

図 1 . 大脳接種部位の炎症
(SV接種後 5 日)

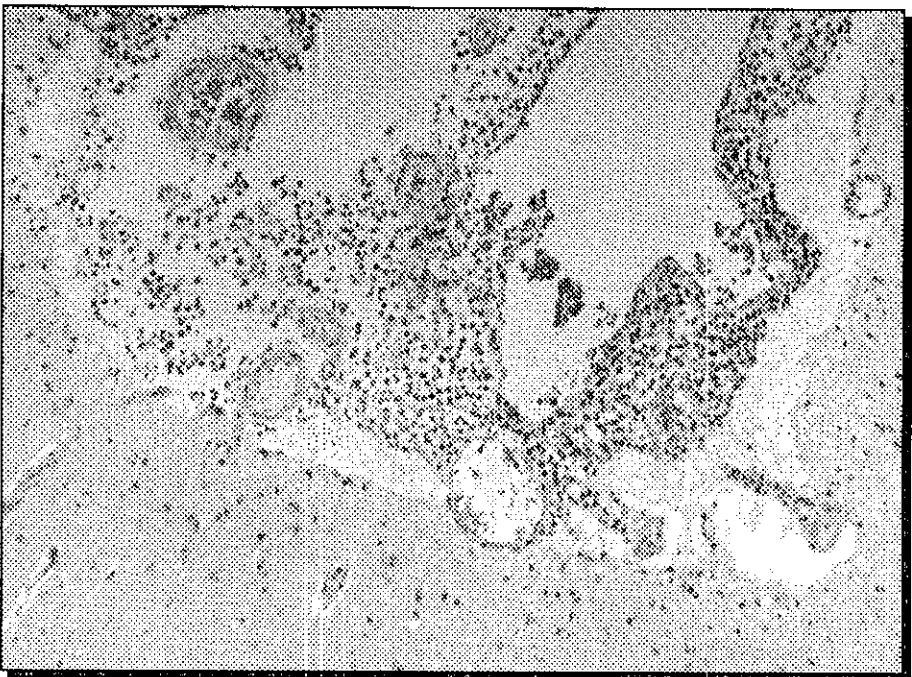


図 2 . 大脳接種部位周囲の髄膜炎
(SV接種後 5 日)

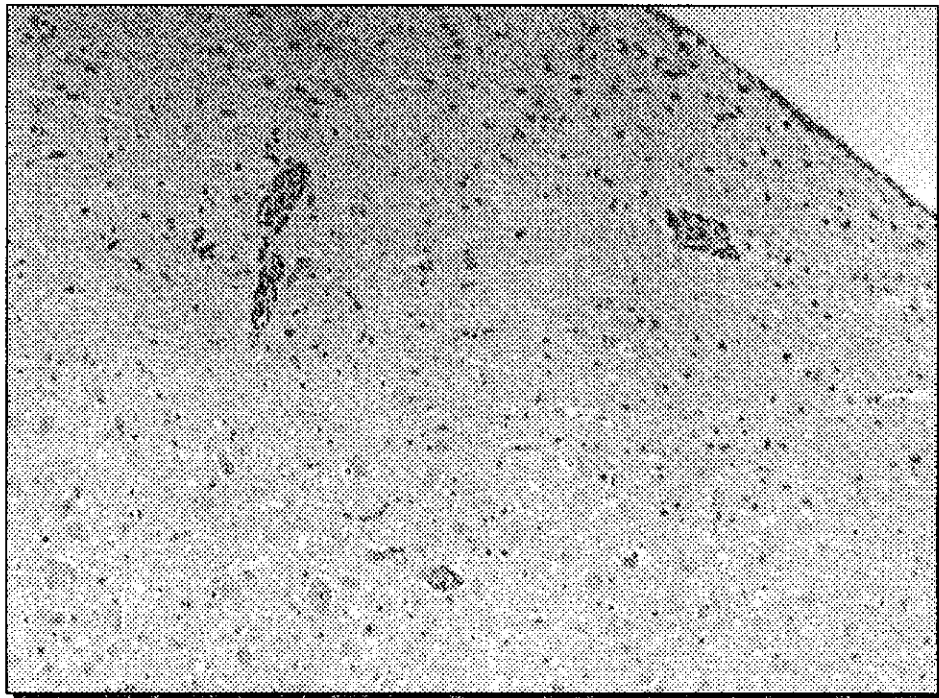


図 3. 延髄の囲管性細胞浸潤
(SV接種後 5 日)

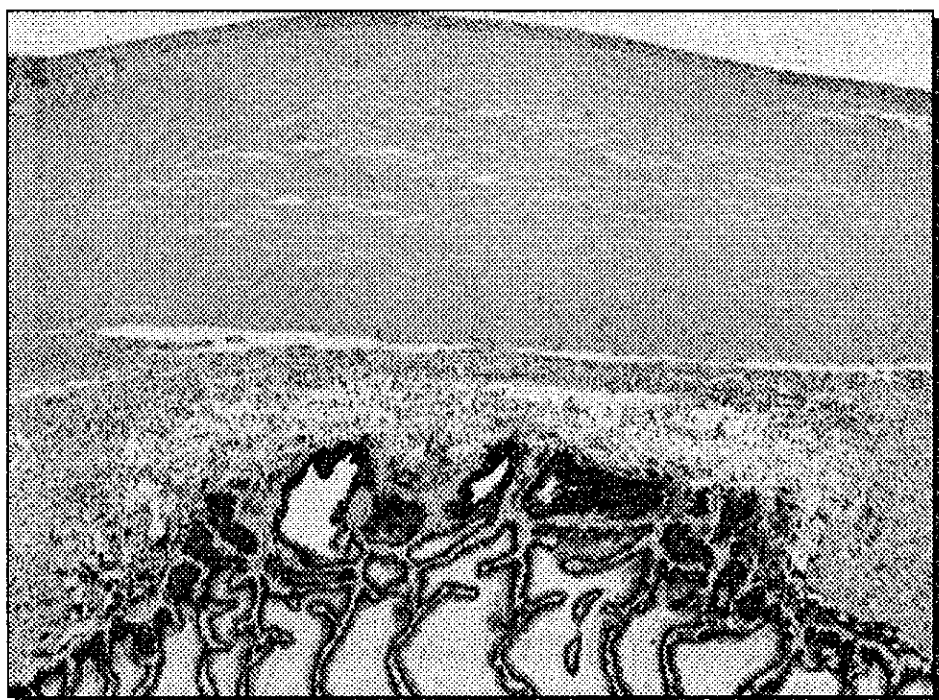


図 4. 角膜と虹彩の炎症性癒着
(SV接種後 5 日)

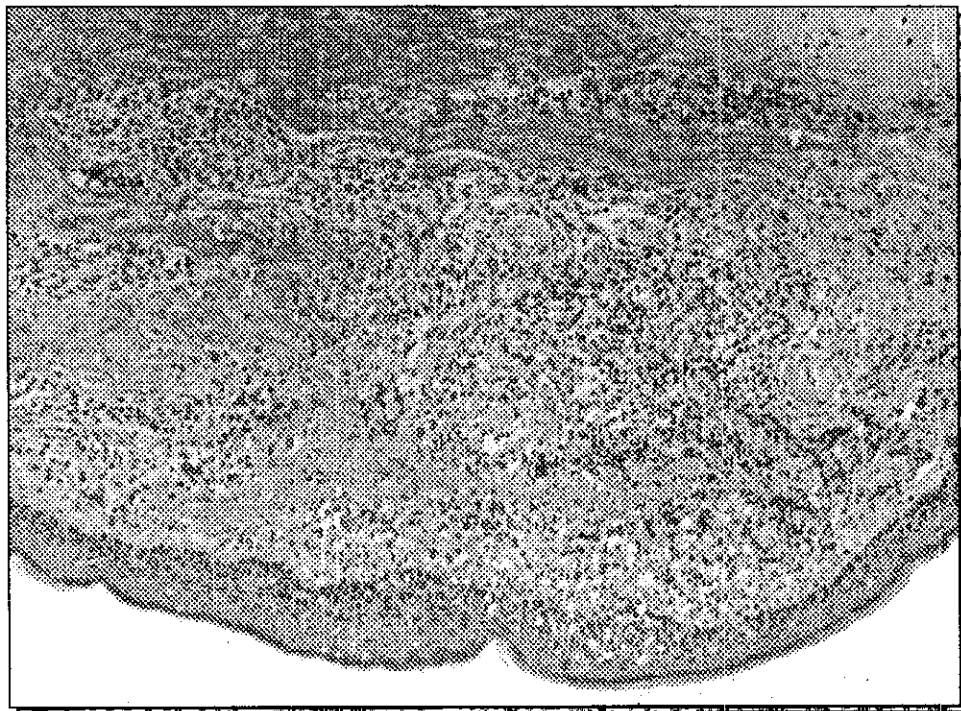


図5. 鼻粘膜下の炎症
(SV接種後5日)

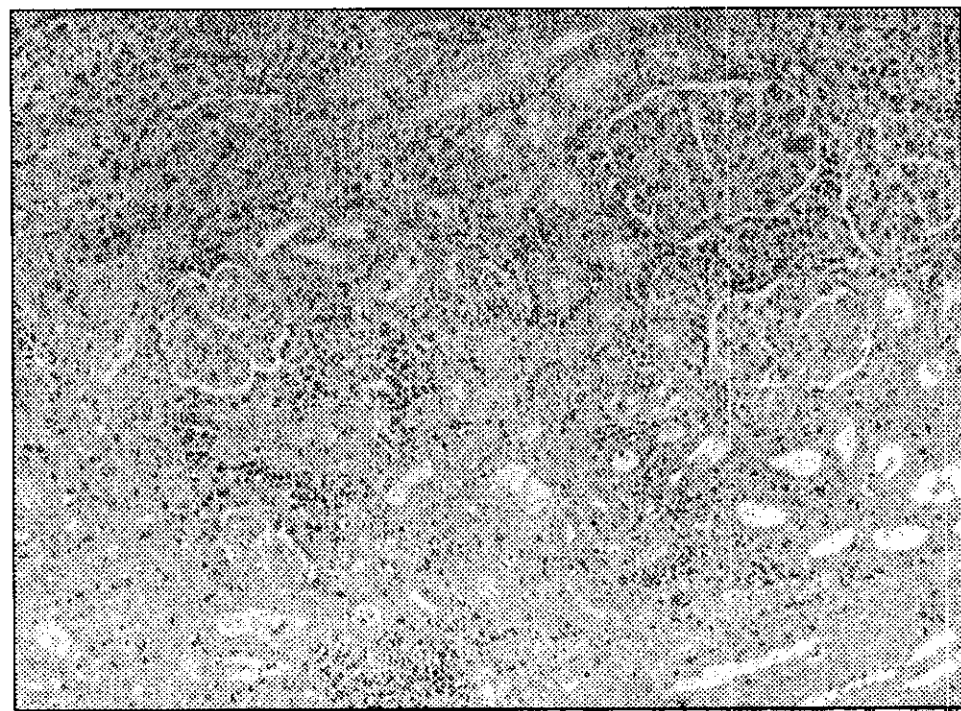


図6. 腎臓間質のリンパ球集簇
(SV接種後5日)

マカク属サルを用いた遺伝子治療法の評価システムの開発に関する研究

分担研究者 寺尾恵治（国立感染症研究所・筑波霊長類センター）

研究要旨

今年度はウイルスベクターの有効性評価の指標として、ベクター接種にともなう宿主応答の評価システムの開発を目的として以下の研究をおこなった。

1) 遺伝子導入経路と宿主免疫応答との関連を解析するため、レトロベクターにより骨髄造血幹細胞と末梢リンパ球に GFP 遺伝子を導入したカニクイザルについて、GFP 特異的な免疫応答を比較した。末梢リンパ球に GFP 遺伝子導入したカニクイザルでは、GFP 分子に対する抗原特異的な幼若化反応と細胞障害性 T 細胞 (CTL) 活性が認められたが、造血幹細胞に導入した場合には両反応とも陰性であった。このことから、造血幹細胞への遺伝子導入では宿主に免疫寛容が成立することが確認された。

2) ベクター接種量と宿主反応との関連では、F タンパク欠損センダイウイルスベクター (dFSeV) を 10^{10} /Kg を筋肉内に接種したカニクイザルでは炎症性サイトカインのうち IL6 および INF γ の軽度の上昇が認められるが、 10^9 /Kg を接種したサルではいずれも検出限界以下であった。両接種群とも TNF α は検出されなかった。一方、血中抗体のレベルはウイルス接種量に対応して上昇した。

3) ベクター構造と宿主免疫応答との関連を、野生型センダイウイルスベクター (wtSeV) と dFSeV を接種したマウスで比較した。dFSeV を接種したマウスでは Direct CTL および CTL Precursor 活性のいずれも wtSeV 接種マウスより有意に低く、宿主の細胞性免疫応答回避という点で dFSeV は wtSeV より優れていると判断した。さらに、wtSeV と dFSeV をそれぞれ感染させた標的細胞では dFSeV 感染標的の方が細胞障害を受けにくいことから、標的細胞上への抗原提示に関しても dFSeV は wtSeV より優っていると推測された。

4) カニクイザルでウイルスベクターに対する CTL 活性を測定する方法として、自己骨髄ストローマ細胞を標的とするアッセイ法を開発した。この方法を用いて dFSeV を多臓器に接種したカニクイザルでは接種後 5 日目に比較的高い Direct CTL 活性が検出されることが明らかになった。

キーワード：カニクイザル、ウイルスベクター、細胞障害性リンパ球、炎症性サイトカイン

を用いて遺伝子デリバリーシステムと治療プロトコルの有効性と安全性を評価する必要がある。

A. 研究目的

現在開発中の遺伝子治療医薬品の生体内での安定性、安全性および有効性については、前臨床試験としてヒトに最も近縁な霊長類を用いて評価する必要がある。さらに、遺伝子治療医薬品として開発の進んだ製剤については、霊長類

本研究では、マカク属サルを用いて 1) 新規開発ベクターの生体内での安定性、安全性、有効性を評価する。ついで開発の進んだベクターについては 2) 遺伝子デリバリーシステムを含む有効な遺伝子導入法を確立し、3) 特定の疾患を標的とした遺伝子治療法の有効性を評価することを目的としている。

遺伝子治療用ベクター、特にウイルスベクターの場合には、接種されたベクターそのものまたは導入遺伝子の産物に対する宿主免疫応答のレベルが、治療遺伝子の発現レベル、発現時間さらには再治療の可否を決定する。今年度はベクターの有用性評価の指標として、レトロウイルスベクターとセンダイウイルスベクターについて、宿主免疫応答を中心にしてベクター導入経路、ベクター接種量およびベクター構造が、宿主反応に及ぼす影響について解析した。

B. 材料と方法

1) レトロウイルスベクターで造血幹細胞に導入した GFP に対する CTL 誘導：

レトロベクターで GFP 遺伝子を造血幹細胞に導入したカニクイザル 3 頭 (BMT#3、BMT#4、BMT#5) と末梢リンパ球に導入したカニクイザル 1 頭 (BMT#9) について、末梢リンパ球の GFP ペプチドに対する幼若化反応と CTL Precursor 活性を比較した。造血幹細胞への GFP 遺伝子の導入は昨年報告した方法により行い、骨髄移植後 1~1.5 年を経過したサルから末梢リンパ球を分離した。末梢リンパ球への GFP 遺伝子の導入は、分離したリンパ球を ConA と IL2 存在下で培養し、GFP 組み込みレトロウイルスをレトロネクチン存在下で感染させて行った。GFP の発現を指標にして FACS により定量した遺伝子導入効率は 30%であった。 2×10^8 個の遺伝子導入リンパ球を静脈内投与した後 1 ヶ月目に採血し、末梢リンパ球を分離した。

GFP に対する *in vitro* の幼若化反応は、GFP ペプチド (GVVPILVEL) で感作し、X 線照射した自己刺激リンパ球 (2×10^6 /ml) と等量の自己反応リンパ球とを 96 穴平底プレートに混合し、4、5、6、7 日間培養し、TdR の取り込みで幼若化反応を測定した。なお、レトロウイルスベクターで GFP および LacZ 遺伝子を導入した自己

骨髄ストローマ細胞 (以下 SC) と非導入 SC を X 線照射して調整した刺激細胞についても同様な方法で幼若化反応を調べた。

CTL Precursor の誘導は、GFP ペプチドで感作した自己リンパ球を刺激細胞として、20IU/ml のヒト IL2 存在下で 10 日間培養して行った。CTL 活性の測定は、前述した方法でレトロベクターにより GFP (GFP) を導入したリンパ球と空ベクター (PL) を導入したリンパ球とをそれぞれ標的とした ^{51}Cr 遊離法でおこなった。

2) dFSeV 大量接種ザルの宿主応答：

2 頭のカニクイザルの大腿筋肉内に 10^9 /Kg および 10^{10} /Kg の dFSeV を接種し、接種 7 日前、接種後 6 時間、1、3、5、7、14 日目に採血し、分離した血漿を凍結保存した。ウイルス接種後の宿主応答として、血漿中の 3 種の炎症性サイトカイン (IL6、 $\text{INF } \gamma$ 、 $\text{TNF } \alpha$) レベルの変化と抗 SeV 抗体の変化を調査した。サイトカインレベルはサルのサイトカインと交叉反応性を示す市販の ELISA キットを用いておこない、抗体価の測定は不活化 SeV (野生型) を結合した ELISA プレートを用いて、1,000 倍に希釈した血漿の反応性を酵素抗体法で測定した。

3) 野生型 SeV (wtSeV) と F タンパク欠損 SeV (dFSeV) の CTL 誘導能の比較：

ベクター構造と宿主免疫応答との関連をカニクイザルでの実験に先立ち、今年度は C3H マウスをモデルにして調査した。

C3H マウスの腹腔内に 10^8 /マウスの wtSeV および dFSeV を接種し、接種後 4 日目に脾臓細胞を調整した。wtSeV または dFSeV をそれぞれ MOI5 および MOI10 で L929 細胞に感染させ、感染後 22 時間目に細胞を回収洗浄した後、 ^{51}Cr で標識したものを CTL の標的細胞とした。Direct CTL アッセイは、脾臓細胞と標的 L929 細胞と

を 100:1、50:1、25:1、12.5:1、6.4:1、3.2:1 に混合し、4 時間反応後に上清中の ^{51}Cr を測定して CTL 活性を評価した。CTL Precursor の誘導は、wtSeV および dFSeV を上記の方法で感染させ、X 線照射した L929 細胞を刺激細胞として、20IU/ml のマウスリコンビナント IL2 存在下で脾臓細胞と 4 日間混合培養しておこなった。CTL Precursor 活性は、誘導後の脾臓細胞をエフェクターとして Direct CTL と同様な方法で測定した。

dFSeV を多臓器に接種したカニクイザル 3 頭について、接種後 5 日目 (2 頭) および 10 日目 (1 頭) の Direct CTL 活性を調査した。CTL の標的細胞としては wtSeV を MOI5 で感染させ、22 時間後の自己骨髄ストローマ細胞 (SC) を ^{51}Cr で標識し標的細胞とした。GFP 発現を指標にして FACS で調べた標的細胞での遺伝子導入効率は、L929 細胞、SC のいずれも 90%以上であった。

C. 結果及び考察

1) レトロウイルスベクターで造血幹細胞に導入した GFP に対する CTL 誘導:

図 1 は、レトロウイルスベクターで末梢リンパ球に GFP 遺伝子を導入したカニクイザルについて、末梢リンパ球中の GFP 特異的 T 細胞の有無を幼若化反応で調べた結果を示す。幼若化反応の刺激抗原として GFP ペプチドと GFP 導入自己骨髄ストローマ細胞 (GFP/SC) を用いたが、両者とも培養時間の増加に伴って幼若化反応性の増加が認められた、しかしながら、ストローマ細胞の場合には LacZ 導入 SC (LacZ/SC) でも GFP/SC と同程度の反応が認められたことから、GFP 特異的な反応でない可能性が高い。このことから、GFP 特異的な CTL Precursor の誘導には GFP ペプチドが適していると判断した。一方、造血幹細胞に GFP を導入した 3 頭のカニクイザルでは、GFP ペプチド刺激による幼若化反応は

認められなかった (結果略)。

図 2 は GFP 導入造血幹細胞移植をおこなった 3 頭 (BMT#3、BMT#4、BMT#5) と GFP 導入末梢リンパ球移植をおこなった 1 頭 (BMT#9) の末梢リンパ球をエフェクターとした CTL Precursor アッセイの結果を示す。造血幹細胞に GFP を導入した 3 頭のカニクイザルでは細胞障害活性はほとんど認められないが、末梢リンパ球に GFP を導入した BMT#9 では、GFP 導入自己リンパ球 (GFP) を標的とした場合には、空ベクター導入自己リンパ球 (PL) を標的とした場合に比べて有意に高い細胞障害活性が認められた。

造血幹細胞遺伝子治療の有用性の一つに、造血幹細胞に導入した遺伝子の産物に対する免疫寛容の成立が示唆されている。これに対して、最近アカゲザルの造血幹細胞にレトロベクターを用いて導入した GFP に対して CTL が誘導されることが報告された。今回のカニクイザルの結果は、造血幹細胞遺伝子治療では導入遺伝子産物に対する免疫寛容が成立する可能性を強く示唆している。今回の実験に用いた 3 頭の骨髄移植ザルでは、骨髄中の造血前駆細胞レベルでは導入遺伝子 (GFP) の発現が 1 年以上に渡って持続するにも関わらず、末梢には GFP 陽性細胞の存在が確認できていない。今回の結果から、これらのサルで遺伝子導入細胞が末梢に出現しない可能性として、CTL による免疫学的排除ではなく、GFP の毒性による可能性が高いと判断した。

2) dFSeV 大量接種ザルの宿主応答:

大量の dFSeV ベクターを接種した場合の宿主反応を血中の炎症性サイトカインレベルと抗体産生を指標に調査した。図 3 に $10^9/\text{Kg}$ よび $10^{10}/\text{Kg}$ の dFSeV を筋肉内接種したカニクイザルで、3 種のサイトカインレベルの変化を調査した結

果を示す。 10^{10} /Kg を接種した個体でのみ、接種後 6 時間目をピークとする IL6 の上昇と接種後 5 日間持続する INF γ の一過性の上昇が認められた。一方、 10^9 /Kg 接種個体では、いずれのサイトカインも検出限界以下であった。

ウイルスベクター接種が宿主反応を誘発する程度を評価する指標として、サイトカインに加えて血中抗体の変化を調査した。図 4 に示すように、 10^{10} /Kg を接種した個体では接種後 5 日目にはほぼプラトーに達する抗体価の急激な上昇が見られたが、 10^9 /Kg を接種した個体では、抗体価の上昇は緩やかであった。これらの結果から、炎症性サイトカインと抗体産生誘導という観点からみれば、dFSeV は 10^9 /Kg という大量接種でも宿主に対して比較的刺激性の少ないベクターと判断される。今後は同量の wtSeV 接種ザルでのサイトカインレベルの変化と比較する必要がある。

3) 野生型 SeV (wtSeV) と F タンパク欠損 SeV (dFSeV) の CTL 誘導能の比較：

ウイルスベクターの構造と宿主免疫反応誘導能との関連を明らかにする目的で、dFSeV と wtSeV での CTL 誘導能をマウスで予備的に調査した。図 5 は dFSeV と wtSeV とを接種したマウス脾臓細胞での異なった標識細胞に対する Direct CTL の結果を示す。図 5 上段に示すように wtSeV 接種マウスでは下段に示す dFSeV 接種マウスに比べて、有意に高い CTL 活性が認められた。さらに wtSeV 接種マウスの CTL 活性は wtSeV を感染させた標的に対する CTL 活性 (図左) が dFSeV を感染させた標的細胞 (図右) に比べて著しく高いことが明らかとなった。図 6 に示すように CTL Precursor アッセイにおいても wtSeV 接種マウスの脾臓細胞で dFSeV 接種マウスに比べて高い CTL Precursor 活性が認められた。興味深いことは、CTL Precursor 活性では Direct

CTL 活性で見られたような標的細胞の違いによる細胞障害活性の差が認められなかった。

SeV の CTL エピトープは主として F タンパクに存在することが知られている。今回の結果から、F タンパクを欠損した dFSeV は wtSeV に比較して Direct および Precursor のいずれにおいても CTL 誘導能が低いと判断される。さらに、少なくとも Direct CTL においては、dFSeV 感染標的細胞の CTL 感受性は wtSeV 感染標的細胞より低いことから、dFSeV は wtSeV に比べて感染細胞表面での CTL エピトープ提示能も低いと判断される。CTL 誘導能および CTL エピトープ提示能が低いウイルスベクターは宿主の免疫機構による排除を回避できるという点で有利であり、遺伝子発現期間の延長や再接種時の発現能という点でより有効なベクターと考えられる。

カニクイザルを用いて dFSeV と wtSeV との CTL 誘導能を比較する実験に先立って、昨年確立した自己骨髄ストローマ細胞 (SC) を標的とする Direct CTL 活性をカニクイザルで調査した。図 6 に dFSeV を多臓器接種した 3 頭のカニクイザルで接種後 5 日目、10 日目の末梢血リンパ球を用いた Direct CTL 測定結果を示す。3 頭とも wtSeV を感染させた自己 SC 細胞を標的とした場合に、非感染 SC に比べて高い細胞障害活性が認められ、昨年確立した方法で SeV 特異的な CTL 活性が測定できることが明らかになった。一方、カニクイザルにおいては、dFSeV 接種でも感染後 5 日目にすでに比較的高い CTL 活性が認められることから、今後は、wtSeV 接種での CTL 誘導能との比較が必要である。

D. 結論

ウイルスベクター接種に対する宿主応答評価システムの開発をおこない、以下の結果を得た。

1) レトロベクターによる遺伝子導入経路と免疫応答との関連をカニクイザルを用いて造血幹

細胞導入と末梢リンパ球導入の2経路で比較し、造血幹細胞への遺伝子導入では宿主に免疫寛容が成立することを確認した。

2) SeV ベクターのウイルス接種量と宿主応答との関連を炎症性サイトカインレベルと抗体産生で解析し、dFSeV は 10^9 /Kg の大量投与でも宿主の反応性が低いことが明らかとなった。

3) ウイルスベクターの構造と宿主応答との関連を dFSeV と wtSeV で比較した。dFSeV はマウスでの CTL 誘導能、感染細胞での CTL エピトープ発現能のいずれも wtSeV に比べて低いことが実証された。カニクイザルでは dFSeV 接種後5日目に Direct CTL 活性が検出された。

D. 研究発表

1. 論文発表

TAKAHASHI,K., MIYAKE,S., KONDO,T., TERAO,K.,HATAKENAKA,M.,HASHIMOTO,S. and YMAMURA,T. (2001) Natural killer type 2 (NK2) bias in remission of multiple sclerosis. THE JOURNAL OF CLINICAL INVESTIGATION, 107: R23-R29.

AGEYAMA,N., SHIBATA,H., NARITA,H., HANARI,K., KHONO,A., ONO,F., YOSHIKAWA,Y. and TERAO,K.(2001) Specific gravity of whole blood and total blood volume in nonhuman primates. CONTEMPORARY TOPICS IN LABORATORY ANIMAL SCIENCE, May; 40(3):33-5.

OSADA,N., HIDA,M., TANUMA,R., ISEKI,K., HIRATA,M., SUTO,Y., HIRAI,M., TERAO,K., SUZUKI,Y., SUGANO,S. and HASHIMOTO,K. (2001). Assignment of 118 novel cDNAs of cynomolgus monkey brain to human chromosome. GENE, 275: 31-37

MURAMATSU,S., FUJIMOTO,K., IKEGUCHI,K., SHIZUMA,N., KAWASAKI,K., ONO,F., SHEN,Y., WANG,L., MIZUKAMI,H., KUME,A., MATSUMURA,M., NAGATSU,I., URANO,F., ICHINOSE,H., NAGATSU,T., TERAO,K., NAKANO,I and OZAWA,K. (2002), Behavioral recovery in primate model of Parkinson's disease by triple transduction of striatal cells with adeno-associate viral vectors expressing dopamine-synthesizing enzymes. HUMAN GENE THERAPY, 13: 345-354.

KAWASAKI,K., MITSUI,Y., ONO,T.,

OGAWA,H., TAKANO,I., SANKAI,T. and TERAO,K. (2002). Simple assay method for serum oxytocin and comparison of serum oxytocin levels between infant-accepted and infant-rejected monkeys during parturition in cynomolgus monkeys.

EXPERIMENTAL ANIMALS, -in press-

LEE,W.W., NAM,K.H., TERAO,K. and YOSHIKAWA,Y (2002) Age related telomere length dynamics in healthy cynomolgus monkey's PBMC measured by Flow FISH. IMMUNOLOGY, -in press-

SHIMADA,MK., SHOTAKE,T. and TERAO,K. (2002). Mitochondrial sequence variations within and between subspecies of savanna monkeys (*Cercopithecus aethiops*) JOURNAL OF HEREDITY, -in press-

KANO,M., MATANO,T., KATO,A., NAKAMURA,H., TAKEDA,A., SUZUKI,Y., AMI,T., TERAO,K. and NAGAI,Y. (2002) Primary replication of a recombinant Sendai viral vector in macaques. JOURNAL OF GENERAL VIROLOGY, -in press-

2. 学会発表

Hanazono,Y., Nagashima,T., Shibata,H., Ageyama,N., Asano,T., Ueda,Y., Kume,A., Terao,K., Hasegawa,M. and Ozawa,K. In vivo expansion of gene-modified hematopoietic cells with retroviral vectors expressing the selective amplifier gene in a nonhuman primate model. The Forth Annual Meeting of American Society of Gene Therapy, May 30-Jun 3, 2001, Seattle.

Muramatsu,S., Fujimoto,K., Ikeguchi,K., Shizuma,N., Kawasaki,K., Ono,F., Shen,Y., Wang,L., Mizukami,H., Kume,A., Matsumura,M., Nagatsu,I., Urano,F., Ichinose,H., Terao,K., Nakano,I and Ozawa,K. Behavioral Recovery in Primate Models of Parkinson's Disease by Gene Therapy using Adeno-Associated Virus Vectors Expressing Dopamine-Synthesizing Enzymes. The Forth Annual Meeting of American Society of Gene Therapy, May 30-Jun 3, 2001, Seattle.

Hanazono,Y., Nagashima,T., Asano,T., Shibata,H., Ageyama,N., Ueda,Y., Kume,A., Terao,K., Hasegawa,M. and Ozawa,K. In vivo selective expansion of retrovirally transduced hematopoietic cells in the setting of a clinically applicable nonhuman primate transplantation protocol. The 7th Annual Meeting of the Japanese Society of Gene Therapy, July 5-7,2001, Tokyo.

Muramatsu,S., Fujimoto,K., Ikeguchi,K., Shizuma,N., Kawasaki,K., Ono,F., Shen,Y., Wang,L., Mizukami,H., Kume,A., Matsumura,M., Nagatsu,I., Ichinose,H., Nagatsu,T., Terao,K., Nakano,I. and Ozawa,K. Behavioral Recovery in a

Primate Model of Parkinson's Disease by triple transduction of striatal cells with AAV vectors Expressing Dopamine-Synthesizing Enzymes. The 7th Annual Meeting of the Japanese Society of Gene Therapy, July 5-7,2001, Tokyo.

Nagashima,T., Ueda,Y., Hanazono,Y., Kume,A., Shibata,H., Ageyama,N., Komatsu,N., Terao,K., Ozawa,K. and Hasegawa,M. A new design of selective amplifier genes with an erythropoietin receptor-based molecular switch for controlled expansion of gene-modified hematopoietic cells. The 7th Annual Meeting of the Japanese Society of Gene Therapy, July 5-7,2001, Tokyo.

柴田宏昭、花園 豊、長島建之、揚山直英、浅野隆之、上田泰次、久米晃啓、加藤郁之進、長谷川護、小澤敬也、寺尾恵治、吉川泰弘、レトロウイルスベクターを用いたカニクイザル造血幹細胞への遺伝子導入、第 17 回日本霊長類学会、2001 年 7 月 12 日～15 日、京都

坂手龍一、肥田宗友、菅野純夫、橋本雄之、早坂郁夫、寺尾恵治、平井百樹、霊長類遺伝子データベース、第 17 回日本霊長類学会、2001 年 7 月 12 日～15 日、京都

肥田宗友、坂手龍一、鈴木 穰、菅野純夫、五條堀孝、橋本雄之、寺尾恵治、平井百樹、ヒ

トとカニクイザル mRNA5'領域の比較、第 17 回日本霊長類学会、2001 年 7 月 12～15 日、京都

花園 豊、長島建之、浅野隆之、柴田宏昭、揚山直英、上田泰次、久米晃啓、寺尾恵治、長谷川護、小澤敬也、造血幹細胞遺伝子治療の霊長類モデルにおける遺伝子導入細胞の体内増幅、第 60 回日本癌学会、2001 年 9 月 26 日～28 日、横浜

TERAO,K. Development of nonhuman primate models for evaluating safety and efficacy of gene therapy. The 2nd International Primate Symposium. November 16, 2001, Seoul, Korea.

Ueda,Y., Nagashima,T., Hanazono,Y., Shibata,H., Kume,A., Terao,K., Komatsu,N., Ozawa,K. and Hasegawa,M. Efficient Expansion Of Hematopoietic Cells By A Novel Selective Amplifier Gene, EPO-MPL. 43rd Annual Meeting of American Society of Hematology, December 7-11, 2001, Orlando, Florida, USA

Keiyo,O., Hanazono,Y., Kume,A., Nagashima,T., Ueda,Y., Terao,K. and Hasegawa,M. SAGs (Selective Amplifier Genes) for in vivo expansion of transduced cells in hematopoietic stem cell gene therapy. 3rd Stem cell gene therapy conference, Rockville MD, March 21-23, 2002

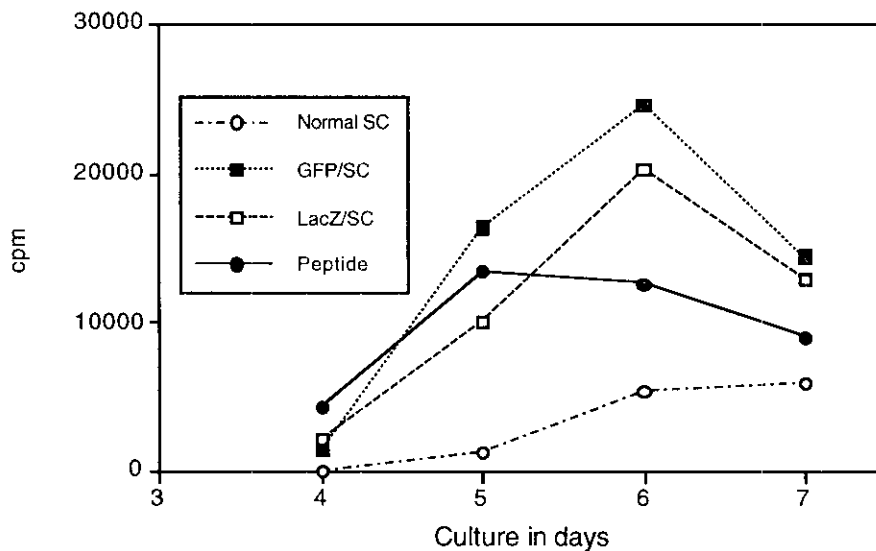


図 1 :GFP 遺伝子導入自己リンパ球で免疫したカニクイザル末梢リンパ球の GFP に対する幼若化反応

CTL to GFP (Autologous Target)

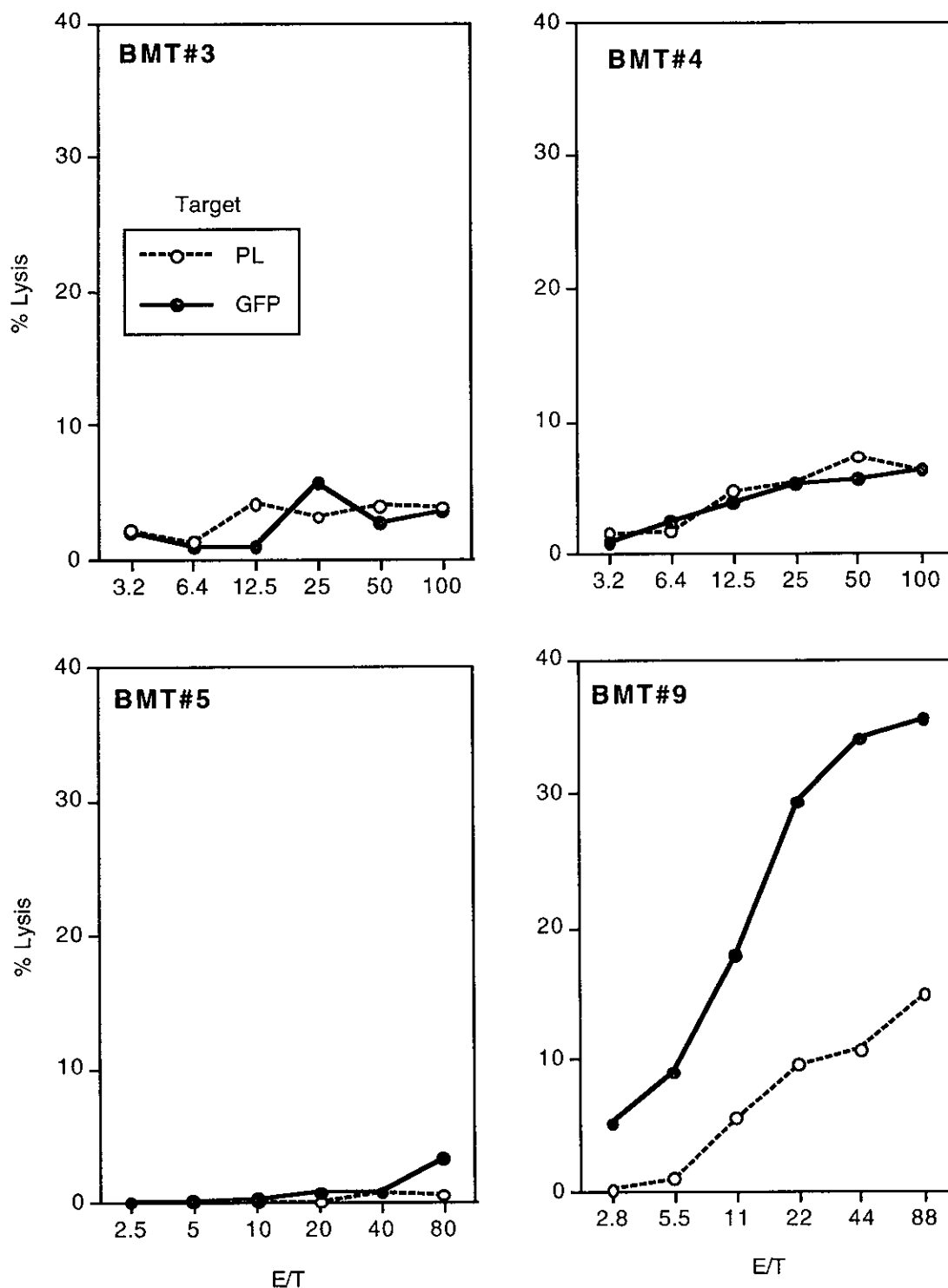


図 2: レトロウイルスベクターで GFP 遺伝子を骨髄中の造血幹細胞に導入したカニクイザル (BMT#3、BMT#4、BMT#5) と末梢リンパ球に導入したカニクイザル (BMT#9) での GFP に対する CTL 活性の比較

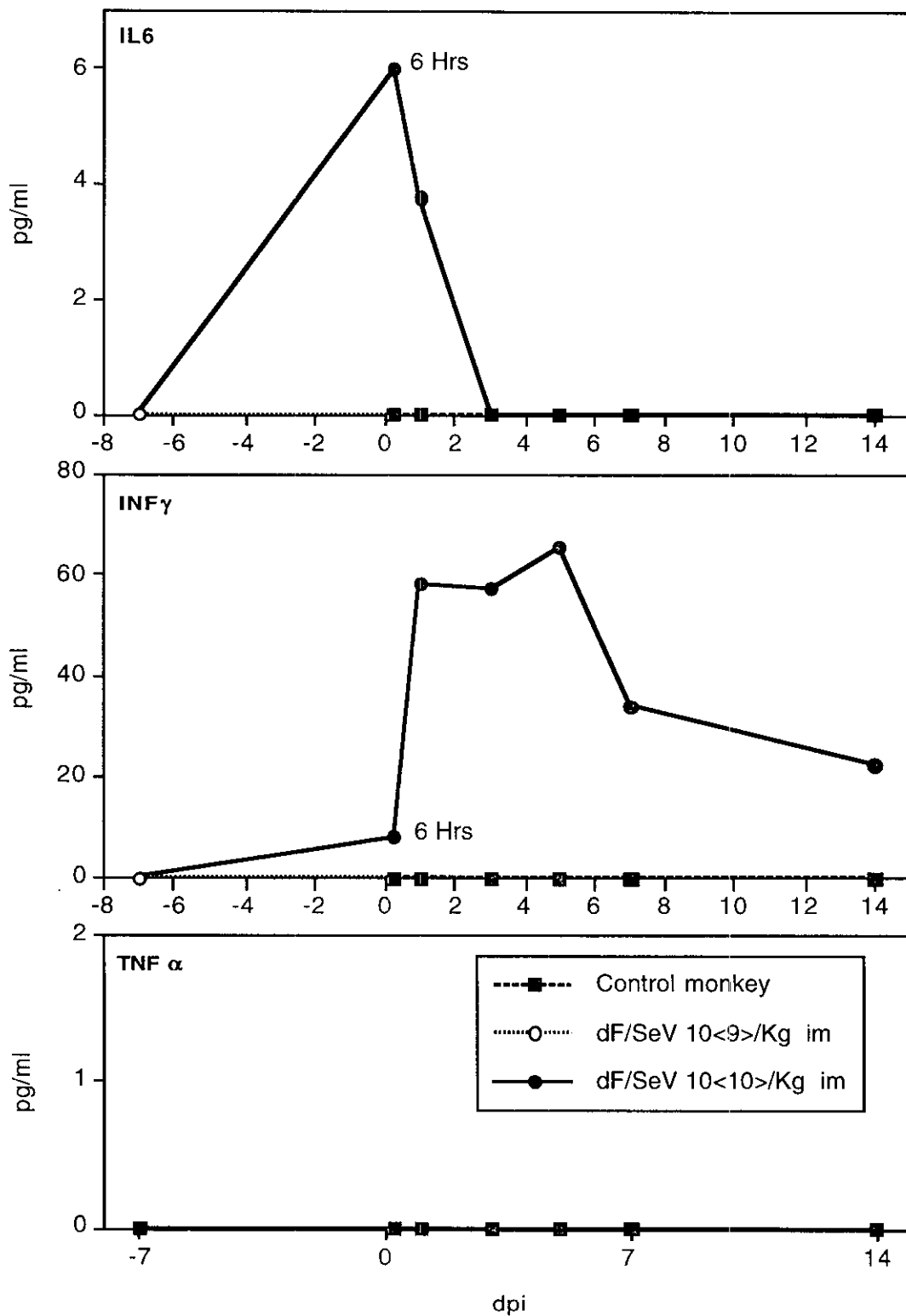


図 3 : dFSeV を大量接種 (im) したカニクイザルにおける血中サイトカインレベルの変化

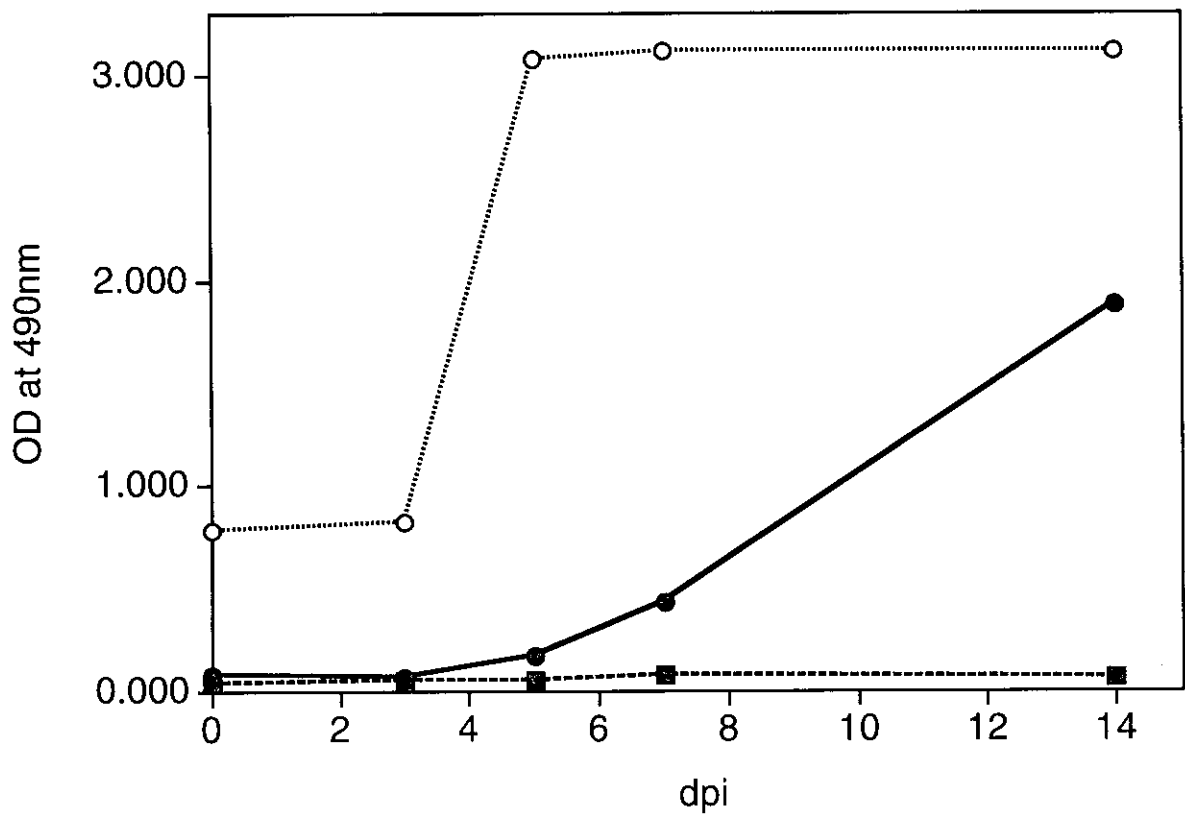


図 4 : dFSeV を大量接種したカニクイザルにおける血中抗体レベルの変化

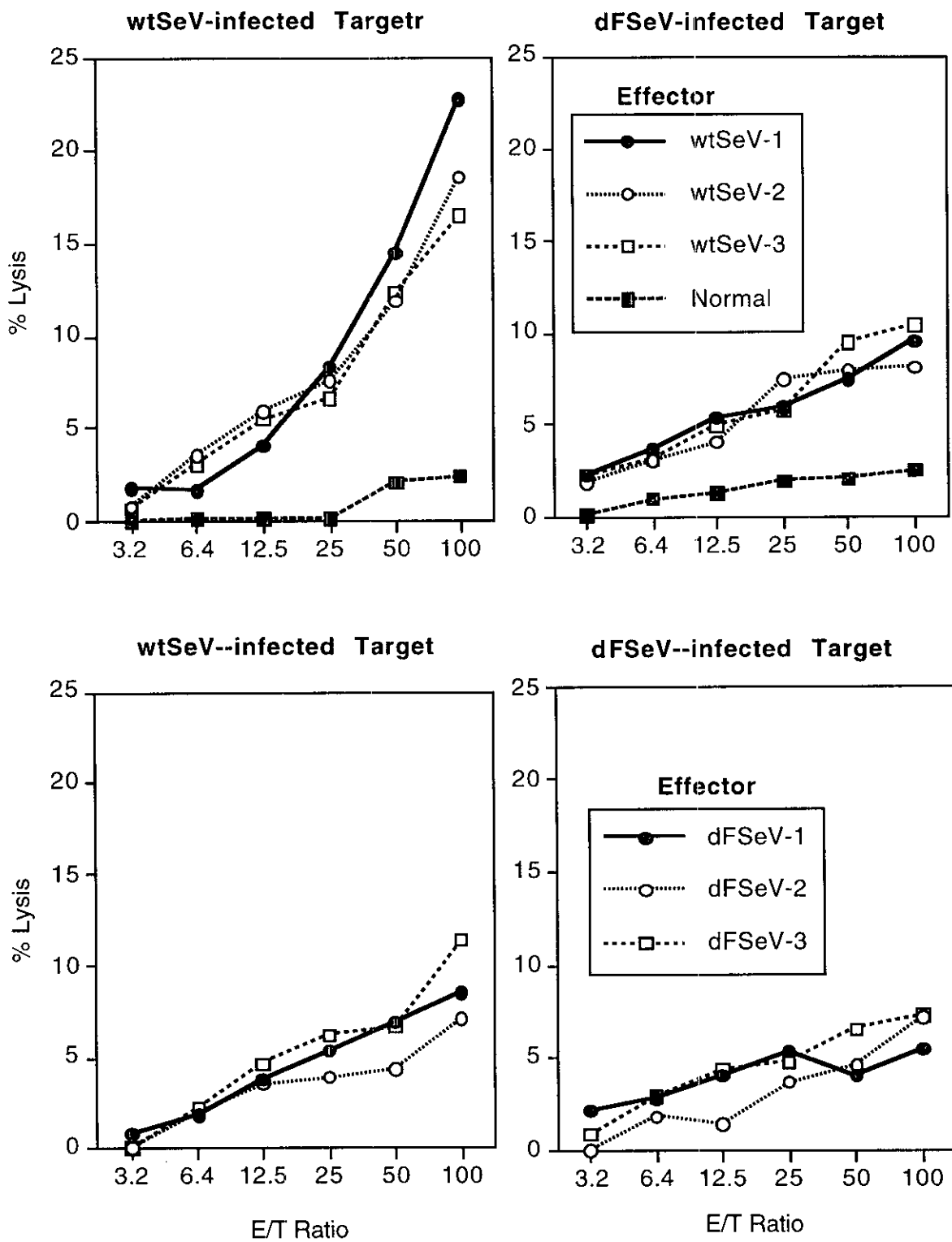


図 5 : wtSeV および dFSeV を腹腔内接種したマウス脾臓細胞の Direct CTL 活性

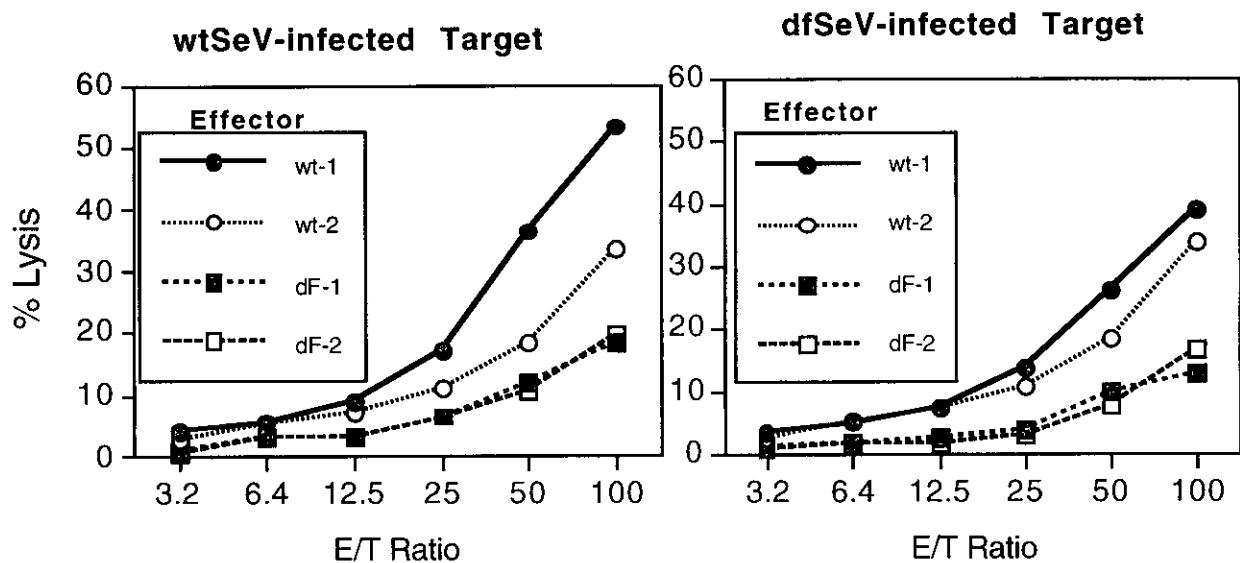


図6 : wtSeV (wt) およびdfSeV (dF) を腹腔内接種したマウス脾臓細胞の CTL Precursor 活性

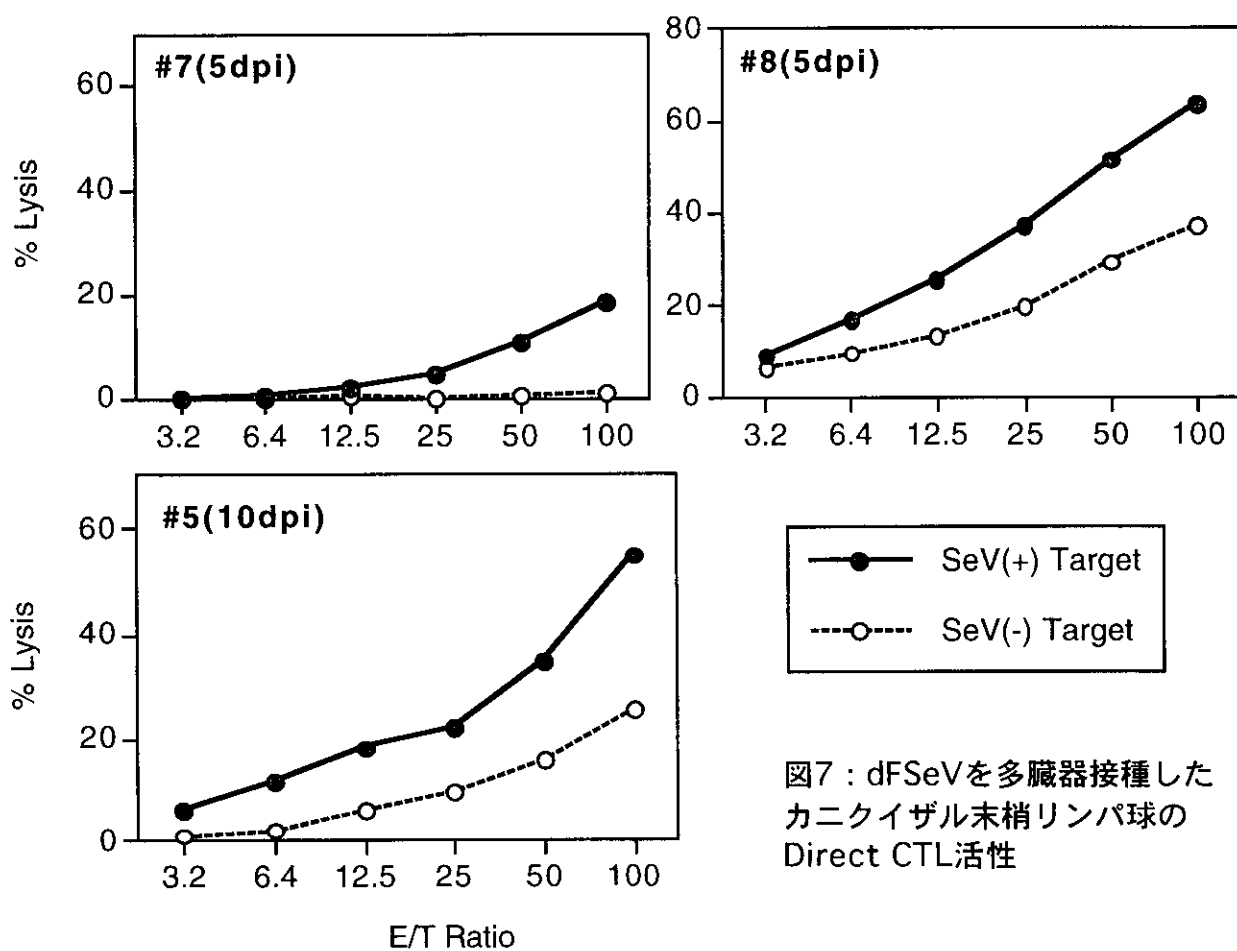


図7 : dFSeVを多臓器接種したカニクイザル末梢リンパ球の Direct CTL活性

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を用いた評価システムの開発を目的として、発生工学的基盤技術の開発研究を行っている。本年度は主として4つの項目について、以下の成果を得た。

1) Buffalo Rat Liver (BRL) 細胞が卵の発育に及ぼす影響を明らかにするためにマウスを用いた実験系を確立して検討したところ、BRL細胞の培養上清に含まれる因子が卵の発育に良好な効果をもたらすことが明らかとなった。また、その因子は時間経過に伴い失活する可能性が示唆された。2) カニクイザルの円形精子細胞の体外培養においてフィーダーとしてBRL細胞が有効であること、また、培地へのhFSHおよびIGF-Iの添加が有効に作用することが明らかとなった。さらに、アポトーシスインヒビターを用いることで死滅する細胞を減少させることができた。3) カニクイザル円形精子細胞の顕微授精により得られた受精卵の胚移植により妊娠を確認することができた。しかし、その個体は103日目に流産した。流産の原因はわからないが、少なくとも円形精子細胞の顕微授精卵は妊娠後期までは発育することが確認された。4) カニクイザルのES様細胞を樹立し、アルカリフォスファターゼ活性を有することが確認された。SCIDマウスへの移植実験を試みているが今のところテラトーマ形成能は認めていない。また、マウスES細胞を樹立しマーカー遺伝子を高率に導入したES細胞株を得ることができた。これらの細胞株は今後のES細胞に関する研究に有用なものである。

協力研究者

広瀬良宏 (HS財団、感染研・霊長類センター)
岡田浩典 (東京農大、感染研・霊長類センター)
越後貴成美 (感染研・獣医)
鈴木 治 (感染研・獣医)
小倉淳郎 (感染研・獣医)

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を用いた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となる。サル類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現在の目標である。一部の実験においては、マウスを用いた実験も併用し、得られた成果をサル類に応用するという戦略を採用した。

本年度は、主として4つの項目についての成果を報告する。各項目の目的は以下のとおりである。

1) Buffalo Rat Liver (BRL) 細胞が卵の発育に及ぼす影響

本プロジェクトにおいて、サル類の受精卵の作出と発育培養系の確立は必須の課題である。すでにカニクイザルの体外受精あるいは顕微授精による受精卵の作出とその卵の発育培養に成功している。しかし、blastocystへの発育率は決して高くはない。一方、BRL細胞との共培養が卵の発育成績を向上させることが知られており、その効果はカニクイザルの卵発育においても良好な作用を及ぼす可能性があることを経験している。本研究ではBRL細胞との共培養が卵の発育に及ぼす影響についての詳細を明らかにすることを目的とし、マウス卵を用いた実験系を確立して検討した。まず始めにBRL細胞と直接接触しない培養上清が卵の発育に良好な効果を及ぼすか否かについて、そしてその上清に含まれていると思われる有効な因子の失活時間について検討した。

2) カニクイザル円形精子細胞の体外成熟培養

精祖細胞から精子に成熟するまでの過程で減数分裂という生殖細胞特有の細胞分裂を経て形態の大きな変化とともに運動機能が獲得される。これ

らの精子成熟過程を体外で再現するための体外培養系を確立することの意義は大きい。そこでサル類の円形精子細胞の体外培養系を確立することを目的として、カニクイザル円形精子細胞の培養条件について検討した。また、その培養過程で多くの細胞が死滅していくことを経験したため、円形精子細胞の体外培養系でのアポトーシスについて検討を加えた。

3) 円形精子細胞の顕微授精により得られた受精卵の卵管内移植による妊娠

受精卵の作出法の一つとして顕微授精が考えられる。これまでにカニクイザルの円形精子細胞には卵活性化因子が存在することを見だし、受精を成立させる技術を確認してきた。これらの研究は受精卵を得るという実用面のみならず、自然界では起こり得ない受精系を解析することにより生命現象を理解するうえでの大きなヒントを与えてくれるものである。今回は、本法により得られた受精卵の胚移植により正常な発生が認められるか否かについて検討した。

4) ES細胞の樹立に関する検討

ES細胞は全能性をもった細胞であり、個体作成のみならず再生医療、遺伝子治療といった分野での応用が期待されている細胞である。しかし、分化に関する研究、移植後の動態などを解析する上で多くの基礎研究が必要である。また、ヒトへの応用を考えたときにその基礎検討は霊長類のES細胞を用いることが望まれる。すでに、サル類のES細胞は米国および我が国の機関で樹立されているが、当霊長類センターにおいてもカニクイザルのES細胞の樹立を試みてきた。すでにES様細胞を樹立しており、その細胞の性状について解析した。また、基礎研究への使用を考えてマウスES細胞の樹立とマーカー遺伝子の導入を試みた。

B. 研究方法

1) Buffalo Rat Liver (BRL) 細胞が卵の発育に及ぼす影響

1-1) マウス卵を用いた実験系の確立

培養液は10%FBSを添加したDMEMを用いた。フィーダー細胞は24wellプレートに 4×10^5 個/wellでBRL細胞を播種し、24時間インキュベートしたものをを用いた。マウス卵は体外受精により得られた2細胞期卵を用いた。培養はBRL細胞をフィーダーとした共培養区、BRL細胞上にMillicell insertを乗せた共培養非接触区、フィーダー上の培養液を新たなwellに移して培養した上

清区、また10%FBS添加DMEMを対照区とした。各試験区に2細胞期卵を入れた後、卵の発育を観察した。なお、非接触区についてはinsertのフィルター上で卵を培養することでBRL細胞と卵の接触を遮った。

1-2) BRL細胞の培養上清がマウス卵の発育に及ぼす影響

体外受精により得られたBDF1マウスの2細胞期の受精卵を実験に供した。BRL細胞の初期の培養には10%FBSを添加したD-MEMを用いたが、卵子への影響を検討するときには無血清のD-MEMと置換したのち実験に供した。まずFBS添加D-MEMを用いてBRL細胞を24wellプレートに 4×10^5 個/wellの濃度で播種し、24時間後に細胞がプレートに広がっていることを確認したのちFBSを添加していないD-MEMでwellを3回洗浄した。そして同培養液を500 μ l加え、さらに24時間以上経過したものを実験に用いた。BRL細胞との接触の影響を検討した実験では、BRL細胞のうえで卵を培養した接触区、BRL細胞上にフィルター(Millicell insert)をおきその上で培養した非接触区、またBRL細胞と関与していないD-MEMを用いて培養した対照区を設けた。各試験区で2細胞期卵の培養を行い、卵の発育状況について観察した。ここではBRL細胞の培養上清を経時的に交換することで上清に含まれていると思われる因子の失活について検討した。培養開始から観察終了まで培地、すなわち培養上清を交換しない試験区、24、12、6および3時間ごとに新鮮な培養上清と交換した試験区を設け卵の発育状況について比較した。

2) カニクイザル円形精子細胞の体外成熟培養

2-1) フィーダー細胞および培地に添加するhFSH、IGF-Iの濃度の検討

精細胞はカニクイザルの精巣からバイオプシーで得たもの、あるいは摘出した精巣から採取し凍結保存されたものをを用いた。これらの精細胞からマイクロマニピレーターにより円形精子細胞を選抜、収集した。フィーダー細胞には、カニクイザルから採取したセルトリ細胞と卵管細胞、またアフリカミドリザル由来のVero細胞、Cos7細胞、さらにラット由来のBRL細胞を用いた。培地は10%FCS添加D-MEMにhFSHとIGF-Iを添加したものの、あるいは非添加のものをを用いた。採取した円形精子細胞は12の試験区(5種類のフィーダー細胞とフィーダー細胞のないもので、それぞれ2種類の培地)で培養し、実験期間をとおして細胞

形態の変化について観察した。また、基本培地として10%FCS添加D-MEMを用いて6試験区(2.5 μ g/ml hFSHおよび0.25 μ g/ml IGF-Iを基準とし、1、2、4、8および16倍の濃度で添加した培地および非添加の培地)で培養を試み、細胞の形態変化を経時的に観察した。このときのフィーダー細胞にはBRL細胞を用いた。

2-2) 採取した円形精子細胞のアポトーシスと体外培養系におけるアポトーシスインヒビターの影響

カニクイザル11頭から精細胞を採取し、AnnexinVおよびPIを用いたアポトーシスの解析を経時的にFACSにより試みた。また、アポトーシスインヒビターを用いた培養実験を行った。精巣からパイオプシーにより精細胞を採取し、洗浄したのちマイクロマニピレーターを用いて円形精子細胞のみを選抜した。採集した円形精子細胞は十分に増殖したフィーダー細胞上に移し、32°C、5%CO₂の条件下で培養した。その後、細胞の形態の変化について観察した。なお、フィーダー細胞には、各種細胞の検討により最も良好な成績が得られたBRL細胞を用いた。また、10%FBS、hFSHおよびIGF-Iを添加したD-MEMを基本培地とし、アポトーシスインヒビター(Caspase-3 inhibitor)を添加したもの、あるいは非添加のものを培養に用いた。

3) 円形精子細胞の顕微授精により得られた受精卵の卵管内移植による妊娠

カニクイザルにホルモン製剤を用いて卵胞発育を誘起し、卵胞から卵を採取した。MII期の成熟した卵を授精実験に使用した。円形精子細胞は精巣パイオプシーにより採取し、ピエゾ装置がついたマイクロマニピレーターを用いて卵細胞質内に円形精子細胞を注入した。その後、前核形成、分割について観察し、4-8細胞期の卵をレシピエントザルの卵管に移植した。レシピエントザルは血中E₂濃度を測定することで排卵日を推定して選抜した。妊娠診断および胎児成長の観察には超音波診断装置を用いた。

4) ES細胞の樹立に関する検討

4-1) カニクイザルから樹立したES様細胞の解析

カニクイザルの胚盤胞からES様細胞を分離した。ES様細胞は霊長類のES細胞株の特徴であるといわれている扁平な形態を目安にした。その細胞株のアルカリフォスファターゼ活性の解析を行い、さらにSCIDマウスに細胞を移植してテラトーマ形成能について検索した。

4-2) マウスにおけるES細胞の樹立とマーカー遺伝子の導入

マウス(129SVJ/tarおよびICR)の胚盤胞を用いてES細胞を樹立した。また、樹立したES細胞にマーカー遺伝子(EYFP-mito)とネオマイシン耐性遺伝子をカチオニックリポソーム法(リポフェクトアミンを使用)により導入した。遺伝子導入細胞はネオマイシンにより選抜し、安定した蛍光が認められるようになったところで良好な株を拾い出して継代培養するにより高率に目的遺伝子が導入されたES細胞の樹立を試みた。

C. 研究成果

1) Buffalo Rat Liver (BRL) 細胞が卵の発育に及ぼす影響

1-1) マウス卵を用いた実験系の確立

BRL細胞が関与していない対照区、すなわち10%FBS添加DMEMで培養した試験区では胚盤胞への発育はほとんど認められなかった。一方、細胞との接触の有無に関わらずBRLとの共培養により供試したほとんどの卵が胚盤胞まで発育した(図1)。また、上清区においても卵の発育効果が認められた。このように、BRL細胞との共培養がマウス卵においても発育効果を示すことが明らかとなった。

1-2) BRL細胞の培養上清がマウス卵の発育に及ぼす影響

BRL細胞が卵の発育に影響を及ぼすときにBRL細胞との接触が必要か否かについて検討した結果、無血清という条件下でも接触区および非接触区ともに約9割の卵で胚盤胞への発育を認めた。一方、BRL細胞と関与していないD-MEMで培養した卵は、ほとんどが発生初期の段階で分割を停止し胚盤胞まで発育した卵は認められなかった。このように、BRL細胞の培養上清に何らかの因子が存在することが示された。一方、培養上清で卵を培養したところ培地交換を行わなければ3割程度の卵しか胚盤胞まで発育できなかった。そこで新鮮な培養上清を経時的に交換したところ、交換時間が短縮するほど胚盤胞への卵の発育率は上昇し3時間ごとの培養上清交換区では約9割の発育率を得ることができた。

2) カニクイザル円形精子細胞の体外成熟培養

2-1) フィーダー細胞および培地に添加するhFSH、IGF-Iの濃度の検討

培養3日目以降に、細胞の形態変化を認めた。hFSHとIGF-Iを添加した試験区では、セルトリ細

胞、卵管細胞、Cos7細胞とBRL細胞上で共培養した細胞のうちの2~3%の円形精子細胞で伸長あるいは精子の形態を示すものが確認された。BRL細胞で共培養した円形精子細胞の一部で、細胞の伸長部分がゆっくりではあるが明らかに動いていることが確認された。一方、hFSHとIGF-Iを添加していない試験区では、セルトリ細胞とBRL細胞で共培養した円形精子細胞の1%未満で伸長を認めるに過ぎなかった。またhFSHおよびIGF-Iの添加濃度を検討した結果、hFSHとIGF-Iを1、2および4倍濃度で添加した試験区でそれぞれ1.7、3.3および2.5%に細胞の伸長が認められた。8、16倍濃度添加群および非添加群では形態の変化は認められなかった。

2-2) 採取した円形精子細胞のアポトーシスと体外培養系におけるアポトーシスインヒビターの影響

精細胞のアポトーシスについて検索したところ、摘出後の日数が経過するにつれてAnnexinVおよびPI陽性の細胞が増加した(図2)。また、円形精子細胞の培養系において、アポトーシスインヒビターを添加した試験区と非添加区を比較したところ、生存細胞は培養開始後24時間目以降の観察において添加区で明らかに多く存在していた。また、形態が変化した円形精子細胞はいずれの試験区においても観察されたが、添加区においてより良好な成績が得られた。形態変化が観察された細胞には、細胞の一端が細長く伸びたもの、精子尾部様に長く伸びたものなどいくつかの成熟段階にあると思われる異なった形態のものが存在した。また、ゆっくりではあるが伸長部分が動いている細胞も観察された。

3) 円形精子細胞の顕微授精により得られた受精卵の卵管内移植による妊娠

カニクイザル円形精子細胞の顕微注入を試みた後、91%の卵が生存し、77%に前核形成を認めた。9個の受精卵を5頭のレシピエントザルに移植したところ、そのうち1頭に妊娠が確認された(図3)。胎児は順調に発育していたが、顕微授精の日から数えて103日目に流産した。

4) ES細胞の樹立に関する検討

4-1) カニクイザルから樹立したES様細胞の解析

これまでに形態が扁平なES様細胞をカニクイザルから樹立してきた(図4)。その細胞株はアルカリフォスファターゼ活性を有することが確認された。しかし、SCIDマウスへの注入を試みたが顕著なテラトーマ形成能を確認することができてい

ない。

4-2) マウスにおけるES細胞の樹立とマーカー遺伝子の導入

これまでに2系統のマウス(129SVJ/tarおよびICR)のES細胞を樹立することができた。129SVJ/tarにおいては14個の胚盤胞を用いて4個のラインを得ることができた。また、ICRにおいては25個の胚盤胞からES細胞20ラインを樹立した。それぞれ、一部を用いてEYFP遺伝子の導入を試み、ほぼ100%の細胞に目的遺伝子が導入されたコロニーを得ることができた(図5)。また、これらのES細胞から胚様体に発生させることにも成功しており、また、少なくとも心筋に分化して拍動することが確認された。

D. 考 察

1) Buffalo Rat Liver (BRL) 細胞が卵の発育に及ぼす影響

1-1) マウス卵を用いた実験系の確立

BRL細胞との共培養がマウス卵の発育においても良好な効果を示すことが明らかとなり、BRL細胞の卵発育に及ぼす影響を明らかにするためのマウス卵を用いた実験系が確立された。またこの結果は、BRL細胞が卵の発育に及ぼす効果は特定の動物種の卵に特異的に働く性質のものではなく、普遍的なものである可能性を示唆している。さらに培養上清区において卵の発育効果が認められたことは、BRL細胞と卵の接触は必ずしも必要とするものではなく、BRL上清中に産生される何らかの物質が関与している可能性を強く示唆している。

1-2) BRL細胞の培養上清がマウス卵の発育に及ぼす影響

無血清という条件下においてもBRL細胞が卵の発育に効果的に作用していることは明らかであり、また、卵とBRL細胞の接触がなくてもその効果を認めたことから、BRL細胞の培養上清に何らかの因子が存在していることが強く示唆された。また、その培養上清を頻繁に交換することで卵の発生率が向上することからその因子は時間の経過とともに失活している可能性が考えられた。

2) カニクイザル円形精子細胞の体外成熟培養

2-1) フィーダー細胞および培地に添加するhFSH、IGF-Iの濃度の検討

本実験の結果より、hFSHとIGF-Iの培地への添加、また、フィーダー細胞、とくにBRL細胞との共培養は円形精子細胞の体外成熟培養に有効に作用したと考えられた。しかし、培養した円形精子

細胞の形態変化および運動性の獲得は未だほんのわずかな変化を認めたに過ぎない。体内での現象を再現するまでには多くの基礎データを得る必要があると考えている。

2-2) 採取した円形精子細胞のアポトーシスと体外培養系におけるアポトーシスインヒビターの影響

本研究により、円形精子細胞の培養が困難な理由のひとつとしてアポトーシスによる細胞死が考えられた。そこで円形精子細胞の成熟培養において、アポトーシスインヒビターを培地に添加したところ死滅する細胞が減少することが確認された。しかし、形態変化、運動性を獲得する細胞の率を飛躍的に向上させるものではなかった。

3) 円形精子細胞の顕微授精により得られた受精卵の卵管内移植による妊娠

サル類における円形精子細胞の顕微授精の成功例はほとんど報告されていない。その細胞がもつ卵活性化因子についての報告も研究者によって異なっているのが現状である。本研究により妊娠させることに成功したことは、ここで得られた受精卵が正常な発生をつづけていたことを示唆するものである。しかし、今回得られた妊娠個体は103日目に流産している。流産の原因はわからない。胚移植に用いた受精卵は自然界では起こり得ない円形精子細胞の顕微授精により得られたものであるため、正常性、発生能に関する評価は慎重に行わなければならない。現段階では、少なくともサル類での本研究に関する結論は出すことはできない。

4) ES細胞の樹立に関する検討

4-1) カニクイザルから樹立したES様細胞の解析

カニクイザルのES様細胞を樹立したが、テラトーマ形成能の確認ができていない。今後も継続して実験を進めるが、サル類のES細胞はマウスにおいて用いられている分化抑制因子(LIF)の効果が認められないことが知られており、分化させないで継代、維持することが困難であると言われている。今回樹立した細胞株においても未だ全能性を維持しているか否かはわからない。また、この種の研究をサル類で行うばあい、キメラ動物の作成実験などは実施が困難である。ES細胞に関する多くの情報から新たな評価系をも確立する必要があるかも知れない。

4-2) マウスにおけるES細胞の樹立とマーカー遺伝子の導入

マウスのES細胞は多くの研究者によって樹立さ

れている。本プロジェクト研究においてはサル類のES細胞を樹立することが目標ではあるがマウスES細胞を樹立、継代、維持する過程で何らかのヒントが得られるものと期待して本研究を実施した。明らかなことはマウスの場合と同じ方法ではサル類のES細胞樹立は困難であるということであり、霊長類特有の方法を確立する必要がある。とくにLIFにかわる分化抑制因子を見つけ出すことは意義が大きいと考えられる。また、樹立したマウスES細胞にマーカー遺伝子を導入した。多くの場合、遺伝子導入法として電気パルスが用いられているが今回の経験ではカチオニックリポソーム法による導入、そして最終的には良好な株を拾い出すという方法で細胞を選抜することがもっとも効率的であることが分かった。マーカー遺伝子が導入されたES細胞株はES細胞を用いた応用研究を行ううえできわめて有用な細胞株であると考えている。

E. 結論

1) Buffalo Rat Liver (BRL) 細胞が卵の発育に及ぼす影響

1-1) マウス卵を用いた実験系の確立

BRL細胞の培養上清がマウス卵の発育に良好な効果をもたらすことが明らかになり、BRL細胞についての研究にマウス卵を用いた実験系で検討できることが示された。

1-2) BRL細胞の培養上清がマウス卵の発育に及ぼす影響

BRL細胞の培養上清中には、卵の発育に影響する細胞が産生している因子が存在することが示された。しかし、卵の発育に及ぼす効果はその上清の放置時間の経過とともに失活していくことが示唆された。

2) カニクイザル円形精子細胞の体外成熟培養

2-1) フィーダー細胞および培地に添加するhFSH、IGF-Iの濃度の検討

カニクイザル円形精子細胞の体外成熟培養系においてフィーダー細胞にBRL細胞を用いることで最も良い結果が得られた。また、hFSHおよびIGF-Iの培地への添加が有効であることが示され、その至適濃度はそれぞれ5 μ g/ml、0.5 μ g/mlであることが明らかとなった。

2-2) 採取した円形精子細胞のアポトーシスと体外培養系におけるアポトーシスインヒビターの影響

カニクイザルから採取した精細胞は時間の経過とともにアポトーシスにより死滅していくことを

認めた。また、成熟培養系へのアポトーシスインヒビターの添加により死滅精子が減少することが確認された。

3) 円形精子細胞の顕微授精により得られた受精卵の卵管内移植による妊娠

カニクイザルの円形精子細胞の顕微授精により受精卵を作出することができた。その受精卵をレシピエントザルに移植することで妊娠を確認したが、103日目に流産した。本法により作成された受精卵は少なくとも妊娠後期までは発育することが示された。

4) ES細胞の樹立に関する検討

4-1) カニクイザルから樹立したES様細胞の解析

カニクイザルのES様細胞を樹立した。形態は扁平でありアルカリフォスファターゼ活性を有することが確認され既報に一致するものであった。また、SCIDマウスへの移植を試みているが今のところテラトーマ形成は観察されていない。

4-2) マウスにおけるES細胞の樹立とマーカー遺伝子の導入

マウスのES細胞を樹立した。また、カチオニックリポソーム法によりマーカー遺伝子を導入し効率に蛍光蛋白を発現するES細胞を樹立した。これらの細胞は、ES細胞に関する基礎研究に有効に応用できるものと考えている。

F. 研究発表

1. 誌上発表

- 1) Ji-Hong Liang, Tadashi Sankai, Takashi Yoshida, Yasuhiro Yoshikawa. Immunolocalization of proliferation cell nuclear antigen (PCNA) in cynomolgus monkey (*Macaca fascicularis*) testes during postnatal development. *J. Med. Primatol.* 30, 107-111, 2001
- 2) Tadashi Sankai, Hideaki Tsuchiya, Narumi Ogonuki. Short-term nonfrozen storage of mouse epididymal spermatozoa. *Theriogenology* 55, 1759-1768, 2001
- 3) 久保南海子, 小山高正, 川崎勝義, 土田順子, 山海直, 寺尾恵治, 吉川泰弘. 老齡ザルと若齡ザルにおける位置再認課題での位置偏好反応の検討. *動物心理学研究* 51, 11-18, 2001
- 4) Narumi Ogonuki, Tadashi Sankai, Kenichi Yagami, Tomohide Shikano, Shoji Oda, Shunichi Miyazaki, Atsuo Ogura. Activity

of a sperm-borne oocyte-activating factor in spermatozoa and spermatogenic cells from cynomolgus monkeys and its localization after oocyte activation. *Biol. Reprod.* 65, 351-357, 2001

- 5) Akiko Okada, Hiroaki Igarashi, Masaru Kuroda, Keiji Terao, Yasuhiro Yoshikawa, Tadashi Sankai. Cryopreservation-induced acrosome vesiculation in live sperm from cynomolgus monkeys (*Macaca fascicularis*). *Hum. Reprod.* 16, 2139-2147, 2001
- 6) Namiko Kubo, Takamasa Koyama, Katsuyoshi Kawasaki, Junko Tsuchida, Tadashi Sankai, Keiji Terao, Yasuhiro Yoshikawa. Behavioral complements in a positional learning and memory task by aged monkeys. *Behavioural Processes* 56, 15-22, 2001
- 7) Hideaki Tsuchiya, Narumi Ogonuki, Tadashi Sankai, Kiichi Kanayama. Short-term preservation of mouse oocytes at 5 C. *Exp. Anim.* 50, 441-443, 2001
- 8) Sachiko Miyamoto, Yang Chen, Hidetoshi Kurotori, Tadashi Sankai, Takashi Yoshida, Takeo Machida. Monitoring the reproductive status of female gorillas (*Gorilla gorilla gorilla*) by measuring the steroid hormones in fecal samples. *Primates* 42, 291-299, 2001
- 9) Takashi Yoshida, Mie Matsumuro, Sachiko Miyamoto, Yasuyuki Muroyama, Yasuko Tashiro, Yuji Takenoshita, Tadashi, Sankai. Monitoring the reproductive status of Japanese monkeys (*Macaca fuscata*) by measurement of the steroid hormones in fecal samples. *Primates* 42, 367-373, 2001
- 10) Katsuyoshi Kawasaki, Yuko Mitsui, Takahiro Ono, Hiromi Ogawa, Ichiro Takano, Tadashi Sankai, Keiji Terao. Simple assay method for serum oxytocin and changes of serum oxytocin level during parturition in cynomolgus monkeys. *Exp. Anim.* (in press)

2. 学会発表

- 1) 広瀬良宏, 岡田浩典, 伊藤雅夫, 田中温,