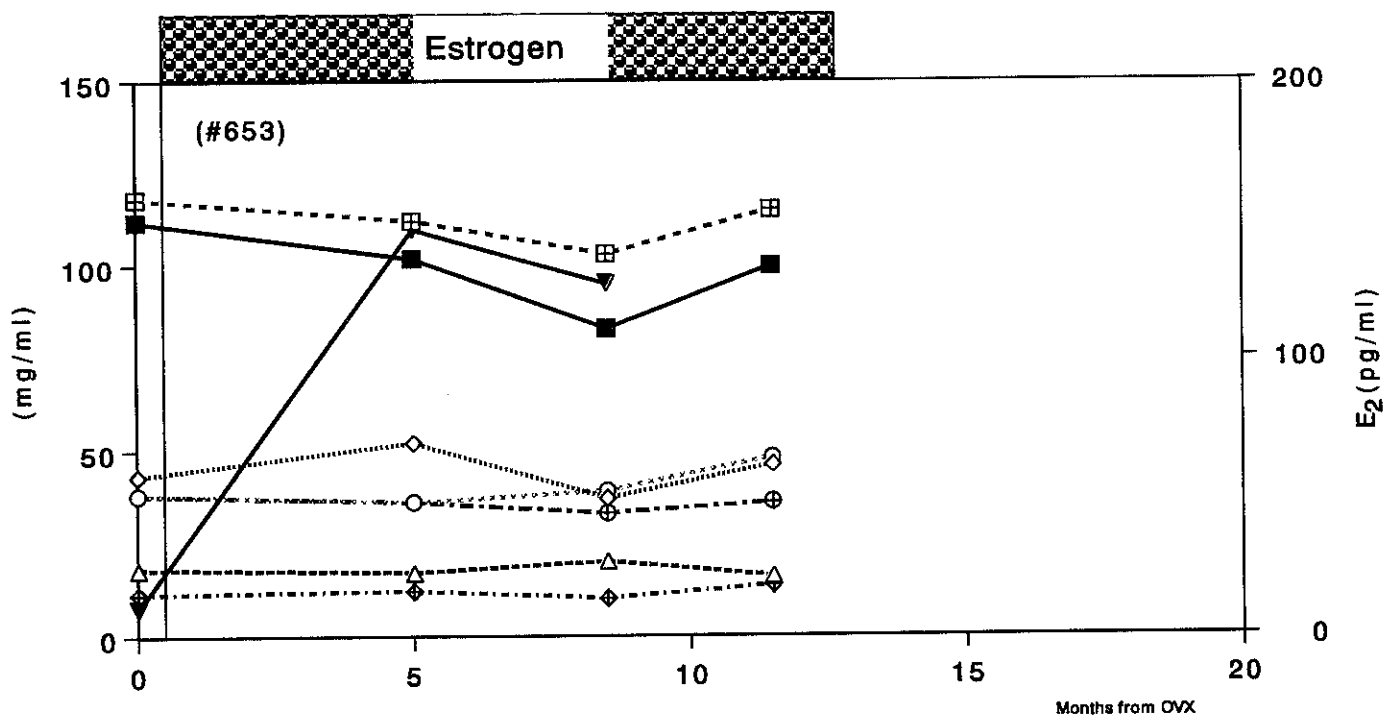
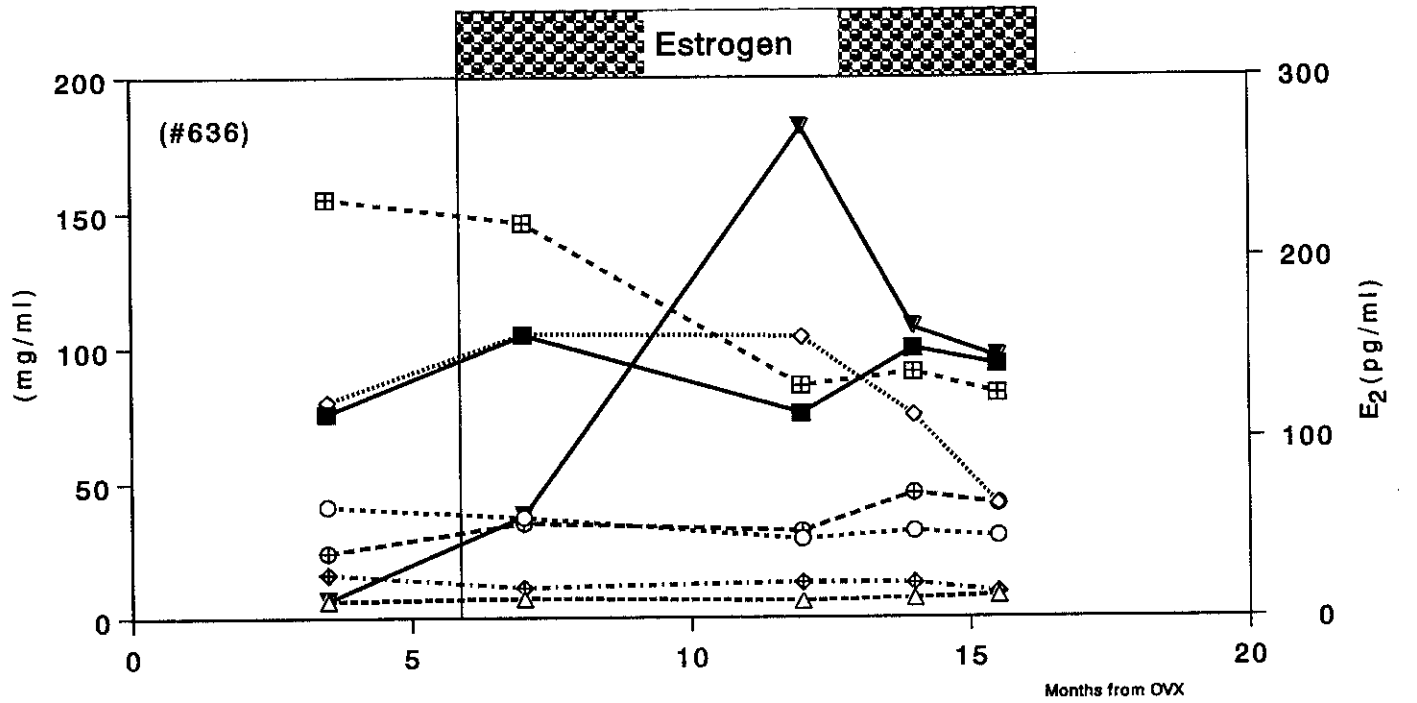


図-6 卵巣摘出メス・ニホンザルへの エストロゲン 投与後の血中脂質の動態



T.chol
 TG
 HDL-chol
 Lp(a)
 apolipo-A1
 apolipo-A2
 apolipo-B
 E2

図-7 卵巣摘出メス・ニホンザルへのエストロゲン投与

(#636)

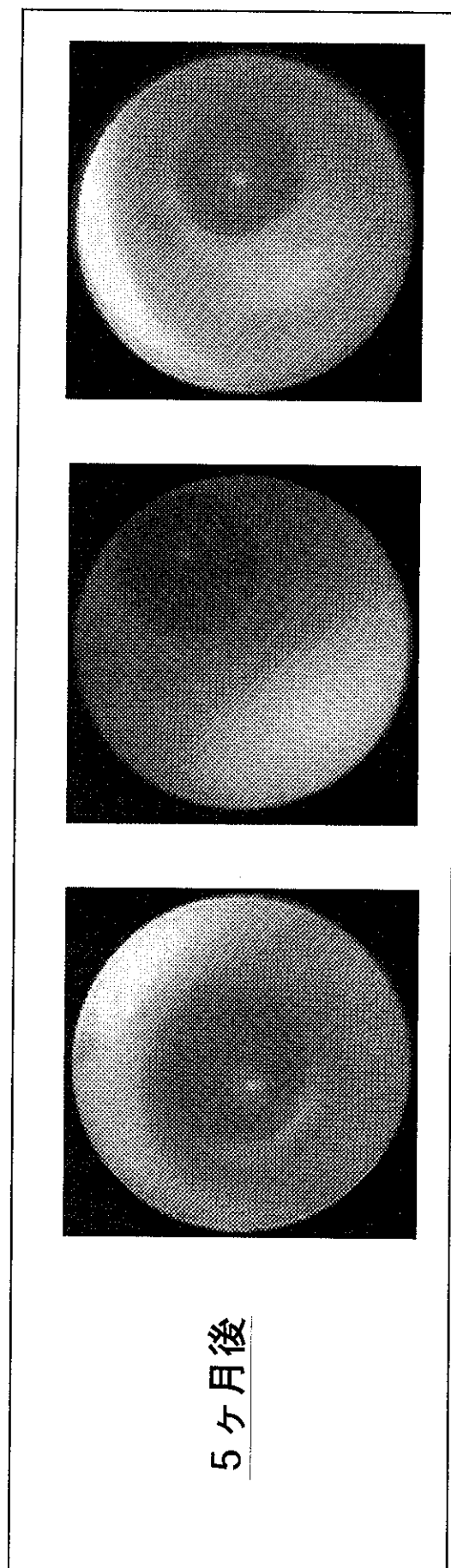
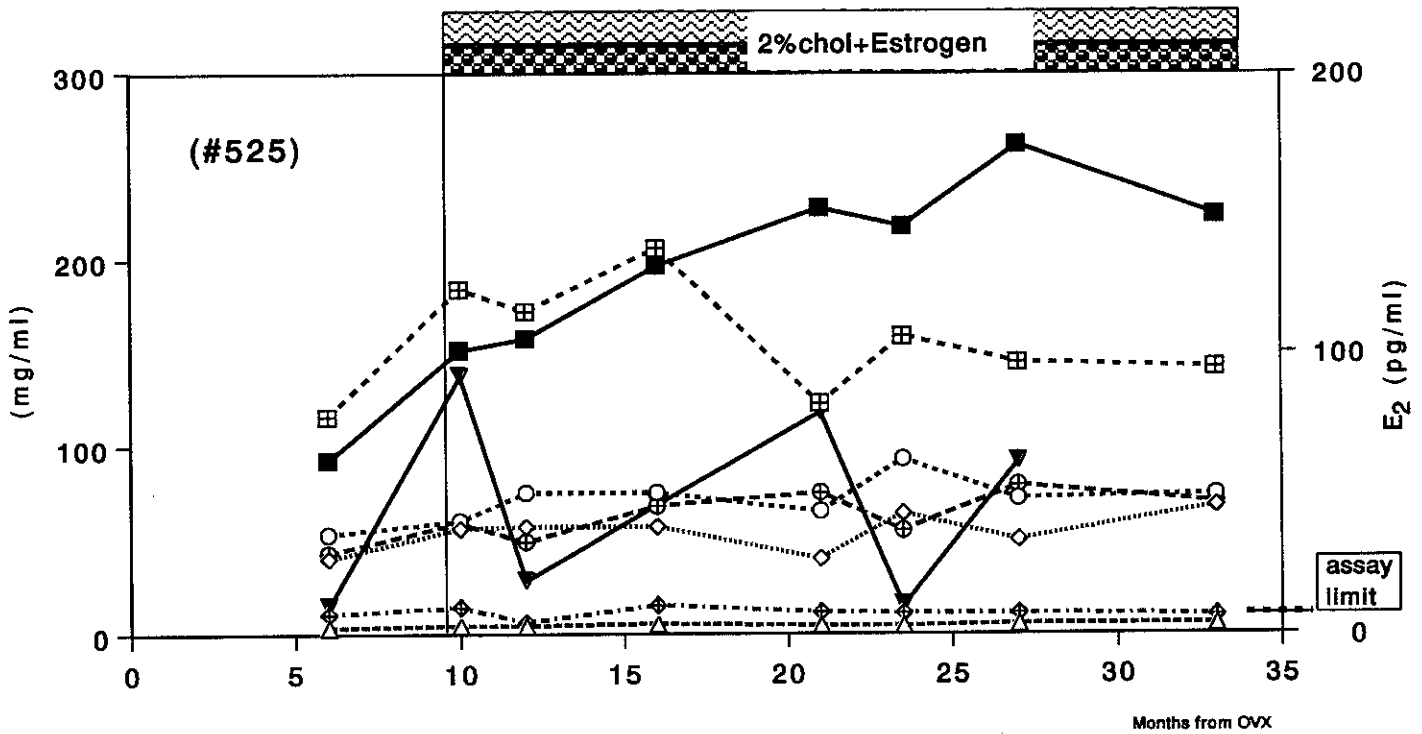
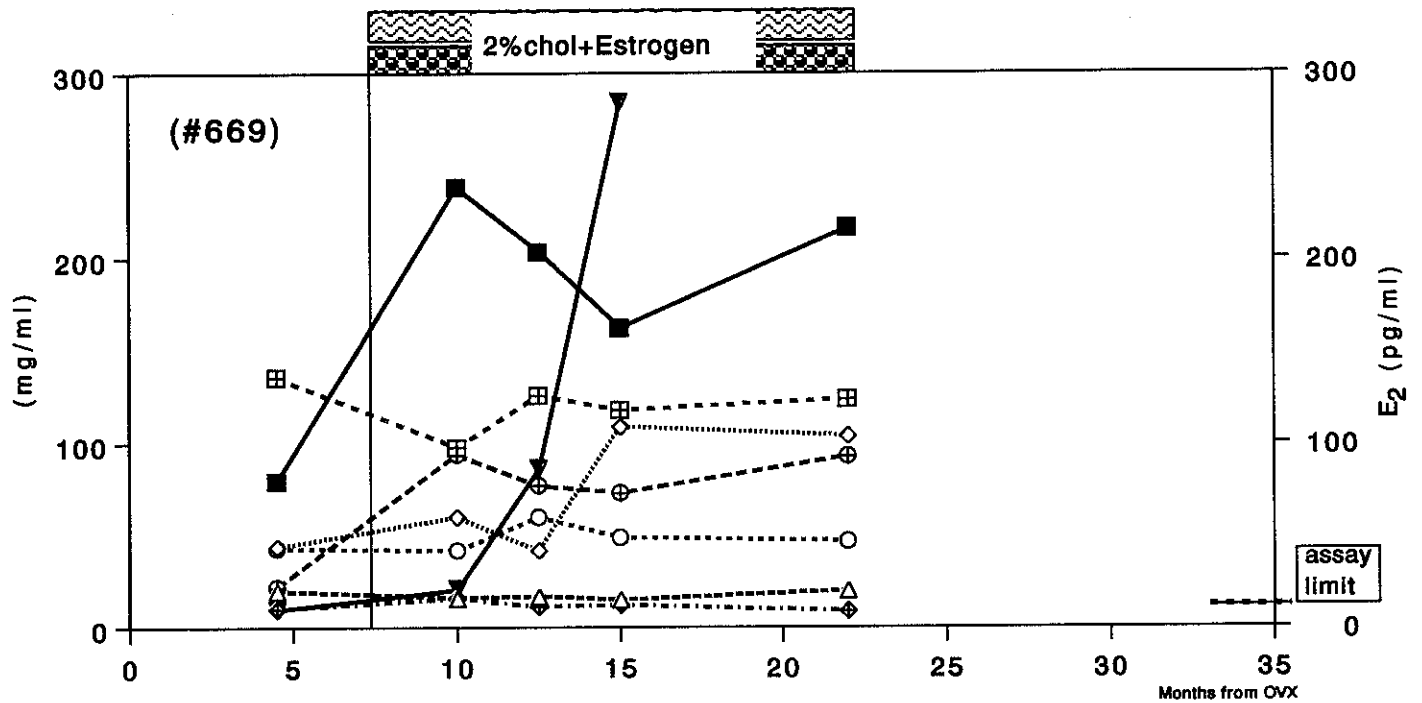


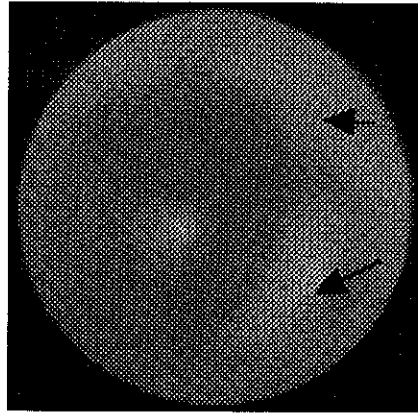
図-8 卵巣摘出メス・ニホンザルへの 2%コレステロール食 と エストロゲン 同時投与後の血中脂質の動態



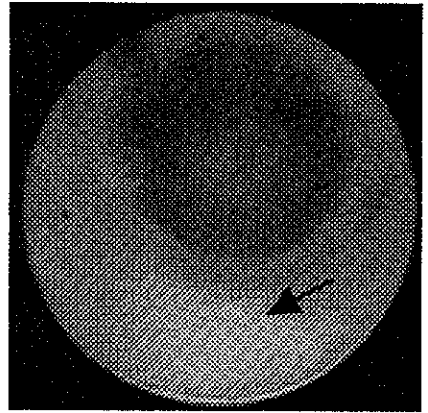
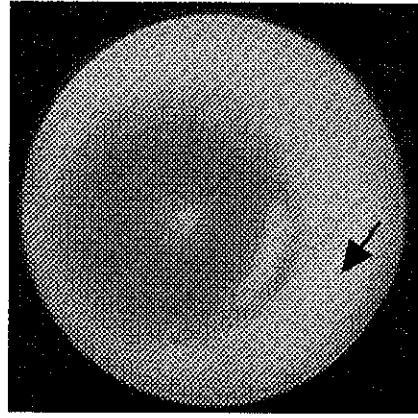
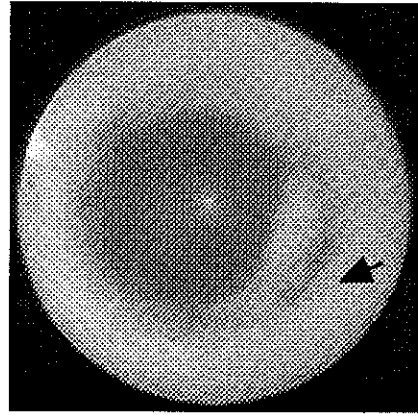
■ T.chol ◇ TG ○ HDL-cholesterol △ Lp(a)
 ▣ apolipo-A1 ◆ apolipo-A2 ⊕ apolipo-B ▼ E2

図-9 卵巣摘出メス・ニホンザルへのコレステロール食+エストロゲン投与

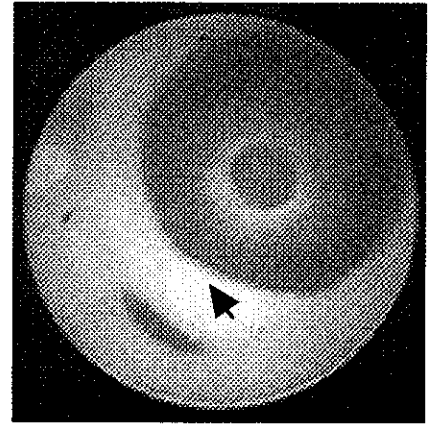
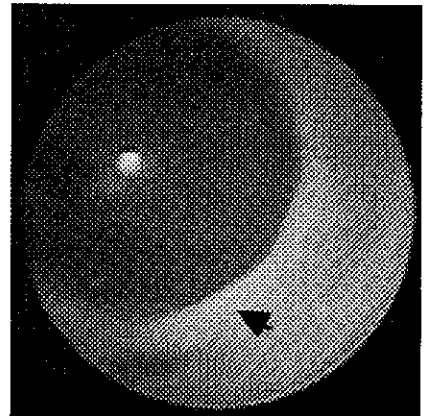
(#669)



5ヶ月後



1年3ヶ月後



厚生科学研究費補助金（長寿科学総合研究事業）

分担研究報告書

網膜変性症モデルに関する研究

分担研究者 鈴木 通弘 社団法人 予防衛生協会
協力研究者 柏木 賢治 山梨医科大学
阿部 圭哲 山梨医科大学
齋藤 克也 山梨医科大学

研究要旨 本研究では、サル類の眼科領域疾患モデル開発のための基礎研究として、（1）筑波医学実験用霊長類センターにおいて飼育されているカニクイザルの白内障発生率調査と（2）カニクイザル眼を用いた緑内障治療薬の作用機序解明に関する研究を取り上げた。その結果、（1）筑波医学実験用霊長類センターにおいて飼育されているカニクイザルに観察される白内障は6,199頭中53頭、先天性白内障は4,773頭中4頭であり、その発生率は低率であることが今回の研究により明らかとなった。また、（2）緑内障治療薬のプロスタグランジンF2アルファ関連製剤であるイソプロピルウノプロストンとラタノプロストの眼内薬物動態の一部が今回の研究により明らかになった。また、イソプロピルウノプロストンの眼圧下降機序が、毛様体筋の細胞外基質の変化による可能性が示唆された。

分担研究者 鈴木 通弘
社団法人 予防衛生協会

は見られない、霊長類特有の疾患はヒトに最も近縁なサル類を使用しなければ解明できず、こうした疾患モデルの開発研究が切望されている。

A. 研究目的

超高齢化社会を迎え、加齢に伴う眼疾患の重要性が増しつつある。特に緑内障、白内障、網膜変性症のような晩発性の疾患に関しては、現在まで良い動物モデルの開発がなされていない。こうした眼科領域疾患の原因究明、診断、治療あるいは予防には、ヒトに類似した疾患モデルが必要である。特に、網膜黄斑変性のように、ゲツ歯類で

本年度の研究では、サル類の眼科領域疾患モデル開発のための基礎研究として、（1）筑波医学実験用霊長類センターにおいて飼育されているカニクイザルの白内障発生率の明らかにすること、また、（2）カニクイザル眼を用いた緑内障治療薬の作用機序解明に関する研究として、プロスタグランジンF2アルファ関連の緑内障治

療薬であるイソプロピルウノプロストンとラタノプロストの眼内薬物動態を明らかにすることと、イソプロピルウノプロストンの眼圧下降機序を明らかにすることを目的とした。

B. 研究方法

(1) 被検動物として野生由来2,764頭（雌2,074頭、雄690頭）および当施設で繁殖・育成した3,435頭（雌1,684頭、雄1,751頭）の計6,199頭を用いた。また、先天性白内障例については当施設で出生した4,773頭（雌2,297頭、雄2,476頭）を用いた。これら動物を散瞳させた後、細隙燈顕微鏡（SL-2型、興和）による観察、もしくは前眼部に光線を当てて肉眼観察を実施した。

(2) 実験1：イソプロピルウノプロストンとラタノプロストの眼内動態の検討；カニクイザル眼から単離培養した毛様体筋、虹彩メラノサイトのラジオアイソトープで標識したイソプロピルウノプロストンを加え、一定時間培養した後に、細胞中、もしくは培養細胞中の薬物濃度を検討した。また、薬物の代謝を検討するために高速液体クロマトグラフィーを用い、代謝体とそれぞれの代謝を検討した。更に、現在唯一知られているプロスタグランدينトランスポーターであるPGTを発現した細胞において、イソプロピルウノプロストンとその代謝体、もしくはラタノプロストとその代謝体が、細胞内に運搬されるかを検討した。

実験2：イソプロピルウノプロストンのカニクイザル眼における細胞外基質分解酵素（MMP）活性への影響；カニクイザル眼にイソプロピルウノプロストン一日一回点眼し、2週間後、眼球を摘出。毛様体部を採取し、同部の細胞外基質、MMP等の変化を検討した。

（倫理面への配慮）

すべての実験はヘルシンキ条約に乗っ取り動物愛護の精神の元で行われた。

C. 研究結果

(1) 白内障は計53頭に観察された。その病変の程度は様々であったので、程度を軽度、中等度、重度の3型に分類した。すなわち、軽度とは水晶体の白濁はわずかで眼底観察が通常のように可能な状態、中等度とは水晶体に白濁がはっきりと認められるが、眼底は不鮮明ながら観察可能な状態、重度とは水晶体の白濁が著しく眼底観察不可能な場合とした。白内障は野生由来サル群では雌25頭、雄9頭の計34頭に観察され、病変は、軽度22頭、中等度7頭、重度5頭であった。育成サル群では雌9頭、雄10頭の計19頭に観察され、病変は軽度12頭、中等度3頭、重度4頭であった。これら白内障が観察された育成サル19頭のうち、8頭は同じ雄サルの子孫であった。一方、野生由来サル群で白内障がみられた34頭の子孫において白内障は記録されていない。また、先天性白内障例は4頭に観察された。この4頭はいずれも雄サルで、このうちの3頭は異父兄弟であったが、これら4頭の両親に白内障は観察されなかった。さらに、異父姉サル1頭にも白内障は観察されなかった。

(2) 実験1：イソプロピルウノプロストンとラタノプロストの眼内動態の検討；

1) イソプロピルウノプロストンとその代謝体、もしくはラタノプロストは共に細胞内へはPGTを介しては移行しない事が判明した。一方ラタノプロストの代謝体はプロスタグランدينF2アルファの移行よりも少ないが、細胞内にPGTを介して移行する事が判明した。

2) イソプロピルウノプロストンは眼房水、血清培養毛様体筋などにより代謝を受けた

が、虹彩メラノサイトによっては代謝は受けなかった。一方、ラタノプロストはいずれにおいても代謝を受けない。したがって、イソプロピルウノプロストンとラタノプロストの眼内における動態はかなり違う事が判明した。また、イソプロピルウノプロストンの眼内代謝も細胞によって異なる事が判明した。

実験2：イソプロピルウノプロストンのカニクイザル眼における細胞外基質分解酵素（MMP）活性への影響；

1) イソプロピルウノプロストンを点眼したカニクイザル眼においては、毛様体筋中におけるMMP-2活性がコントロールに対して亢進している事が判明した。

2) イソプロピルウノプロストンを点眼したカニクイザル眼に毛様体の主要な細胞外基質であるコラーゲンタイプ3がコントロール眼に比べ減少している事が判明した。

D. 考察

(1) サル類の自然発生白内障については、既にいくつかの報告がある。例えば、アカゲザル284頭とチンパンジー35頭を調査し各々1頭の白内障を観察している報告、あるいは526頭のマーモセットとタマリンを調査し、32頭に白内障を認め、そのうち4頭は兄弟という報告がある。しかし、先天性白内障に関する報告は非常に少なく、サル種不明1頭とアカゲザル1頭に報告されているのみで、その発生率は極めて低率と言える。我々が観察したカニクイザルの白内障例については親子関係が明らかであり、したがって今後、遺伝学的解析に役立つと同時に、これらの症例はヒトの白内障の貴重な動物モデルとなり得るかも知れない。

(2) 実験1：イソプロピルウノプロストンとラタノプロストの眼内動態の検討；イソプロピルウノプロストンとラタノプロ

トの2者はどちらもプロスタグランدينF2アルファ系の薬物であるが、眼圧下降力や有効時間はラタノプロストの方が優れている事が臨床的に示されている。一方、イソプロピルウノプロストンは眼圧下降効果に関してはやや劣るものの、副作用に関してはラタノプロストに比べ軽度である事も、報告されている。今回の結果により、このような臨床的な違いを一部説明することが可能であると考えられる。すなわち、イソプロピルウノプロストンは眼内で生理活性のより低い代謝体に分解されてしまうのに対し、ラタノプロストが生理活性の強い、薬剤のまま、眼内により長く残るため、薬理効果がより強く長く表れるものと考えられる。また、PGTにより眼内に移行したラタノプロストの代謝体は依然薬理活性を持つため、このことも、薬理作用が強い事と関連していると考えられる。さらに、PGTによって、代謝されないイソプロピルウノプロストンが培養細胞によって、代謝されてことは、未知のプロスタグランディントランスポーターが存在する事を示したものである。また、イソプロピルウノプロストンの代謝が細胞によって違う事は、未知のプロスタグランディントランスポーターの分布が細胞によって異なる事を示しており、このことは薬物やプロスタグランディンの細胞特性などに関連しているかもしれない。

実験2：イソプロピルウノプロストンのカニクイザル眼における細胞外基質分解酵素（MMP）活性への影響；これまでイソプロピルウノプロストンの眼圧下降機序に関してはほとんど不明であったが、今回の研究の結果、毛様体筋の細胞外基質に変化をもたらす事が判明した。毛様体は房水の排出路の一つである、葡萄膜強膜路に深く関与する部分で、同部の細胞外基質が変化

する事は、イソプロピルウノプロストンによる眼圧下降は同部の変化による可能性があるものと考えられる。

E. 結論

(1) 筑波医学実験用霊長類センターにおいて飼育されているカニクイザルに観察される白内障は6,199頭中53頭、先天性白内障は4,773頭中4頭であり、その発生率は極めて低率であることが今回の研究により明らかとなった。

(2) イソプロピルウノプロストンとラタノプロストは同一系統薬であるが、その眼内薬物動態の違いから、薬理作用に差が生じる可能性がある。眼内には未知のプロスタグランディントランスポーターが存在し、それらが、内因性外因性のプロスタグランディンの薬理作用、代謝に関連しているものと考えられる。イソプロピルウノプロストンの眼圧下降機序は毛様体筋の細胞外基質に変化を起こす事で、葡萄膜強膜路抵抗が変化する可能性が考えられた。

F. 研究発表

1. 論文発表

- ① Michihiro T. SUZUKI, Akio HIYAOKA, Fumiaki CHO, Keiji TERAOKA and Shigeo HONJO

Ophthalmoscopic Observations of Ocular Fundus in African Green Monkeys Aged from 0 day to 15 years and Retinal Hemorrhage in Neonates

Anim. Eye Res. 17 111-118, 1998

2. 学会発表

- ② 堀田喜裕、藤木慶子、大田隆、森脇也、藤巻拓郎、金井淳、鈴木通弘、吉川泰弘
カニクイザル網膜黄斑部のcDNAライブラリーの作製

第103回 日本眼科学会総会 (1999年4月) 千葉

③ 鈴木通弘

カニクイザルに観察される白内障例について

第19回 比較眼科学会年次大会 (1999年7月) 江別

④ 柏木賢治、飯塚洋子、金井直明、土田孝之、鈴木通弘、飯島裕幸、塚原重雄

プロスタグランディン系緑内障治療薬の眼内動態

第10回日本緑内障学会 (1999年9月) 三重

⑤ 小野文子、羽成光二、成田勇人、鴻野あや子、揚山直英、大藤圭子、中村紳一朗、鈴木通弘、藤本浩二、吉田高志、寺尾恵治、吉川泰弘

カニクイザルを用いた老人病モデルの開発研究

第128回 日本獣医学会学術集会 (1999年10月) 熊本

G. 知的所有権の取得

なし

カニクイザルの雄性生殖機能の加齢変化についての研究

分担研究者 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

カニクイザルの雄性生殖機能の加齢変化について検討を加えた。精巣機能を、細胞分裂の指標となる核内増殖抗原（PCNA）の発現状況、組織中のテストステロンの存在状況、およびステロイドホルモンの合成酵素として代表的な 3β -ヒドロキシステロイドデヒドロゲナーゼの検出状況から調べた。その結果、新生仔期(出生後数日以内)の精巣ではヒトと同じように活発な機能発現が見られるものの、その後休眠状態になり、4歳齢頃に再度活発化し春機発動期到来となる。その反映として血中テストステロン濃度も増加し始める。10歳齢頃には体重もプラトーに達し、成長も完了し、その後、加齢とともに生殖機能も低下に転じると考えられるが17歳齢の個体であっても明確な機能低下を検出する事は出来なかった。

A. 研究目的

カニクイザルの生殖機能の加齢変化についての報告は少ない。雌カニクイザルの場合、2歳齢前後に到来する初潮を指標として性成熟を知る事が出来る。また20歳齢から25歳齢頃にある閉経も老化の指標として有効である。しかし、雌の場合と異なって、雄ザルの場合には、このような明確な性成熟や老化の指標は乏しい。血中のテストステロン濃度は、性成熟以前では低値を呈するものの、性成熟後は、2～3時間程度の周期の拍動的分泌が認められるため採血のタイミングによっては、必ずしも高値が得られるとは限らず指標とし

ての信頼性にかける点がある。そこで、雄カニクイザルの生殖機能の加齢変化を明らかにする目的で、年齢の異なる個体を材料として精巣組織像について免疫組織化学的に検討を加えた。

B. 研究方法

27頭の対象とした動物は、その発育段階によって、新生仔期（7日齢未満、n=4）、幼仔期（1.3ヶ月齢から2.9ヶ月齢、n=4）、若齢期（3.5歳齢から4.0歳齢、精巣組織像に精子形成がまだ認められない、n=5）、春機発動期（3.0歳齢から4.4歳齢、精巣組織像で減数分裂

像の確認、精子形成過程の進行の確認および成熟精子の不在、 $n=5$) および成熟期(5.7歳齢から17.0歳齢、 $n=9$)の5段階に分けた。

抗ヒト一核内増殖抗原(PCNA)抗体および抗一テストステロン抗体は市販品を用いた(それぞれ、Dako Co., CA, USA, および株式会社ニチレイ, 東京)。また、 3β -ヒドロキシステロイドデヒドロゲナーゼ(3β -HSD)に対するウサギ抗体は、Dr. J. I. Mason(エジンバラ大学医学部教授)より提供を受けた。採取した精巣は、ブアン固定し、常法に従って 6μ 厚のパラフィン標本にした。そして脱パラフィン後、前記した3種類の抗体を第一抗体として組織と反応させ、ストレプトアビジン-ビオチン複合体法(ヒストファインSAB-POキット、株式会社ニチレイ, 東京)によって組織と反応した第一抗体の検出を行った。

C. 研究結果

PCNAの検出状況をカニクイザルの発育段階を追って述べる。新生仔期に於いては精祖細胞、セルトリ細胞、精細管周辺細胞、そしてライジヒ細胞等でPCNAが検出されたものの、幼仔期になるとこれらの細胞の内のごく一部でしか検出されなくなった。若齢期の精巣では、上記した細胞で

PCNA陽性細胞の数はこれまでの時期に比べて顕著に増加した。特に精祖細胞での陽性率は高値であった。春機発動期の精巣では、上記した4種類の細胞とも陽性率は著しく増加した。しかし、成熟期になると、精祖細胞、精母細胞でかなりの割合で陽性であったものの、精細管周辺細胞やライジヒ細胞ではまれに陽性であり、第二精母細胞、精子細胞そしてセルトリ細胞は陰性であった。

テストステロンの検出状況は以下のとおりである。新生仔期ではライジヒ細胞の一部でテストステロンは検出されたが幼仔期の精巣ではほとんど検出されなかった。若齢期および春機発動期の精巣ではライジヒ細胞の大部分からテストステロンが検出された。しかし成熟期ではテストステロンが検出されたライジヒ細胞はそれらの一部でしかなかった。

3β -HSDの検出では、新生仔期にライジヒ細胞とセルトリ細胞とに、細胞毎に検出の多いすくないは有るものの認められた。幼仔期や若齢期では陰性を呈するようになり、春機発動期では大部分のライジヒ細胞とすべてのセルトリ細胞に強い陽性反応が認められた。この傾向は成熟期の精巣でも認められた。

これらの成績を表1に示した。

D. 考察

カニクイザルの精巣の組織像と年齢との関係について光学顕微鏡あるいは電子顕微鏡で解析した報告は多い。しかし、免疫組織化学的に調査した報告はほとんど無い。我々は出生直後の仔ザルから17.0歳齢に至る雄カニクイザルで3種類の抗体を用いて免疫組織化学的手法による精巣組織と年齢との関係について検討を加えた。PCNAは細胞周期のG1、S-およびG2/M-期の細胞核に発現しているとされている。G-0期の細胞核では発現していない。ヒト・サル類あるいはラットでは精祖細胞の新生や、精細管上皮細胞の増殖の指標としてPCNAの発現が用いられている。本報告に示されているとおり、カニクイザルにおいてもPCNAの精巣での発現が細胞増殖の適切な指標になる事が明らかになった。カニクイザル新生仔で精巣の精祖細胞の一部、セルトリ細胞、精細管周辺細胞、そしてライジヒ細胞でPCNAが検出された事は、この時期にそれらの細胞が活発に細胞増殖を行っている事を意味している。さらにセルトリ細胞やライジヒ細胞においてステロイドホルモン合成酵素である 3β -HSDが検出され、後者の細胞ではテストステロンも検出されており、この酵素がこの時期の精巣

で実際に発現している事も確認された。これらの現象はヒトで報告されているのと同じである。ところで、胎盤絨毛性生殖腺刺激ホルモン(CG)はヒトやサル類で胎児-胎盤系から母体血流に分泌され妊娠の維持に関与するとともに胎児の性分化にも大きな役割を果たしている。ヒトの場合には、分娩間際まで母体血中でCGの高値が維持されている。胎児に作用したCGの影響が新生児期にまで残留し、新生児の精巣の細胞分裂・テストステロン合成をつかさどっているとされている。しかしカニクイザルの母体血中CG濃度は、妊娠初期に一過性に増加するのみで、以後、分娩まで低値が維持される。カニクイザル新生仔での精巣での細胞分裂・テストステロン合成がどのような調節・支配を受けているのかは不明であるが、あるいはヒトとは異なって、CGは胎児-胎盤系で局所的に作用し、母体血中にはあまり現れないという妊娠維持・胎仔の性分化の機構の違いを意味しているのかもしれない。今後の詳細な検討が要望される。春機発動期に到る直前まで、精巣組織は、いわば休眠状態を呈する。3種類の抗体のいずれに対してもほとんど反応していない。このことは、この時期にこれらの個体の血中テストステロン濃度が低値

のまま維持されている事とよく対応している。春機発動期に到る直前になって、精巣組織は再活性化し、細胞分裂・テストステロンの合成を始める。精祖細胞、セルトリ細胞そしてライジヒ細胞でのPCNAの発現、セルトリ細胞およびライジヒ細胞での 3β -HSDの発現とライジヒ細胞でのテストステロンの蓄積である。そして春機発動期の到来とともに精祖細胞から精母細胞への分化、そして精子形成へと進展する。これら一連の過程を本研究によって実証する事が出来たものと判断される。成熟期において活発な精子形成とテストステロン合成とが行われている事も実証された。しかし、セルトリ細胞でのテストステロン合成はあるものの、その蓄積が顕著でない事はカニクイザルの特性であるのかも知れない。17.0歳齢に至るまでのカニクイザルで調査を実施したとはいえ未だ加齢に伴う精巣機能の低下を実証するまでには至らなかった。しかし本研究によってその為の技術的基盤は確立されたものと判断される。今後さらに長期にわたる検討を行って行きたい。

E. 結論

ヒトの加齢モデルとしてのカニクイザルの雄性生殖機能について免疫組

織化学的に検討を加えた。新生仔から17.0歳齢までのカニクイザルを対象としたが、未だ加齢に伴う精巣機能の低下を実証するまでには至らなかった。しかし本研究によってその為の技術的基盤は確立されたものと判断される。今後さらに長期にわたる検討を行って行きたい。

F. 研究発表

1. 論文発表

Chen, Y., Shimizu, M., Sato, K., Koto, M., Tsunemi., Yoshida, T. and Yoshikawa, Y.: Effects of Aging on Bone Mineral Content and Bone Biomarkers in Female Cynomolgus Monkeys. *Exp. Anim.* (in press)

Liang, J.-H., Sankai, T., Yoshida, T. and Yoshikawa, Y.: Comparison of the Effects of Two Fixatives for Immunolocalization of Testosterone in the Testes of the Cynomolgus Monkey, Mouse, and Rat. *Exp. Anim.* (in press)

Liang, J.-H., Sankai, T., Yoshida, T. and Yoshikawa, Y.: Immunolocalization of Proliferating Cell Nuclear Antigen (PCNA) in Cynomolgus Monkey (*Macaca fascicularis*) Testes During Postnatal Development. *J. Med. Primatol.* (in press)

Matsumuro, M., Sankai, T., Cho, F., Yoshikawa, Y. and Yoshida, T.: A Two-Step Extraction Method to Measure

Fecal Steroid Hormones in Female
Cynomolgus Monkeys (Macaca
fascicularis). *Am. J. Primatol.*, 48, 291-
298, 1999.

Liang, J.-H., Sankai, T., Yoshida, T.
Cho, F. and Yoshikawa, Y.:

Localization of Immunoreactive
Testosterone and 3 beta-Hydroxysteroid
Dehydrogenase/delta 5-delta 4 Isomerase
in Cynomolgus Monkey (Macaca
fascicularis) Testes During Postnatal
Development. *J. Med. Primatol.*, 28,
62-66, 1999.

2. 学会発表

吉田高志: カニクイザルと比較した
人間の成長の特徴. 日本発達心理学
会第11回大会シンポジウム「発
達における行動と身体—行動発達と
身体成長」、2000年3月、東京.

吉田高志: カニクイザルの生殖機能.

群馬大学生体調節研究所シンポジウ
ム「脳・下垂体・生殖腺」、200
0年3月、前橋.

吉田高志: 先天異常研究のヒトへ
の外挿を考える—サルとヒトとの類
似性—生殖内分泌学の立場から. 第
39回日本先天異常学会学術集会シ
ンポジウム、1999年7月、鹿
児島.

山海 直、土屋英明、吉田高志: 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. 第46回日本
実験動物学会総会、1999年五月、
市川.

土屋英明、吉田高志、小野孝浩、鈴
木通弘、長 文昭、山海 直: 妊娠
カニクイザルにおける膣インピーダ
ンスの変化. 第46回日本実験動物
学会総会、1999年五月、市川.

表1：カニクイザルの精巣組織中のPCNA、テストステロン、
および 3β -HSD免疫活性の検出状況と発育段階との関係

発育段階	PCNA				テストステロン				3β -HSD			
	SG	SC	ST	L	SG	SC	ST	L	SG	SC	ST	L
新生仔	+	*	+	+	-	*	-	+	-	*	+	+
幼仔期	±	*	±	±	-	*	-	±	-	*	-	±
若齡期	+	*	+	+	-	*	-	+	-	*	+	+
春機発動期	++	++	+	+	-	-	-	++	-	-	++	++
成熟期	++	++	-	±	-	-	-	++	-	-	++	++

PCNA：核内増殖抗原、 3β -HSD： 3β -hydroxysteroid dehydrogenase

-：陰性、±：やや陽性、+：陽性、++：顕著に陽性、*：存在せず

SG：精粗細胞、SC：精母細胞、ST：セルトリ細胞、L：ライジヒ細胞

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）

加齢にともなう細胞機能の変化をもたらす要因の一つとして T 細胞レセプター (TCR) の多様性の加齢変化を調査した。まず始めに、カニクイザルの TCR 多変領域 (V 領域) の β 鎖 (TCR V β) をコードする遺伝子の多様性を解析する手法を確立した。TCR V β 1 から 24 までの PCR プライマーを作成し、末梢リンパ球から抽出した mRNA から RT-PCR により増幅した産物を SSCP 法により解析した結果、それぞれの TCR V β ファミリーで特異的に増殖している T 細胞クローンが同定できた。一方、SSCP 解析でバンドとして検出される増殖 T 細胞クローンは、胎児または新生児ではほとんど検出されないが、1 歳以上の若齡ザルリンパ球ではすべての TCR V β ファミリーで増殖クローンが検出された。また、4~5 日齡、5 歳、9~11 歳、15~16 歳のサルでクローン数を比較した結果、増殖 T 細胞クローンの数は加齢にともない増加する傾向が見られた。さらにこれらのクローンは少なくとも 6 ヶ月間は安定して末梢に出現することが判明した。リンパ組織では、脾臓細胞では増殖 T 細胞クローンが検出されたが、リンパ節細胞では検出されなかった。本法の確立により、カニクイザルにおける加齢にともなう T 細胞機能の変化を末梢の T 細胞クローンの変化と併せて解析することが可能となった。

キーワード：カニクイザル、T リンパ球、T 細胞レセプター、増殖 T 細胞クローン、SSCP

A. 研究目的

これまで、老齡カニクイザルでは種々の免疫機能に変化が生じており、特に T 細胞の量的、質的变化が著しいことから、老化にともなう T 細胞機能の変化が生じていることを明らかにしてきた。また、カニクイザルではヒトおよびマウスと異なり、加齢にともない末梢リンパ球中に胸腺細胞と同様 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から、末梢 DP 細胞が胸腺外分化 T 細胞である可能性を考慮した解析も行ってきた。

一方、老齡ザルでは単鎖 DNA (ssDNA) に対する抗核抗体などの自己抗体が高頻度で出現することも明らかにしている。多くの自己免疫疾患患者では、自己抗体の出現と平行して特異的な

TCR をもつ T 細胞クローンの増加が報告されている。そこで今年度はカニクイザルの TCR V β 鎖を検出することにより、T 細胞クローンの加齢変化を解析する目的で実験を行った。

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 4 日齡から 16 歳までのカニクイザルと胎齡 160 日の胎児から採血し、リンパ球を分離した。また、実験安楽殺個体からリンパ組織 (胸腺 (胎児)、脾臓、表層リンパ節、深部リンパ節) を採取し、リンパ球を分離した。分離したリンパ球から定法に従い mRNA を抽出した。

アカゲザルの TCR V β の 1 から 24 の各ファミリーの塩基配列を基に、増幅用のプライマーを作成した。1~1.5x10⁶ のリンパ球から抽出した mRNA から RT-PCR によりそれぞれの TCR V β ファミリー遺伝子を増幅した。この PCR 産物を

denaturing solution で希釈し、94C で 3 分間処理した。処理後直ちに 4% polyacrylamide ゲルで泳動展開し、分離した DNA を nylon 膜上に移した。ビオチン化した C β 特異的プローブでハイブリダイズした後に、バンドを染色し X 線フィルムに感光させた。

C. 結果

1) カニクイザルの加齢にともなう T 細胞クローンの変化：図 1A に 11 歳のカニクイザル末梢リンパ球から抽出した mRNA から TCR V β の 1~24 ファミリーのプライマーを用いて増幅した PCR 産物の泳動図を示す。予想されたサイズの PCR 産物が得られていることが確認できた。これらの産物を SSCP 解析した結果、図 1B に示すように 1~24 のいずれのファミリーにおいても、複数の増殖した T 細胞クローンが単一バンドとして検出され、SSCP 法によりカニクイザル T 細胞のクローナル増殖が解析できることが判明した。

図 1B に示す成体のリンパ球に対し、図 2 に示す 160 日齢の胎児（上図）の末梢血リンパ球ではいずれの TCR V β ファミリーにおいても、大部分がスメアー状になり、バンドとして検出できる増殖 T 細胞クローンはほとんど検出されなかった。一方、4 日齢の新生児（下図）では、図 1B の成体と比較すると本数は少ないが、胎児に比較すれば明らかにバンドとして検出できるクローンが出現していることが判った。

図 3 は 4~5 日齢、5 歳、9~11 歳、15~16 歳の年齢の異なる 4 群のカニクイザルサルで検出可能なバンド数を示したものである。図に示すように、いずれのファミリーにおいても増殖した末梢 T 細胞クローンを表すバンドの数は加齢にともない増加する傾向が見られ、総バンド数は 15~16 歳齢のカニクイザルが最も多かった。

2) T 細胞クローンの安定性と体内分布：

次に SSCP 法で検出される末梢増殖 T 細胞クローンの末梢血中での安定性（持続性）を確認する目的で、同一のサルから 1 ヶ月、3 ヶ月、6 ヶ月目に採血し、T 細胞クローンの変化を調査した（図 4 上図）。図には 6 つの代表的ファミリーについての結果を示すが、いずれのファミリーにおいても、バンドとして検出される T 細胞クローンの数および量（濃度）には 6 ヶ月間でほとんど変化が見られない。このことから外見上正常なカニクイザルでは末梢の T 細胞クローンは比較的安定して出現していることが判明した。

図 4 下図に同一個体で、末梢血リンパ球、表層リンパ節細胞、深部リンパ節細胞、脾臓細胞のそれぞれで T 細胞クローンを比較した結果を示す。図に示すように増殖 T 細胞クローンの数は末梢血リンパ球で最も多く、ついで脾臓細胞にも検出されたが、表層、深部を問わずリンパ節細胞にはほとんど検出されなかった。

D. 考察

T 細胞はそれぞれ抗原特異性の異なる TCR を発現し、抗原提示細胞により組織適合性抗原とともに提示されている抗原を認識する。抗原を認識して活性化した T 細胞クローンは、分裂増殖を繰り返して、同一の TCR を発現している T 細胞が末梢血中で増加する。こまでの研究で、老齢カニクイザルでは末梢 T 細胞の表現型および機能に高齢者と同様な変化が生じていること、これらの変化が胸腺退縮後に急激に生じることを明らかにしており、胸腺退縮後の末梢 T 細胞の抗原レパトアの変化と機能変化との関連が注目されている。一方、種々の感染症や免疫疾患患者で特定の TCR を発現している T 細胞クローンが増殖していることが報告されている。TCR の解析は、老化に伴う T 細胞機能の変化を末梢に出現している T 細胞のレパトアと関連させて解析することを可

能とする。今年度の最も大きい成果は、カニクイザルの TCR V β の 1~24 のファミリーをコードする遺伝子を解析することにより、特定の TCR を発現している増殖 T 細胞クローンを同定することが可能になったことである。

TCR の多様性を利用した T 細胞のレパトリを解析した報告は多いが、T 細胞クローンの初期発達、体内分布および末梢での安定性について検討した報告はほとんどない。そこで今年度は新規に開発した TCR 解析法を用いて、カニクイザルにおける T 細胞クローンの初期発達と加齢変化、末梢中の安定性、体内分布を調査した。予想されたように、胎児および 4 日齢の新生児の末梢 T 細胞では生体に比べて増殖 T 細胞クローンはほとんど検出されないことから、特定の T 細胞クローンの増殖をもたらす抗原刺激が少ないことが実証された。さらに T 細胞クローンの数は加齢に伴い増加する傾向が認められたが、特定の TCR を発現したクローンが増加するという結果は得られなかった。すなわち、加齢にともない多様な抗原刺激により広範な T 細胞クローンの増殖が蓄積されることが判明した。一方で、個体が暴露される抗原刺激は量的にも質的にも継時的に変化するにも関わらず、末梢中に出現する増殖 T 細胞クローンは 6 ヶ月間に渡って安定して出現していることから、これらのクローンは持続的な抗原刺激に対応して増殖している T 細胞の可能性がある。前述したように、自己免疫疾患の患者の末梢中には、特定の TCR を発現している T 細胞クローンの増殖が報告されており、これらのクローンは自己反応性 T 細胞である可能性が示唆されている。老齢カニクイザルでも高齢者と同様に抗核抗体やリン脂質抗体などの自己抗体のレベルが高いことから、今回明らかとなった末梢中に持続的に出現している T 細胞クローンと自己抗原との関連性が注目される。

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強く示唆されている。我々はこれまでに老齢カニクイザルの末梢に出現する CD4⁺/CD8⁺ (DP) T 細胞が胸腺退縮後に末梢に出現する胸腺外分化 T 細胞であるという仮説のもとに DP 細胞の表現型と機能を解析してきた。今回確立した TCR 解析法を適用すれば、DP 細胞のレパトアおよび由来を TCR の遺伝子レベルで解析することが可能となる。

E. 結論

カニクイザルの TCR 解析法を確立し、本法を用いて特定の TCR V β を発現している末梢 T 細胞クローンの初期発達、加齢変化、安定性および体内分布を調査し、以下の結果を得た。

胎児および 4 日齢の新生児の末梢血中には SSCP 法で単一バンドとして検出される増殖 T 細胞クローンはほとんど検出されなかった。一方、解析した TCR V β の 1 から 24 のいずれのファミリーにおいても、増殖 T 細胞クローンの数は加齢に伴い増加する傾向が認められた。

末梢中の T 細胞クローンは 6 ヶ月間は安定して出現していることが判明した。

増殖 T 細胞クローンは末梢血及び脾臓細胞では検出できたが、表層および深部リンパ節細胞ではほとんど検出できなかった。

F. 研究発表

1. 論文発表

Ikura S, Terao K., Matsuzaki I, Inoue-Murayama M, Murayama Y. (1999) 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

Akari H, Nam KH, Mori K, Otani I, Shibata H, Adachi A, Terao K., Yoshikawa Y (1999) Effects of

SIVmac infection on peripheral blood CD4+ CD8+ T lymphocytes in cynomolgus monkeys.

CLINICAL IMMUNOLOGY, 91: 321-329

小倉 剛、杉本哲朗、野口規子、川島由次、寺尾恵治 (1999) アカゲザルのリンパ球サブセット解析におけるリンパ球分離法の比較検討、*霊長類研究*、15: 361-368

Wakao K, Matsuzaki I, Terao K, Inoue-Murayama M, Murayama Y (1999) Involvement of granzyme B expression in the enhancement of natural killer activity by beta-endorphin. *BRAIN, BEHAVIOR, AND IMMUNITY*, -in press-

Suzuki J, Gotoh S, Miwa N, Terao K, Nakayama H (2000) Autoimmune hemolytic anemia (AIHA) in an infant rhesus macaque (*Macaca mulatta*). *JOURNAL OF MEDICAL PRIMATOLOGY*, -in press-

Yoshino N, Ami Y, Terao K, Tashiro F, Honda M (2000) Upgrading of flow cytometric analysis for absolute counts, cytokines and other antigenic molecules of cynomolgus monkeys using anti-human crossreactive antibodies. *EXPERIMENTAL ANIMALS*, -in press-

Nam KH, Illes Z, Terao K, Yoshikawa Y, Yamamura T (2000) Characterization of expanded T cell clones in healthy macaque: ontogeny, distribution and stability. *DEVELOPMENTAL AND COMPARATIVE IMMUNOLOGY*, -in press-

Murayama Y, Terao K, Inoue-Murayama M (2000) Molecular cloning and characterization of cynomolgus monkey Fas. *HUMAN IMMUNOLOGY*, -in press-

2. 学会発表

川崎勝義、山海 直、寺尾恵治、小山高正、吉川泰弘 カニクイザル及びラットの行動解析におけるデジタル動画像処理応用の試み、第 56

回動物心理学会、1999 年 5 月、金沢

南 基煥、明里宏文、寺尾恵治、吉川泰弘 カニクイザルにおける末梢血 CD4+ CD8+ T細胞の加齢変化、第 46 回日本実験動物学会、1999 年 5 月、市川

笠井文生、寺尾恵治、平井百樹、ヒト第 2 番染色体の進化、第 15 回日本霊長類学会、1999 年 6 月、宮崎

肥田宗友、鈴木 穰、日尾有宏、寺尾恵治、平井百樹、菅野純夫、ヒトとの 5'UTR (untranslated region) の比較を中心としたカニクイザルの脳部位特異的 cDNA ライブラリーの解析、第 15 回日本霊長類学会、1999 年 6 月、宮崎

浅田陽子、川本 芳、庄武孝義、寺尾恵治、ヒト IgG サブクラス (IgG1、IgG2、IgG3、IgG4) に対する抗体の各種霊長類血清中の IgG との反応性、第 15 回日本霊長類学会、1999 年 6 月、宮崎

吉野直人、網 康至、寺尾恵治、田代文夫、本多三男、非ヒト霊長類モデルの免疫病態解析のための抗ヒト抗体交叉反応性、第 9 回日本サイトメトリー学会、1999 年 8 月、札幌

川崎勝義、池口邦彦、村松慎一、静岡奈美、山海 直、寺尾恵治、小山高正、吉川泰弘、パーキンソン病の重症度判定における動画差分処理の応用、第 29 回日本神経薬理学会、1999 年 9 月、広島

小野文子、羽成光二、成田勇人、鴻野あや子、揚山直英、大藤圭子、中村紳一郎、鈴木通弘、藤本浩二、吉田高志、榊原一兵、寺尾恵治、山田章雄、吉川泰弘、カニクイザルを用いた老人病モデルの開発研究、第 128 回日本獣医学会、1999 年 10 月、熊本

寺尾恵治、サル類のストレスモデルと神経・免疫・内分泌相関、平成 11 年度京大霊長類研究所共同利用研究会「霊長類のストレス反応とそのメカニズム」、1999 年 11 月、犬山

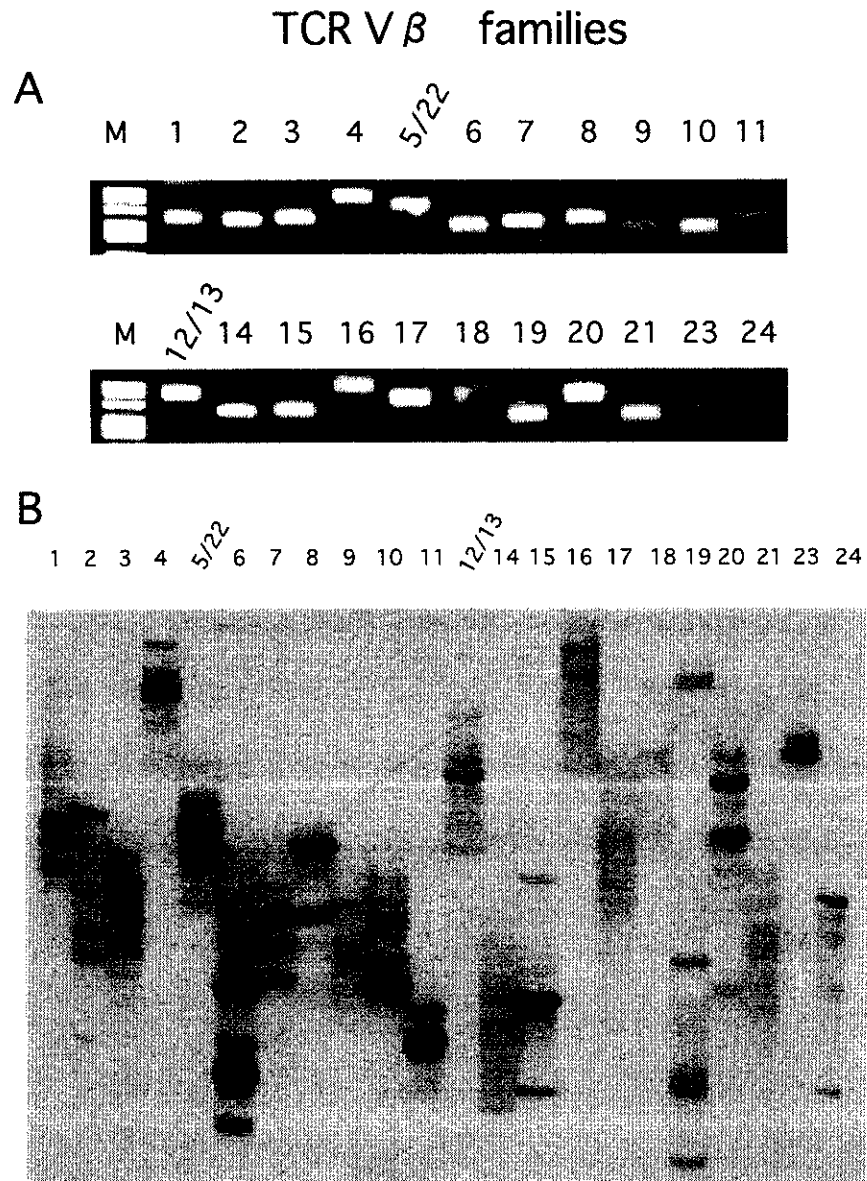


図 1、カニクイザルの T 細胞レセプター TCR V β ファミリー遺伝子の増幅と SSCP による T 細胞クローンの解析

A : TCR V β 1~24 のファミリー特異的プライマーで増幅した PCR 産物

B : 11 歳齢カニクイザルの末梢血 T 細胞の TCR V β 遺伝子の SSCP 解析
増殖した T 細胞クローンがバンドとして検出できる

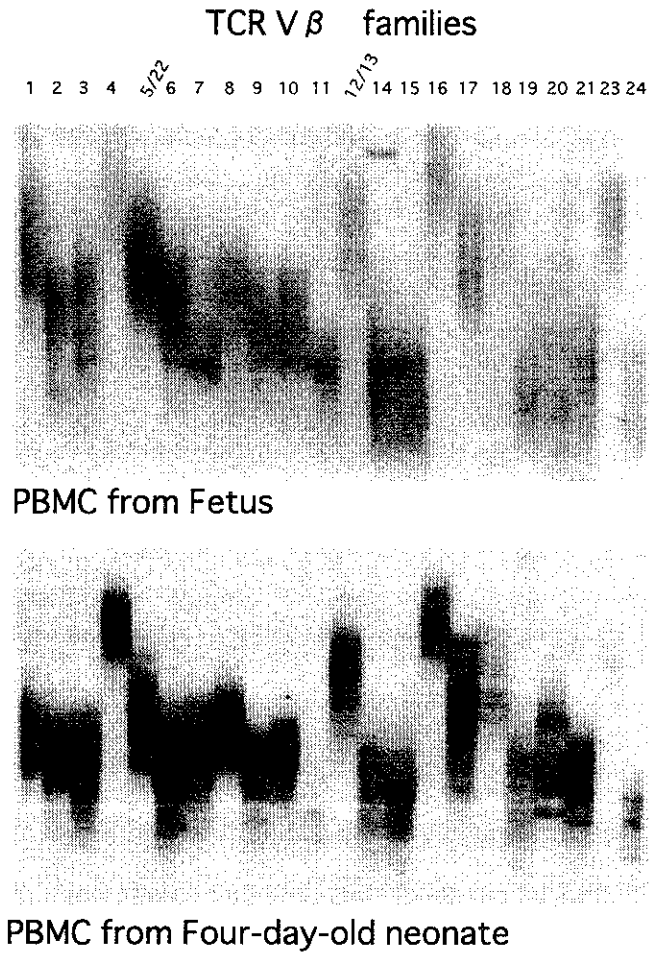


図 2 : 160 日齢胎児（上図）および 4 日齢新生児（下図）末梢血 T 細胞 TCR V β の SSCP 解析

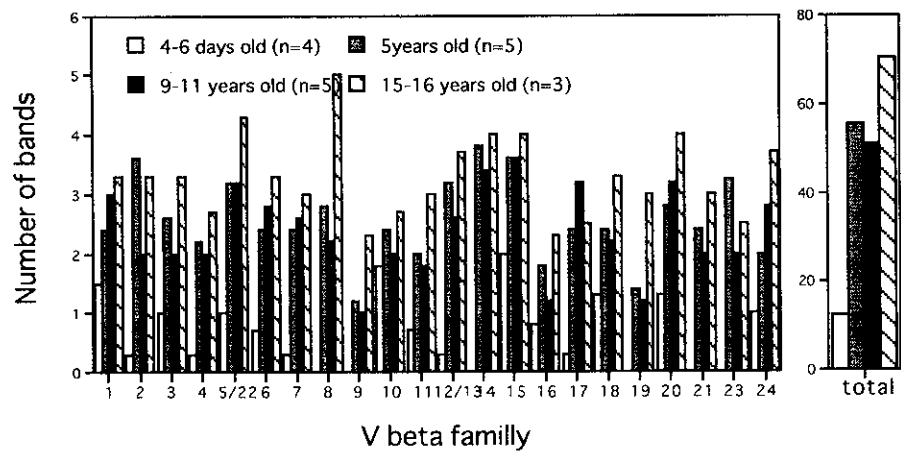


図 3 : 年齢の異なるカニクイザルの末梢血での増殖 T 細胞クローン数の比較