

表 1. センダイウイルス接種サルスの病理組織所見

個体	接種量	肺	胸腺	脾臓	腸管	精巢	筋線維部位	その他の臓器	備考
#G3		中度～重度の水腫					筋線維間に炎症細胞浸潤		
#G15					大腸粘膜：中度の炎症細胞浸潤（リンパ球、プラズマ細胞）		筋線維間に炎症細胞浸潤		
#G16	1 x 10 <sup>9</sup>	結節部：好酸球、リンパ球、類上皮細胞を主とする炎症細胞浸潤巣、中央部に虫体（肺ダニ）	大型	リンパ濾胞腫大・増数	大腸粘膜：中度の炎症細胞浸潤（リンパ球、プラズマ細胞） 結節部：結合織性または肉芽腫性結節（寄生虫の通過痕と思われる）	未発達	筋線維間に炎症細胞浸潤		若齢個体と思われる
#G4			萎縮				筋線維間に炎症細胞浸潤		
#G18							筋線維間に炎症細胞浸潤		
#G20	1 x 10 <sup>8</sup>	結節部：好酸球、リンパ球、類上皮細胞を主とする炎症細胞浸潤巣（肺ダニ結節）、虫体はみられない 上記病巣の周囲気管支内・粘膜に好酸球浸潤	大型			未発達	筋線維間に炎症細胞浸潤		若齢個体と思われる

上表の空欄は著変なし。

G16とG20の肺にみられた結節性病変は肺ダニによるものと考えられる。  
G16の腸管にみられた結節性病変は何らかの寄生虫が通過した痕と考えられる。  
G16とG20は胸腺が発達し、精巣が未発達であることから、若齢個体と考えられる。  
センダイウイルスによる病変はいずれの個体においても顕著ではない。

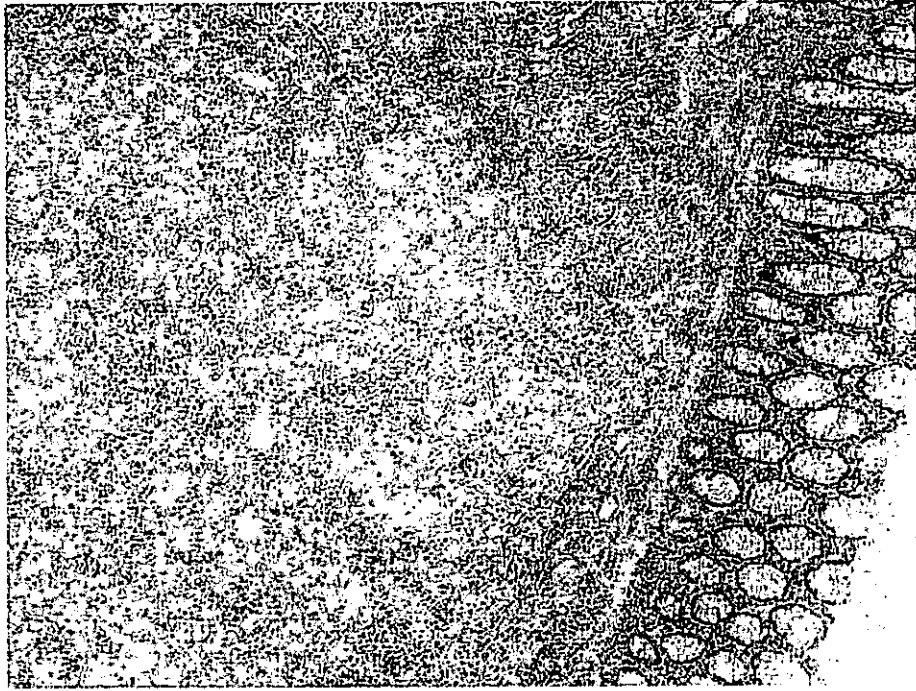


図3. 大腸の肉芽腫結節  
(G16、ウイルス接種後15日)

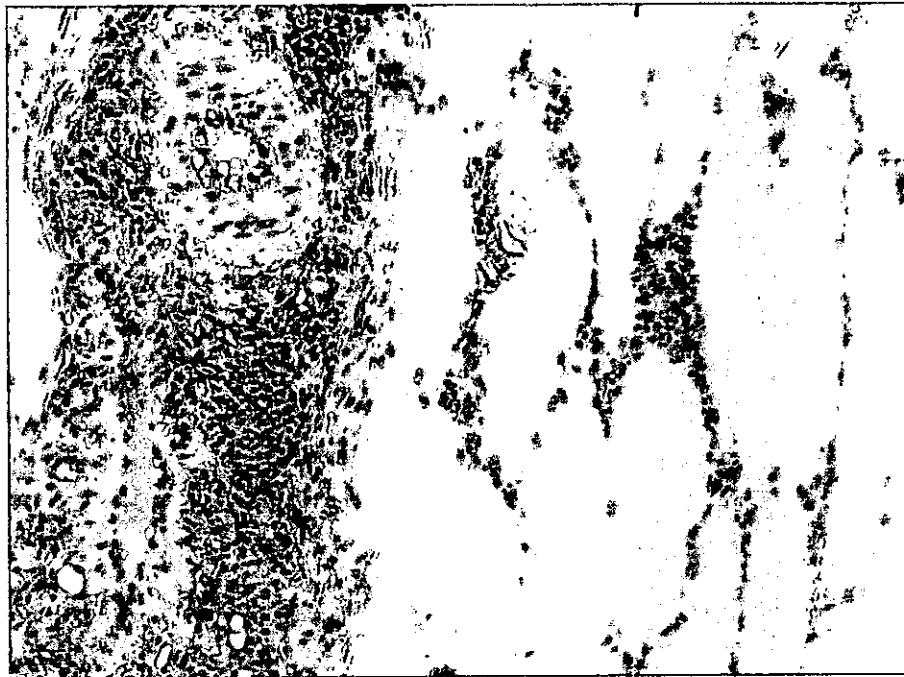


図4. ウイルス接種部位の炎症細胞浸潤巣  
(G16、ウイルス接種後15日)

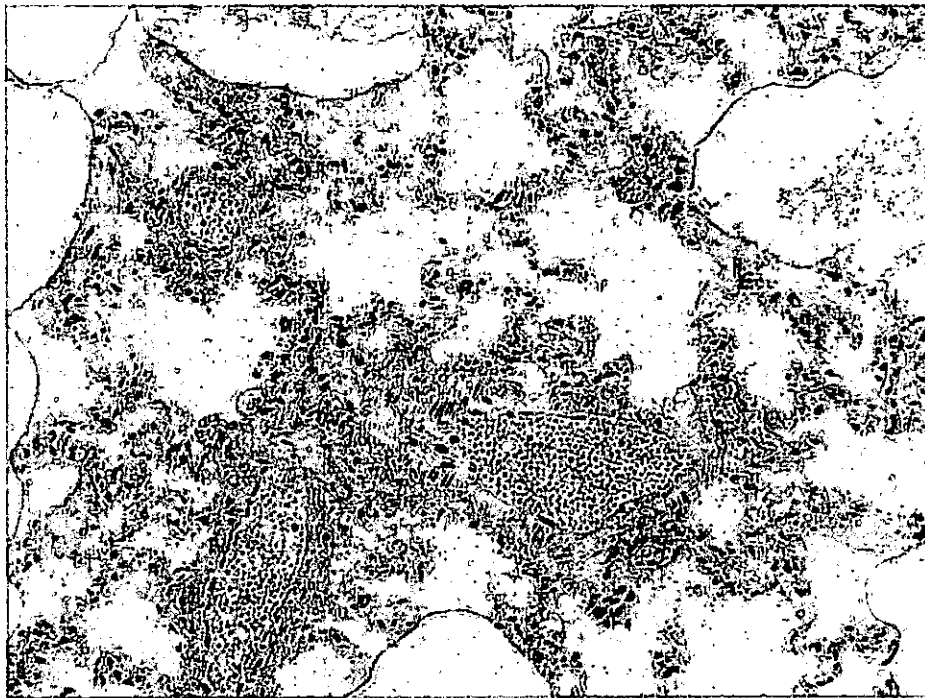


図1. 肺水腫  
(G3、ウイルス接種後13日)

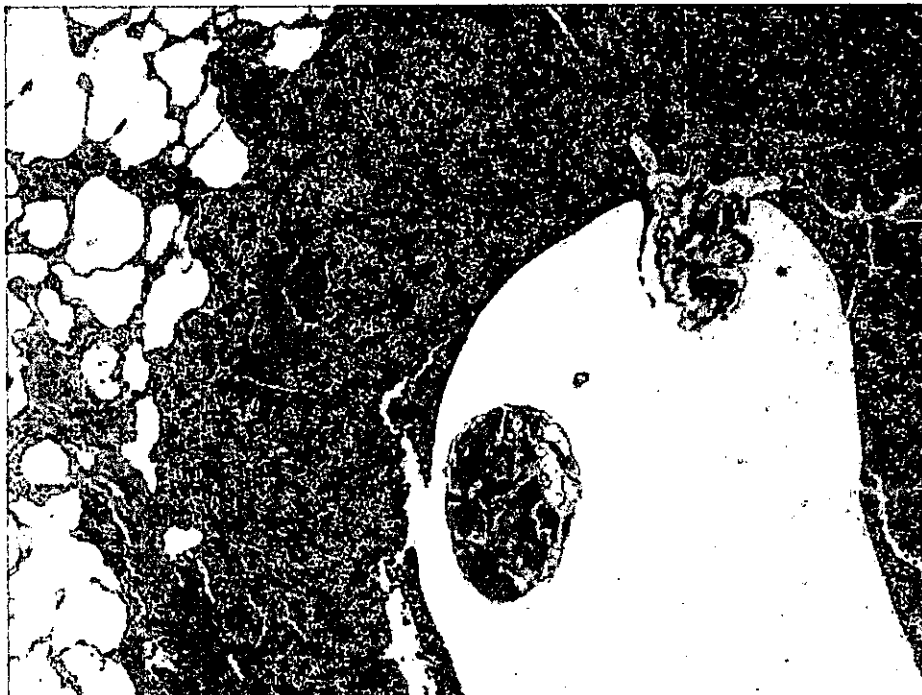


図2. 肺の肺ダニ結節  
(G16、ウイルス接種後15日)

## 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・筑波霊長類センター）

#### 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つの項目について検討し、以下の成果を得た。1) 受精卵培養時のフィーダー細胞の使用が有効であることが示され、カニクイザル卵管上皮細胞は少なくとも7種類のグロースファクターおよびサイトカインを発現していることが確認された。2) 同時期に多数の卵を収集することを目的としたPercollを用いた卵収集法を開発した。3) カニクイザル円形精子細胞が有する卵子活性化能には個体差があることが明らかとなった。4) ウサギのES様細胞、また除核した卵細胞にマウスおよびウサギの体細胞の核を移植して得られた胚からES様細胞を樹立した。今回の経験は今後のサル類ES細胞の研究に有用であると確信している。

キーワード：発生工学、卵培養、卵収集、ES細胞、カニクイザル

#### 協力研究者

広瀬良宏（HS財団、感染研）  
岡田浩典（東京農大、感染研）  
小倉淳郎（理研）  
井上貴美子（理研）  
越後貫成美（理研）

*in vitro*での生殖細胞の操作技術を確立することが現段階の目標である。一部の実験においては、マウス、ウサギを用いた実験を併用し、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) 受精卵の発育培養における各種フィーダー細胞の影響

#### 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、

カニクイザルの受精卵の発育培養においてラット由来のBuffalo Rat Liver (BRL)細胞をフィーダーとして用いることが有効であるという報告がなされ、我々も本法を採用している。これまでにBRL細胞の影響を検討するためにマウス卵を用いた実験系を確立している。今回は、フィー

ダー細胞としてBRL細胞およびカニクイザル、ミドリザルおよびヒト由来の細胞を用いてマウス卵の実験系により発生成績を比較した。また、サル類由来の細胞においてはその有用性はほとんど明らかにされていない。サル類の生殖細胞に関わる研究を遂行するにあたり、サル類の各種体細胞を株化し、その有用性を解析することの意義は大きい。我々はカニクイザルから採取した各種体細胞の株化を試み、一部の細胞株においては受精卵および精細胞の培養系への適用の可能性について検討した。また、卵が初期発生時に*in vivo*において近接している卵管上皮細胞について検討することは卵の発育環境を知る上で非常に重要である。そこで、カニクイザルの卵管上皮細胞株を樹立し、数種のグロースファクター、サイトカイン等の遺伝子発現について解析した。

#### 2) Percollを用いた卵の新しい収集法の確立

近年、卵を研究対象としてタンパク質等の分子レベルでの解析を試みている。この種の研究を遂行する過程で多数の卵を同時期に準備する必要が出てきた。また解析時に卵以外の細胞が混入しているとその後の結果に大きな影響を及ぼしてしまう可能性があるため、卵を準備するときの条件として卵以外の細胞をすべて除去しなければならなかった。キャピラリーを用いた従来の方法で卵のみを収集することは非常に労力を要するうえ操作に長時間を要してしまう。そのために卵そのものの性状が変わってしまう可能性も考えられる。そこで迅速かつ簡便に多数の卵を収集する方法を検討した。

#### 3) カニクイザル円形精子細胞が有す

#### る卵子活性化能の個体差の解析

カニクイザルの円形精子細胞は精子と同様、卵子活性化能を有していることを示してきた。さらに、円形精子細胞の卵への顕微注入により得られた受精卵を移植することで妊娠を確認した。この妊娠個体はその後流産したが、原因を解明するためには多くの基礎研究を積み重ねる必要がある。今回、円形精子細胞を採取するオスの個体間でその卵子活性化能に差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

サル類のES細胞の樹立および樹立したES細胞を用いた検討に先がけ、マウスおよびウサギのES細胞を用いた基礎検討を行った。ウサギのES細胞に関する報告は少なく、生殖系列へ寄与したキメラ個体は未だ得られていないのが現状である。よって、ウサギにおいてES細胞の樹立法を確立すること、さらにそのES細胞の特性を解析することの意義は発生工学分野にとって非常に大きく、今後、サル類でのES細胞を用いた実験を実施するうえでも意義ある多くの知見が得られると考えられる。そこで今回、ウサギのES細胞の樹立を試みた。また、核移植技術を用いた体細胞由来再構築胚からの幹細胞（ntES細胞）についてはその基礎的研究が始まったばかりである。基礎データの蓄積を目的としてマウスおよびウサギの体細胞核を移植した胚からのntES細胞の樹立を試みた。

#### B. 研究方法

#### 1) 受精卵の発育培養における各種フィーダー細胞の影響

#### 1-1) 各種フィーダー細胞が卵の発育に及ぼす影響

フィーダー細胞としてBRL細胞およびカニクイザル由来の卵管上皮細胞、セルトリ細胞、ミドリザル由来のVero、Cos-7、ヒト由来の5637（膀胱由来の細胞）を用いてマウス卵の実験系により発生成績を比較した。

### 1-2) 生殖細胞との共培養を目的としたカニクイザル各種体細胞株の確立とその有用性

体細胞は雌雄の成熟カニクイザルおよび胎児より採取した。細胞は他の実験のために安楽殺された個体から速やかに無菌的に採取した。一部の細胞においては麻酔下でバイオプシーを行った。卵管、精巣、子宮、卵巢、脳、腎、心、肺および胎児由来のカニクイザルの細胞を分離し培養を試みた。卵管からはガラスキャピラリーを用いた吸引法により卵管上皮細胞を採取して培養した。また、精巣からは精細胞を付着細胞用ペトレイに播種し、一部の細胞が付着したのを確認したのち浮遊している細胞を直ちに荒い流すという方法でセルトリ細胞を選別した。子宮からは内腔の細胞をかき出し、また卵巢については排卵後の卵に付着している卵丘細胞を採取して培養した。その他の細胞については採取した各組織を細かく切り刻み、十分に洗浄したのちに付着細胞用フラスコに播種した。基本培地には10%FBSを添加したD-MEMを用い、数日おきに新鮮な培地と交換した。増殖が確認された細胞に対しSV40由来の遺伝子と抗生物質ネオマイシン耐性を組み込んだベクターpSV3-neo遺伝子をカチオニックリポソーム法により導入した。遺伝子導入後ネオマイシンを添加した細胞選択用培地を用いて複数回継代することにより上記遺伝子を導入した細胞株を得た。得られた細胞株

のうち卵管上皮細胞をフィーダーとしてマウス卵の培養を、またセルトリ細胞をフィーダーとしてカニクイザル円形精子細胞の培養を試みた。

### 1-3) カニクイザル卵管上皮細胞の不活化細胞株の樹立とその特性

雌のカニクイザルから摘出した卵管の内腔をトリプシン-EDTA溶液で灌流して上皮細胞を採集し、10%FBSを添加したDMEMにて培養した。この細胞にpSV3-neo遺伝子を導入して不活化した。不活化した細胞の一部はanti-cytokeratinモノクローナル抗体を用いて免疫染色した。これとは別に、一部の細胞から作成したcDNAを鋳型とし、GAPDH (Control)、oviductin、LIF、VEGF、EGF、TGF、IGF-I、TGF-beta、IL-2およびIL-4プライマーセットを用いたPCR法によりDNA増幅の有無を検索した。

### 2) Percollを用いた卵の新しい収集法の確立

BDF<sub>1</sub>雌マウスを供試動物とし、eCGとhCGにより過排卵処理を施した。hCG投与後14時間目に採卵し、同系統の雄より精巣上体精子を採取、常法に従い体外受精を行った。媒精後24時間目に卵の収集を試みた。22.5%Percoll、4 mlが入った遠心チューブに卵を含む媒精後の溶液を重層した。2000rpm (750g) で5分間遠心した後、溶液の上層部 (Percollの上端部)、下層部 (Percollの下の部分)、および最下層部 (細胞のペレットが確認できる部分) を個別に回収し、各層における卵の分布状況を検索した。回収された2細胞期の卵を発育培養用の培地に移し、その後の発生成能について観察した。

### 3) カニクイザル円形精子細胞が有する卵子活性化能の個体差の解析

カニクイザル円形精子細胞をマウ

ス卵子に顕微注入することでその活性化能を検索した。精細胞は4頭の成熟オスカニクイザルから麻酔下で生検により採取した。卵は過排卵誘起したB6D2F1マウスより採取した。マイクロマニピュレーターを用いてサル円形精子細胞をマウス卵に注入し、その2時間後にホールマウント標本を作成して卵の状態を観察した。第二減数分裂終期以降への発生をもって活性化されたと判定した。

#### 4) ES細胞の樹立に関する検討

##### 4-1) ウサギのES細胞の樹立

実験には成熟ウサギを用いた。卵採取のためのメスとしてJapanese Whiteを、また交配のためのオスとしてDutchを用いた。メス個体にFSHを複数回投与し、その最終投与の翌日にオスと交配し同時にhCGを静注した。交配後2日目に卵管を灌流して4細胞期の受精卵を採取した。卵は20%ウサギ自家血清を添加したTCM199を培養液にして37.5℃、5%CO<sub>2</sub>の条件下で培養した。発育培養によりblastocystまで発生した卵の透明帯を除去しフィーダー細胞上で培養を続けた。このときの培養液にはLIF、アミノ酸等を加えた15%FBS添加DMEMを用い、フィーダー細胞にはSTO細胞をマイトマイシン処理して使用した。数日後に卵がフィーダー細胞に強く接着していることを確認したのち、酵素処理を施して細胞を分散し新しいフィーダー細胞上に播種した。その後、ES様細胞が確認できたところで同じ操作を繰り返して継代した。継代の過程で一部の細胞を凍結保存した。樹立したES様細胞はアルカリフォスファターゼ活性の有無を検査した。また、一部の株においては継代している細胞コロニーをフィーダー細胞と分離して

非付着性細胞用フラスコで培養し、その分化能について調べた。分化発生を目的とした培地には、LIFは添加していない10%FBS添加DMEMを用いた。

##### 4-2) マウスおよびウサギの体細胞核移植由来胚からのES細胞の樹立

マウス(129/Sv)はeCG、hCG処理、ウサギ(Japanese White)はFSH、hCG処理による過排卵誘起後、卵管より未受精卵を採取した。これらの卵の核を除去した後に卵丘細胞の核を卵細胞質内に注入した。活性化処理後、発育培養によりblastocystまで発育した卵の透明帯を除去しフィーダー細胞上で培養した。一部の卵では、内部細胞塊をマイクロマニピュレーターを用いて採取し、内部細胞塊のみをフィーダー細胞と共培養するという方法を試みた。その後、細胞を分散させ新たなフィーダー上に播種した。出現したntES様細胞のコロニーを継代、維持し一部を凍結保存した。

#### C. 研究成果および考察

##### 1) 受精卵の発育培養における各種フィーダー細胞の影響

###### 1-1) 各種フィーダー細胞が卵の発育に及ぼす影響

いずれの試験区においてもフィーダー細胞を用いていない対照区に比べてblastocystへ高率に発生することが示された。また、共培養に用いた細胞により、hatchingの成績に違いが認められた。特に、カニクイザル卵管上皮細胞および5637細胞と共培養を行った卵は高率にhatched blastocystへ発生した。

###### 1-2) 生殖細胞との共培養を目的としたカニクイザル各種体細胞株の確立

### とその有用性

カニクイザルより卵管上皮細胞と卵丘細胞をそれぞれ3株、セルトリ細胞、グリア細胞と腎、心、肺由来の細胞、胎児繊維芽細胞をそれぞれ1株ずつ樹立した。各細胞の同定には至っていないが培養細胞の形態はそれぞれ明らかに異なった特徴を有していた。卵管上皮細胞をフィーダーとしてマウス卵と共培養したところ栄養外胚葉が大きくexpandする現象を認め卵の発生に良好な影響を及ぼしているものと考えられた。セルトリ細胞をフィーダーとしてカニクイザルの円形精子細胞を培養したところ、フィーダー細胞を用いない対照区と比べて長期の生存を確認し、一部の円形精子細胞で伸長あるいは精子の形態を示すものを認めた。このように、少なくとも卵管上皮細胞とセルトリ細胞においては生殖細胞との共培養の有効性が示された。

### 1-3) カニクイザル卵管上皮細胞の不死化細胞株の樹立とその特性

免疫染色の結果、今回不死化した細胞はanti-cytokeratin抗体に対して陽性であった。また、PCR反応の結果IL-2を除くプライマーによりDNAの増幅が認められた。すなわち、今回、不死化したカニクイザルの卵管由来の細胞は、上皮系細胞に特異的なcytokeratinを持ち、また卵管に特異的なoviductinの発現が認められたことから卵管上皮細胞細胞であることが確認された。この細胞株は今回検索した中では、IL-2以外の全ての因子を発現しており、カニクイザル卵の体外培養系において有効に作用するものと期待される。

### 2) Percollを用いた卵の新しい収集法の確立

遠心後、各層から回収された卵は、

上層部において98.8% (588個)、下層部において1.2% (7個)であった。最下層部のペレット中には卵は存在していなかった。回収された卵の80.1% (481個)が2細胞期であり、この2細胞期卵は発育培養により97.9% (471個)がblastocystまで発育した。今回のPercollを用いた卵の収集を行う前の溶液には卵の他に多数の卵丘細胞、精子等が含まれていた。本法によりこれらの細胞と卵を明確に分離することができ、速やかに多数の卵を回収することが可能であった。遠心後の上層部、すなわちPercollの上端から全体の99%の卵を回収した。その部分の卵は肉眼でも確認することができたため、その後の処理も容易であった。下層に認められた1%の卵はいずれも2細胞期の卵であり、上層部の卵を回収する時に混入したものと考えている。すなわち今回のPercoll濃度を適用すると遠心後、全ての卵はPercollの上端に位置すると推察される。卵の回収もれを避けるにはピペットを用いて最下層部の卵丘細胞等の細胞ペレットのみ（ここには卵は含まれていない）を吸引除去するという方法が有効かもしれない。また、今回は2細胞期の受精卵を対象に実験を試み、その後のblastocystへの発生に影響がないことが示された。本法は他のステージの受精卵あるいは未受精卵にも応用可能であると思われる。なお、我々はすでに本法により複数回、卵の収集を試みており高い再現性を確認している。取り扱う卵の数によっては従来どおりのキャピラリーを用いた手作業の方が効率が良いときもある。しかしながら、多数の卵を取り扱う必要がある場合には本法の効果は絶大である。本法の最大の利点



は卵数に関係なく一度の操作で卵と卵以外の細胞を分離し、卵のみを簡単に収集できることである。今後、卵のproteome解析のようなタンパク質を分析する研究が盛んになるにともない、また、その他多数の卵を必要とする研究を実施するにあたり本法は有用な手法になるものと思われる。

### 3) カニクイザル円形精子細胞が有する卵子活性化能の個体差の解析

カニクイザル4頭から採取した円形精子細胞による卵子活性化率は、それぞれ22、43、89および100%であり、サル円形精子細胞の活性化能には個体差があることが示された。

## 4) ES細胞の樹立に関する検討

### 4-1) ウサギのES細胞の樹立

本研究によりウサギのES様細胞が17株樹立できた。未分化を示すマーカーであるアルカリフォスファターゼ活性が陽性であることがすべての株において確認された。また、分化能について検討したところ、分化発生用培地で培養を開始後2から5日目には細胞塊の形態が球状に変化するものが観察された。この球状の細胞塊は複数の層からなり三胚葉に分化している可能性が示唆された。また、さらに培養を続けることで嚢胞状に変化したことからこれらの細胞塊は胚様体を形成したものと考えられた。本研究における操作の過程で、フィーダー細胞に接着したウサギ卵からはマウス卵の場合に観察されるようなectoplacental cone様の形態は確認されず、盛り上がることなく平面状の増殖が認められた。これはウサギ卵を用いたときの特性と考えている。樹立したES様細胞の形態はいずれも扁平であり、マウスES細胞の形態とは明らかに異なっていた。

ヒトやサル類のES様細胞が扁平であることが知られており、ウサギにおいても同様の特徴を有していることが確認された。今後、染色体検査、多分化能の確認、キメラ動物の作出などを試みることで樹立した株がES細胞であるという確証を得たい。

### 4-2) マウスおよびウサギの体細胞核移植由来胚からのES細胞の樹立

本研究によりマウスntES様細胞が12株、ウサギのそれが3株樹立できた。ntES様細胞3株のうち2株はblastocystの内部細胞塊のみを採取して培養した方法により樹立された。内部細胞塊のみを用いる方法が優れているか否かについて判断するためにはさらに多くの例数で検討する必要がある。樹立したntES様細胞コロニーの形態はマウスでは比較的盛り上がった形態をしていた。一方、ウサギのそれは扁平であった。また、これらの細胞は細胞質の割合から考えると核が大きくES細胞の特徴を示していた。なお、凍結融解した細胞においても良好に増殖することが確認された。未分化を示すマーカーであるアルカリフォスファターゼ活性はすべての細胞株において陽性であり、さらに、ウサギ、マウスともに分化実験において胚様体形成能を有していることが確認された。

## D. 結論

### 1) 受精卵の発育培養における各種フィーダー細胞の影響

種々のフィーダー細胞が生殖細胞、とくに卵培養に良い影響を与えることが確認された。株化したカニクイザル卵管上皮細胞は少なくとも7種類のグロースファクターおよびサイトカインを発現していることが確認された。

## 2) Percollを用いた卵の新しい収集法の確立

同時期に多数の卵を収集するための方法が開発された。本法は、今後様々な実験系に使用できるものである。

## 3) カニクイザル円形精子細胞が有する卵子活性化能の個体差の解析

カニクイザル円形精子細胞の活性化能には個体差があることが明らかとなった。

## 4) ES細胞の樹立に関する検討

ウサギのES様細胞の樹立に成功した。また、マウスおよびウサギの体細胞の核を移植して得られた胚からES様細胞を樹立した。今回の経験はサル類のES細胞を扱ううえで有用な知見を与えてくれるものであると確信している。

## E. 研究発表

### 1. 誌上発表

- 1) Katsuyoshi Kawasaki, Yuko Mitsui, Takahiro Ono, Hiromi Ogawa, Ichiro Takano, Tadashi Sankai, Keiji Terao. Simple method for assaying serum oxytocin and changes of serum oxytocin level during parturition in cynomolgus monkeys. *Exp. Anim.* 51, 181-185, 2002
- 2) Hironori Okada, Yasuhiro Hirose, Masao Ito, Tadashi Sankai. Aspiration method to collect epithelial cells from mouse, rat, and monkey oviducts. *Comparative Topics in Laboratory Animal Science* 42, 46-51, 2003
- 3) Narumi Ogonuki, Hideaki Tsuchiya, Yoshihiro Hirose,

Hironori Okada, Atsuo Ogura, Tadashi Sankai. Pregnancy by the tubal transfer of embryos developed after injection of round spermatids into oocyte cytoplasm of the cynomolgus monkey (*Macaca fascicularis*). *Human Reproduction* (in press)

### 2. 学会発表

- 1) 岡田浩典、広瀬良宏、喜多 清、吉田高志、伊藤雅夫、山海 直. Buffalo Rat Liver細胞との共培養がマウス卵の発育に及ぼす影響. 第49回日本実験動物学会 (名古屋) 2002年5月
- 2) 広瀬良宏、岡田浩典、喜多 清、伊藤雅夫、山海 直. カニクイザル円形精子細胞の体外成熟培養におけるアポトーシスインヒビターの影響. 第49回日本実験動物学会 (名古屋) 2002年5月
- 3) 岡田浩典、広瀬良宏、吉田高志、伊藤雅夫、山海 直. Buffalo Rat Liver細胞の培養上清がマウス卵の発育に及ぼす影響. 第43回日本哺乳動物卵子学会 (和歌山) 2002年5月
- 4) 山海 直. サル類の発生工学—基盤技術の開発を目指して—. シンポジウム「霊長類の生殖生物学：ラボからフィールドまで」. 第18回日本霊長類学会 (東京) 2002年7月
- 5) 宮本幸子、山海 直、町田武生、吉田高志. 雌雄のカニクイザルの糞便中テストステロン様物質の検出. 第18回日本霊長類学会 (東京) 2002年7月
- 6) 広瀬良宏、李 元雨、吉川泰弘、岡田浩典、山海 直. カニクイザル精細胞のアポトーシスの検索お

- よび体外成熟培養におけるアポトーシスインヒビター添加の影響. 第18回日本霊長類学会（東京）2002年7月
- 7) 岡田浩典、広瀬良宏、Manonmani Periyasamy、吉田高志、伊藤雅夫、山海 直. 受精卵の発育培養における各種フィーダー細胞の影響. 第18回日本霊長類学会（東京）2002年7月
- 8) 土屋英明、松田佳子、喜多 清、岡田浩典、広瀬良宏、桑名 貴、山海 直. サル類始原生殖細胞に関する体外操作基盤技術. 第18回日本霊長類学会（東京）2002年7月
- 9) 松田佳子、土屋英明、山海 直、桑名 貴. カニクイザル始原生殖細胞の検出と培養の試み. 第18回日本霊長類学会（東京）2002年7月
- 10) 越後貫成美、小倉淳郎、広瀬良宏、岡田浩典、山海 直. カニクイザル円形精子細胞が有する卵子活性化能の個体差の解析. 第18回日本霊長類学会（東京）2002年7月
- 11) 川崎勝義、小山高正、山海 直、寺尾恵治、吉川泰弘. 老齡ザルの非修正法による指迷路学習. 第18回日本霊長類学会（東京）2002年7月
- 12) 広瀬良宏、岡田浩典、井上貴美子、越後貫成美、三木洋美、小倉淳郎、山海 直. ウサギの受精卵および体細胞の核移植由来胚からのES細胞樹立の試み. フォーラム「医療に貢献する実験用ウサギの新しい展開」（佐賀医科大）2003年3月
- 13) 山海 直、広瀬良宏、岡田浩典、土屋英明、越後貫成美、岡田詔子.
- サル類精子の特性と凍結保存. 第5回SSRE (The Society for the Study of Reproduction Engineering) シンポジウム（東京）2003年3月
- 14) 鯉江 洋、揚山直英、酒井健夫、金山喜一、山海 直. カニクイザルにおける筋性部心室中隔欠損症が疑われた1例. 第135回日本獣医学会（東京）2003年3月

## 分担研究報告書

### チンパンジーを用いた遺伝子治療の評価方法の開発に関する研究

分担研究者 早坂郁夫\*

協力研究者 吉本信彦\*、富永壽和\*、本田律生\*\*、岡村 均\*\*、熊澤俊彦\*\*\*、井手幸恵\*\*\*\*、  
中潟直己\*\*\*\*

\*(株)三和化学研究所熊本霊長類パーク、\*\*熊本大学産科婦人科学教室、

\*\*\*(株)三和化学研究所総合研究所、\*\*\*\*熊本大学動物資源開発研究センター

## 研究要旨

チンパンジーのES細胞利用による遺伝子治療の評価法開発を目指し、GnRHα・hMG・hCGを併用した卵巣刺激(short protocol)を行い、1頭から複数の卵を経膣的に採取した。採取卵はICSIにより受精させたのち、培養した。チンパンジー5頭の雌から総数27個の卵を採取し、そのうち22個が受精した。受精卵のうち、18個は8細胞期まで分割し、4個は胚盤胞まで発生した。しかし、本研究ではES細胞まで進まなかったため、今後ES細胞樹立の検討を行う予定である。

また、昨年度にバイオプシーして得られたチンパンジー気管支上皮でLacZ遺伝子発現が認められたが、そのAd5-CMV-LacZベクターによる遺伝子導入発現のメカニズムを検討するために、免疫組織細胞化学染色法を用いて、培養細胞がCoxsackie-Adenovirus Receptor (CAR)を有しているか否かを調べた。培養0、3、10、20日目のいずれにおいても、抗CAR抗体に対し陽性を示し、器官培養したチンパンジー気管支上皮細胞はCARを有することが判明した。

## 研究目的

遺伝子治療の安全性および有効性の前臨床評価はゲッ歯類を用いられてきたが、評価の限界がでてきている。導入される遺伝子がヒト由来の遺伝子であることを考慮すると、生体内の安全性および有効性の前臨床評価はゲッ歯類ではなくヒトに近縁な霊長類を用いた評価系の開発が待たれる。特に、最もヒトに近いチンパンジーを用いた評価は、非常に有効な方法であると期待される。しかし、チンパンジーは最もヒトに近いが故に、高度な実験動物倫理が求められる。我々は、チンパンジーを用いてよりよい遺伝子治療の評価方法の開発を、in vitroを中心に進めてきた。

バイオプシーによって得られる細胞・組織は、in vitro 実験に必要な細胞・組織の種類および量において限界がある。様々な種類の細胞・組

織・臓器に分化する能力を持っているES細胞の利用はバイオプシーの限界をブレイクスルーする可能性を秘めている。そこで、本年度はES細胞の利用検討のためチンパンジーの採卵、受精卵の培養を検討した。

また昨年度、バイオプシーして得られたチンパンジー気管支上皮にAd5-CMV-LacZを曝露したところ、培養3日目にはLacZ遺伝子は発現しなかったが、18日目においてLacZ遺伝子発現が認められた。そこで今回、LacZ遺伝子導入発現のメカニズムを検討するために、免疫組織細胞化学染色法を用いて、培養細胞がアデノウイルスのレセプターであるCoxsackie-Adenovirus Receptor (CAR)を有しているか否かを調べた。

実験はすべてチンパンジー実験審査委員会(外部委員も含む)の承認を得て行なった。

## 実験1 チンパンジーの採卵および受精卵の培養

### 材料および方法

チンパンジー雌5頭(サチ 25 才、ナッキー 27才、サンゴ 26 才、クッキー 11 才、タマエ 23 歳)を用いた。卵巣刺激は GnRHa と hMG + hCG を併用した short protocol で行った。

月経開始から 3 日以内にケタミン麻酔下(動物用ケタラル、三共)に GnRHa 3.75mg(リユープリン注射用 3.75、武田)を皮下投与した。

GnRHa 投与翌日より hMG(ヒュメゴン、三共)を毎日筋肉内投与した。hMG(75~300 IU)の投与量は卵巣過剰刺激症候群(OHSS)を発症しないように、卵胞サイズと血中エストラジオール濃度を見ながら適宜増減した。卵胞の観察はケタミン麻酔下にて経膈超音波診断装置(SONOVISTA MSC、持田)を用いて行った。

卵胞観察時に得られた血液および尿の FSH、LH、エストラジオール、プロゲステロンの定量を実施した。血液の各ホルモンと尿中の FSH、LH は RIA 固相法にて測定した。尿中エストラジオールは RIA 硫酸塩析法、尿中プレグナンジオールは Gas・chromatograph 法(酵素水解法)にて行った。なお OHSS の重要なパラメータである血中エストラジオールの結果は翌日に得た。

17 mm を超える複数個の卵胞の成育を確認した時点(GnRHa 投与後 17~18 日)で、hCG (プレグニール、三共)10,000 IU の筋肉内投与を行い、その 30~36 時間後に経膈的に採卵を実施した。hCG 投与と採卵のタイミングは 1 例目(サチ)でヒトと同じ 36 時間を設定した。採卵 2 日前まで 7 個の卵胞が確認できていたが、採卵時には 1~2 個の卵胞しか確認できず、すでに排卵が始まっていたことが考えられた。そこで 2 例目以降、採卵は hCG 投与後 31 時間前後に実施することとした。

採卵は経膈プローベに装着した穿刺アダプターを介し、17G 採卵針(OVUM ASPORATION NEEDLE、K-OPS-1035-RWH-ET、COOK)

を用い超音波観察下にて、卵胞を穿刺吸引することにより行った。

得られた卵は前もって凍結保存しておいた精子を用い ICSI により授精させた。10% SPS(serum protein substitute) fertilization medium で前核ができるまで培養し、受精卵の前核を確認後 10%SPS cleavage medium に移した。8 細胞期以降は 10%SPS blastocyst medium にて培養した。

### 結果および考察

GnRHa 投与直後に flare up が認められ、個体間に程度の差はあったものの FSH と LH の一過性の上昇がみられた。その後 down-regulation により spontaneous premature LH surge は観察されなかった。(図 1~5)。hMG による刺激により、複数の卵胞の生育が認められ、徐々にエストラジオールが上昇した。1 頭あたり 13~27 個の卵胞が観察され、hCG 投与直前で 17 mm を超える卵胞は 2~6 個/頭みられた。hCG 投与後、30~36 時間に卵が成長し、3~10 個/頭(総数 27 個)の卵が採取された(表 1)。

27 個の卵のうち、22 個が受精した。その後、82%の卵は 8 細胞期まで卵割が進んだ(前核期まで 3 個、2 細胞期まで 2 個、3~4 細胞期まで 2 個、5~6 細胞期まで 4 個、7~8 細胞期まで 7 個)。4 個(15%)の卵は、さらに発生が進み、胚盤胞に至った(表 1)。受精から胚盤胞までに 120 時間を要した(表 2、図 6)。また、卵のグレードと発生の進展との間に、相関はみられなかった。

ホルモンによる卵巣刺激の副作用として、OHSS が 5 例中 1 例(ナッキー)に認められた。この個体は血中のエストラジオールが 7500 pg/ml と非常に高い値を示した。極軽度の OHSS を示した 1 例(クッキー)では、2920 pg/ml まで上昇した。これらデータから、OHSS が発症するか否かは、血中エストラジオール

3000 pg/ml が目安になると考えられる。

昨年度は、チンパンジーの月経周期と性ホルモン動向の基礎データを取り、経膣採卵技術の検討を行った。本年度は、複数の成熟卵を採取するために、ホルモン剤の投与量や投与期間を検討した。その結果、ヒト I V F で使用されている過排卵刺激法がチンパンジーに適用でき、その技術がほぼ確立できた。

E S 細胞の樹立の過程で、受精から胚盤胞まで、胚盤胞から E S 細胞までの 2 つの壁があると言われている。本実験においても、当初 2 ~ 8 cell block がみられたが、その後胚盤胞まで進むようになった。今後、2 つ目の壁を検討し、チンパンジーの E S 細胞を樹立する予定である。

## 実験 2 器官培養チンパンジー気管支上皮の抗 CAR 抗体による免疫組織細胞化学染色材料および方法

2 個の気管支上皮組織片をバイオプシーにより採取し、採取直後（培養 0 日）と培養後経時的（培養 3、10、20 日）に、4%パラホルムアルデヒド液で 24 時間固定した。定法に従い、パラフィン包埋、連続切片作製後、免疫組織細胞化学染色に供した。

免疫組織細胞化学染色は、抗 CAR 抗体（US Biological 社製）を 50 倍希釈し、ペルオキシダーゼ標識ストレプトアビジン-ビオチン法（LSAB 2 キット：DAKO 社製）により行った。またカウンター染色はヘマトキシリンにて行った。

## 結果および考察

気管支上皮細胞は培養 0、3、10、20 日の全例において、抗 CAR 抗体に対し陽性を示した。全体に陽性の程度は弱かったが、培養 20 日の 2 例で他に比べ強い陽性を示した（図 7）。また比較対照においたヒトの気管支上皮細胞では強い陽性が認められた。

今回の結果により、器官培養したチンパンジー気管支上皮細胞は、いずれの培養時期においても CAR を有することが判明した。LacZ 遺伝子が培養 18 日目において発現し、培養 3 日目では認められないことについては、アデノウイルスの、CAR への到達性の違いに起因することが考えられる。CAR はタイトジャンクションより下方に位置するとされるので、今後アデノウイルスベクターの通り道であるタイトジャンクションの構造の違いを調べる予定である。

## 結論

- 1) チンパンジーの E S 細胞を樹立するために、ヒト I V F で用いられている卵巣刺激 (short protocol) により 27 個の卵を得、そのうち 4 個が胚盤胞まで発生した。
- 2) チンパンジーの器官培養気管支上皮に発現する Ad5-CMV-LacZ ベクターのメカニズムを検討した結果、Coxsackie - Adenovirus Receptor は培養 0、3、10、20 日目のいずれにおいても認められた。

## 学会発表

友栗徹士、金子武人、坂本亘、長野邦寿、井上聖也、早坂郁夫、中瀬直己。チンパンジー精子の凍結保存。第 18 回日本霊長類学会大会（東京）2002 年 7 月

早坂郁夫、吉本信彦、森雄介、鶴殿俊史、江見美子、本田律生、大場隆、岡村均、吉川泰弘。チンパンジーにおける GnRH $\alpha$ /hMG の過排卵刺激の検討。第 18 回日本霊長類学会大会（東京）2002 年 7 月

富永壽和、吉本信彦、熊澤俊彦、小林久雄、早坂郁夫、山本太郎、吉川泰弘。チンパンジー気管支上皮の器官培養法の検討。第 18 回日本霊長類学会大会（東京）2002 年 7 月

吉本信彦、森裕介、鶴殿俊史、江見美子、早坂  
郁夫、内野貴久子、大場隆、岡村仁、吉川泰弘、  
超音波診断装置測定によるチンパンジーの成熟  
卵胞サイズ. 第18回日本霊長類学会大会（東  
京）2002年7月

図1 チンパンジー(サチ)の GnRHa、hMG、hCG 投与による尿中ホルモン(1日量)の変化と卵胞の成育

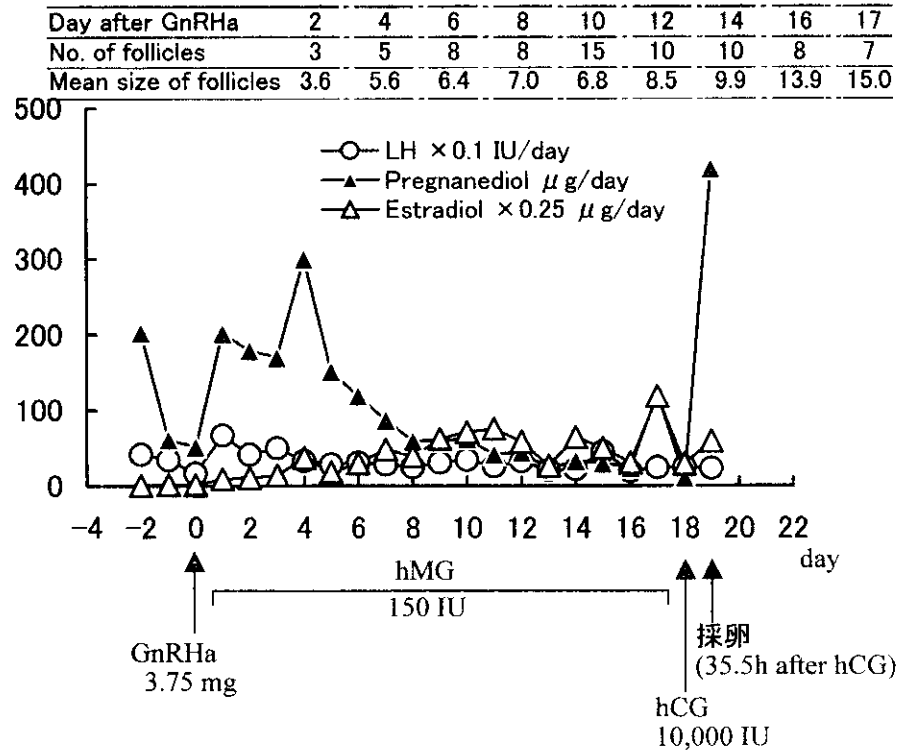


図2 チンパンジー(ナッキー)の GnRHa、hMG、hCG 投与による尿中ホルモン(1日量)の変化と卵胞の成育

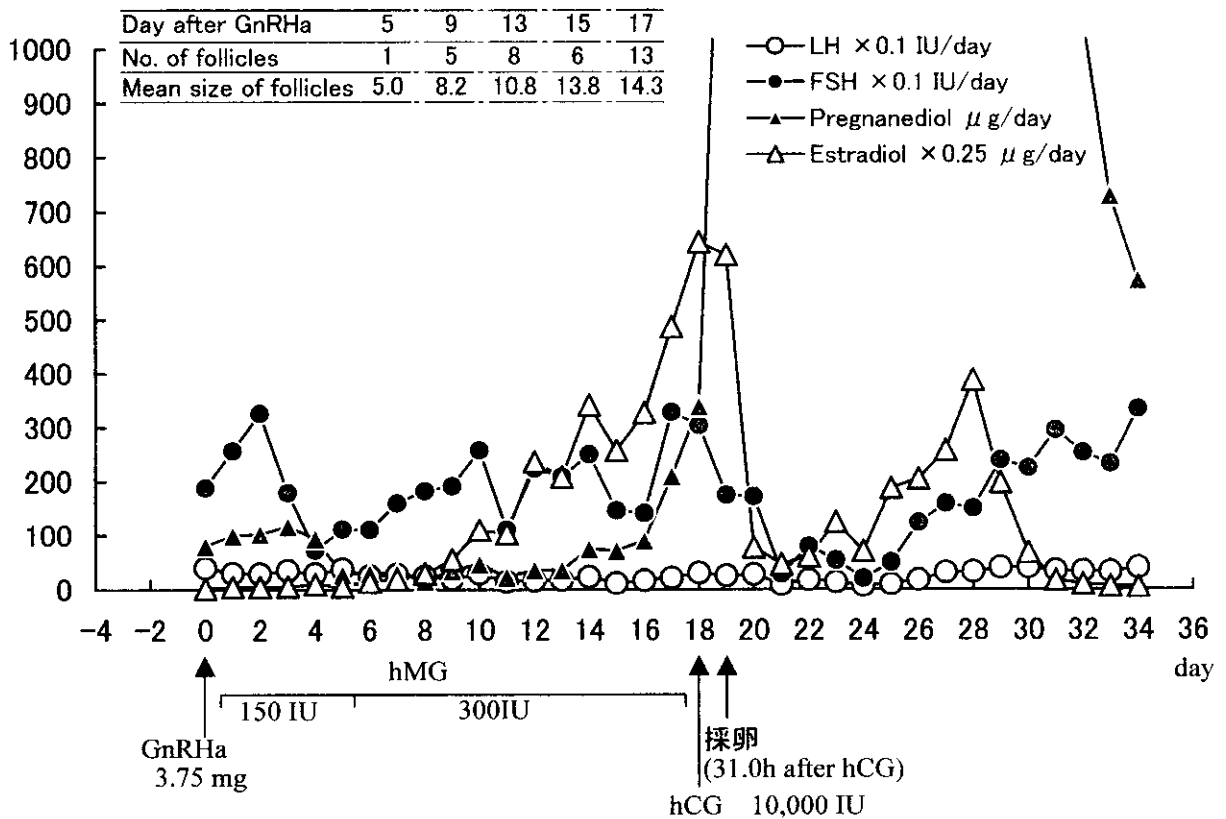




図3 チンパンジー(サンゴ)の GnRHα、hMG、hCG 投与による尿中ホルモン(1日量)の変化と卵胞の成育

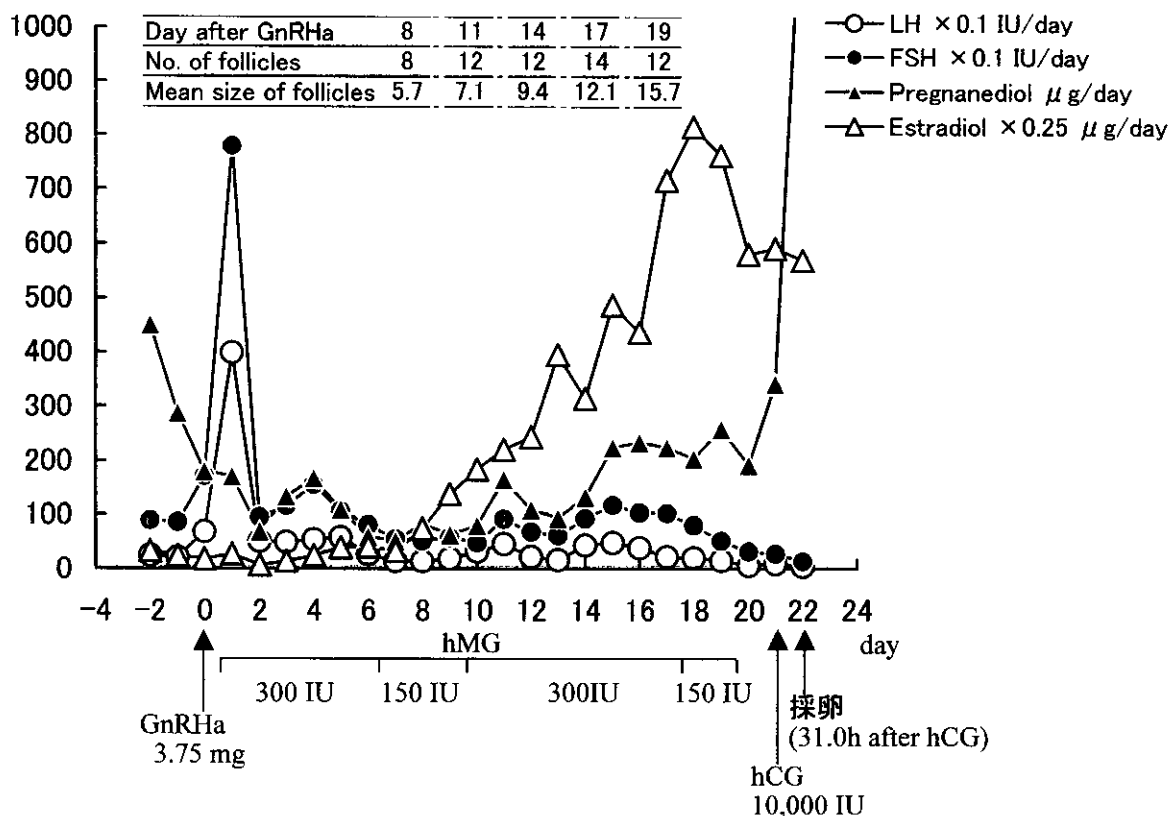


図4 チンパンジー(クッキー)の GnRHα、hMG、hCG 投与による尿中ホルモン(1日量)の変化と卵胞の成育

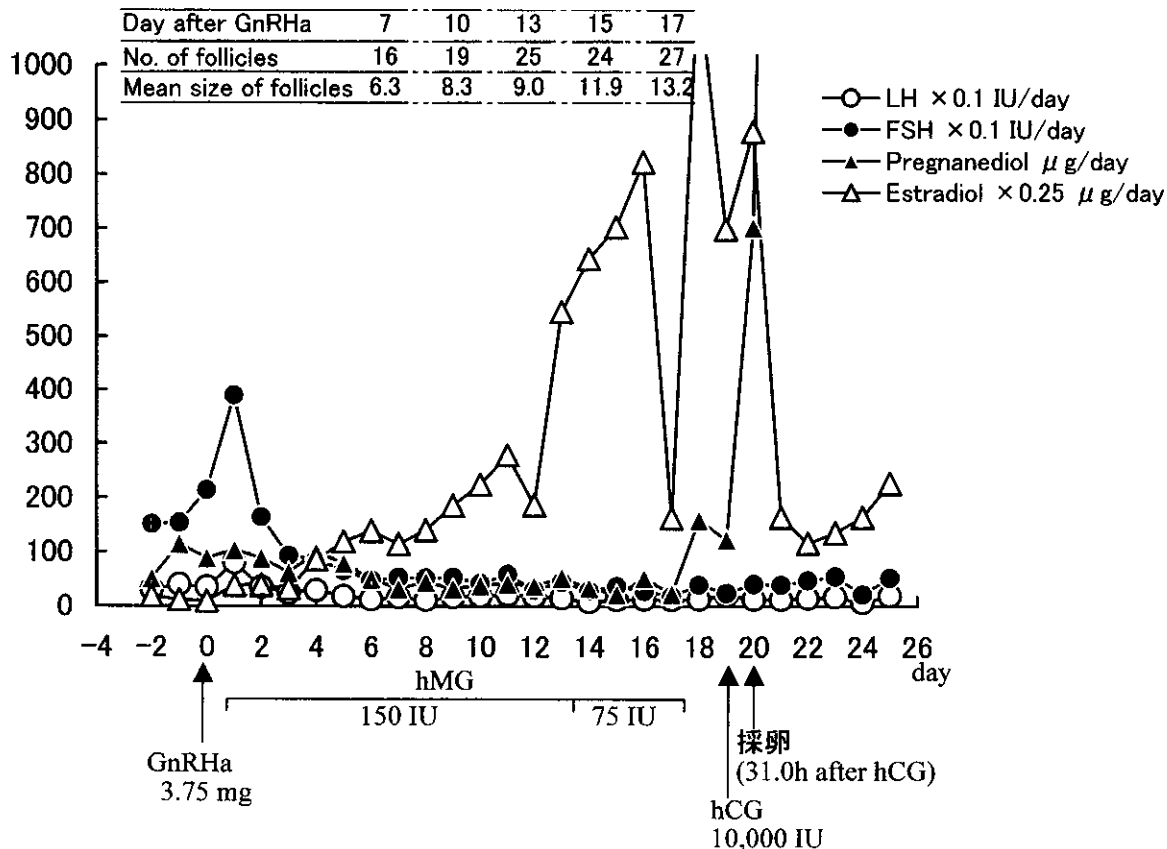


図5 チンパンジー(タマエ)の GnRH $\alpha$ 、hMG、hCG 投与による尿中ホルモン(1日量)の変化と卵胞の成育

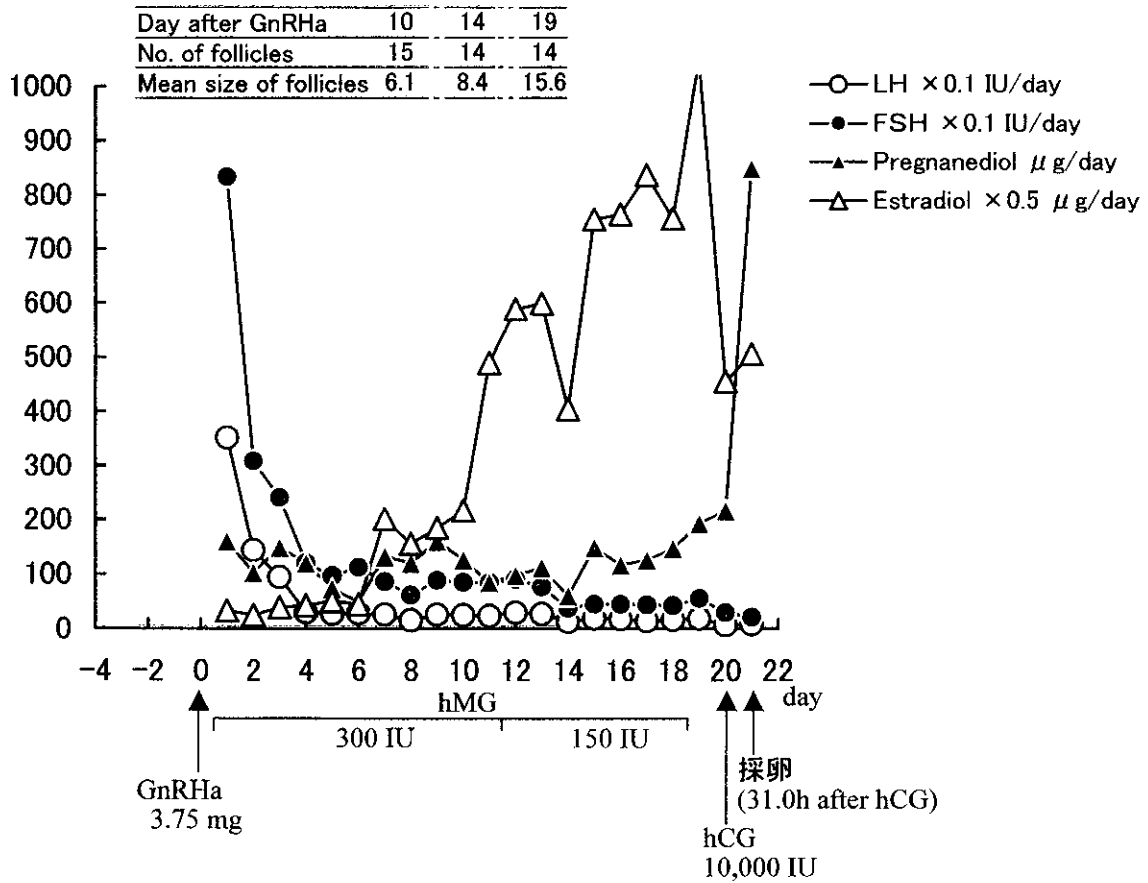


図6 チンパンジーの受精卵から胚盤胞までの発生

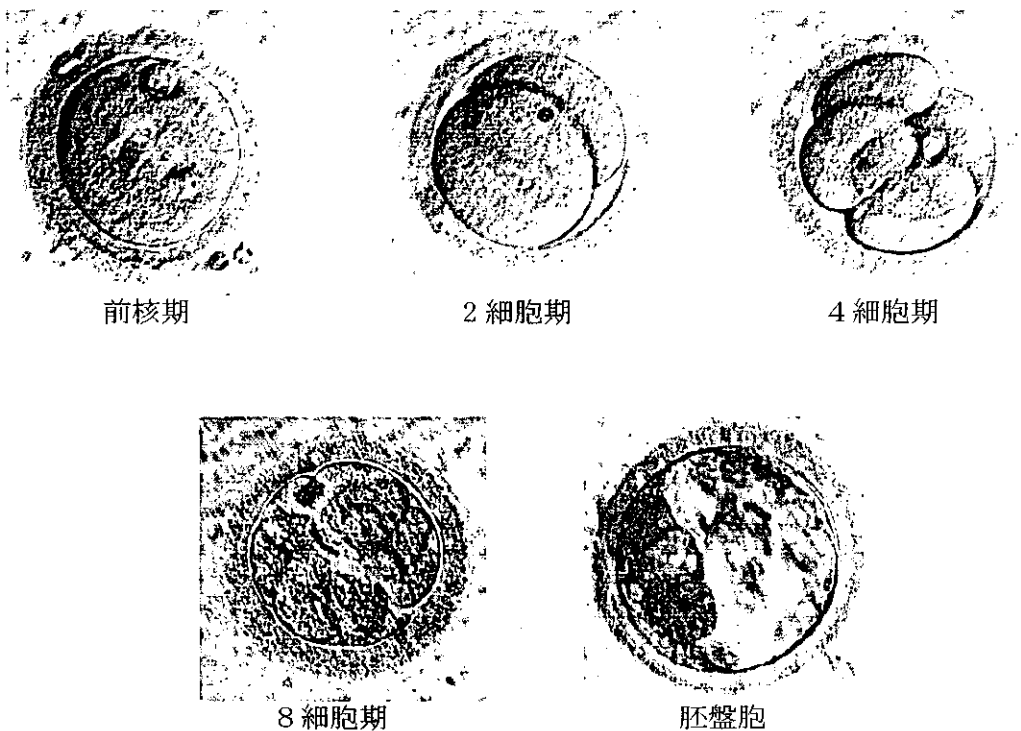


表1 採卵数、卵のグレードおよび胚の発生

		サチ	ナッキー	サンゴ	クッキー	タマエ
採卵数		3	5	4	5	10
グ レ ー ド	G1	—		2	3	2
	G2	—	3	2	1	7
	G3	—	1			1
	frag	—	1		1	
deg or frag			2		2	1
prenucleus				1		2
2 cells			1		1	
発 生	3-4 cells			1		1
	5-6 cells	1		2	1	
生	7-8 cells	2	2		1	2
	morula					
blastocyst						2
expand blastocyst						2

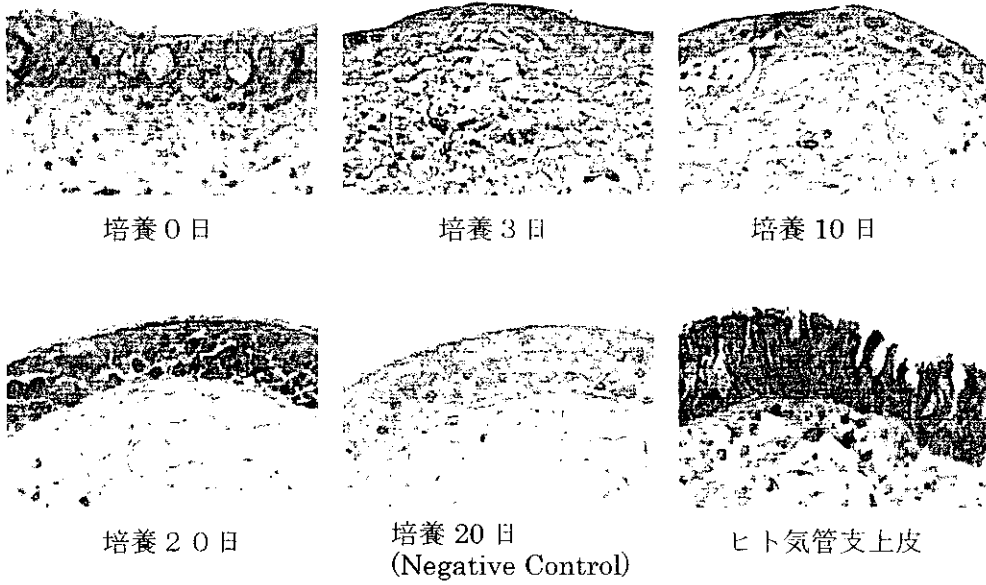
表2 胚の発生と時間(タマエの事例)

hour	12	24	48	60	72	96	120	144
deg or frag			1(9)	1(9)	1(9)	1(9)	1(9)	1(9)
prenucleus	10(1-10)	10(1-10)	3(1,5,6)	2(1,6)	2(1,6)*			
2 cell			4(4,7,8,10)					
3-4 cell			2(2,3)	1(10)	1(10)	1(10)*		
5-6 cell				3(4,5,8)				
7-8 cell				3(2,3,7)	3(4,5,8)	2(4,5)*		
morula					3(2,3,7)	1(8)		
early blastocyst						3(2,3,7)		
blastocyst							2(7,8)	2(2,3)
expand blastocyst							2(2,3)	

\*:凍結、数字は胚の数を示、括弧内の数字は胚の番号を示す。

胚のグレード G1:No.6,7, G2:No.1,2,8,9, G2~G3:No.3,5,10, G3:No.4.

図7 器官培養チンパンジー気管支上皮の抗 CAR 抗体染色



Ad5-CMV-lacZ による遺伝子導入(X-gal 染色)

