

Figure 3: Recovery of CD34+ cells between bone marrow and leucoapheresis

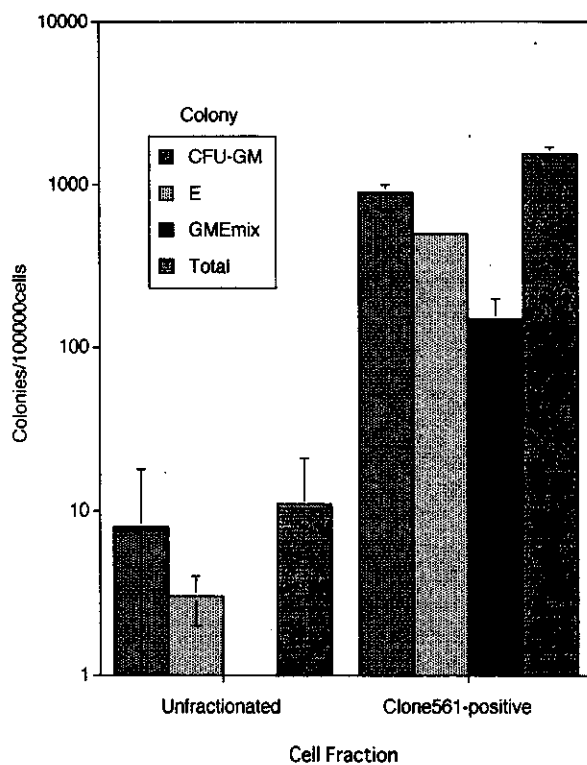


Figure 4: Colony assay with CD34+ cells

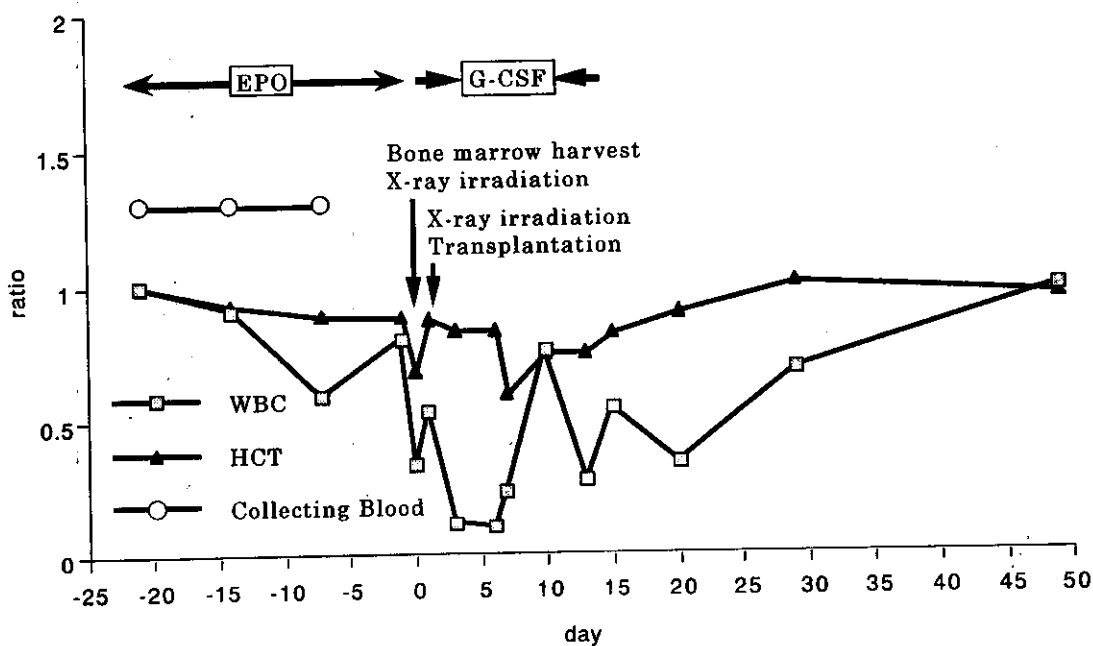


Figure 5: Bone marrow transplantation (Whole bone marrow)

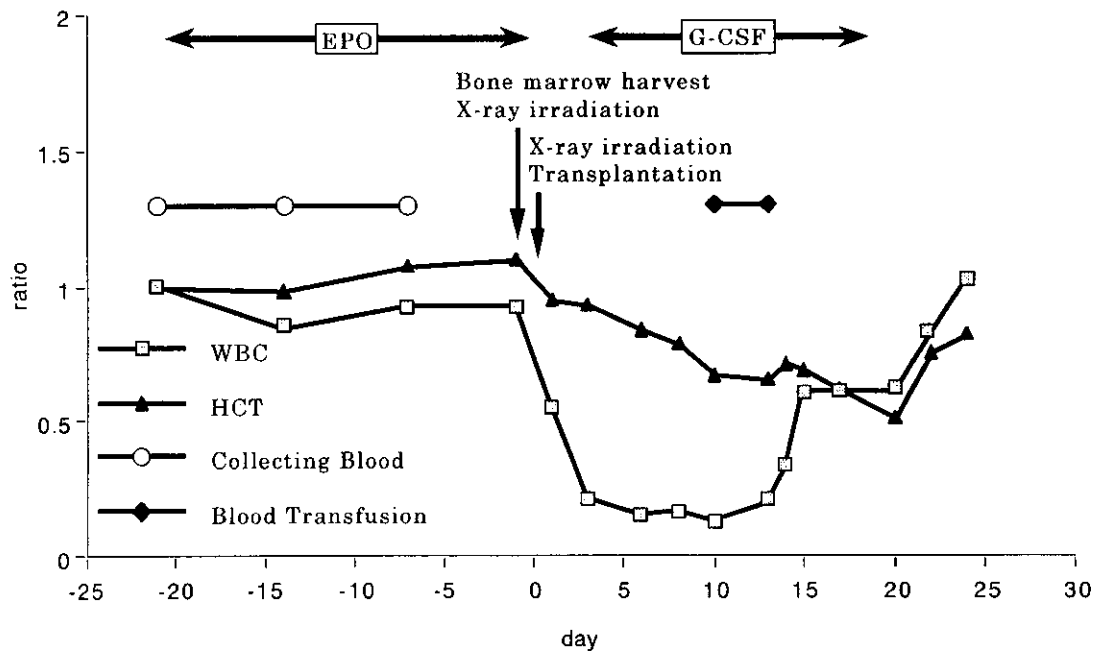


Figure 6: Bone marrow transplantation (CD34+ stem cells)

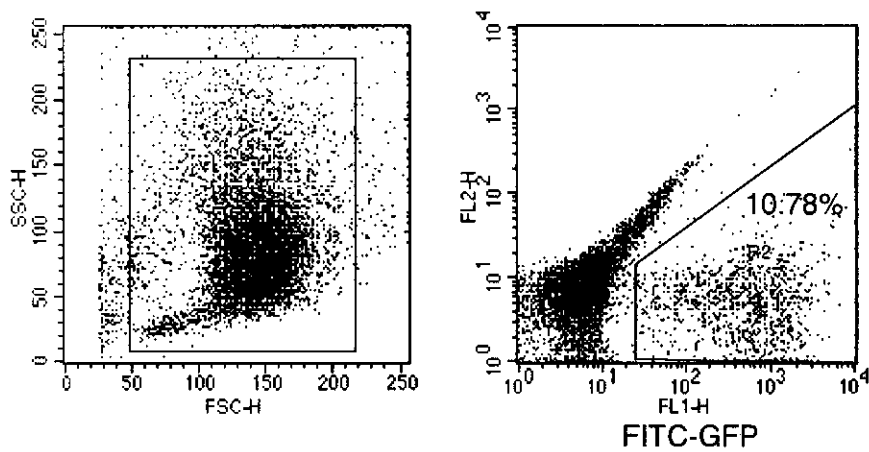


Figure 7: GFP-retro virus transduced CD34+ cells

分担研究報告書
チンパンジーを用いた遺伝子治療の有効性・
安全性評価方法の開発に関する研究

分担研究者 早坂 郁夫*

研究協力者 富永 壽和* 吉本 信彦*
武士俣 清彦* 春山 清*
鶴殿 俊史* 熊澤 俊彦*
中市 統三** 古屋 孝文***

* (株)三和化学研究所熊本霊長類パーク

** 山口大学農学部付属家畜病院

*** 長崎大学医学部第一内科

研究要旨

チンパンジーを用いた遺伝子治療評価システムの確立をめざして、今年度は次の2実験を実施した。

- (1) 中枢神経系疾患の遺伝子治療研究の基礎となるチンパンジーの脳解剖学的所見を得るために、チンパンジー正常脳の外表および内部構造をMRI撮像により明らかにした。
- (2) 遺伝子治療用ベクターの ex vivo 評価に用いる各種組織の採取技術開発の一環として、チンパンジーの胃および大腸粘膜を、ヒトと同様に内視鏡による直視下で採取する手法を確立した。

A. 研究目的

中枢神経系疾患を対象とした遺伝子治療研究をチンパンジーを用いて進展させるための基礎として、チンパンジーの脳の構造や機能を明らかにすることが必要である。その際、動物倫理の観点から非侵襲的な手段を用いることが望まれる。今回、MRIを用いてチンパンジー正常脳の断面像の撮像と三次元立体像の構築を行い、チンパンジー脳の解剖学的検討を行った。

遺伝子治療法は大きく ex vivo 法と in vivo 法に分かれるが、何れの場合も有効性・安全性評価の基礎として、培養細胞を用いた ex vivo でのベクターおよび導入遺伝子の発現効率、安定性、および安全性の評価が不可欠である。そこで ex vivo 評価に供するチンパンジーの各種組織の、安全かつ確実な採取技術開発が急務で

ある。昨年度、骨髄採取技術を確立したのに続いて、本年度は胃および大腸粘膜組織の採取方法の確立を試みた。

B. 研究方法

1. チンパンジー正常脳のMRI

(1) MRI 撮像

22才の雄(体重:63.8kg、名前:テツ)に対して、ケタミン5mg/kg i.m.とメドミジン50μg/kg i.m.の併用による麻酔下、脳のMRIを日立MRP-201-1(磁場強度:0.2T)を用いてスピンエコー法(SE法)により施行した。撮像パラメーターをT1強調像:500/25(TR/TE)、T2強調像:2000/110(TR/TE)、プロトン強調像:2000/38(TR/TE)とし、脳の水平断面、冠状断面および矢状断面を撮像した。また、別に三次元

画像を構築するために水平断面と矢状断面のT1強調像を3Dフーリエ変換法(3DFT法)を用いて50/23/75(TR/TE/FA)の条件で撮像した。各撮像条件は、予め実施したホルマリン固定脳標本の撮像結果をもとに設定した。

(2) 三次元構築

3DFT法により得られた2.5mm間隔の水平断面画像および3.0mm間隔の矢状断面画像をもとに、画像解析装置:3DBRAIN STATION(ローツ社)を用いてコンピュータ処理し、ボリュームレンダリングによる三次元画像を構築した。座標系は前交連と後交連を結ぶ線(AC-PCライン)を基準としたTalairachの系¹⁾を採用した。

(3) 脳解剖の識別および解剖用語の命名法

SE法により撮像した断面像と、3DFT法による撮像をもとに構築した三次元像の脳表面画像および内部構造について、チンパンジー脳解剖の成書や文献、さらにヒトやサル²⁾のMRI脳解剖の成書や脳図譜、データベース等をもとにチンパンジー脳解剖構造の識別を行った。解剖用語の命名法は、脳溝や脳回などの脳表構造については、Shanthaら²⁾に従ったが、対応する日本語名称が知られている場合はこれを併記した。また脳の内部構造については日本語名称で表示した。

2. 胃および大腸のバイオプシー

(1) 胃の内視鏡観察およびバイオプシー

8才の雌(体重:36.6kg、名前:フク)を用いた。当日、食事を与えなかったことを除き、特に前処置は行わなかった。ケタミン5mg/kg i.m.およびメデトミジン50μg/kg i.m.の併用により麻酔し、体位は左側臥位とした。塩酸リドカイン(キシロカインゼリー)を適量咽頭部に塗布後、上部消化管用ビデオスコープ(オリンパス:GIF-SV、先端部外径:8.7mm)を口腔より挿入し、咽頭部、食道を経て胃の各部すなわ

ち噴門部、胃底部、胃体部、胃角部、幽門部、さらに十二指腸球部、十二指腸下行部を観察した。さらに内視鏡用バイオプシー鉗子を用いて直視下、胃体部と幽門部粘膜のバイオプシーを行った。

(2) 大腸の内視鏡観察およびバイオプシー

12才の雌(体重:53.8kg、名前:アイ)を用いた。前日は制限食とし蒸かしたジャガイモ約300gを与え、当日は施行まで食事を与えなかった。また前日より下剤の経口投与を試みたが摂取せず、また当日麻酔導入後グリセリン浣腸を行ったが排便の誘起はみられなかった。麻酔はケタミン5mg/kg i.m.による導入後、少量の点滴静注により維持し、体位は左側臥位を基本体位とした。塩酸リドカイン(キシロカインゼリー)を適量肛門部に塗布後、大腸消化管用ビデオスコープ(オリンパス:CF-SV、先端部外径:9.6mm)を挿入し、直腸およびS状結腸について観察・撮影を行った。さらに内視鏡用バイオプシー鉗子を用いて直視下、直腸粘膜のバイオプシーを行った。

(3) 組織学的検討

胃(胃体部)および大腸(直腸部)の粘膜片を0.1Mリン酸緩衝10%ホルマリン液で固定し、常法に従いパラフィン包埋切片を作製し、ヘマトキシリン・エオジン染色を施した後、光学顕微鏡観察を行った。一方、胃(胃体部、幽門部)および大腸(直腸部)の粘膜片を0.1Mリン酸緩衝3%グルタルアルデヒド液で3時間前固定、続いて1%オスミウム酸で2時間後固定し、常法に従いエポキシ樹脂に包埋後、超薄切片を作製し、酢酸ウラニルおよび鉛染色を施した後、透過型電子顕微鏡による観察を行った。

C. 研究結果

1. チンパンジー正常脳のMRI

撮像した脳は前後に約11cm、側頭葉底部から

頭頂部に至る高さが約6cmであった。脳は大腦、間脳、中脳、小脳、橋、延髄から成る。

大腦の外側面および内側面は脳溝の密な走行が認められ、主要な脳溝である、中心溝（前頭葉と頭頂葉の境界）、シルビウス溝（前頭葉・頭頂葉と側頭葉の境界）、頭頂後頭溝（頭頂葉と後頭葉の境界）をはじめ、頭頂間溝、帯状溝、上側頭溝、下側頭溝、月状溝などが描出された。さらに溝と溝の間にある脳回のうち、上前頭回、中心前回、中心後回、帯状回など主要な脳回を同定した（Fig.1、Table1）。また、島についても脳溝の存在が確認された（Fig.2-1）。

側頭葉の内部構造として海馬を同定したが、歯状回との“巻き”構造など微細な構造の描出には至らなかった（Fig.2-2）。

大腦内部の白質中に灰白質塊として存在する基底核、則ち、線状体（尾状核と被殻からなる）、淡蒼球、扁桃核、前障では、線状体および淡蒼球が描出されたが、他は同定できなかった（Fig.2-1）。また淡蒼球については磁性体（鉄）を含んでいるためT2強調像で低信号となり明瞭に識別された（Fig.3）。

間脳は視床、視床上部、視床下部からなる。視床は多くの核群によって構成されているが、諸核の分離同定は不可能であった。視床上部は松果体、手綱、後交連、髄条が含まれる。松果体は同定され、後交連は周囲の構造から識別されたが、その他の同定は困難であった（Fig.2-1）。また視床下部には乳頭体、視神経交叉、漏斗、灰白隆起、視索、脳弓が含まれる。乳頭体や灰白隆起の同定は困難であったが、他は識別できた。さらに漏斗に連続して視床下部の下方に位置する下垂体も描出された（Fig.2-2、Fig.4、Fig.5）。

中脳は中脳蓋（上丘、下丘）、赤核や黒質が含まれる中脳被蓋、大腦脚からなる。中脳被蓋の諸核のうち黒質の識別はできたが他の核の分離同定はできなかった（Fig.2-2）。上丘、下丘、大腦脚は描出された（Fig.2-1、Fig.2-2）。

脳室系では、大腦半球の中にある左右一对の側脳室、間脳の中の第三脳室、橋と小脳の間第四脳室の各脳室、さらに脳室間連絡路として側脳室と第三脳室を連絡するモンロー孔、第三脳室と第四脳室を連絡する中脳水道、第四脳室と脳表のクモ膜下腔をつなぐマジヤンディー孔とルシュカ孔があるが、マジヤンディー孔とルシュカ孔を除き、各脳室、連絡路は描出された（Fig.2-1、Fig.2-2、Fig.4、Fig.5）。さらに側脳室では、体部、後角を除き、前角、三角部、下角の3部位が明確に同定できた（Fig.2-1）。この他、脳底部のクモ膜下腔が広がった所である大槽、脚間槽、四丘体槽について、大槽は明らかではなかったが他は描出された（Fig.2-2、Fig.5）。

尚、今回の撮像では周辺部にあたる小脳や延髄では鮮明な像が得られなかった。従って、小脳で虫部と小脳半球を確認した以外、細部の構造の識別は困難であった（Fig.2-1、Fig.2-2）。

2. 胃および大腸のバイオプシー

(1) 胃の内視鏡観察と胃粘膜のバイオプシーおよび組織学的検討

内視鏡で見た咽頭部、食道、胃の内部（噴門部、胃体部、胃角部、幽門部）および十二指腸内部（球部、下行部）をFig.6に示した。口腔から十二指腸下行部までヒトと同様のオリエンテーションが可能であり、また食道、胃、十二指腸の各部の形態について、チンパンジー特有の特徴的な所見はみられず、ヒトとの明らかな相違は認められなかった。またバイオプシー時の出血は極めて少量であったため、止血等の処置は特に行わなかった。

採取した胃体部粘膜切片の光顕像および電顕像をFig.8およびFig.9に示した。光顕像では主細胞、壁細胞および粘液分泌細胞を含む胃底腺の構造が明らかになった。電顕像では、粘液分泌細胞の細胞内部の形態が明瞭に示された。

一方、幽門部粘膜については採取量が少な

ったため十分な組織学的検討を行うことができなかった。

(2) 大腸の内視鏡観察と直腸粘膜のバイオプシーおよび組織学的検討

内視鏡で見た肛門、直腸およびS状結腸をFig. 7に示した。下剤を飲まず、浣腸も効かなかったため便が残り、肛門より内視鏡を挿入し観察が可能な範囲はS状結腸の途中までであった。直腸からS状結腸までヒダ状構造がヒト同様観察され、肉眼的にヒトとの形状の差異は認められなかった。また胃粘膜の場合と同様、バイオプシー時の出血も僅かであった。

採取した大腸粘膜切片の光顕像および電顕像をFig. 10およびFig. 11に示した。光顕により、表面に吸収上皮細胞と杯細胞が密に詰まった管状腺構造が明らかとなり、さらに電顕により杯細胞に含まれる分泌果粒が明らかになった。

D. 考察

中枢神経系疾患の遺伝子治療の評価系をチンパンジーにおいて確立するためには、その基礎としてチンパンジーの脳構造を明らかにするための解剖学的検討が必要である。

過去、チンパンジーでは死後脳標本をもとに脳の解剖学的知識の集積が図られてきた。しかしながら、実際の脳の立体的な形態を明らかにするためには、萎縮等の影響が不可避な切片標本を並べて外挿するだけでは不十分である。また当研究所では事故や病気による死亡例がほとんど無い現状に照らし、今後、死亡個体の脳を研究材料として用いることは困難である。

他方、最近の診断機器における飛躍的な発展は生きた個体から詳細な解剖学的情報を非侵襲的に取得することを可能にした。特にMRIはCTに比較し分解能において優っており、また鉄などの磁性体の含まれる構造を識別できることから神経核等も描出できる。そこで、今日ヒトの脳解剖は生存個体から得られたMRI画像

をもとにデータベース化され、脳科学および中枢神経系研究の領域で有効に活用されている。

動物倫理の観点からも、チンパンジーに対しては、障害を残さないように非侵襲的な手法を用いることが必須であり、生体から解剖学的情報を得る手段としてはヒト同様にMRIを用いる方法が最善と考える。また、MRIは無侵襲のため、多数の個体を用いて個体差、性差および年齢差等が評価できること、1個体について幾度も撮像ができるため長期間の観察ができること等が利点としてあげられる。

今回施行したMRIの結果、得られた脳の断面像と、平面画像データから構築した三次元画像によって、脳の各部の解剖を識別することができた。同定できた構造は、MRIで区別できると言われている構造とほぼ合致した。今回、解剖構造の命名法はShanthaら²⁾に拠ったが、例えば前頭葉の脳表でSulcus rectusと定めている脳溝については、Bailey³⁾がfrontomarginal sulcusと称しているように、脳表構造に関しては必ずしも一律の命名法が定着しているものではない。

チンパンジーの脳は、重量が400-500gでヒトの脳の約1/3、アカゲザルの脳の約5倍、形状は「ヒトの脳のミニチュア」と形容されるようにヒトの脳に極めて良く似ている。チンパンジーの脳表を見ると、サルに比べ、脳溝がヒト同様に密に走行しており脳表構造は複雑である。一例を挙げると、下前頭回や島がそれぞれ脳溝で分かれる複数の部分で構成されているのに対し、マカクザルではこれらの場所にsubdivisionのないことが知られている。

一方、脳表構造に関してチンパンジーがヒトと異なる所としては、ヒトではシルビウス溝の分枝として上行枝と前枝を含むのに対し(ヒトの場合、左側の上行枝と前枝の間およびその後方にはブローカの運動性言語野が局在する)、チンパンジーにはこれらの分枝がないとされる点があげられる。しかしながらチンパンジーはこ

れらに相当する場所の近傍に sulcus subcentralis anterior、sulcus opecularis を有している（今回同定できた。）。Bailey ら³⁾ はチンパンジーにおいてヒトのブローカ言語野に相当するところを電気刺激し咽頭部が動くことを認めたが、今後、さらに機能と細胞構築が解明されることによって、これら脳溝のヒトの上行枝と前枝に対するホモロジーが明らかになる可能性がある。

また、チンパンジーは角回がアカゲザルより発達しているが、ヒトに比べれば著明に小さいと言われる。定量的解析は行っていないが得られた画像から角回における3種間の大小関係は明らかと思われた。

この他の違いとして、ヒトでは頭頂後頭溝と鳥距溝が内側で繋がっているのに対し、チンパンジーは離れていることが知られているが、今回の結果では鳥距溝の同定が困難でこの点の確認はできなかった。

大脳半球の左右差について、ヒトでは、右側に比べ、左側のシルビウス溝が長く、また島についても左側の方が大きい傾向が認められると言う。また、感覚性言語野であるウェルニッケ野の key component として知られている planum temporale も左側が大きいと言われ、左側のシルビウス溝が長いこととの関連性が示唆されている。最近、Gannon ら⁴⁾ により、死亡したチンパンジーの左右の planum temporale の大きさを比較したところ左側が大きかったとの興味深い報告があった。今回の結果で左右を比べると、大脳半球の大きさ、シルビウス溝の長さ、島の大きさ等については顕著な左右差を認めることはできなかった。また planum temporale の部分については同定が困難であったため検討できなかった。左右大脳半球の形態差についてMRI画像を用いて結論を出すためには、測定条件の検討と併せて、例数を重ねることが必要と思われる。

また今回の結果、脳の内部構造に関しては、

ヒト、サルと比べて、脳幹部や辺縁系各部位の脳全体に占める割合には違いが認められる。これは高等になるほど脳幹部に対して大脳が発達し、大脳の中でも辺縁系より新皮質が発達していることに起因した違いであると考えられる。しかしながらこの点以外では側脳室(特に体部)がやや小さかったことを除きヒトと比べ顕著な脳内部構造の違いを見いだすことはできなかった。内部構造に関する霊長類間の種差については、大脳基底核や視床における諸核の大きさ等、微細構造について、脳解剖により様々な知見が得られているが、これらの内、MRI上に反映されるものは少ないものと考えられる。

以上のように、MRI画像をコンピューター処理して得られた三次元立体脳画像をもとに解剖学的検討を行った結果、チンパンジー正常脳の外表および内部構造を明らかにすることができた。但し、MRIの特性や能力に起因して、小さな脳溝および微細な内部構造の同定は困難であった。

脳の形態には個体差がある。それゆえMRIによる三次元立体脳画像は individual map としての価値がある。最近、脳科学の領域でヒトやサルの脳機能を評価するために、PETなどを用いた脳機能画像とMRIによる三次元立体脳画像との重ね合わせによる脳機能地図作製の試みが盛んに行われている。今回の成果は、チンパンジーを用いた中枢神経系疾患の遺伝子治療評価系を確立させるための基礎として、解剖学的所見を得たのみならず、脳機能の評価や、将来 in vivo における遺伝子の発現を画像として捕らえることができるようになれば、発現部位のマッピングに対しても有用であると考えられる。

昨年度より遺伝子治療用ベクターの ex vivo 評価に用いるチンパンジーの各種組織の採取技術開発に取り組んでいるが、本年度は胃と大腸について、ヒトと同様に内視鏡を用いて試みた。細径化により挿入性に優れた内視鏡を用いて、チンパンジーに対し大きな負荷を与えることな

しに胃および大腸の観察とバイオプシーを行うことができた。内視鏡で得られた像からは、食道、胃、十二指腸の下行部に至るまで、また大腸では直腸からS状結腸の途中まで形態的にヒトとの明らかな違いは認められなかった。さらに採取した粘膜片の光顕および電顕観察を行い、胃体部胃底腺と直腸粘膜の組織像を明らかにしたが、ヒトとの著明な違いは認められなかった。また鈴木ら⁵⁾は霊長類の胃粘膜における胃腺分布の比較を行い、チンパンジーは噴門腺粘膜が狭く、胃底腺と幽門腺粘膜が広いことから、ヒトと同様の胃構築であることを示した。これらの知見はチンパンジーの胃および大腸が形態学的にヒトに近い動物種であることを示唆するものである。

以上により、チンパンジーの胃および大腸粘膜のバイオプシー手技を確立させたことから、細胞・組織培養法開発およびベクターの *ex vivo* 評価への胃および大腸粘膜の供給を可能とした。またヒトと 98.4%同じと言われる遺伝子のホモロジーに加えて、胃および大腸の細胞、組織および器官の各レベルでヒト同様の形態が明らかになったことから、胃および大腸を対象とした遺伝子治療のチンパンジーでの評価がヒトでの予測に極めて有益であるものと考えられる。加えて、遺伝子治療の *in vivo* 評価に際して、ベクターの投与や導入遺伝子の発現の検討をヒト用の内視鏡を用いて効果的に進めることができることは大きな利点と考える。

E. 結論

中枢神経系疾患の遺伝子治療法評価系の確立に向けて、チンパンジー脳の内視鏡撮影を施行し、正常脳構造を明らかにした。

また遺伝子治療用ベクターの *ex vivo* 評価の基礎として、チンパンジーの胃および大腸粘膜を内視鏡にて採取する手技を確立した。

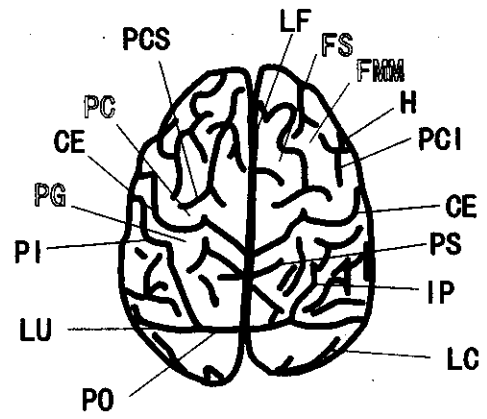
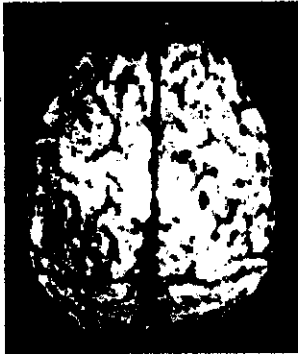
[謝辞]

脳の構造や機能の解析方法についてご指導いただいた東京都神経科学総合研究所、尾上浩隆先生に深謝いたします。

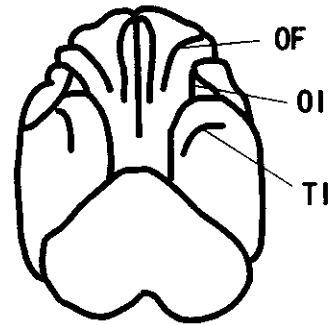
文献

- 1) Talairach, J., and Tournoux, P. 1988. *Co-planar Stereotaxic Atlas of the human Brain*. Thieme, New York.
- 2) Shantha, T. R., and Manocha, S. L. 1969. The brain of chimpanzee. *The chimpanzee*. Vol. 1.
- 3) Bailey, P., Bonin, G. v. and McCulloch, W. S. 1950. *The Isocortex of the Chimpanzee*. Univ. of Illinois Press, Urbana.
- 4) Gannon, P. J., Holloway, R. L., Broadfield, D. C. and Braun, A. R. 1998. Asymmetry of chimpanzee planum temporale: Humanlike pattern of Wernicke's brain language area homolog. *Science* **279**:220-222.
- 5) 鈴木一憲, 永井廣, 稲垣晴久, 玉手英夫. 1986. 霊長類の胃粘膜に関する比較形態学的研究—食性との関係について—. *哺乳動物学雑誌* **11**:45-55.

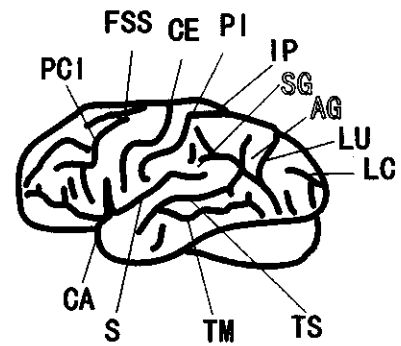
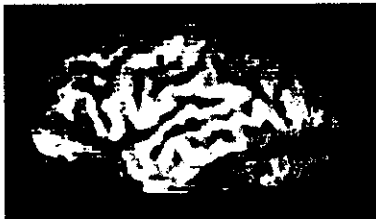
上面



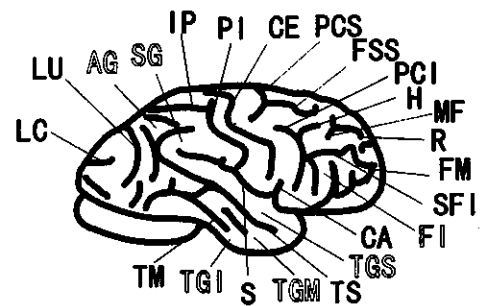
下面



左側面



右側面



内側面

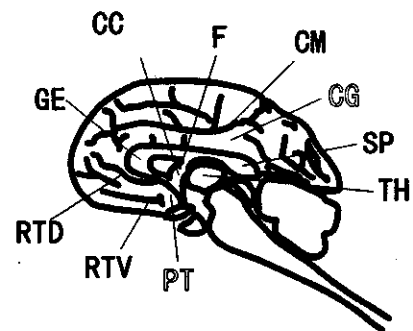
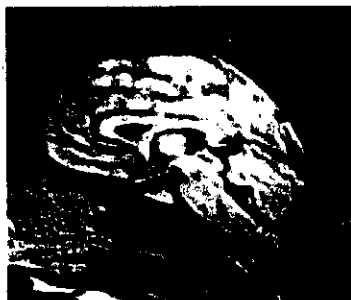


Fig.1 各方向から見た脳の外表
三次元構築像およびその模式図
(黒字:脳溝、白抜き文字:脳回、何れも略語)

Table 1 脳解剖用語—略語対照表

AG	Gyrus angularis	角回
CA	Sulcus subcentralis anterior	
CC	Corpus callosum	脳梁
CE	Sulcus centralis	中心溝
CG	Gyrus cinguli	帯状回
CM	Sulcus callosomarginalis(sulcus cinguli)	帯状溝
F	Fornix	脳弓
FI	Gyrus frontalis inferior	下前頭回
FM	Sulcus frontomarginalis	
FMM	Gyrus frontalis medianus	中前頭回
FS	Gyrus frontalis superior	上前頭回
FSS	Sulcus frontalis superior	上前頭溝
GE	Genu	膝
H	Horizontal branch of sulcus precentralis inferior or arcuate sulcus	
IP	Sulcus intra-parietalis	頭頂間溝
LC	Sulcus calcarinus lateralis	
LF	Longitudinal fissure	大脳縦裂
LU	Sulcus lunatus	月状溝
MF	Sulcus midfrontalis	
OF	Sulcus orbito-frontalis	
OI	Sulcus opercularis(Sulcus orbitalis inferior)	
PG	Gyrus precentralis	中心前回
PCI	Sulcus precentralis inferior	
PCS	Sulcus precentralis superior	
PG	Gyrus postcentralis	中心後回
PI	Sulcus postcentralis inferior	
PO	Sulcus parieto-occipitalis	頭頂後頭溝
PS	Sulcus postcentralis superior	
PT	Gyrus paraterminalis	終板旁回
R	Sulcus rectus	
RTD	Sulcus rostralis dorsalis	
RTV	Sulcus rostralis ventralis	
S	Fissura Sylvii(sulcus lateralis)	シルヴィウス溝
SFI	Sulcus frontalis inferior	
SG	Gyrus supramarginalis	縁上回
SP	Splenium	脳梁膨大
TGI	Gyrus temporalis inferior	
TGM	Gyrus temporalis medianus	中側頭回
TGS	Gyrus temporalis superior	上側頭回
TH	Thalamus	視床
TI	Sulcus temporalis inferior	下側頭溝
TM	Sulcus temporalis medianus	
TS	Sulcus temporalis superior	上側頭溝

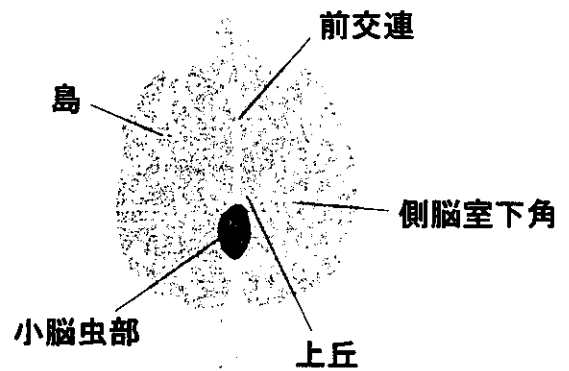
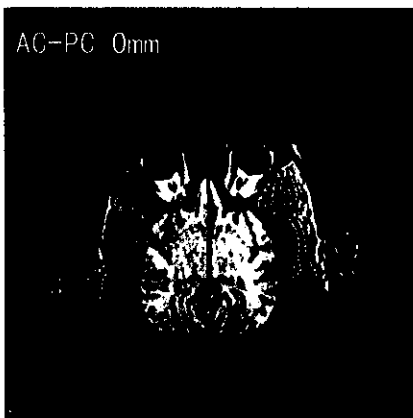
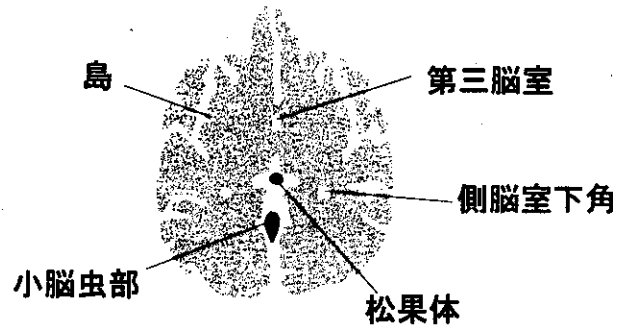
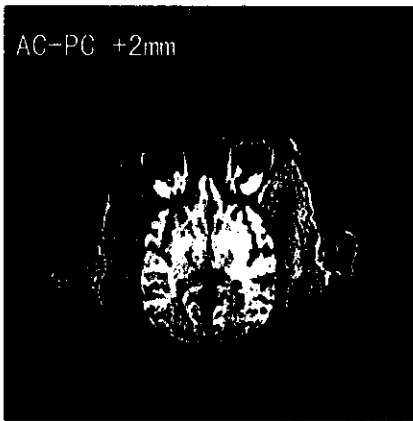
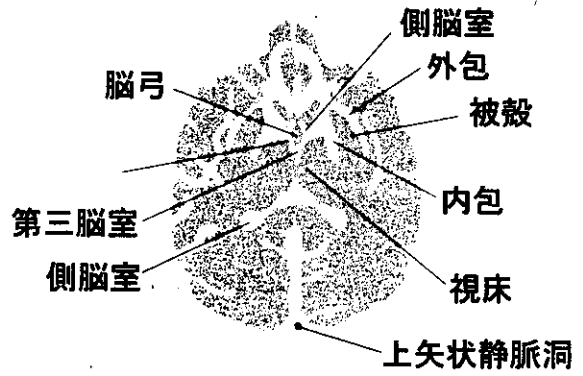
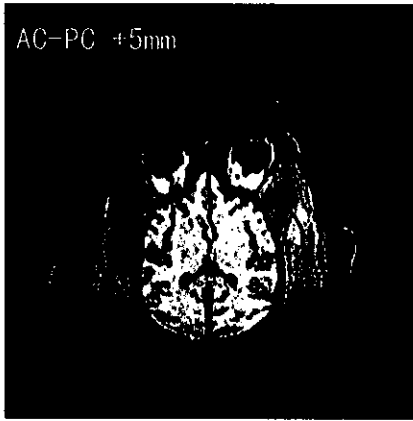
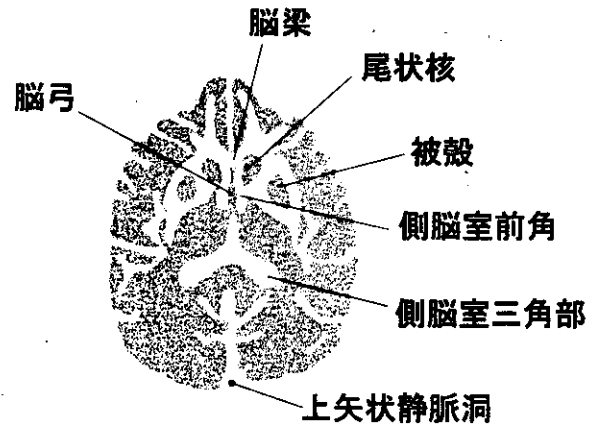
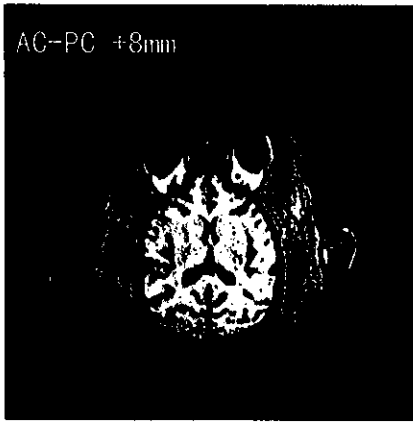


Fig. 2-1 脳の水平断面像

三次元構築像のAC-PCラインを基準とした各レベルにおける水平断面像とその模式図

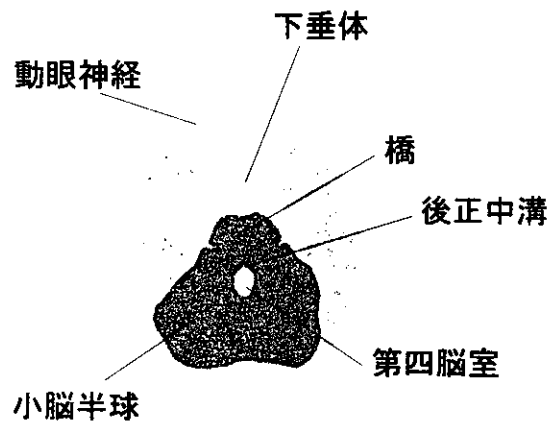
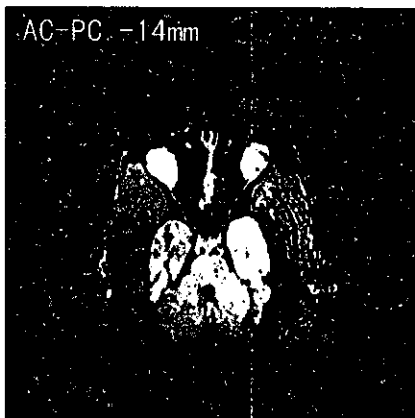
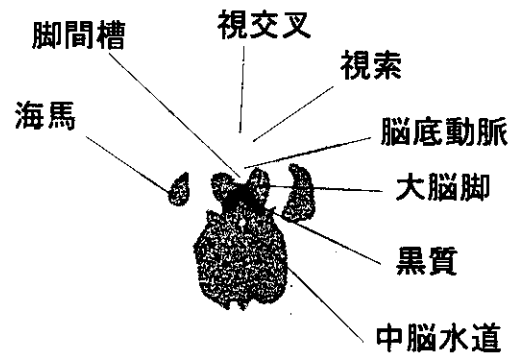
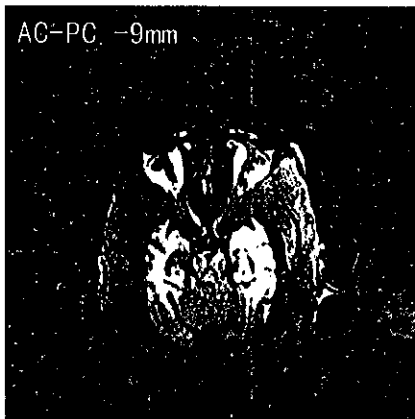
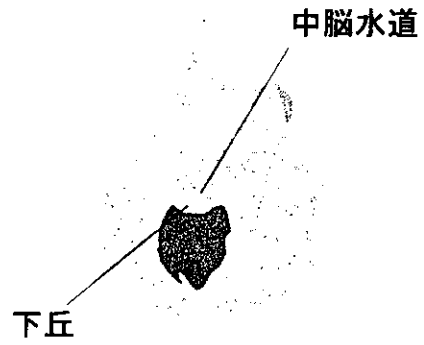
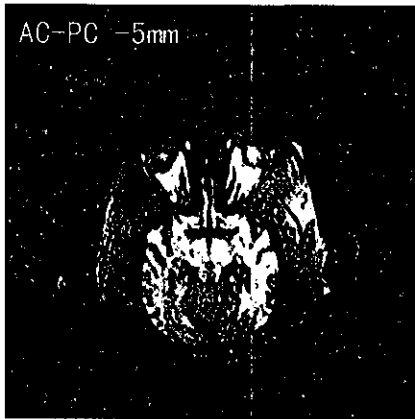


Fig. 2-2 脳の水平断面像

三次元構築像のAC-PCラインを基準とした各レベルにおける水平断面像とその模式図

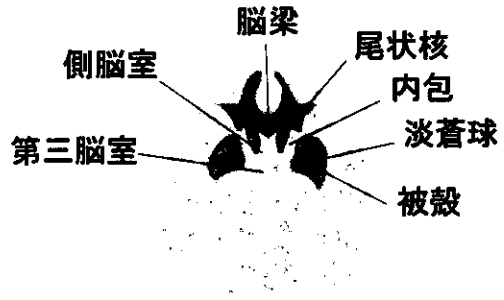
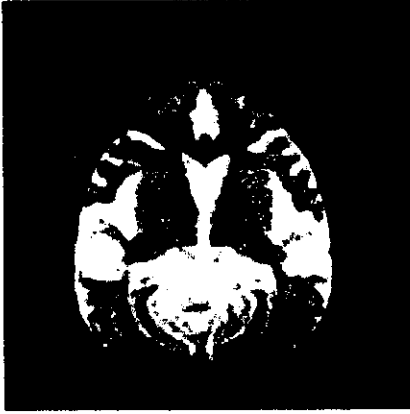


Fig. 3 脳梁-松果体レベルにおける脳の断面像
SE法による脳梁-松果体レベルにおけるT2強調画像とその模式図

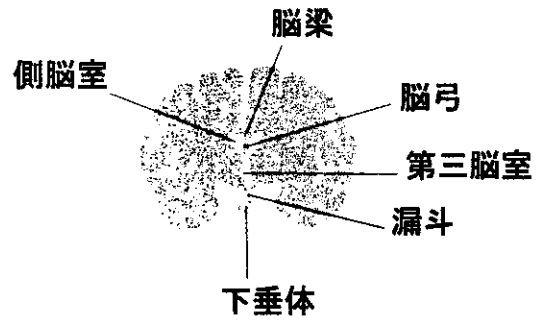
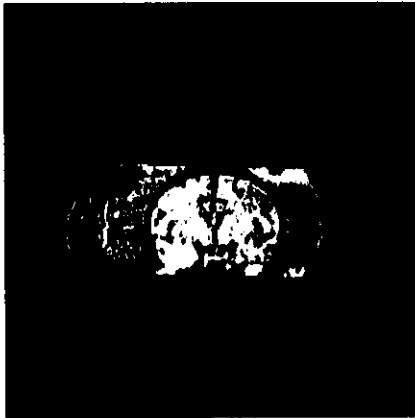


Fig. 4 前交連後部レベルにおける脳の冠状断面像
三次元構築像の前交連レベルにおける冠状断面像とその模式図

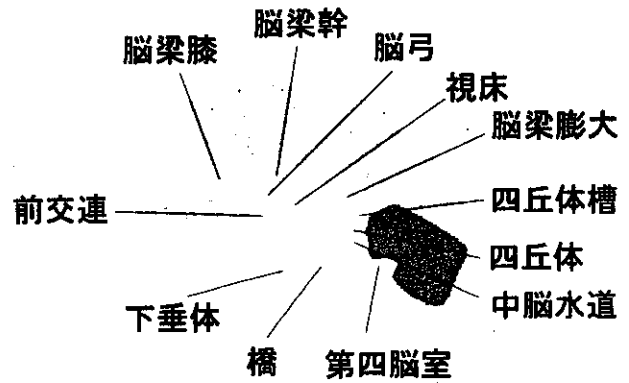
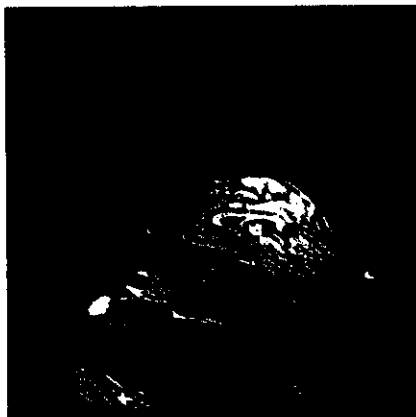


Fig. 5 脳の正中矢状断面像
三次元構築像の正中矢状断面像とその模式図

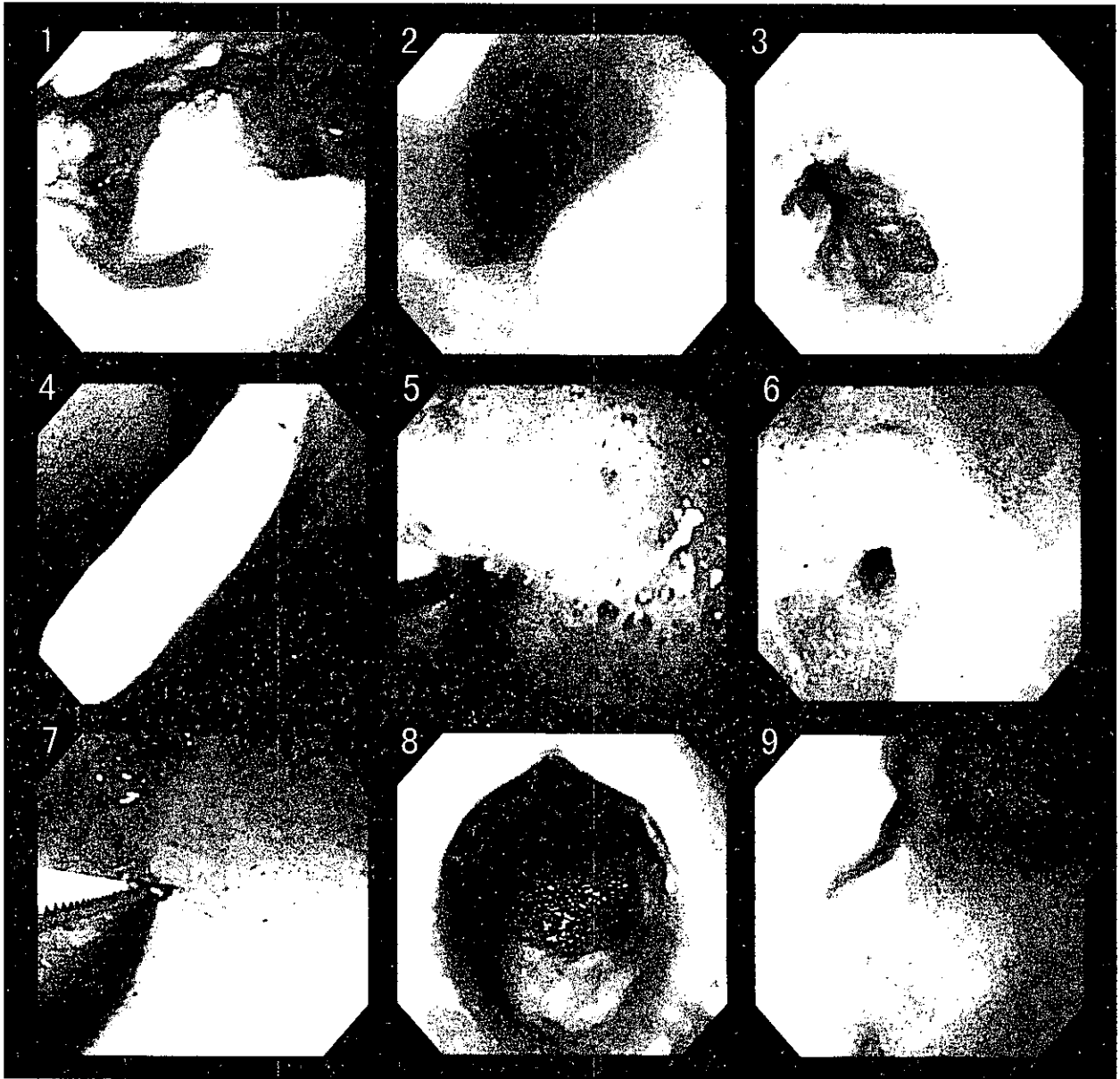


Fig. 6 咽頭・食道・胃および十二指腸

1. 咽頭部 2. 食道 3. 噴門 4. 胃角部 5. 胃体部 (ハイアプシー) 6. 幽門 7. 幽門部 (ハイアプシー)
8. 十二指腸球部 9. 十二指腸下行部

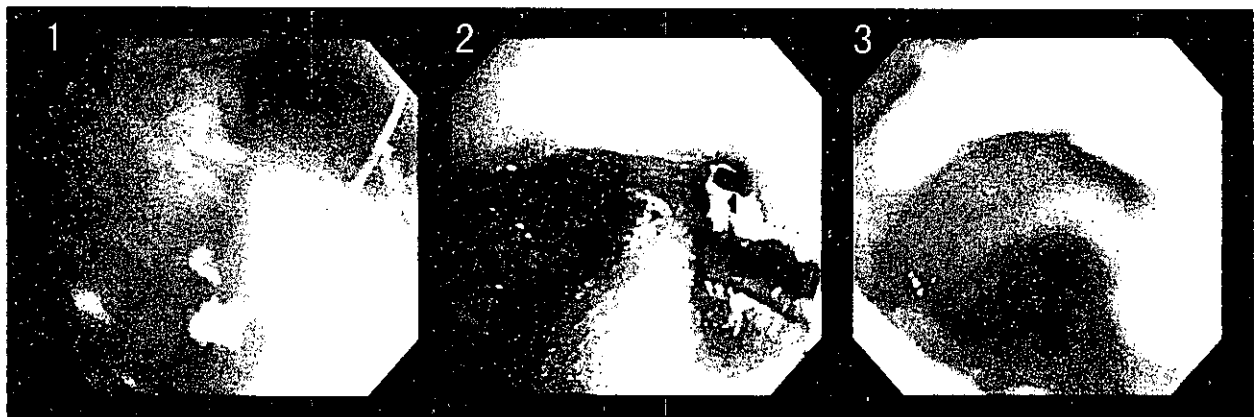


Fig. 7 肛門・直腸およびS状結腸

1. 肛門 2. 直腸 (ハイアプシー) 3. S状結腸



Fig.8 胃体部粘膜 (H.E.染色 ×10)
GP:胃小窩 M:表層粘液細胞 Pl:壁細胞 Pc:主細胞



Fig.9 表層粘液細胞 (EM ×10000)
Sg:分泌果粒 N:核



Fig.10 直腸粘膜上皮 (H.E.染色 ×20)
Ae:吸收上皮細胞 Gc:杯細胞 MM:筋板



Fig.11 杯細胞 (EM ×10000)
Sg:分泌果粒

分担研究報告書

サル類の生殖生理学的基礎研究と発生工学的基盤技術の開発

分担研究者 山海 直 国立感染症研究所・筑波医学実験用霊長類センター主任研究官

研究要旨 サル類の疾患モデル動物の開発、疾患モデル動物の胚や配偶子の保存方法の開発、さらに遺伝子治療法の生殖細胞への評価システムの開発を目指し、発生工学的基盤技術の確立を目的とした研究を進めてきた。本年度は以下の4項目について検討した。1) 妊娠カニクイザルにおける膣インピーダンスの変化について検討し、膣インピーダンス値は、妊娠早期には高値を、妊娠末期には低値を示すことが明らかになった。2) エストロジェンの即日測定による排卵日の推定を基盤データとして膣内腔への人工授精を試みたところ、妊娠例を得ることに成功した。3) eCG投与回数、hCG投与時期が未性成熟カニクイザルの卵胞発育および回収卵の質に及ぼす影響について検討し、eCG、hCG投与スケジュールを考慮することで卵の質的向上を認めた。4) 雄性生殖細胞に由来する卵子活性化因子の解析を加え、卵子活性化因子の発現能はマウスとカニクイザルで異なること、受精後その因子は前核に存在すること、精子核周辺活性化物質のみでも卵を活性化する能力を有していることが示された。

協力研究者

土屋英明 霊長類センター協力研究員
越後貫成美 霊長類センター研究生

A. 研究目的

本プロジェクトでは、サル類遺伝子、細胞などの研究資源の保存、遺伝子疾患モデル動物などの開発に関する有効な手段を確立すること、さらに遺伝子治療法の生殖細胞への評価システムの開発を目指している。これらの目的を達成するためにはサル類の生殖生理を熟知し、発生工学的手法を用いた基盤技術の開発が必須の条件である。サル類の生殖細胞の生理学的研究を進めるとともに、in vitroでの生殖細胞の操作技術を確立することが当面の目的である。

本年度は、4つの項目について検討したが、各項目の目的は以下のとおりである。

1) 妊娠カニクイザルの横断調査による膣インピーダンスの動態の解析

カニクイザルにおける膣インピーダンスの変化は月経周期にともなう血中の性ステロイドホルモン、とくにプロジェステロン濃度の動態と関係があることをすでに見出している。性ステロイドホルモンは妊娠中きわめて重要な作用を有しており、妊娠成立から分娩に至るまでに大きな変動が認められる。今回、妊娠カニクイザルにおける膣インピーダンス値を横断的に調査することで性ステロイドホルモンとの関連について解析した。また、

膣インピーダンス値の変動をとらえることで早期妊娠診断あるいは分娩日の予測が可能か否かについて検討を加えた。

2) エストロジェンの即日測定による排卵日の推定を基盤データとした人工授精技術の確立

ヒト用キットを用いたEIA法によりサル類の血中エストロジェンの即日測定が可能であることを確認している。本技術は非外科的にほぼ確実に排卵日を推察することができる方法である。本法を応用することで、サル類では比較的困難な人工授精による妊娠例が得られるか否かについて検討した。

3) eCG投与回数、hCG投与時期が未性成熟カニクイザルの卵胞発育および回収卵の質に及ぼす影響

サル類を用いて体外受精、胚移植などの一連の基礎検討を行っている。これらの研究を遂行する上で、良質な卵を少しでも多く確保することは必須の検討課題である。その一環として性周期がまだ成立していない未性成熟個体を用いた卵胞発育誘起について検討してきた。性成熟個体での卵胞発育誘起法に準じたホルモン投与スケジュール(eCG 8回投与)を未性成熟個体に適応した場合、hCG投与時にはすでにプロジェステロン値が上昇し回収卵に質的問題があることをすでに見出している。今回、未性成熟カニクイザルの卵胞発育誘起においてeCGの投与回数、hCG投与の時期が卵胞発育および卵の質に及ぼす影響について検討し

た。

4) 雄性生殖細胞に由来する卵子活性化因子の解析

精子は、受精において雄染色体を卵に持ち込むとともに、卵を活性化させ、減数分裂を再開させるという機能を有している。顕微授精技術を応用していく上で卵子活性化の機序など、多くの情報を得ることはきわめて重要である。しかし、精子由来の卵子活性化因子に関する詳細はほとんど明らかにされていない。ここでは、精子由来卵子活性化因子が精子の前段階である円形精子細胞の注入においても機能発現するのか否か、また卵内に入ったこの因子が受精卵ではどこに存在するのかを明らかにすることを目的とし、顕微授精技術を応用して検討を行った。さらに、精子由来卵子活性化因子の詳細を明らかにする目的で、可溶性因子を除去した精子核周辺活性化物質のみを有する精子を作出して検討を加えた。

B. 研究方法

1) 妊娠カニクイザルの横断調査による膣インピーダンスの動態の解析

実験には、妊娠日齢が異なるカニクイザルを用い、妊娠中の膣インピーダンス値の変動を横断的に調査した。膣インピーダンスの測定には交流抵抗測定装置(定電流方式 $0.7\mu A$)に直径6mm、幅5mm、のリング状電極を2mm間隔で2本配置したカニクイザル用測定プローブを装着したものを用いた。プローブはアルコール綿で清浄し、よく乾燥させてから測定に供した。測定は、午前の給飼前に全身麻酔下で行った。カニクイザルを背位に保定しプローブを子宮外口に達するまで挿入して膣インピーダンス値を測定した。

2) エストロジェンの即日測定による排卵日の推定を基盤データとした人工授精技術の確立

連日、採血を行いEIAによるエストロジェンの測定を行った。その値より排卵日を推察し、適時人工授精を試みた。人工授精は、直腸電気刺激法で採取したカニクイザル精子を1mlシリンジに接続したマウス用ゾンデを用いて、膣内あるいは子宮外口より子宮頸管を経由して子宮内腔に注入した。その後、4あるいは5週目に超音波画像診断装置により妊娠の有無を確認した。

3) eCG投与回数、hCG投与時期が未性成熟カニクイザルの卵胞発育および回収卵の質に及ぼす影響

実験には、体重1.5-2.7kgの未性成熟カニクイ

ザルを用いた。eCG投与開始日を0日とし、2、4および5日目に(4回投与群)、あるいは0、2、4、6、8、9、10および11日目に(8回投与群)eCG200IUを筋肉内投与した。それぞれeCG最終投与日の翌朝にhCG 4,000IUを筋肉内投与し、hCG投与後24-28時間目に開腹手術により卵巣の状態を観察するとともに卵胞を吸引して卵の採取を行った。回収卵は倒立顕微鏡下で性状を観察し体外受精(一部は顕微授精)を試みた。また、実験期間を通して経時的に採血を行い、血中エストロジェンおよびプロゲステロン濃度の動態について解析した。

4) 雄性生殖細胞に由来する卵子活性化因子の解析

実験にはマウスおよびカニクイザルの精子および円形精子細胞を用い、マウス未受精卵への顕微注入を試みた。また、精子注入により得られた前核期卵の各種部位を電気融合により未受精卵へ移植した。さらにTriton X処理を施した精子核周辺活性化物質のみを有する精子を用いて同様に検討した。

C. 研究成果

1) 妊娠カニクイザルの横断調査による膣インピーダンスの動態の解析

妊娠カニクイザルにおける膣インピーダンス値は、妊娠早期には高値を、妊娠末期には低値を示した。

2) エストロジェンの即日測定による排卵日の推定を基盤データとした人工授精技術の確立

膣内に精子を注入した個体群では妊娠例は得られていないが、子宮内腔に注入した群で妊娠個体を得ることに成功した。

3) eCG投与回数、hCG投与時期が未性成熟カニクイザルの卵胞発育および回収卵の質に及ぼす影響

eCG 4回投与群および8回投与群の両群におけるすべての個体でeCG投与にともなうエストロジェン値の上昇を認め、hCG投与あるいは卵胞吸引によりE2値の急激な低下を認めた。プロゲステロン値はeCG 4回投与群では、hCG投与後プロゲステロン値の上昇を認めた。eCG 8回投与群ではeCGの5回目投与の後にすでにプロゲステロン値は徐々に上昇しはじめていた。eCG 4回投与群および8回投与群における1個体あたりの発育卵胞数はそれぞれ 26.3 ± 6.8 個と 64.4 ± 33.5 個であり、それらの卵胞からの回収卵数は 19.3 ± 12.7 個

および31.0±24.3個であった。回収卵のうち実験に使用可能な成熟卵は4回投与群で48.1%(26/54)、8回投与群で20.6%(51/248)であり、体外受精における受精率は57.7%(15/26)と31.4%(16/51)であった。

4) 雄性生殖細胞に由来する卵子活性化因子の解析

マウス精子の注入ではマウス未受精卵の活性化を認めた(100%)が、円形精子細胞の注入では活性化率は有意に低かった(16%)。カニクイザルにおいては、それぞれの活性化率は95%および90%であった。受精後の活性化因子の存在部位について検討したところ、雌性前核および雄性前核の未受精卵への融合により活性化を認めた。また、精子核周辺活性化物質のみを有する精子の注入を試みたところ、マウス、カニクイザルともに未受精卵の活性化を認めた。

D. 考 察

1) 妊娠カニクイザルの横断調査による臍インピーダンスの動態の解析

妊娠カニクイザルにおける臍インピーダンス値は、妊娠早期には高値を、妊娠末期には低値を示したが、通常に考えられるプロゲステロンの動態とは異なった変動形態を示している可能性が示唆された。今後、同一個体、同一時期のプロゲステロン値の測定を試み、詳細に調査する必要があるものと考えられた。その詳細な検討により本法は簡便な妊娠診断、さらに分娩日を予測するための方法になる可能性がある。

2) エストロジェンの即日測定による排卵日の推定を基盤データとした人工授精技術の確立

エストロジェンの即日測定による排卵日の推定を行い、適時、子宮内腔に精子を注入することにより妊娠例を得ることができた。今後、例数を増加し精子注入時期と排卵日の関係、精子注入量、注入精子の運動性などについて詳細な解析を加える予定である。

3) eCG投与回数、hCG投与時期が未成熟カニクイザルの卵胞発育および回収卵の質に及ぼす影響

eCG 8回投与群ではeCGの5回目投与の後にすでにプロゲステロン値は徐々に上昇しはじめおり、hCG投与前に顆粒膜細胞の黄体化が始まり回収卵が過熟であった可能性が示唆された。hCG投与を早めたeCG 4回投与群ではhCG投与後にプロゲステロン値の上昇を認めており、過熟卵の出

現抑制され、結果的に回収卵の質的向上したものであると思われる。本法はカニクイザルの卵採取のための有効な手段に成り得るものと考えている。

4) 雄性生殖細胞に由来する卵子活性化因子の解析

カニクイザルにおいてはマウスと明らかにことなり円形精子細胞の段階で卵子活性化因子は機能発現が可能であることが明らかとなり、本因子の発現能には動物種により差があることが確認された。また、精子によって持ち込まれた卵子活性化因子は少なくとも前核に存在していることが確認され卵細胞質内を拡散、移動した可能性が示唆された。さらに、マウス、カニクイザル精子ともに可溶性活性化因子の存在しない精子、すなわち精子核周辺活性化物質のみでも卵を活性化する能力を有していることが示された。なお、本実験における活性化の判定は減数分裂の再開を基準としているが、カルシウムのオシレーションにおいてもその確認をしている。今後、本因子の分離、カルシウム動態等を明らかにし、より明確な卵子活性化機序について明らかにする必要があるものと考えている。

E. 結論

1) 妊娠カニクイザルの横断調査による臍インピーダンスの動態の解析

妊娠カニクイザルにおける臍インピーダンス値は、妊娠早期には高値を、妊娠末期には低値を示すことが明らかになった。

2) エストロジェンの即日測定による排卵日の推定を基盤データとした人工授精技術の確立

カニクイザルにおいて排卵日を推測し、子宮内腔に精子を注入することにより妊娠例を得た。

3) eCG投与回数、hCG投与時期が未成熟カニクイザルの卵胞発育および回収卵の質に及ぼす影響

eCG 4回投与群では8回投与群と比較して過熟卵の出現が減少し、回収卵の質的向上が認められた。

4) 雄性生殖細胞に由来する卵子活性化因子の解析

雄生殖細胞由来の卵子活性化因子の発現能はマウスとカニクイザルで異なることが明らかとなり、カニクイザルでは円形精子細胞の段階でその能力を有していることが示された。また、受精後その因子は前核に存在することが示され、さらに、精

子核周辺活性化物質のみでも卵を活性化する能力を有していることが明らかになった。

F. 研究発表

1. 論文発表

- 1) T. Sankai, N. Ogonuki, H. Tsuchiya, K. Shimizu, F. Cho and Y. Yoshikawa. Comparison of results from IVF-related studies for cynomolgus monkeys, Japanese monkeys, African green monkeys, and red-bellied tamarins. *J. Fertil. Implant.* (Tokyo), 15, 177-179, 1998
- 2) J. H. Liang, T. Sankai, T. Yoshida, F. Cho and Y. Yoshikawa. Localization of testosterone and 3 β -hydroxysteroid dehydrogenase/ Δ 5- Δ 4-isomerase in cynomolgus monkey (*Macaca fascicularis*) testis. *J. Med. Primatol.*, 27, 10-14, 1998
- 3) S. Malaivijitnond, O. Takenaka, T. Sankai, T. Yoshida, F. Cho and Y. Yoshikawa. Effects of single and multiple injections of ketamine hydrochloride on serum hormone levels in male cynomolgus monkeys. *Lab. Anim. Sci.*, 48(3), 270-274, 1998
- 4) N. Ogonuki, T. Sankai, F. Cho, K. Sato and Y. Yoshikawa. Comparison of two methods of assisted fertilization in cynomolgus monkeys (*Macaca fascicularis*): Intracytoplasmic sperm injection and partial zona dissection followed by insemination. *Hum. Reprod.*, 13(9), 2555-2560, 1998
- 5) H. Tsuchiya, N. Ogonuki, T. Yoshida, F. Cho, Y. Yoshikawa, M. Ito and T. Sankai. Changes in the electrical impedance level of vaginal mucus during the menstrual cycle in cynomolgus monkeys (*Macaca fascicularis*). *Lab. Anim. Sci.*, 48(5), 535-537, 1998
- 6) A. Okada, H. Igarashi, M. Kuroda, Y. Yoshikawa, H. Tsuchiya and T. Sankai. Acrosome vesiculation in unincubated frozen-thawed cynomolgus monkey (*Macaca fascicularis*) spermatozoa. *J. Reprod. Dev.*, 44(4) Suppl., 33, 1998
- 7) S. Miyamoto, T. Sankai and T. Yoshida. A simple non-invasive method to measure

fecal steroid hormones for monitoring the reproductive status of female great apes. *Proceedings of the Japan Society for Comparative Endocrinology*, 13, 52, 1998

- 8) T. Endo, K. Kanayama and T. Sankai. Rabbit fetuses implanted and developed in the greater omentum. *J. Mamm. Ova Res.* 16 (in press)
 - 9) J. H. Liang, T. Sankai, T. Yoshida, F. Cho, and Y. Yoshikawa. Localization of immunoreactive testosterone and 3 β -hydroxysteroid dehydrogenase/ Δ 5- Δ 4 isomerase in cynomolgus monkey (*Macaca fascicularis*) testes during postnatal development. *J. Med. Primatol.* (in press)
 - 10) M. Matsumuro, T. Sankai, F. Cho, Y. Yoshikawa and T. Yoshida. A two-step extraction method to measure fecal steroid hormones in female cynomolgus monkeys (*Macaca fascicularis*). *Am. J. Primatol.* (in press)
- ### 2. 学会発表
- 1) 山海 直. サル類における発生工学的基盤技術の開発. 日本実験動物学会学会賞奨励賞受賞講演. 第45回日本実験動物学会(松本) 1998年5月
 - 2) 越後貫成美, 土屋英明, 寺尾恵治, 長 文昭, 山海 直. マウス未受精卵の非凍結低温保存. 第45回日本実験動物学会(松本) 1998年5月
 - 3) 土屋英明, 越後貫成美, 寺尾恵治, 長 文昭, 山海 直. 多層Percoll不連続密度勾配を利用して遠心分離したカニクイザルおよびマウス精子の性状. 第45回日本実験動物学会(松本) 1998年5月
 - 4) 吉田高志, 宮本幸子, 松室三重, 山海 直. ゴリラ糞便中の性ステロイドホルモン測定による性周期の推定. 第45回日本実験動物学会(松本) 1998年5月
 - 5) 岡田詔子, 五十嵐広明, 黒田 優, 喜多 清, 伊藤雅夫, 山海 直, 吉川泰弘. マウス卵母細胞のG負荷の影響と電顕観察. 第39回日本哺乳動物卵子学会(神戸) 1998年5月. *J. Mamm. Ova Res.*, 15(2), S22, 1998
 - 6) 宮本幸子, 山海 直, 吉田高志. 大型類人猿糞便中の性ステロイドホルモン測定による性周

- 期の推定. 第23回日本比較内分泌学会(釜石) 1998年7月
- 7) J. Tsuchida, K. Kawasaki, T. Sankai, N. Kubo, K. Terao, T. Koyama, J. Makino and Y. Yoshikawa. An analysis of finger maze learning in cynomolgus monkey. 17th Congress of the International Primatological Society (Madagascar) Aug. 1998
- 8) K. Kawasaki, T. Sankai, K. Terao, T. Koyama, J. Makino and Yoshikawa Y. Unique video image processing systems for behavior analysis of monkeys and rats. 17th Congress of the International Primatological Society (Madagascar) Aug. 1998
- 9) N. Kubo, T. Koyama, K. Kawasaki, J. Tsuchida, T. Sankai, K. Terao and Y. Yoshikawa. Learning and memory ability and behavioral characteristics in aged monkeys (*m. fascicularis*). 17th Congress of the International Primatological Society (Madagascar) Aug. 1998
- 10) 山海 直. サル類生殖細胞の体外操作技術の確立. 筑波実験動物研究会第7回セミナー(つくば) 1998年9月
- 11) 亀山祐一, 本城史絵, 山海 直, 石島芳郎. マウス精子の受精能力に及ぼす屠殺後放置日数の影響. 日本畜産学会第95回大会(東京) 1999年3月