

# 図5

## Direct PCR detection of proviral DNA with genomic DNA prepared from whole blood of cynomolgus monkeys

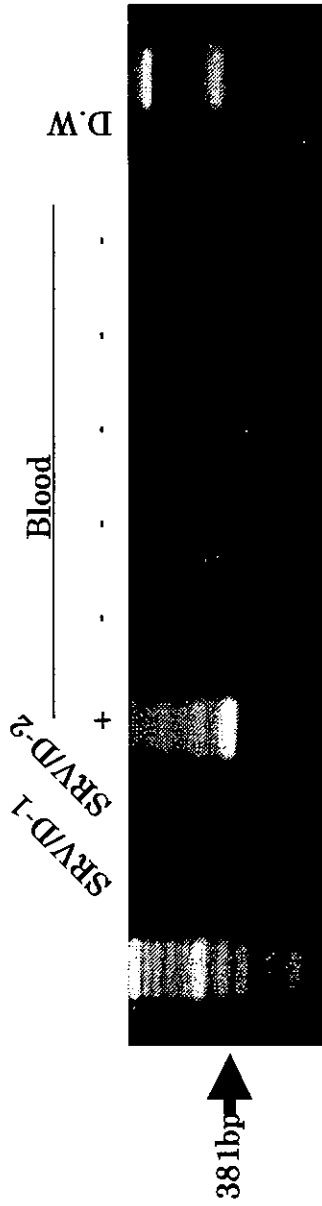
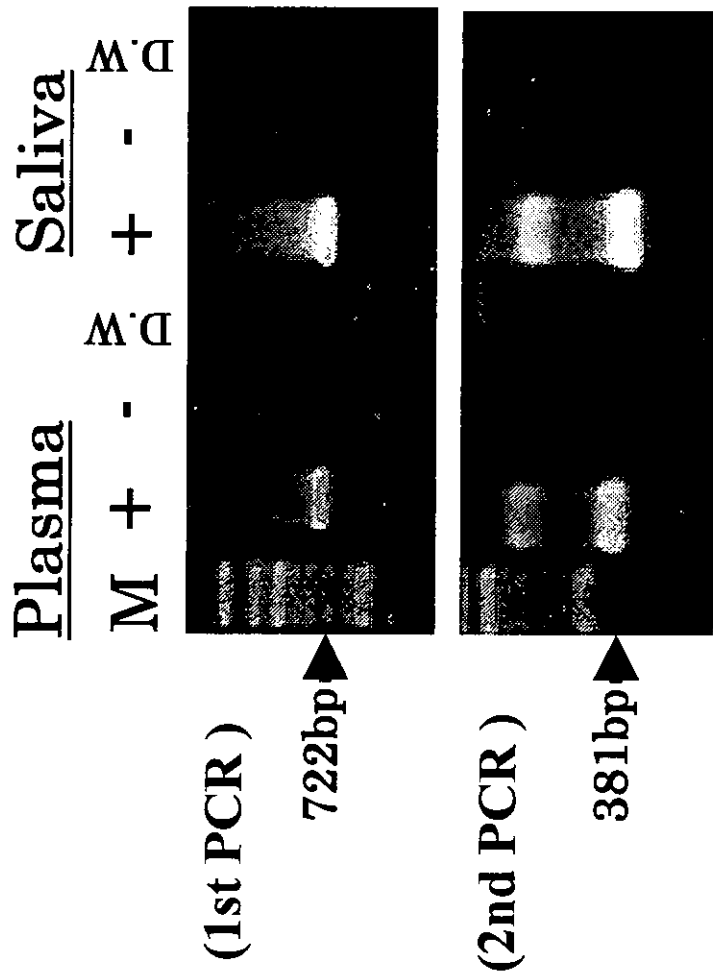


Fig.5 Detection of SRV/D-Tsukuba from blood using nested PCR. SRV/D-1 is the Raji cell infected with SRV/D-1. SRV/D-2 is the Raji cell infected with SRV/D-2. +; the blood of the monkey infected with SRV/D-7. -; the blood of uninfected monkeys with SRV/D.

NucleoSpin Blood (Macherey-Nagel Co.) was used.

図6

### Detection of SRV/D-Tsukuba signal by RT-Nested-PCR using Plasma and Saliva



筑波霊長類センターカニクイザル繁殖コロニーにおけるサル EBV, CMV, Foamy virus の感染状況調査と SPF 化に関する研究

分担研究者 藤本浩二 社団法人予防衛生協会研究推進企画部 部長  
協力研究者 成田豊子、高野淳一郎、小野文子（(社)予防衛生協会）

研究要旨：筑波医学実験用霊長類センターのカニクイザル繁殖コロニーにおけるサルエプスタイン・バーウイルス (EBV)、サルサイトメガロウイルス (CMV)、サル Foamy virus (SFV) の感染状況とその感染様式を調査し、未感染ザル (SPF ザル) を生産する方法を検討した。その結果、人工哺育あるいは早期離乳と汚物等に手や尾が届かない一段飼育方式を組み合わせることで、SPF ザルを生産できる可能性が明らかとなった。

A. 研究目的

臓器移植、AIDS 等の重度免疫抑制を伴う研究にサル類を使用する場合、サル類に潜伏感染しているヘルペスウイルス、レトロウイルス等の再活性化と発症が問題となる。またこれら感染ウイルスに対する宿主免疫反応が実験データに影響を与える場合がある。

筑波医学実験用霊長類センターのカニクイザル繁殖コロニーにおいては既に、B ウイルス、サル水痘ウイルス、SIV、STLV、SRV/D、麻疹ウイルスについて SPF 化を完了し定期モニタリングにより SPF 状態を確認している。

サル EBV、CMV、SFV については、1990 年に調査を実施し、コロニーの感染率が高く排除が難しいウイルスと判断したが、最近、臓器移植等の研究分野でこれらウイルス未感染ザルの必要性が高まっている。特に、EBV については腫瘍形成および節外性リンパ増殖作用、SFV については初代細胞株への迷入等の問題が生ずる。以上の理由から、本研究では、筑波医学実験用霊長類センターのカニクイザルコロニーにおいて、サル EBV、CMV、SFV の SPF 化を検討する。

本年度の研究ではまず、筑波霊長類センターカニクイザルコロニーにおける EBV、CMV、

SFV の感染状況と感染様式を調査し SPF 化の方法を検討する。

B. 研究方法

(1) 動物

筑波霊長類センターカニクイザル繁殖コロニーの 4~7 ヶ月齢 12 頭、1 歳齢 23 頭、3 歳~22 歳齢 79 頭、SRV/D-SPF コロニーの 56 頭について調査した。

(2) 材料

ウイルス抗体検査には血清を用いた。

(3) ウイルス株

EBV は筑波霊長類センターのカニクイザルから分離した Cyno-EBV を用いた。CMV はアフリカミドリザル由来 SA6、ST3835-7 株を用いた。SFV は台湾ザル由来 2 型 FV34 株を用いた。また、ヒト用サイトメガロウイルス抗体測定キットである、サイトメガロ IgG (II) -EIA「生研」(デンカ生研(株))も使用した。

(4) 抗体検査方法

それぞれのウイルスに対する抗体は蛍光抗体法、ELISA 法で調べた。

### C. 研究結果

#### (1)サル EBV (図 1)

4~7 ヶ月齢の離乳時仔ザルの EBV 抗体陽性率 ~3 歳で 50~60%、4~9 歳で 70%、10 歳齢以上では全頭抗体陽性であった。

#### (2)サル CMV (図 1)

1 歳齢で 1 頭、3 歳齢で 1 頭が抗体陽性であったが、他のサルは全て抗体陰性であった。

#### (3)サル SFV (図 1)

SFV の抗体陽性率は 3 歳齢までは 10%以下であり、4~9 歳齢で約 30%、10 歳齢以上で 80%であった。

#### (4)SRV/D-SPF 群における EBV、CMV、SFV 抗体保有状況 (図 2)

56 頭の SRV/D-SPF 群は 2.5 歳齢以上のサルで構成されていた。

56 頭のうち母ザルの保育不良等の理由で人工哺育された 21 頭の EBV 抗体陽性率は 19%

(4/21)、CMV は全頭陰性、SFV は 1 頭のみ抗体陽性であった。一方、母ザル哺育された 34 頭の EBV 抗体陽性率は 97% (33/34)、CMV は全頭陰性、SFV は 37% (9/34) であった。

### D. 考察

筑波霊長類センターのカニクイザル繁殖コロニー内の 4 ヶ月齢~23 歳齢のサルについて、EBV、CMV、SFV に対する抗体検査を実施して、その感染状況を調査した。EBV は離乳時に約 25%が感染していたが、年齢と共に感染率は上昇し 10 歳齢以上では全頭が抗体陽性となり、1990 年の調査結果とほぼ同じ傾向が認められた。CMV については全体で感染率が大変低いことが明かとなり、1990 年以降コロニーから CMV が排除されつつあることが分かった。SFV 感染については、3 歳齢で抗体陽性率は 10%以下であったが、成長と共に抗体陽性率は上昇し 10 歳齢以降では 80%が抗体陽性とり、EBV と同様な感染パターンが認められた。以上の結果から、4 ヶ月齢前後での離乳によりサル EBV、CMV、SFV 未感染ザルをある程度確保できることが明らかとなった。

SRV/D-SPF 群の調査では、出生直後より人

率は約 25%であった。抗体陽性率は成長と共に上昇し 1

工哺育されたサルでは、EBV 感染率が同年齢のサルに比べて低く、母ザルからの EBV 感染が防がれており、人工哺育が SPF コロニー作出の手段として極めて有効なであることが明らかとなった。

筑波霊長類センターで採用してきた二段飼育方式は、サルが便などの汚物に触られる構造であり、便、尿、唾液等を介する感染を防ぐのは難しい構造であった。そのため、SRV/D-SPF 群では一段飼育方式を採用して、汚物等との接触を断つ試みを行った (図 3)。今回の調査で、SRV/D-SPF 群内の人工哺育由来のサルでは 3 歳齢に至っても EBV、CMV、SFV の感染率が極めて低いことが明らかとなり、一段飼育方式がこれら 3 種のウイルスの感染防御においても有効であることが明らかとなった。

以上の研究結果から、人工哺育あるいは 4 ヶ月齢前後での離乳により、EBV、CMV、SFV 未感染サルを確保できるとことが分かった。また SPF コロニーではサルが便等の汚物に接触できない一段飼育方式を採用することにより SPF 状態を維持できることが明らかとなった。

### E. 結論

本研究結果から、筑波霊長類センターのカニクイザルについて、従来からの SPF 化項目であった B ウイルス、サル水痘ウイルス、SIV、STLV、SRV/D、麻疹ウイルスに加え、EBV、CMV、SFV についても人工哺育あるいは早期離乳と、一段飼育方式を組み合わせることにより SPF 化が可能であると判断した。

今後は、離乳ザルに対して 6 項目のウイルス抗体検査を実施して、陰性ザルを分離して飼育する。

### G. 研究発表

無し

図1. EBV CMV SFV 抗体陽性率の年齢による比較

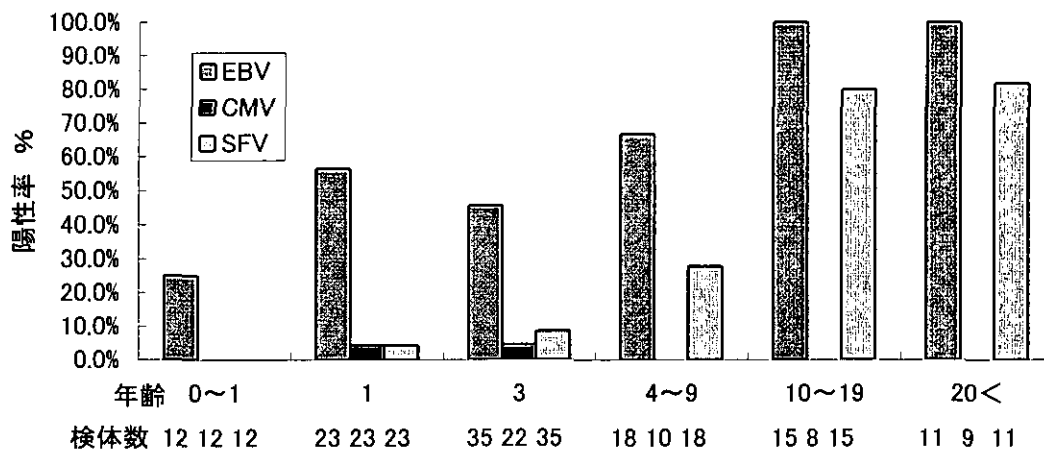
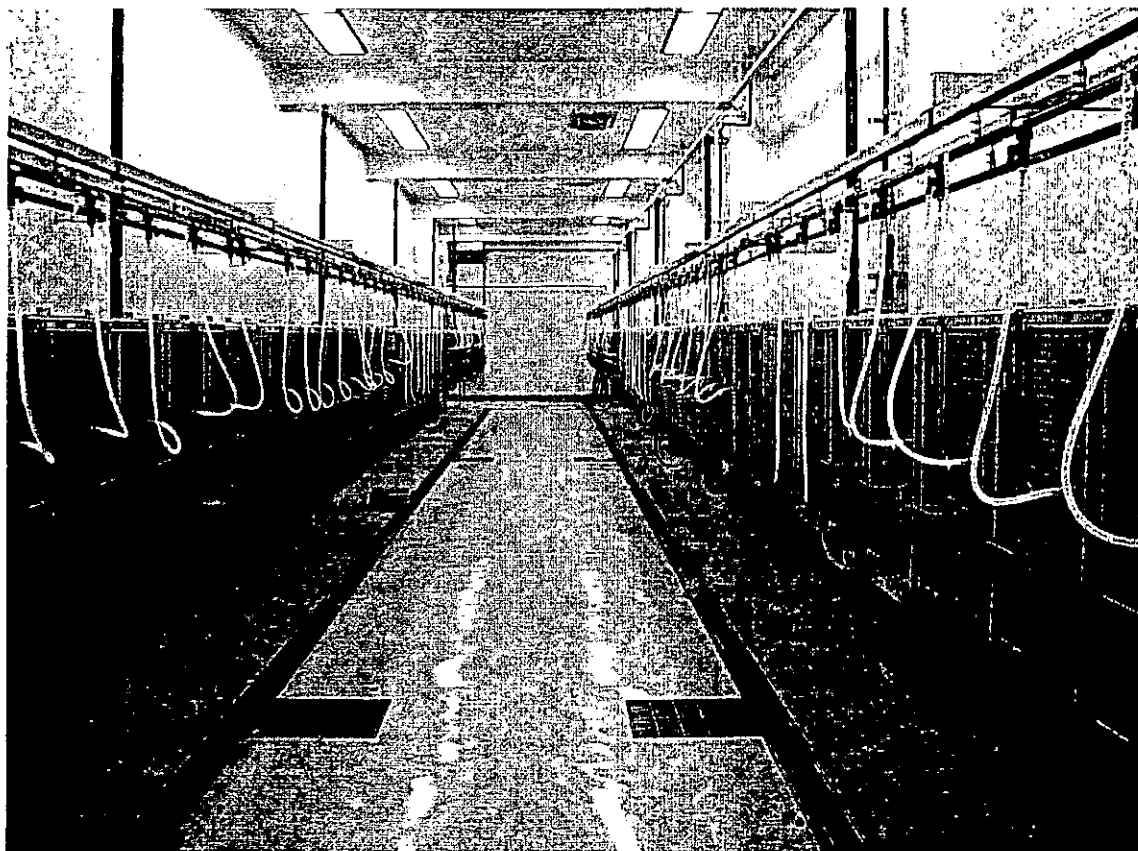


図2. SRV/D-SPF コロニーにおける EBV、CMV、SFV 抗体陽性率

	EBV	CMV	SFV
人工哺育ザル	4/21 (19.0%)	0/21 (0%)	1/21 (4.8%)
母ザル哺育ザル	33/34 (97.1%)	0/34 (0%)	9/34 (36.5%)

※ 動物は全て 2.5 才以上

図 3. SRV/D-SPF コロニーで使用した 1 段飼育方式



## 医科学研究用リソースとしてのカニクイザルの基盤高度化に関する研究

分担研究者 小倉淳郎（独立行政法人理化学研究所） 室長

研究要旨：年度は、ゲノム修飾の可塑性に関わる新しい知見を得る目的で、新たに2種類の細胞種をドナーとして体細胞移植を実施するとともに、129系マウスによるクローン効率改善の細胞学的背景について検討した。終末分化前の幹細胞はクローンのドナーとして適しているのではないか、という推測をもとに、成体幹細胞を用いて核移植クローンを行った。予想通り、G0細胞のために2-cellへ高率に発生したが、その後の発生低下が顕著であり、成体幹細胞のゲノムは必ずしも可塑性に富むとは限らないことが示された。また、始原生殖細胞（PGC）から初めて産子を作成し、その完全な再プログラム化を明らかにした。全能性維持に関わる因子であるOct-3/4の発現および胎盤初期形成の解析により、129系マウスのゲノムが他の系統のゲノムと異なり、正常に再プログラム化されることを明らかにした。

### A. 研究目的

カニクイザルの基盤高度化のための発生工学技術の開発は必須であるが、卵子の採取や胚移植の条件設定などには生物学および労力的な著しい制限が伴う。これらの障害を避ける1つの方策は、他の小型実験動物をモデルとして新たな発生工学技術の開発をすることがある。そこで、最も情報が豊富でかつ容易に実験を行えるマウスを用いて新規の発生工学技術の開発を行う。

### B. 研究方法

マウス核移植クローン技術は、基礎生物学のみならず、遺伝子導入動物作出や遺伝子保存など実用面での貢献が期待されているが、その産子を得る効率は著しく低く、またドナー細胞の種類も限られていた。今年度は、技術的改善の基礎データを得るために、新たに2種類の細胞種をドナーに用いるとともに、129系によるクローン効率改善の細胞学的背景について検討した。方法は、Wakayama et al. (1998)の方法に一部

変更を行った(Ogura et al., 2000)。

倫理面への配慮：実験動物に対しては、動物愛護上の配慮を行い、独立行政法人理化学研究所筑波研究所動物実験委員会の審査を経ている。

### C. 研究結果

#### 1) 成体幹細胞を用いた核移植クローン

特異抗体を用いて選別した造血系幹細胞を用いて核移植クローンを行った。予想通り、G0細胞のために2-cellへ高率に発生したが、その後の発生低下が顕著であった。BrUTP取り込み試験の結果、zygote clockは正常に働いて後期1-cellにおける翻訳は開始されていることが明らかになった。胚移植の結果、1種類の遺伝子型から1匹が生まれたのみであった。

#### 2) 生殖細胞を用いた核移植クローン

マウス生殖細胞は、エピプラスト領域から始原生殖細胞（PGC）として分化を開始する。これまでに11.5日齢以降のPGCを用いて核移植クローンを行い、ゲノム刷込み消去

のために産子は得られないことを明らかにした。DNAメチル化検索の結果、10.5日PGCの少なくとも1部は、体細胞型ゲノム刷込み状態が保たれていたことから、これらのPGCを用いることにより産子が得られる可能性がある。そこでPGC特異マーカを持つトランスジェニックマウス胎仔から10.5日PGCを採取し、核移植クローンを行った。その結果、これまでに産子3匹（うち2匹は死産）が得られており、生殖細胞として分化を開始した後も、ゲノム刷込みが残っている限り、完全な再プログラム化が生じることを明らかにした。

### 3) 129系マウスの核移植における正常性について

129系マウスを用いることにより体細胞核移植クローンの効率が改善することが知られている。そこでその機序を検討するために、胚盤胞から着床後までの129系クローン胚の遺伝子発現および組織学的検索を行った。全能性維持に関わる因子であるOct-3/4のプロモーター+GFP遺伝子を持つトランスジェニックマウスを用いて卵丘細胞由来胚盤胞の蛍光を観察した。その結果、129系backgroundの場合により蛍光強度が強いことが明らかになった。また、着床後に通常の核移植胚では胎盤外円錐細胞の増殖がほとんど見られないが、129系卵丘細胞由来の着床部位では胎盤外円錐細胞が正常に増殖していた。そして、129系卵丘細胞クローンの胎盤は、その大きさも組織学的構造も正常であった。

### D. 考察

マウス核移植クローンの効率、特に胚移植後の産子への発生率は、胚性幹細胞（ES細胞）をドナーとして用いた場合に有意に高いことが知られている。これは、ES細胞のゲノムが未分化状態にあるために、卵子内での再プログラム化のエラーが少ないためであると考えられている。そのため成体組織に存在する幹細胞もクローンのドナー

として適しているのではないかと推測がなされている。そこで本研究では、特異抗体を用いて選別した造血系幹細胞を用いて核移植クローンを行った。2-cellへ高率な発生は予想通りであったが、その後の発生低下が顕著であった。zygote clockは正常に働いていることから、そのうちの一部の遺伝子が活性化していない可能性が高い。今後、活性化していない遺伝子の特定をする予定である。成体幹細胞のゲノムは再プログラム化されるものの、必ずしも可塑性に富むとは限らないことが示された。

本研究では、初めてマウス生殖細胞由来のクローン産子の作出に成功した。生殖細胞として分化を開始した後も、ゲノム刷込みが残っている限り、完全な再プログラム化が生じることを明らかにした。

129系マウスを用いたクローンの解析から、マウス体細胞核移植クローンの典型的な初期胎盤形成不全および後期の胎盤過形成を生じることがなく、これが129系体細胞核移植クローンの良好な効率につながっていることが示唆された。本系統の詳細な検討を今後行い、クローンによる再プログラム化エラーの本態を明らかにする予定である。

### E. 結論

マウス核移植クローン実験から、成体幹細胞ゲノムは必ずしも再プログラム化されやすくはないこと、生殖細胞ゲノムは完全に再プログラム化されうることを明らかにした。

### F. 健康危険情報

とくになし。

### G. 研究発表

#### 1. 論文発表

1) Fulka Jr., J., Miyashita, N., Nagai, T. and Ogura, A. Do cloned mammals skip a reprogramming step?. Nat Biotechnol.



22: 25-26, 2004.

2) Inoue, K., Ogonuki, N., Mochida, K., Yamamoto, Y., Takano, K., Kohda, T., Ishino, F. and Ogura, A. Effects of Donor Cell Type and Genotype on the Efficiency of Mouse Somatic Cell Cloning. *Biol Reprod.* 69: 1394-1400, 2003.

3) Inoue, K., Ogonuki, N., Yamamoto, Y., Takano, K., Miki, H., Mochida, K., and Ogura, A. Tissue-specific distribution of donor mitochondrial DNA in cloned mice produced by somatic cell nuclear transfer. *Genesis.* (in press).

4) Kai, M., Irie, M., Okutsu, T., Inoue, K., Ogonuki, N., Miki, H., Yokoyama, M., Migishima, R., Muguruma, K., Fujimura, H., Kohda, T., Ogura, A., Kaneko-Ishino, T. and Ishino, F. The Novel Dominant Mutation *Dspd* Leads to a Severe Spermiogenesis Defect in Mice. *Biol Reprod.* (in press).

5) Kanatsu-Shinohara, M., Ogonuki, N., Inoue, K., Miki, H., Ogura, A., Toyokuni, S. and Shinohara, T. Long-Term Proliferation in Culture and Germline Transmission of Mouse Male Germline Stem Cells. *Biol Reprod.* 69: 612-616, 2003.

6) Kanatsu-Shinohara, M., Ogonuki, N., Inoue, K., Ogura, A., Toyokuni, K., Kogishi, T., Honjo, T. and Shinohara, T. Allogeneic offspring produced by male germ line stem cell transplantation into infertile mouse testis. *Biol Reprod.* 68: 167-173, 2003.

7) Kanatsu-Shinohara, M., Ogonuki, N., Inoue, K., Ogura, A., Toyokuni, S. and Shinohara, T. Restoration of fertility in infertile mice by transplantation of cryopreserved male germline stem cells. *Hum Reprod.* 18: 2660-2667, 2003.

8) Miki, H., Lee, J., Inoue, K., Ogonuki, N., Noguchi, Y., Mochida, K., Kohda, T.,

Nagashima, H., Ishino, F. and Ogura, A. Microinsemination with first-wave round spermatids from immature male mice. *J Reprod Dev.* 50: 131-137, 2004.

9) Ogonuki, N., Mochida, K., Inoue, K., Matsuda, J., Yamamoto, Y., Takano, K. and Ogura, A. Fertilization of Oocytes and Birth of Normal Pups Following Intracytoplasmic Injection with Spermatids in *Mastomys (Praomys coucha)*. *Biol Reprod.* 68: 1821-1827, 2003.

10) Ogonuki, N., Tsuchiya, H., Hirose, Y., Okada, H., Ogura, A. and Sankai, T. Pregnancy by the tubal transfer of embryos developed after injection of round spermatids into oocyte cytoplasm of the cynomolgus monkey (*Macaca fascicularis*). *Hum Reprod.* 18: 1273-1280, 2003.

11) Ogura, A., Ogonuki, N., Inoue, K. and Mochida, K. New microinsemination techniques for laboratory animals. *Theriogenology* 59: 87-94, 2003.

## 2. 学会発表

Ogura, A. Phenotypic effects of somatic cell cloning in the mouse. The Third Meeting on Pathology of Genetically Modified Mice. October 2-4, 2003, Kumamoto, Japan.

## 医科学研究用リソースとしてのカニクイザルの基盤高度化に関する研究

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  
研究協力者 下沢律浩、岡田浩典、広瀬良宏（筑波医学実験用霊長類センター）

研究要旨：医学研究用サルのリソース整備を目的とした発生工学的基盤技術を確立することを担当した。本年度の研究は、1) アフリカミドリザルの顕微授精に関する検討、2) アフリカミドリザルのES細胞樹立の試み、そして3) グリセリン溶媒を用いたFSHによる卵胞発育誘起の試みという3つの課題に取り組んだ。アフリカミドリザルはカニクイザルとは異なる属であり、今回の成果は属間比較を行ううえで重要である。アフリカミドリザルの発生工学的研究はほとんどなされていなかったが、本研究により顕微授精（ICSI）にはじめて成功し、その受精卵由来のES様細胞が確認できた。また、新規の卵胞発育を試み良質な卵が採取できる可能性が示唆された。属間での反応性あるいは個体差を越える方法は確立できなかったが、今後の研究につながる成果が得られた。

### A. 研究目的

オナガザル属であるアフリカミドリザルは、ウィルス感染の検定や分離、外来遺伝子の導入などに広く利用されているVERO細胞株、Cos7細胞株の起源である動物種である。アフリカミドリザルはリソースとして有用なサル種であり、発生工学的技術を確認することの意義は大きい。また、そこで得られる成果はリソースとしてのカニクイザルを整備するうえでの比較対照として貢献するところは大い。すなわちアフリカミドリザルでの開発研究そのものが医学研究として重要であるとともにカニクイザルを含むサル類全体のリソースとしての価値を見いだすことにつながる。さらに野生希少サル類の維持増殖への応用にも期待ができる。しかし、マカカ属のカニクイザルやアカゲザルなどに比べ発生工学的研究はほとんどなされていない。そこで今回は、アフリカミドリザルの顕微授精による受精卵の作成を試み、その受精卵の発育培養について検討した。さらに、得られた胚盤胞からES細胞樹立を試みた。また、サル類の発生工学的研究を遂行するにあたり、良質な卵を少しでも多く採取することは極めて重要である。今回、ホルモン製剤の溶媒にグリセリン溶液

を用いる新規な方法で卵胞発育誘起を試みた。

### B. 研究方法

#### 1) アフリカミドリザルの顕微授精に関する検討

当霊長類センターで維持している成熟したアフリカミドリザルのメス4頭およびオス1頭を実験に用いた。メスの月経初日にGnRH agonistを投与して2-3週間後からeCGあるいはFSHを複数回投与した。さらに、それらの最終投与翌日にhCGの投与を行って卵胞発育を誘起した。その約38時間後に麻酔下で開腹手術により卵胞から卵を吸引採取した。また、直腸電気刺激法により採取した精液をパーコール洗浄し精子を回収した。精子あるいは尾部を切断した精子頭部のみをピエゾパルスにより卵細胞質中に穿刺し注入することで顕微授精を行った。注入した卵は前核形成の有無および第二極体の放出を確認して卵活性化あるいは受精の判定を行い、継続して培養した。一部の卵の培養にはバッファローラットリバー（BRL）細胞をフィーダーとして用いた。

#### 2) アフリカミドリザルのES細胞樹立の試み 実験にはアフリカミドリザルの顕微授精に

より得られた受精卵を用いた。顕微授精卵の培養12日目に拡張期に発生した胚盤胞3個を供試した。拡張胚盤胞は27G注射針を用いて内部細胞塊部分を単離するようにして透明帯および栄養外胚葉を除いた。フィーダー細胞にはマイトマイシンCで処理したSTO細胞を用いた。また、培養液にはグルタミン、 $\beta$ メルカプトエタノール、LIF、非必須アミノ酸ならびに抗生物質を含むDMEMを用いた。この培地に20%のFBSあるいはKSRを添加したもので、それぞれ2個と1個の卵からES細胞株の樹立を試みた。細胞の継代は、酵素処理後、ピペッティングで細胞を分離し、新たに準備したフィーダー細胞上に移すことで行った。

3) グリセリン溶媒を用いたFSHによる卵胞発育誘起の試み

アフリカミドリザルおよびカニクイザルのメスを実験に用いた。朝の個体観察で月経出血が認められた日を月経初日として、その日の夕方にGnRH agonist (リュープリン、武田薬品) 3.75mgを皮下投与した。その2-3週間後に卵胞刺激ホルモンであるFSH(フェルティノーム、Serono)の投与を開始した。FSHは徐放性に作用させることを目的として50%グリセリン溶液に溶解し、一頭一回あたり75IUを連日9回の皮下投与を行った。FSHの最終投与から約36時間後にhCG(ゴナトロピン、帝国臓器)を静脈内に投与した。その36-40時間後に麻酔下で開腹手術により卵巣を露出させ卵胞から卵を吸引採取した。採取した卵はヒアルロニダーゼ処理により卵丘細胞を除去し、10%FBS加CMRL-1066培地に移して卵の状態を観察した。得られた成熟卵は射出精子による顕微授精を試み、その受精能および発生成能について検索した。精子は直腸電気刺激法により採取しパーコール洗浄を行ったものを用いた。受精の判定は前核形成および第2極体の放出の状況で判断し、受精卵は上記の培地にて体外培養を行い発生状況を観察した。

倫理面への配慮：動物に対しては動物福祉上の配慮を十分に行い、研究内容およびその

方法については国立感染症研究所の動物実験委員会の審査を経ている。

### C. 研究結果

1) アフリカミドリザルの顕微授精に関する検討

4頭のメスから回収した75個の卵子のうち、極体を有する成熟卵が35個(47%)、卵核胞崩壊期の卵が10個(13%)、卵核胞期のものが8個(11%)および変性卵が29個(39%)であった。作出した受精卵を培養したところ3個が拡張胚盤胞に発生した。

2) アフリカミドリザルのES細胞樹立の試み

単離した全ての内部細胞塊は培養の翌日には3つ全ての細胞でフィーダー細胞に付着していた。培養3日目には20%FBS添加培地で培養した1個で伸張しているコロニーが出現した。そのコロニーを培養7日目に継代したところ、カニクイザルやヒトなど霊長類のES細胞に類似した形態を呈した扁平なコロニーが確認できた。しかし、その後の継代でES様細胞は消失してしまった。

3) グリセリン溶媒を用いたFSHによる卵胞発育誘起の試み

アフリカミドリザルおよびカニクイザルにおける一頭あたりの平均回収卵数はそれぞれ約20個と50個であった。また、アフリカミドリザルにおいて第1極体の放出を認めた成熟卵、卵核胞崩壊期卵、そして卵核胞期卵はそれぞれ約30、10、および20%であった。一方、カニクイザルでは、それぞれのステージの卵は約40、25および30%であった。アフリカミドリザル、カニクイザルともに顕微授精によっておよそ半数で雌雄の前核形成と第2極体の放出を認め、さらにその後の発生成能についても確認された。

### D. 考察

アフリカミドリザル由来であるVERO細胞株、Cos7細胞株などは広く用いられており、医学研究に欠かせない細胞となっている。このようなアフリカミドリザルは多くのサル種のな

かでも有用なリソースと成りうると考えられる。しかし、アフリカミドリザルの発生工学的研究はほとんどなされていない。筆者は以前にアフリカミドリザルの体外受精に成功し、その発生能もカニクイザルやアカゲザルのそれに劣らない成績を得ている。その後、追隨する研究は決して多くない。そこで今回は精子を卵細胞質に注入する顕微授精 (ICSI) を試みた。このような研究は、リソースとしてのカニクイザルを整備するための戦略を考えるうえで、重要な成果を提供していると考えている。アフリカミドリザルの精子の注入あるいは精子頭部のみを注入した卵の受精成績に差は見られなかった。このことから精子頭部が卵活性化能を有することが示された。この結果はカニクイザルやマウスなどの実験動物で知られていることであったが、新しいサル種で再確認できたことになる。今回のアフリカミドリザルにおける顕微授精による受精卵の作出および体外培養の成功ははじめての報告である。この成績はカニクイザルの場合よりも良好であった。その要因については詳細に解析する必要があるが、今後、カニクイザルを中心としたサル類で本分野の研究を遂行するにあたり意義ある成果を得たと考えている。このような顕微授精を含む発生工学的手法は医学研究のみならず広い分野への応用が期待される。

今回、アフリカミドリザルのES細胞の樹立を試み、扁平な形態を示すES様細胞を確認できたことは、ES細胞の樹立が可能であることを示唆するものである。サル類ES細胞は、マカカ属を中心としたサル類から樹立されており、再生治療等への応用を目的とした研究に利用されている。アフリカミドリザル由来のES細胞株は、新たな付加価値を持つ貴重なリソースとなり得るものであり、今後の継続研究によりアフリカミドリザルのES細胞は広い分野の研究に応用されるものと考えている。

また、今回、新規の方法で卵胞発育誘起を試みた。カニクイザルとアフリカミドリザルにおいて、成熟卵子の得られる割合は同程度

であったが、数を確保する面ではアフリカミドリザルよりもカニクイザルで効果的であることが確認された。また個体差が生じたものの、アフリカミドリザルとカニクイザルのように属が異なるサル間において効果的な卵胞発育誘起法が異なることが示唆された。個体差、それぞれのサル種に適した方法をさらに検討する必要があると思われる。

#### E. 結論

アフリカミドリザルにおいて初めて顕微授精により受精卵の作出に成功した。その受精卵は胚盤胞にまで発育し、その胚盤胞由来の細胞の継代培養によりES様細胞が確認できた。また、グリセリンを溶媒にしたFSHによる卵胞発育誘起により比較的良好な卵の回収成績を得た。

#### F. 健康危険情報

特になし。なお、実験者は国立感染症研究所のバイオセーフティ講習会を受講している。

#### G. 研究発表

##### 1. 論文発表

- 1) Ogonuki, N., Tsuchiya, H., Hirose, Y., Okada, H., Ogura, A. and Sankai, T. Pregnancy by the tubal transfer of embryos developed after injection of round spermatids into oocyte cytoplasm of the cynomolgus monkey (*Macaca fascicularis*). *Hum. Reprod.* 18, 1273-1280, 2003
- 2) Okada, H., Hirose, Y., Ito, M. and Sankai, T. Aspiration method to collect epithelial cells from mouse, rat, and monkey oviducts. *Comp. Top. Lab. Anim. Sci.* 42, 46-51, 2003
- 3) Tsuchida, J., Kawasaki, K., Sankai, T., Kubo, N., Terao, K., Koyama, T., Makino, J. and Yoshikawa, Y. Newtype of puzzle-task finger maze learning in *Macaca fascicularis*. *Int. J. Primatol.* 24, 261-270, 2003
- 4) Okada, A., Sudo, T., Igarashi, H.,

Kuroda, M., Yoshikawa, Y., Hidaka, H. and Sankai, T. Distribution of the Ca<sup>2+</sup> binding proteins calyculin (S100A6) and annexin XI in guinea pig seminiferous cells and epididymal. (to be submitted)

5) Okada, H., Hirose, Y., Periyasamy, M., Ito, M. and Sankai, T. Zona-froast method for separating mouse eggs from other cells. (to be submitted)

6) Okada, H., Hirose, Y., Periyasamy, M., Ito, M. and Sankai, T. Characterization of an immortalized oviduct cell established from the cynomolgus monkey (*Macaca fascicularis*). (to be submitted)

7) Okada, H., Ito, M., Hirose, Y., Yoshida, T. and Sankai, T. Buffalo rat liver cells produce proteins that support the preimplantation development of mouse embryos cultured in vitro. (to be submitted)

8) Miyamoto, S., Chen, Y., Nakamura, S., Sankai, T., Machida, T. and Yoshida, T. Synthesis and release of steroids in intestines revealed by detection of androstenedione, testosterone, 5 $\alpha$ -dihydrotestosterone, and an unidentified substance in intestinal tissues and contents from cynomolgus monkeys (*Macaca fascicularis*). (to be submitted)

## 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とその展望. 発生工学用マニピュレーション技術研究会 (岡崎) 2003年4月

2) 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. マウスおよびウサギの体細胞核移植由来胚からのES様細胞の樹立. シンポジウム: フィールドトピックスII「ES細胞の樹立と利用」. 第50回日本実験動物学会 (大宮) 2003年5月

3) 岡田浩典、広瀬良宏、宇田晶彦、伊藤雅夫、

山海 直. 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. シンポジウム: フィールドトピックスIX「サル類の繁殖と発生工学」. 第50回日本実験動物学会 (大宮) 2003年5月

4) 岡田浩典、広瀬良宏、伊藤雅夫、山海 直. Percollを用いた多数のマウス受精卵の収集法. 第44回日本哺乳動物卵子学会 (東京) 2003年5月

5) 広瀬良宏、岡田浩典、山海 直. 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樹立とその有用性. 第44回日本哺乳動物卵子学会 (東京) 2003年5月

6) 山海 直. サル類における発生工学の展開. シンポジウム: 発生工学の進歩と生殖医療の今後. 第44回哺乳動物卵子学会 (東京) 2003年5月

7) 川崎勝義、神谷 誠、山海 直、小山高正、寺尾恵治、吉川泰弘、黒田洋一郎. 画像差分を応用したオープンフィールド行動の自動解析法. 第9回画像センシングシンポジウム (横浜) 2003年6月

8) 越後貫成美、井上貴美子、三木洋美、広瀬良宏、岡田浩典、竹入修二、山海 直、小倉淳郎. ウサギ精子および精子細胞の卵子活性化能についての再検討. 第96回日本繁殖生物学会 (帯広) 2003年9月

9) 山海 直. メスザルの生殖生理: ワークショップII「生殖器」. 8th International Workshop of Primate Diseases (つくば) 2003年12月

10) Tsuchida J., Kawasaki K., Sankai T., Kubo N., Terao K., Koyama T., Makino J. and Yoshikawa Y. Finger maze learning in long-tailed macaques. 8th International Workshop of Primate Diseases (つくば) 2003年12月

## 霊長類細胞不死化技術開発と網羅的霊長類細胞株ライブラリーの構築

分担研究者 明里宏文(国立感染症研究所・波医学実験用霊長類センター)主任研究官  
研究協力者 李永仲、宇田晶彦(筑波医学実験用霊長類センター)

研究要旨： Herpesvirus saimiri を用いたカニクイザルを始めとする霊長類細胞の不死化技術  
を確立した。不死化された細胞株は活性化 T 細胞であり、特殊な培養法を用いる必要なく長期  
間継代が可能であることから医科学研究用リソースとして有用であると考えられた。

### A. 研究目的

医科学研究用の霊長類リソース整備の一環として、  
霊長類機能細胞の不死化技術を開発し、これを基  
に多様なカニクイザル個体遺伝情報を保持し得る不  
死化細胞株を樹立する。さらにその遺伝学的・免疫  
学的特性を明らかにすることによりカニクイザル研究  
基盤の高度化を目指す。さらに、本技術を応用して  
種々の霊長類を網羅する培養細胞株ライブラリーを  
構築することにより、医科学研究の推進に供す  
る。

### B. 研究方法:

カニクイザルをはじめとする広範な霊長類培養細胞  
株を樹立することが最終目標であることを念頭に置  
き、比較的入手可能である血液細胞に着目し不死  
化を試みることにした。不死化の方法としては、ガン  
マヘルペスウイルスの一種であり多様な霊長類の末  
梢血リンパ球細胞に感染してその T 細胞を不死化  
することが知られている Herpesvirus saimiri (HVS) を  
用いた。カニクイザルでは、すでに MHC class-I ハ  
プロタイプが明らかとなった個体より細胞株を樹立す  
る。樹立後は各細胞株について Mafa-A ハプロタイ  
プの確認を PCR 法により行なうとともに、細胞表面マ  
ーカー検査による免疫学特性解析、各感染ウイルス  
のゲノム検出を行なった。なおサルからの血液採取  
に際しては、ケタミン麻酔下で必要最低量を単回採  
血しており動物倫理上問題ないと考えられる。

### C. 研究結果

1) カニクイザルでは、mitogen (PHA-P) で活性化し  
た PBL に HVS 感染することにより、RPMI-1640,  
FCS10%添加培地にて培養開始後約1ヶ月ほどで不  
死化細胞株が得られることを確認した。細胞株は培  
養1年後も安定した増殖を示した。また肉眼的には  
活性化リンパ芽球様の形態を示していた (Fig. 1)。  
2) PCR 解析の結果、不死化カニクイザル細胞株  
HSC-3028 および HSC-F は HVS 由来 oncogene の  
一種である *stpC* の存在が確認されたことから HVS  
による不死化であることが示された (Fig.2)。  
3) 次に不死化カニクイザル細胞株の免疫学的特性  
について調べる目的で FACS 解析を行なった。その  
結果、細胞株はいずれも CD3 陽性 Tリンパ球である  
こと、CD25, CD69, MHC-II DR といった活性化マー  
カーおよび CD2, CD28, CD80, CD40L といった共  
刺激分子を強く発現していた (Fig.3)。また MHC  
class-I ハプロタイプを解析したところ、1-4種類の  
異なる MafaA を発現していることが示された  
(Fig.4)。  
4) 本法を用いて試験的に他の霊長類細胞の不死化  
についても試みた。その結果現在までに得られた不  
死化細胞株はカニクイザル由来7株、アカゲザル由  
来3株、タマリン由来4株、チンパンジー由来2株とな  
っている。今後、他のサル種についても京都大学霊  
長類研究所との共同研究により同様に細胞株を作  
成していく予定である。

#### D. 考察

今年度の研究成果より、HVSによる霊長類細胞の不死化技術は確立されたと言える。本技術により遺伝的特性が明らかなカニクイザル個体・家系由来細胞株を樹立可能となることで研究用リソースとしての付加価値がより高まると期待される。

今日、遺伝子治療や臓器移植等トランスレーショナル・リサーチ及び新興再興感染症の治療薬・ワクチン開発研究等において、サル類による動物実験は重要な役割を果たしている。この際動物実験を最小限とするためには、研究目的に応じたサル種の最適化が必要である(例: AIDS研究 → アカゲザル, マラリア研究 → ヨザル, C型肝炎 → チンパンジー)。しかしながら、最適化の検討に本来必要となるサル培養細胞株ライブラリーは現在のところ国内外を問わず作成されていない(Vero, Cosなど、ごく一部のサル種の細胞株が散見されるのが実情)。今後、カニクイザルのみならず多様な霊長類に由来する細胞株を樹立していくことができれば、サル類を用いた動物モデル研究・開発を行なう際に研究用途に応じたサル種の最適化をin vitroレベルで行なうことが可能となる。このことは、動物実験を極力避けるべきとする国際的目標とも合致する。来年度以降は、網羅的霊長類細胞株ライブラリーの構築へ向けてさらに新たなサル種の細胞株樹立を推進していく予定である。

#### E. 結論

今年度の研究成果より、HVSによる霊長類細胞の不死化技術は確立された。本技術を生かして今後は遺伝情報の明らかなカニクイザルを始めとする多様な霊長類細胞株の樹立を推進し、医科学研究用リソースの充実化を計る。

#### F. 健康危険情報

特になし

#### G. 研究発表

##### 1. 論文発表

(1) Kao S, Akari H, Khan MA, Dettenhofer M, Yu X-F, Strebel K: Human immunodeficiency virus type 1 Vif is efficiently packaged into virions during

productive but not chronic infection. *Journal of Virology* 77, 1131-1140, 2003.

(2) Sugimoto C, Tadakuma K, Otani I, Moritoyo T, Akari H, Ono F, Yoshikawa Y, Sata T, Izumo S, Mori K: *Nef* gene is required for robust productive infection of simian immunodeficiency virus in T-cell-rich paracortex in lymph nodes. *Journal of Virology* 77, 4169-4180, 2003.

(3) Fujita M, Yoshida A, Sakurai A, Tatsuki J, Ueno F, Akari H, Adachi A: Susceptibility of HVS-immortalized lymphocytic HSC-F cells to various strains and mutants of HIV/SIV. *International Journal of Molecular Medicine* 11, 641-644, 2003.

(4) Bour SP, Akari H, Miyagi E, Strebel K: Naturally-occurring amino acid substitutions in the HIV-2 ROD envelope glycoprotein regulate its ability to augment viral particle release. *Virology* 309, 85-98, 2003.

(5) Lee WW, Nam KH, Terao K, Akari H, Yoshikawa Y: Age-related increase of peripheral CD4<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup> double positive (DP) T lymphocytes in cynomolgus monkeys: Longitudinal study in relation to thymic involution. *Immunology* 109, 217-225, 2003.

(6) Ueno F, Shiota H, Miyaura M, Yoshida A, Sakurai A, Tatsuki J, Koyama AH, Akari H, Adachi A, Fujita M: *Vpx* and *Vpr* proteins of human immunodeficiency virus type 2 up-regulate the viral infectivity by a distinct mechanism in lymphocytic cells. *Microbes and Infection* 5, 387-395, 2003.

(7) Nguyen KL, Llano M, Akari M, Miyagi M, Poeschla EM, Strebel K, Bour S: Codon optimization of the HIV-1 *vpu* and *vif* genes stabilizes their messenger RNA and allows for highly efficient Rev-independent expression. *Virology*, in press, 2004.

(8) Akari H, Fujita M, Kao S, Khan MA, Shehu-Xhilaga M, Adachi A, Strebel K: High level expression of Human immunodeficiency virus type 1 Vif inhibits viral infectivity by modulating proteolytic processing of Gag precursor at the

p2/NC processing site. *Journal of Biological Chemistry*, in press, 2004.

## 2. 学会発表

(1) Fujita M, Sakurai A, Yoshida A, Akari H, Adachi A: Proteasome-degradation of HIV-1 Vif: mutational analysis. Cold Spring Harbor meeting on Retroviruses, May 2003.

(2) 李永仲、吉川泰弘、明里宏文: HIV-1 Vif 蛋白の機能ドメイン解析。第51回日本ウイルス学会学術集会、2003年10月。

(3) 藤田美歌子、桜井明子、吉田亜希子、小山西、明里宏文、足立昭夫: HIV-1 Vif 蛋白はプロテアソーム分解に高感受性である。第51回日本ウイルス学会学術集会、2003年10月。

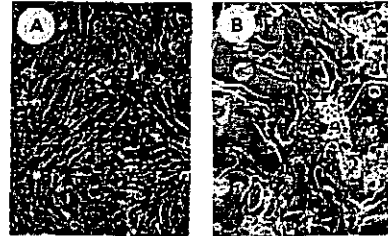
(4) 原正幸、佐多徹太郎、棚林清、明里宏文、山田章雄、向井隼三郎: 新型 SRV/D の分離・同定とウイルス検出法の確立。第51回日本ウイルス学会学術集会、2003年10月。

H. 知的財産権の出願・登録状況  
特になし



Fig. 1 Methods for immortalization of primate Cell Lines

Owl monkey kidney (OMK) 細胞にHVS-C488 株を感染させ、培養上清をウイルス液として回収する (A; uninfected OMK, B; HVS-infected OMK)。



PBMC を Ficol 法により分離後、PHA-P 処理、2日後 HVS を感染させ FCS 10% 添加 RPMI-1640 培地 (IL-2 free) にて培養する。

培養1カ月程度で不死化した細胞株が得られる。通常、細胞株は培養1年後も安定した増殖を示す。

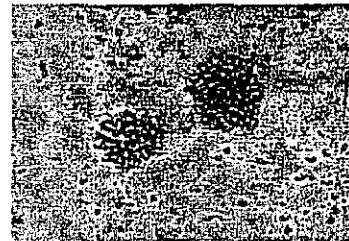


Fig. 2 Detection of HVS-derived oncogene *stpC* in the immortalized primate cell lines by PCR

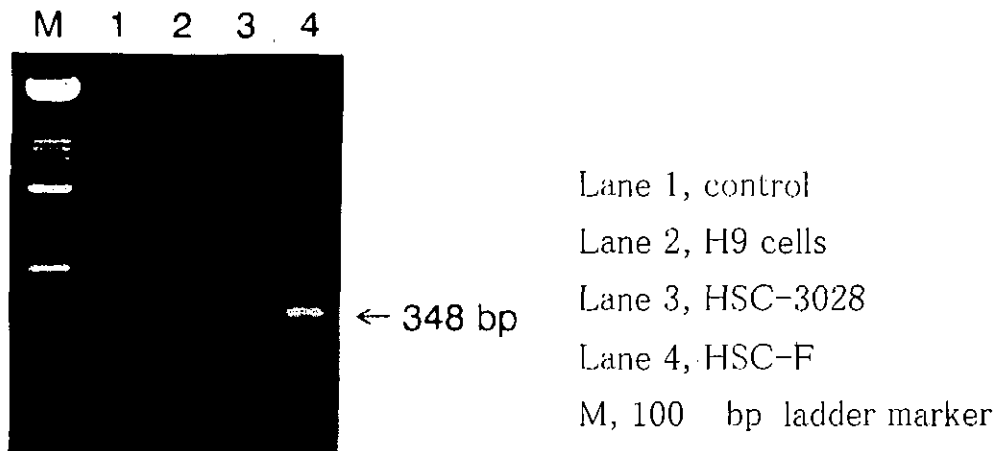


Fig. 3 Phenotypic characterization of HVS-immortalized primate cell lines

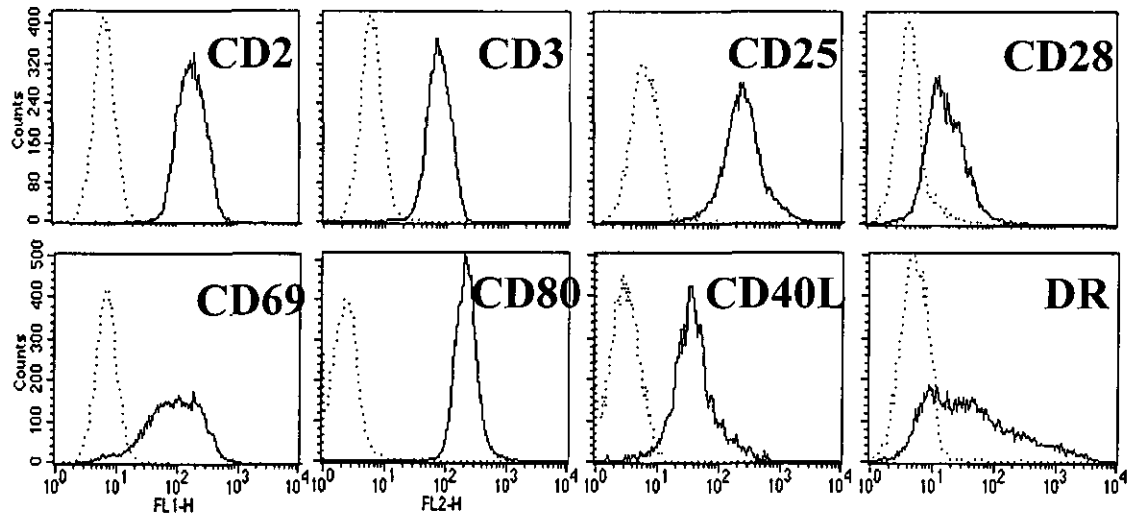
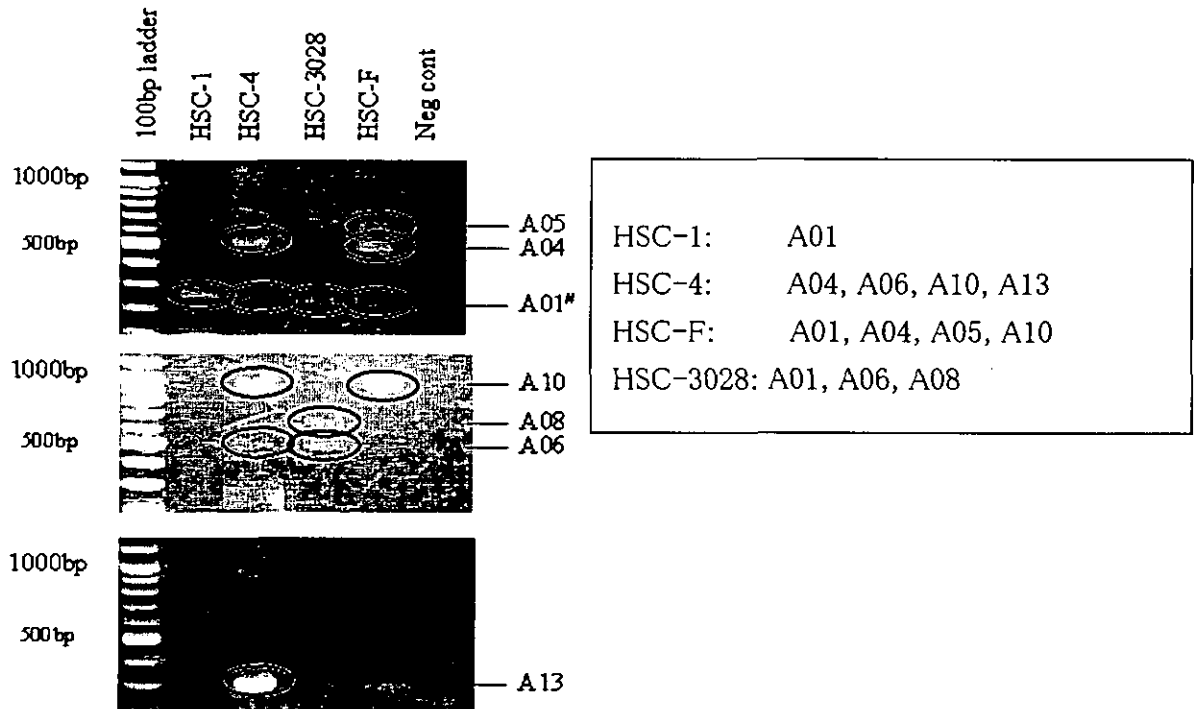


Fig. 4 Typing of MHC-I "Mafa -A" in cynomolgus monkey T cell lines



## 生理学的特性解析、基盤技術開発研究

分担研究者 吉田高志（国立感染症研究所・波医学実験用霊長類センター） 室長

研究要旨： カニクイザルでの肥満の程度を評価するために2波長X線密度測定装置による全身の軟部組織に占める脂肪の割合（%脂肪）の測定法を確立した。そして%脂肪と体重との関係を解析し体重を指標とする肥満動物の簡便な検出法を考案した。この方法を用いて霊長類センターの繁殖コロニーのメス・カニクイザルで肥満の発生状況を調査した。

### A. 研究目的

医科学研究用リソースとしてのカニクイザルの繁殖コロニーをとらえてみると、肥満は、繁殖効率を低下させるのみならず、そのような個体を実験に用いた場合に、実験データにある種のゆがみを生じさせる原因ともなる。

ヒトの場合、肥満度の判定はローレル指数（体重を身長<sup>3</sup>で割り、それに10の7乗を掛ける）等の体格指数を求めておこなうことが多い。しかし、背骨が円弧状に湾曲し、かつ、膝関節が完全に伸びないカニクイザルでは、身長を正確に測定することが困難でありそのような指数を採用することは出来ない。そこで我々は、ヒトの場合でも骨粗鬆症の診断等に用いられている2波長X線密度測定装置（DXA）を小児用全身測定モードでカニクイザルの全身の測定に適用し、カニクイザルの全身骨量・筋肉量および脂肪量の測定に成功した。そして、全身の軟部組織量に占める脂肪の割合（%脂肪 =  $100 \times (\text{脂肪量}) / (\text{脂肪量} + \text{筋肉量})$ ）を指標としてカニクイザルの肥満度を評価することが出来ることを明らかにした。

血液・血清生化学値ならびに代謝関連ホルモン等を測定し、%脂肪との関係を、多変量解析法の一つである正準判別分析法の

適用によって解析したところ、%脂肪の値が増加するとともに、赤血球数やヘマトクリット値の増加し、ヒトの肥満にも共通するいわゆる多血症化の傾向が認められた。他方、中性脂肪やコレステロールについては%脂肪との相関が認められず、カニクイザルの肥満は必ずしも高脂血症化を伴わないものであることも認められた。カニクイザルの肥満を検出するための有効な血清中の指標が求められる。現在肥満の指標として、脂肪細胞より分泌されるレプチンやアディポネクチンのサルでの測定等について検討中である。

とはいえ、血液・血清生化学値を指標として検討したところ、メス・カニクイザルの場合、%脂肪が35以下を正常、45以上を肥満そして35～45が境界型と評価された。しかしながら、DXAによる全身の測定は作業的にも煩雑であり、時間も必要とし、もっと簡便な指標が必要とされる。そこで、%脂肪と体重との間関係を解析したところ、メス・カニクイザルの体重の4Kgを正常の上限、4.5Kg以上を肥満、その間を境界型と見なすことが妥当であると判断された。この方法はヒトの場合にも使用されている標準体重法に相当するものであろう。メス・カニクイザルの場合、ヒトの座高に相当する前胴長の個体差が少

ないために身長による補正は必要ないようである。

#### B. 研究方法

霊長類センターの繁殖コロニーでの肥満の発生状況を調査した。調査頭数は繁殖コロニーで飼育されており調査時点で妊娠・保育をしていなかった外観上では正常なメス648頭である。年齢は5歳齢から33歳齢にわたり、平均体重は3.85Kgであった。

#### C. 研究結果

体重を指標にした場合、全体では64.5%の個体が正常、12.3%が境界型そして23.2%が肥満であると判断された。しかし、年齢ごとに5~10歳齢、11~15歳齢、16~20歳齢に群分けすると肥満個体の占める割合はそれぞれ8.3%、31.9%、47.6%と年齢が増加するとともに急激に増加した。しかし、境界型の占める割合は、それぞれの群で、10.4%、15.1%、14.6%とそれほどの差は認められなかった。

#### D. 考察

メス・カニクイザルは、加齢とともに肥満個体が増加し、このことが原因となって糖尿病等の生活習慣病の引き金となっているのであろう。このような肥満個体の発生を防止するための対策として、ケージの大型化(45x60x60cmから50x85x80cmへ、ケージ床面積として約1.

5倍))をおこなうことによって運動量の増加を計るとともに、これまでのミカン・リンゴならびにサル用固形飼料の給餌によって1日当たり約360Kcalを与えていたものを、ミカンの給餌を止めることによって約12%のカロリー制限をおこない、サルの健康状態を観察しつつ経過を調査中である。

#### E. 結論

霊長類センターの繁殖コロニーでメス・カニクイザルでの肥満の発現状況を調査し、加齢に伴う発現率の増加を明らかにした。今後は動物の運動量の増加ならびに給餌カロリー量の減少による肥満の発生抑制の長期的取り組みをおこなうことにした。

#### G. 研究発表

Chen, Y., Ono, F., Yoshida, T. and Yoshikawa, Y. 2002. Relationship between body weight and hematological and serum biochemical parameters in female cynomologus monkeys (*Macaca fascicularis*). *Exp. Anim.* 51:125-131.

Chen, Y., Ogawa, H., Narita, H., Ohtoh, K., Yoshida, T. and Yoshikawa, Y. 2003. Ratio of leptin to adiponectin as an obesity index of cynomologus monkeys (*Macaca fascicularis*). *Exp. Anim.* 52:137-143.