカニクイザルの骨量を測定している国内の 3 施設での骨量測定のデータを収集した。霊長類センターでは 11 歳齢から 16 歳齢の動物を、他の 2 施設では 9 歳齢から 12 歳齢、および 6 歳齢から 9 歳齢の動物を対象とした。これらのデータを収集することにより対象動物の年齢は 6 歳齢から 16 歳齢までの範囲を網羅することが出来た。

2) 老齢カニクイザルの骨標準像の作成

13 歳齢から 22 歳齢にわたる雌雄 30 頭の骨標本を収集した。これらの標本を、標準像の作成に供した。

C. D. 研究結果および考察

卵巣摘出による骨粗鬆症モデルの作出を、比較的大型の動物で行っている最近の報告を表にまとめた（表 1）。報告されている動物には、ビーグル犬、ブタ、ヒツジなどとともにヒヒ、アカゲザル、カニクイザルが含まれている。また供試されたときの年齢も若齢から性成熟を完了したのまで多様な個体が対象となっていることが理解できよう。これらのうち約半数の報告書は骨

の組織学的検索を行っているのみなので、骨量の測定を行っているものを抜き出して、実験終了時点での骨量の測定結果を見てみると図1のようになる。卵巣摘出後、対照群と比べて測定値に差が認められた群（図1左）にも、差が認められなかった群（図1右）にも、ビーグル犬およびカニクイザルが含まれている。そのような矛盾した報告のないのは、性成熟をすでに完了した個体を用いて行われているヒツジの場合のみである。ちなみに、ヒツジはいうまでもなく季節繁殖性を呈する動物である。カニクイザルの場合は、同一の研究グループからの報告であっても矛盾した成績が報告されている。ところで、これらの報告から、実験開始時点の、すなわち卵巣摘出時の骨量測定を行っている報告を再度抜き出してみると図2のようになる。この場合、報告はカニクイザルとヒツジのそれらに限られてしまうが、興味深いものが見えてくる。カニクイザルでの報告で実験終了時に対照群と卵巣摘出群とで測定値に差があるとする報告では、9歳齢から15歳齢の動物を対象とした場合の卵巣摘出群骨量が低下している（真の骨量低下）と、5歳齢から8歳齢の動物を対象とした場合の卵巣摘出群で骨量の低下が認められず、対照群で骨量が増加している（見かけの骨量低下）場合とが有ることに気づく。ちなみに、カニクイザルの骨量が最大に（PBM）達する年齢は9歳齢から10歳齢頃にあると推定している。すなわち、PBMに達する以前に卵巣摘出を行ったとき、卵巣摘出群では骨量は低下しないが、成長過程にある対照群で骨量の増加が起こって見かけの骨量低下が卵巣摘出群で検出され、PBMに達した

以降のそれでのみ、卵巣摘出に伴う骨量の減少を惹起できるという仮説が浮かび上がってくる。そして5歳齢から12歳齢のカニクイザルを対象とした報告では、PBM前のものと、後のものとの混在し相殺しあって差が無くなったものと思われる。そして、ヒツジの場合では十分にPBMを過ぎて居るにもかかわらず卵巣摘出による骨量の低下は認められなかったものと判断される（後述）。そこで再び図1に戻ってみると、7.7歳齢のアカゲザル、2歳齢から3歳齢のビーグル犬、14Kgのヒヒ、さらには5歳齢から8歳齢のカニクイザルでは、PBM以前の卵巣摘出であり見かけの骨量低下を見ているにしか過ぎないものと判断される。そしてPBMを過ぎて卵巣摘出を行っているにもかかわらず季節繁殖性のヒツジとビーグル犬において骨量低下が認められなかったのは、これらの動物種が一年のある時期に卵巣機能が停止する、すなわち生理的卵巣摘出状態なるために、そのような状態で骨量が低下することを阻止する機構を内蔵しているためであると考えることが出来る。以上の仮説の前半部、卵巣摘出時期と骨量の関係を模式化したものが図3である。この仮説に対して6歳齢から16歳齢でのカニクイザルのデータを集めて解析を加えようとする訳である。解析は、現在、進行中である。さらに、老齢カニクイザルにおける骨標本の標準像を作るべく、解析も進行中である。

E. 結論

閉経後骨粗鬆症の動物モデルを作るにあたって、骨量の最大値（PBM）に達した後

に卵巣摘出（OVX）を行うことが必須の

ことであり、このことが必ずしも十分に考慮されていないことがこれまでの報告に見られる矛盾の原因であると判断される。そして、モデルとして季節繁殖性の動物種は不適切であり、現在のところ適切な動物種としてカニクイザルのみを上げることができる。

F. 研究発表

1. 論文発表

Yoshida, T., Cho, F. and Yoshikawa, Y.: Artificially Induced Osteoporosis in Cynomolgus Monkey (*Macaca fascicularis*). In *Advances in Comparative Endocrinology*. Eds. by Kawashima, S. and Kikuyama, S. Monduzzi Editore, Italy, 1799-1803, 1997.

吉田高志：霊長類の骨粗鬆症モデル。実験動物ニュース。47：37-42 (1998)

吉田高志：サル類での骨減少症モデル—閉経期と思春期とでの骨量減少—。霊長類研究。14：121-127 (1998)

2. 学会発表

吉田高志：成長・老化における最

近の知見と問題点—サル類の成長と老化。第30回成長談話会大会、1998年10月、前橋。

吉田高志：エストロゲンと老化—骨量低下とエストロゲン。第13回下垂体研究会学術集会、1998年8月、埼玉。

Yoshida, T., Shimizu, M., Tsunemi, K. and Cho, F., Osteoporosis and Changes in Serum and Urinary Biochemical Markers of Bone Turnover After Ovariectomy in the Cynomolgus Monkey. The Use of Dual Energy Absorptiometry (DEXA) in Nonhuman Primate Bone and Mineral Research. DEXA Symposium in Seattle. Seattle. 1998 March.

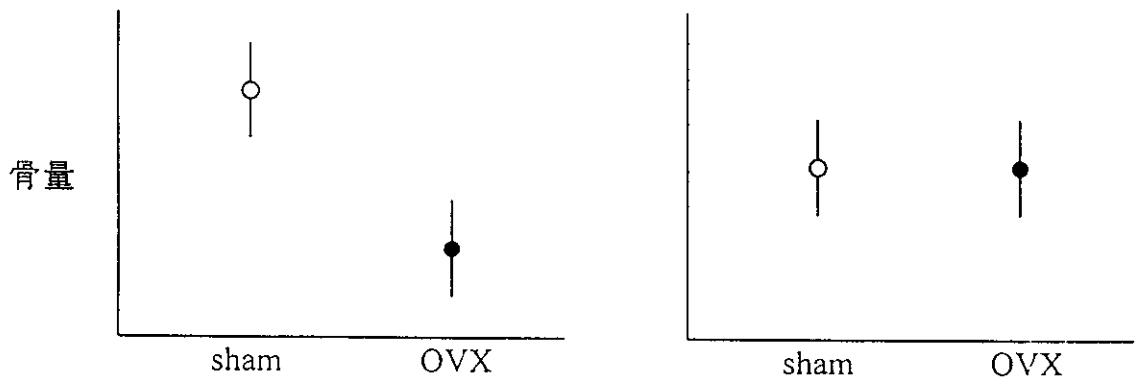
Yoshida, T., Cho, F. and Yoshikawa, Y. Artificially Induced Osteoporosis in Cynomolgus Monkey (*Macaca fascicularis*). 13th International Congress of Comparative Endocrinology. Yokohama. 1997 November.

G. 知的所有権の取得状況

なし

表1 OVXによる骨粗鬆症の動物モデル作製の試み

Animal	Age at OVX	Researchers	Publication
Beagle dog	18M	Boyce et al , 1990	JBMR
	21M	Motoie et al , 1995	JBMR
	2-3Y	Yamaura et al , 1993	Calcif Tissue Int
	4Y	Shen et al , 1992	Bone
	7-9Y	Wilson et al. , 1998	Calcif Tissue Int
	full-grown adult	Monier-Faugere 1996	JBMR
Sow	9M	McAfee et al. , 1991	Spine
	35M	Scholz-Ahrens et al , 1996	Z Ernährungswiss ibid
Minipig	4M	Mosekilde et al , 1993	Bone
Ewe	3-5Y	Turner et al , 1995	Bone
	4-5Y	Turner et al , 1995	Bone
	5-8Y	Geusens et al , 1996	Calcif Tissue Int
	7-9Y	Turner et al , 1995	Bone
	7.6Y	Hornby et al , 1995	Bone
Baboon	adult	Jerome et al , 1986	Calcif Tissue Int
Rhesus M.	adult	Lengcope et al , 1989	Bone
Cynomolgus M	5-8Y	Jerome et al , 1997	Bone
	5-12Y	Jerome et al , 1995	Bone
	9.5Y	Lundon & Grynpas 1993	Bone
	9-15Y	Jerome et al , 1995	Calcif Tissue Int
	4-14Y	Jerome et al , 1994	JBMR
	adult	Jerome et al , 1994	JBMR



Rhesus M.	7.7 Y	Lengcope et al.	Beagle dog	4 Y	Shen et al. *
Beagle dog	2-3 Y	Yamaura et al.	Ewe	4-5 Y	Turner et al.
Baboon	14 kgBW	Jerome et al.	Ewe	7-9 Y	Turner et al.
Cynomolgus M.	4-14 Y	Jerome et al.	Ewe	7.6 Y	Hornby et al.
Cynomolgus M.	adult	Jerome et al.	Cynomolgus M.	5-12 Y	Jerome et al.
Cynomolgus M.	9-15 Y	Jerome et al.	Ewe	5-8 Y	Geusens et al.
Cynomolgus M.	5-8 Y	Jerome et al.			

図1 OVXによる骨粗鬆症モデルの作出

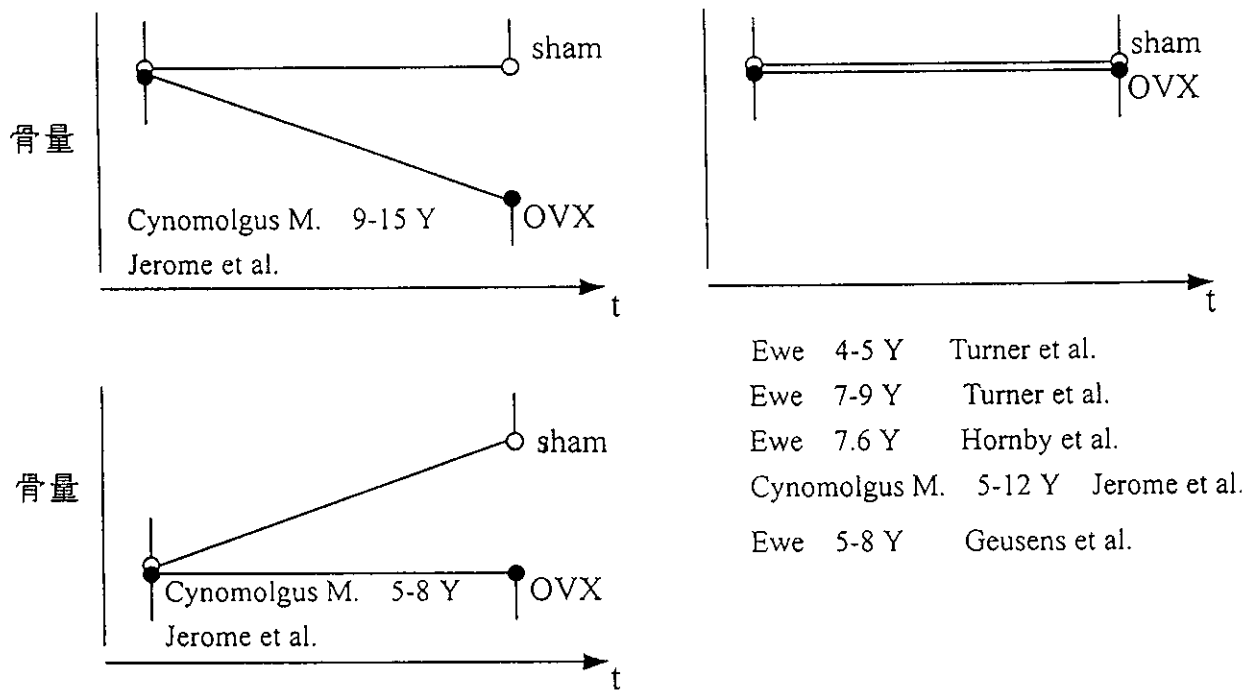


図2 OVXによる骨粗鬆症モデルの作出

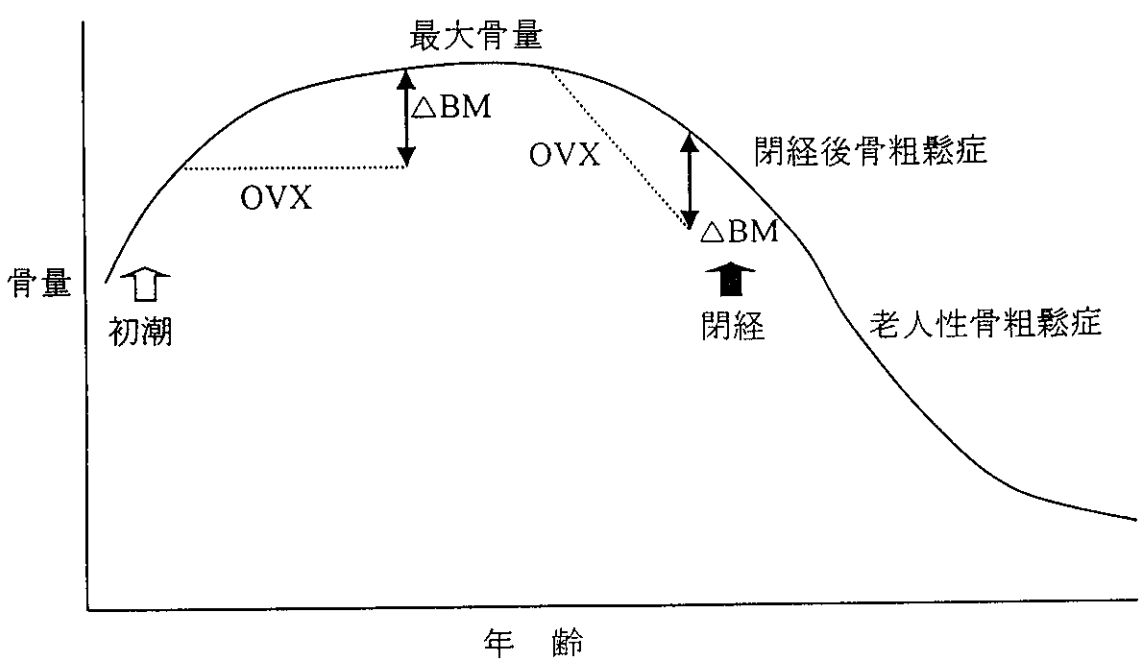


図3 骨量減少症とその動物モデル

老齡カニクイザルをモデルとした老化と免疫機能の変化に関する研究

分担研究者 寺尾恵治 (国立感染研・筑波霊長類センター、室長)

これまでにカニクイザルではCD4とCD8の両者を同時に発現しているT細胞が加齢に伴って末梢血中に出現することから、これらの細胞が胸腺外分化T細胞である可能性を考え、解析を進めてきた。今年度は末梢血中のCD4+/CD8+ (DP) T細胞の機能について調査した。末梢血T細胞をCD4とCD8の発現からCD4+/CD8- (CD4sp)、CD4-/CD8+ (CD8sp) およびCD4+/CD8+ (DP) の3者に分けてそれぞれをFACSで分取した後、種々の機能解析を行った。PHAおよびConAで誘導される幼若化反応および抗CD3抗体で誘導される幼若化反応には3者の間で有意な差は認められなかった。PWMで誘導されるB細胞のIgG産生でのHelper機能ではDPはCD4spとCD8spの中間のHelper機能を示した。一方、CD3抗体を介した細胞傷害活性ではDPはCD8spとほぼ同等な活性を示した。このことから、加齢に伴ってカニクイザルの末梢血中に出現するDP細胞がHelper機能と細胞傷害機能との両者を備えるきわめて特異的なDual Functional T細胞である可能性が示唆された。

キーワード：カニクイザル、CD4+/CD8+ Tリンパ球、胸腺外分化T細胞、Helper機能、細胞傷害活性

A. 研究目的

多くの哺乳動物では、胸腺細胞に特有の表現型を有する細胞が末梢で見いだされないことから、胸腺がT細胞の成熟分化の場とみなされ、T細胞の胸腺外分化機構については未だ明確にされていない。一方、老化に伴うT細胞の質的、量的変化が胸腺の萎縮と関連していることが指摘されており、ヒトおよびマウスの老齡個体では胸腺機能の低下を反映した胸腺外分化T細胞の出現が報告されている。我々はカニクイザルの末梢リンパ球中に加齢に伴い胸腺細胞と同様CD4とCD8の両者を発現している細胞(DP)が比較的高率に検出されることを見だし、末梢DP細胞が老化に伴って出現してくる胸腺外分化T細胞であるという仮説のもとに解析をすすめている。今年度は、末梢DP

細胞の機能を把握する目的で、単離したDP細胞、CD4陽性細胞およびCD8陽性T細胞について代表的なT細胞機能の比較を行った。

B. 材料および方法

筑波霊長類センターで繁殖育成された成熟カニクイザルで、DP細胞レベルの高い個体から採血し、CD4+/CD8- (CD4sp)、CD4-/CD8+ (CD8sp) およびCD4+/CD8+ (DP)細胞をFACSでソーティングし、以下に示す機能試験に用いた。ソートアウトした細胞の純度はいずれも99%以上であった。

1) マイトジェンで誘導される幼若化反応：
10%FCS-RMPI 培地に浮遊させたCD4sp、CD8sp、DP細胞を $10^5/100\mu\text{l}$ の割合で96穴平底培養プレートに分注し、最終濃度が $10\mu\text{g}$ および $5\mu\text{g}$ となるようPHAおよびConAを添加した。3日間培養後 $10\mu\text{Ci}$ の ^3H -thymidine (TdR)を添加しさらに1日培養した細胞をガラスフィルター上に回収し、細胞内に取り込まれたTdR

の量を液体シンチレーションカウンターで測定した。

2) CD3抗体で誘導される幼若化反応: 10 μ g/mlの濃度のCD3抗体溶液を100 μ l/wellの割で96穴平底培養プレートに添加し、4Cで一晩反応させCD3抗体を結合させた。10%FCS-RMPI培地に浮遊させたCD4sp、CD8sp、DP細胞を10⁵/100mlの割でCD3固相化プレートに分注し、日間培養した。10 μ Ciの³H-thymidine (TdR)を添加しさらに1日培養した細胞をガラスフィルター上に回収し、細胞内に取り込まれたTdRの量を液体シンチレーションカウンターで測定した。

3) PWMで誘導されるB細胞のIgG産生系でのHelper機能: 純度90%以上のCD20陽性B細胞を磁気ビーズによるソーティングで回収した。3x10⁴/100 μ lの純化B細胞を平底培養プレートに分注し、これにB細胞の25%および100%の細胞数になるようCD4sp、CD8sp、DP細胞を添加し、10 μ g/mlのPWM存在下で1週間培養した。培養後培養上清中のIgG量をサンドイッチELISA法で定量した。

4) CD3抗体を介した細胞傷害活性: 2x10⁶のマウス由来細胞株P815と⁵¹Cr溶液とを混合し、37Cで3時間反応させ細胞をラベルした。ラベル細胞と20mg/mlのCD3抗体とを混合し、4Cで2時間反応させP815細胞にCD3抗体を結合させた。96穴丸底培養プレートに5x10³のCD3結合P815細胞とCD4sp、CD8sp、DP細胞をそれぞれE/T比が25、12.5、6.4、3.2、1.6となるよう添加し、37Cで4時間反応させた。反応後培養上清中に遊離した⁵¹Crの量をガンマカウンターで測定した。

C. 結果

1) PHAおよびConAで誘導される幼若化反応: 図1左にDP、CD4sp、CD8spおよびPBMC

を用いた幼若化反応の結果を示す。図に示すように、PHAに対する反応性はCD4sp>CD8sp=DPであり、ConAに対する反応性はCD8sp>CD4sp=DPであった。すなわち、DPはPHA、ConAいずれの場合もそれぞれCD8spおよびCD4spと同様な反応性を示したが、3者の間で著しい差は認められなかった。

2) CD3抗体で誘導される幼若化反応: 固相化したCD3抗体で誘導されるT細胞レセプターを介した幼若化反応を比較した結果を図1右に示す。CD4spの反応性が若干低い傾向があるが、3種のT細胞の間にT細胞レセプターを介した幼若化反応に著しい差は認められなかった。

3) PWMで誘導されるB細胞のIgG産生系でのHelper機能: PWM存在下で自己B細胞とそれぞれのT細胞分画を共培養して得た培養上清中のIgG量を図2に示す。CD4spを添加した場合には添加細胞数の増加に伴ってIgG合成量が増加し、100%添加群では500ng/ml以上のIgGが回収された。一方、CD8sp細胞を添加した場合にはIgG合成はほとんど見られないが、DP細胞を添加した場合には100%添加群でCD4spの1/3量のIgG産生が認められた。

4) CD3抗体を介した細胞傷害活性: 図4にCD3抗体結合P815細胞を標的としたCD3を介した細胞傷害活性を3種のT細胞で比較した結果を示す。CD8sp細胞は期待通り高い細胞傷害活性を示すが、CD4sp細胞には活性がほとんど見られなかった。興味あることにDP細胞を添加した場合にはCD8spとほぼ同等な細胞傷害活性が認められた。

D. 考察

T細胞の成熟・分化の場である胸腺は出生直後に最大の相対重量を示し、思春期に絶対重量が頂点に達するがその後は加齢に伴って退縮

し、老年期には組織学的にも実質細胞がほとんど認められなくなることが知られている。一方、末梢血中のT細胞のレベルには老年期においても著しい変化は認められない。老年期での免疫機能を解析する上で重要なことは、胸腺という成熟・分化の場を失った後、末梢のT細胞はどこから供給されるのかという問題である。事実、加齢に伴う免疫機能の変化の中ではT細胞の機能変化が顕著であることから、老化に伴うT細胞機能の変化が胸腺退縮後のT細胞の起源と密接に関連している可能性が極めて高い。しかしながら、これまでのところヒトでは胸腺退縮のT細胞の起源について「胸腺外T細胞分化機構」が推測されているものの、その実態はいまだに明らかにされていない。我々はこれまでにカニクイザルで胸腺の退縮が完了する10歳前後から末梢血中にCD4とCD8の両抗原を同時に発現しているDP細胞が著明に増加することを見だし、これらの細胞がヒトで推測されている「胸腺外分化T細胞」である可能性を考え解析を進めてきた。

カニクイザルの末梢DP細胞が胸腺外分化T細胞であるとすれば、その表現型と機能は重要な解析対象となる。これまでに、末梢DP細胞はメモリータイプの表現型を示すT細胞であることを明らかにしている。DP細胞が胸腺外分化T細胞であるとすれば、胸腺内でのPositiveもしくはNegative selectionの過程を経ていない可能性が高いが、マイトジェンやCD3を介した刺激に対する反応性には他のT細胞と差は見られないことから、機能的な修飾を受けているとは考えがたい。一方、今回の結果はカニクイザルの末梢DP細胞が、細胞傷害性機能(CD8機能)とヘルパー機能(CD4機能)の両者を合わせ持つ、ユニークな成熟記憶T細胞である可能性を示している。従来CD4/TおよびCD8/Tの2種類のT細胞はそれぞれ、Helper機能と細

胞傷害活性という異なった機能を担うとされてきたが、最近ヒトで細胞傷害活性を示すCD4/T細胞やHelper機能を示すCD8/T細胞の存在が報告されている。これら特異的な機能を示す細胞群はマイナーな集団とされているが、今回機能が明らかになったカニクイザルのDP細胞は末梢血リンパ球中の10%前後を占める細胞群である。胸腺外分化T細胞の機能を推測する上で今回のDual Functionという事実は重要な知見と考えられる。今後は、今回明らかになったDP細胞の機能の根拠となる機能分子(サイトカイン、細胞傷害性因子、等)をコードするmRNAおよびタンパク分子の存否を調査して、DP細胞の機能について詳細に検討する必要がある。

E. 結論

カニクイザル末梢血中のCD4+/CD8+ (DP) T細胞の機能を調査して以下の結果を得た。

1) マイトジェンおよびCD3抗体で誘導される幼若化反応性にはDP、CD4sp、CD8sp細胞の間に著しい差は認められなかった。

2) PWMで誘導されるB細胞のIgG合成に対するHelper機能では、DP細胞はCD4sp細胞の1/3の活性を示した。

3) CD3を介した細胞傷害試験ではDP細胞はCD8sp細胞と同程度の細胞傷害活性を示した。

これらの結果から、カニクイザルの胸腺外分化T細胞と考えられる末梢DP細胞は、メモリータイプの表現型を持ちHelper機能と細胞傷害活性を同時に示す特異的なDual Functional T細胞である可能性が高いと判断される。

F. 研究発表

1. 論文発表

Nam, KH., Akari, H., Terao, K., Ohto, H., Itagaki, S. and Yoshikawa, Y.: Age-dependent remodeling of peripheral blood CD4+ CD8+ double-positive T lymphocytes in cynomolgus monkeys. *DEVELOPMENT AND COMPARATIVE IMMUNOLOGY*, 22: 239-248 (1998)

Nam, KH., Akari, H., Terao, K., Itagaki, S., Yoshikawa, Y.: The age-related phenotypic alterations of T cell subsets in cynomolgus monkeys. *EXPERIMENTAL ANIMALS*, 47: 159-166 (1998)

寺尾恵治：老齢カニクイザルの免疫機能-胸腺外分化T細胞の表現型と機能-、*霊長類研究*, 14: 135-140 (1998)

2. 学会発表

村山裕一、寺尾恵治、井上-村山美穂、カニクイザルにおけるアポトーシス関連分子、Fasの構造と機能、第14回日本霊長類学会、岡山、1998

柴田宏昭、寺尾恵治、南 基煥、大谷 功、吉川泰弘、SIV感染初期におけるカニクイザル抹消リンパ球のアポトーシス、第14回日本霊長類学会、岡山、1998

Nam, KH., Illes, Z., Yamanaka, A., Shibata, H., Terao, K., Yoshikawa, Y. and Yamamura, T.: Detection of macaque monkey T cell clonality using single-strand conformation polymorphism (SSCP). 28th Annual Congress of Immunology, December, 1998, Kobe

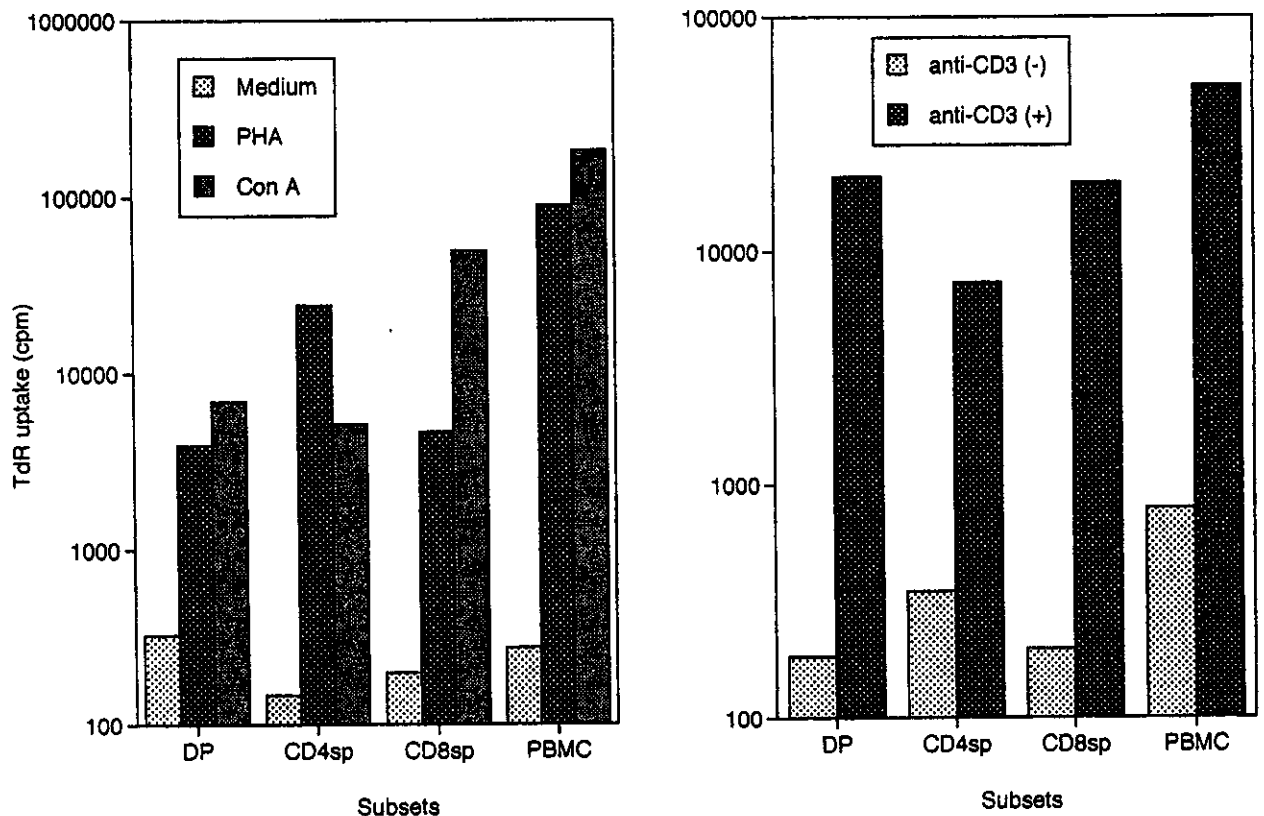


Figure 1: Mitogen (Left) and anti-CD3 antibody-induced blastogenesis in three T cell subsets

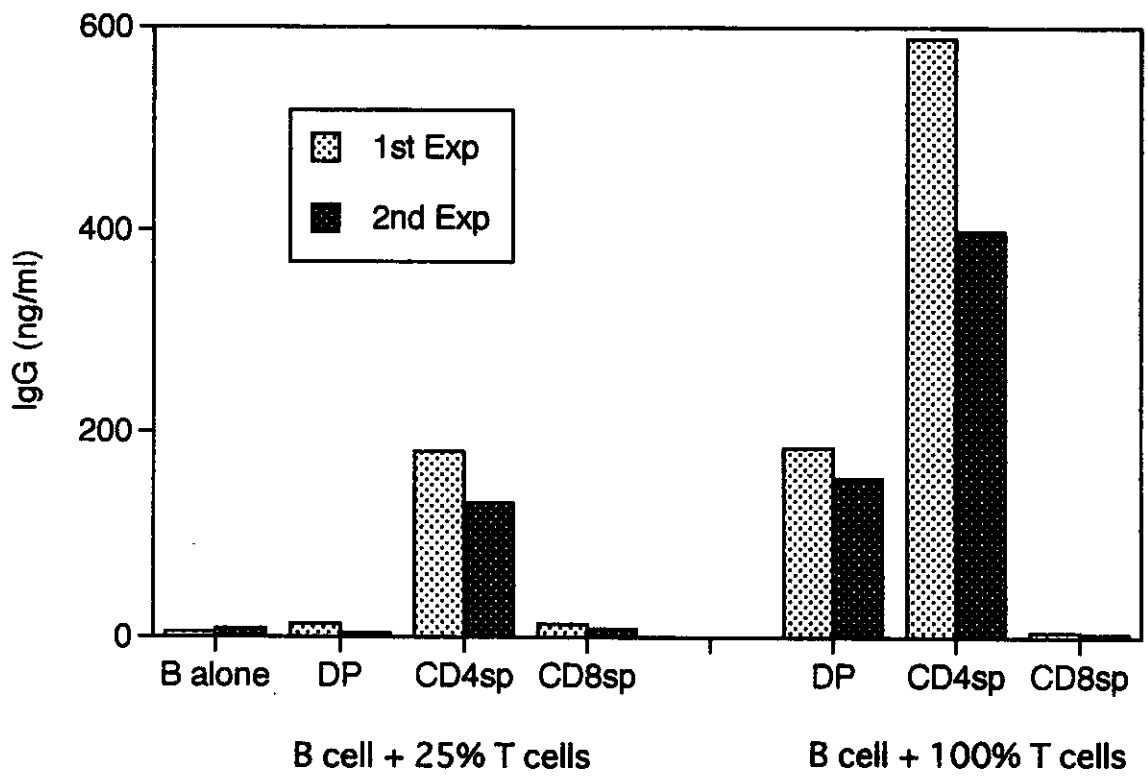


Figure 2: Helper function of three T cell subsets in PWM-induced IgG synthesis

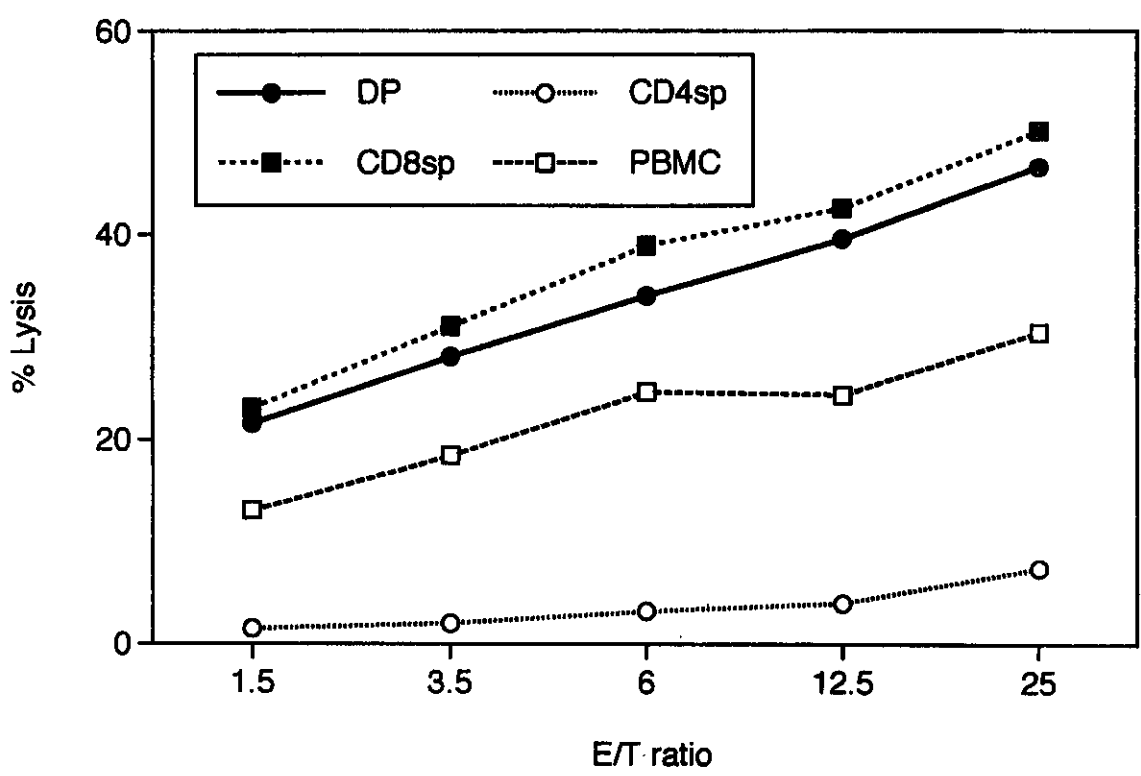


Figure 3: CD3-redirected cytotoxicity in three T cell subsets

長寿科学研究研究基盤高度化に関する研究

-カニクイザルの脳主要部位の cDNA ライブラリーの構築と 核 DNA バンクの整備-

寺尾 恵治 (国立感染研・筑波霊長類センター)

菅野 純夫 (東大・医科研)

中村紳一朗 (日本獣医畜産大・家畜病理)

村山 美穂 (岐阜大・農・多様性生物)

橋本 雄之 (国立感染研・遺伝子資源室)

吉川 泰弘 (東大・実験動物)

長寿科学研究の有用なモデル動物としてのカニクイザルの研究基盤の高度化を目的として、主要臓器の cDNA ライブラリーの構築を行うとともに、家系の明らかな個体の核 DNA のバンク化を試みた。今年度は脳の主要部位別の cDNA ライブラリーの構築を目的として、安楽殺ザルの新鮮脳から主要 13 部位を分別し、それぞれの組織から RNA の抽出を試みた。その結果、前頭葉、側頭葉、小脳の各部位においては、完全長 RNA の比率が 40%以上でクローン数が 10000 以上の cDNA ライブラリーが構築できた。また、筑波霊長類センターの繁殖育成コロニーのカニクイザルを対象として、繁殖群の基となった野生由来ザルを含め約 800 頭のサルの末梢白血球から核 DNA を抽出し、DNA バンクの基礎を確立することができた。今年度は 3 件、計 50 個体の DNA の供与を行った。

キーワード：カニクイザル、cDNA ライブラリー、脳機能、DNA バンク

A. 目的

霊長類をモデルとした老化研究では、研究基盤の整備と高度化が必須の条件となる。特に cDNA ライブラリーの整備は、1) ヒトで見いだされている老人病関連遺伝子の *in vivo* 解析を行うための基盤整備、2) ヒトでの整備が遅れている組織および臓器の cDNA ライブラリーの構築と、未知の老人病関連遺伝子の検索、3) 老人病関連遺伝子を標的とした新規遺伝子治療法の開発、という観点から重要な課題となっている。本研究グループでは、ヒトでは完全長 RNA の回収が困難な臓器を対象として、霊長類の

cDNA ライブラリーを構築するとともに、血縁の明らかなカニクイザルの核 DNA バンクを確立することにより、サルを用いた疾患関連遺伝子の解析に必須な研究基盤の高度化をはかることを最終目的としている。

B. 材料および方法

ヒトでは完全長 RNA の抽出が不可能な臓器として中枢神経系をとりあげ、今年度は、カニクイザル脳の主要 13 部位（前頭葉、側頭葉、頭頂葉、後頭葉、扁桃核、海馬、海馬傍回、視床、中脳（黒質）、小脳、視床下部、下垂体、延髄）の新鮮材料からの cDNA ライブラリーの構築を試みた。

10ml のカニクイザル末梢血から白血球分画を回収し、-80C に保存した。これを出

発材料として、核 DNA を抽出、保存し、要に応じて申請者に分与するシステムの構築を試みた。

C. 結果および考察

カニクイザル脳の主要 13 部位からの完全長 RNA 回収率を表 1 に示す

今回の結果から、前頭葉、側頭葉、小脳の cDNA ライブラリーは確立できたと判断される。その他の部位での完全長 RNA 回収率が低かった理由として、1 頭の個体の脳組織を細分化したために RNA 抽出に必要な十分な組織量が得られなかったことと、予想以上にサル脳の RNA 量が少なかったことが考えられる。今後は部位別の細分化を避け、十分量の RNA が回収できる部位の仕分けを行い、完全長の割合が 70% を越える RNA での cDNA ライブラリーの構築を再度試みる必要がある。

末梢白血球由来の核 DNA バンクについては順調に採材を継続し、現在 1400 頭のカニクイザル、200 頭のみドリザル、100 頭のリスザルの白血球分画を凍結保存するとともに、全頭の野生由来個体を含め、800 頭分の DNA 化を終了している。なお、これまでに所外を含め計 3 件、50 サンプルを供給した。

D. 結論

カニクイザルの脳の 13 部位から cDNA ライブラリーの構築を試みた結果、前頭葉、側頭葉、小脳の各部位では完全長 RNA が

40% 以上でクローン数も 1 万以上のライブラリーが構築できた。

筑波霊長類センターの繁殖コロニーを構成するカニクイザルから末梢白血球由来の DNA バンクの構築を試み、野生由来のファウンダーを含め 800 個体で DNA 化を終了した。今年度は 3 件の分与依頼に応じ、計 50 個体分の DNA の供与を行った。

E. 研究発表

1. 論文発表

なし

2. 学会発表

藤井敦子、鈴木通弘、小野文子、寺尾恵治、吉川泰弘、国枝哲夫：ヒトマイクロサテライト用プライマーを用いたカニクイザルの染色体連鎖地図の構築、第 45 回日本実験動物学会、1998 年、松本

長田直樹、平井百樹、寺尾恵治、森 祐介、早坂郁夫：染色体 DNA 複製タイミングのヒトと近縁霊長類における比較—FISH 法による解析—、第 52 回日本人類学会、1998 年 9 月、札幌

坂手龍一、平井百樹、寺尾恵治、森 祐介、早坂郁夫、染色体複製バンドパターンによるヒトと近縁霊長類との比較研究、第 52 回日本人類学会、1998 年 9 月、札幌

肥田宗友、鈴木 穰、寺尾恵治、菅野純夫：マカク脳の部位特異的 cDNA ライブラリーの作製と解析、第 21 回日本分子生物学会、1998 年 12 月、横浜

Table 1: Characteristics of RNA extracted from major brain regions of cynomolgus monkey

Region	Full length RNA(%)	No. of Clone	Note
Frontal lobe	40%	>10000	OK
Temporal lobe	50%	>10000	OK
Parietal lobe	20-30%	>5000	Contamination*
Occipital lobe	Under estimation		
Amygdala	Under estimation		
Hippocampus	Few	1500	
Parahippocampal gyrus	Under estimation		Contamination
Thalamus	Few	1500	
Hypothalamus	Few	1500	
Mesencephalon	Few		
Cerebellum	40%	>10000	OK
Pituitary gland	not many		Contamination
Medulla oblongata	Few		

*: Contamination of genomic DNA

19980155

これ以降は雑誌/図書等に掲載された論文となりますので「研究成果の刊行に関する一覧表」をご参照ください。

「研究成果の刊行に関する一覧表」

Nam KH, Akari H, Terao K, Itagaki S, Yoshikawa Y. **Age-related changes in major lymphocyte subsets in cynomolgus monkeys.**

Exp Anim. 1998 Jul;47(3):159-66.

Nam KH, Akari H, Terao K, Ohto H, Itagaki S, Yoshikawa Y. **Age-dependent remodeling of peripheral blood CD4+ CD8+ T lymphocytes in cynomolgus monkeys.**

Dev Comp Immunol. 1998 Mar-Apr;22(2):239-48.

Nakamura S, Nakayama H, Goto N, Ono F, Sakakibara I, Yoshikawa Y. **Histopathological studies of senile plaques and cerebral amyloidosis in cynomolgus monkeys.**

J Med Primatol. 1998 Oct;27(5):244-52.

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 14: 83-87, 1998.

Akari H, Terao K, Nam KH, Adachi A, Yoshikawa Y. **Comparative analysis of human and macaque monkey CD4: differences in formaldehyde lability and conformation.**

Exp Anim. 1998 Jan;47(1):23-7.

Liang JH, Sankai T, Yoshida T, Cho F, Yoshikawa Y. **Localization of testosterone and 3beta-hydroxysteroid dehydrogenase/delta5-delta4-isomerase in cynomolgus monkey (*Macaca fascicularis*) testes.**

J Med Primatol. 1998 Feb;27(1):10-4.

Ogonuki N, Sankai T, Cho F, Sato K, Yoshikawa Y. Comparison of two methods of assisted fertilization in cynomolgus monkeys (*Macaca fascicularis*): intracytoplasmic sperm injection and partial zona dissection followed by insemination. Hum Reprod. 1998 Sep;13(9):2555-60.

Tsuchiya H, Ogonuki N, Yoshida T, Cho F, Yoshikawa Y, Ito M, Sankai T. Changes in electrical impedance of vaginal mucus during the menstrual cycle in cynomolgus monkeys (*Macaca fascicularis*). Lab Anim Sci. 1998 Oct;48(5):535-7.

加藤茂孝, 新井智子, 源原博子, 福島雅夫. 【生ウイルスワクチンの動物モデル, ヒトの感染病理】 風疹ウイルス母子感染の機構とカニクイザルモデル(解説/特集) 臨床とウイルス(0303-8092)26 巻 1 号 Page7-12(1998.03)

Akari H, Yagita H, Nishida T, Nakamaru K, Terao K, Yoshikawa Y, Adachi A. Selective expression of beta 7 integrin on lymphocytes undergoing apoptosis in lymphoid tissues. Biochem Biophys Res Commun. 1998 Mar 17;244(2):578-82.

Akari H, Ono F, Sakakibara I, Takahashi H, Murayama Y, Hiyaoka A, Terao K, Otani I, Mukai R, Adachi A, Yoshikawa Y. Simian T cell leukemia virus type I-induced malignant adult T cell leukemia-like disease in a naturally infected African green monkey: implication of CD8+ T cell leukemia. AIDS Res Hum Retroviruses. 1998 Mar 1;14(4):367-71.

小山高正, 寺尾恵治. 老齡ザルの心理・社会的ストレスに対する反応特性. 霊長類研究 14: 109-114, 1998.

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.

Inoue-Murayama M, Takenaka O, Murayama Y. Origin and divergence of tandem repeats of primate D4 dopamine receptor genes. Primates. 1998 April; 39(2):217-224.