

200400050A

厚生労働科学研究費補助金
ヒトゲノム・再生医療等研究事業

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

平成16年度 総括・分担研究報告書

主任研究者 寺尾 恵 治
国立感染症研究所・筑波医学実験用霊長類センター

平成17年(2005)3月

目 次

I. 総括研究報告書	
医科学研究用リソースとしてのカキザルの基盤高度化に関する研究	1
感染研・筑波霊長類センター	寺尾恵治
II. 分担研究報告書	
1. ウイルス学的モニタリングシステム開発、SPFコロニーの確立に関する研究	5
感染研・筑波霊長類センター	向井鎌三郎
2. 人工保育を利用したSPFカキザルの作出と カキザル繁殖コロニーのSRV/D感染状況調査	15
(社)予防衛生協会	藤本浩二
3. 高齢メスカキザルでの骨組織形態と骨強度との関係に関する研究	19
感染研・筑波霊長類センター	吉田高志
4. 霊長類の細胞株リソース整備	21
感染研・筑波霊長類センター	明里宏文
5. 発生工学的技術のリソース研究への応用を目指したマウスを用いた研究	25
(独)理化学研究所	小倉淳郎
6. 発生工学的技術のリソース研究への応用	29
感染研・筑波霊長類センター	山海 直
7. カキザル脳組織における軸索輸送関連蛋白の加齢性変化	33
東京大学農学生命科学	吉川泰弘
III. 研究成果の刊行に関する一覧表	37
IV. 研究成果の刊行物・別刷	41

I . 総括研究報告書

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

主任研究者 寺尾恵治（感染研・筑波医学実験用霊長類センター）センター長

研究概要：医科学研究用のサル類の基盤的、戦略的リソースを個体レベルから遺伝子レベルまで総合的に整備、維持、供給するシステムの構築を目的として効率的な研究を行い以下の成果を得た。

I) 基盤的リソース整備(汎用性、多目的、高品質)

1) 個体レベルのリソース整備では、100頭規模の SPF (Specific Pathogen Free) パイロットコロニーを確立した。排除対象ウイルスであるサルレトロウイルス (SRV/D) 抗体用ザルの約 40% で血液あるいは唾液からウイルス遺伝子が検出されることから体液による当該ウイルスの感染拡大が推測された。また、人工保育ザルが主体の SPF パイロットコロニーでは 58 頭中 37 頭 (64%) が SRV/D、EBV、SFV、CMV に未感染であったことから、人工保育されたサルにより当該 4 ウイルス陰性の SPF コロニーが確立できることが明らかとなった。

2) 細胞レベルでのリソース整備では、マウスをモデルとしてサル類に応用可能な顕微授精技術と核移植技術の確立を継続した。細胞レベルでの遺伝子保存を目的として、HSV を用いてカニクイザル、アカゲザル、チンパンジー、タマリン由来の T 細胞株を樹立し、広範な霊長類不死化細胞ライブラリーの整備を継続した。

3) 遺伝子レベルでのリソース整備では、血縁の明らかな核 DNA の保存を継続するとともに、カニクイザルの BAC ライブラリーを整備した。また、遺伝疾患解析用ツールとして多型性を示すマイクロサテライトを 50 セット確立した。

II) 戦略的リソース整備(疾患モデル)

自然発生疾患モデルとして循環器疾患、脳神経疾患、骨粗鬆症をとりあげ、磁気共鳴画像 (MRI) 検査、超音波検査、X 線検査を中心としてサル類の画像データベース構築を進めている。

分担研究者名：

向井 隼三郎 (筑波霊長類センター・室長)
藤本 浩二 ((社) 予防衛生協会・部長)
吉田 高志 (筑波霊長類センター・室長)
明里 宏文 (筑波霊長類センター・主任研究官)

小倉 淳郎 ((独) 理化学研究所・室長)
山海 直 (筑波霊長類センター・主任研究官)
吉川 泰弘 (東京大学農学部・教授)

A. 研究目的

21 世紀の重要な厚生労働科学研究として、脳・神経科学、長寿科学、感染症制圧、遺伝子治療、再生医療、ゲノム創薬などが注目されているが、これらの先端技術の開発研究および有用性・安全性評価では優れた動物モデルの開発が不可欠である。なかでも、サル類は解剖、生理、代謝、免疫などのシステムがヒトと類似していることから、最も有用なモデル動物とみなされている。一方、分子生物学の進展により複雑な生体反応を細胞レベル、タンパクレベル、

遺伝子レベルで解析することが可能になりつつある。特にポストゲノムプロジェクトとされる研究領域では、これら分子レベルの情報を基にした新しいアプローチが必要であるが、サル類では分子レベルでの解析基盤技術並びにリソースの整備が遅れている。本研究では、21 世紀の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を目的として、個体レベル、細胞レベル、遺伝子レベルでの汎用性の高いリソースの整備と質的向上をめざす。

本研究で整備対象とするサルリソースは、多

目的、汎用性、高品質をキーワードとする基盤的リソースと、目的志向型の戦略的リソースに大別される。前者のうちこれまでの研究で開発・保存技術が確立されたものについては、リソースのバンク事業（品質管理、保存、供給）が中心となり、準 SPF ザル、不死化細胞、核 DNA についてはその体制がほぼ確立できた。後者については、高度 SPF ザル、遺伝子改変ザル、自然発症疾患モデル、実験誘発モデルの開発に関わる基盤技術などが含まれ、今後はこれら新規リソースの開発研究を集中的に推進する。

B. 研究方法

1) 個体レベルのリソース整備：

主として SRV/D 抗体陰性の人工保育された仔ザルを中心として確立した SPF パイロットコロニーの個体について、HBV、SVV、SIV、STLV、SRV、EBV、CMV の 7 種のウイルスに対する抗体を調査した。また繁殖育成群について HBV、SVV、SIV、STLV を標的とした微生物学的モニタリングを継続した。SRV/D の感染経路を特定するため、SRV/D 抗体陽性ザルの血液、唾液、尿、糞からの SRV/D ウイルス遺伝子の検出を試みた。

2) 細胞レベルのリソース整備：

HSV を用いた末梢 T 細胞の不死化技術を用いて、異なったサル種の T 細胞株の樹立を継続し細胞株ライブラリーの充実を図った。配偶子レベルのリソース整備を目的として、発生工学的技術を用いて精子、未受精卵、受精卵等の生殖機能細胞の保存を試みた。また遺伝子改変ザルの作成を視野に入れて、配偶子の体外操作技術の安定化をすすめた。

3) 遺伝子レベルのリソース整備：

昨年に引き続き繁殖育成コロニーを構成するすべての個体について核 DNA の保存を継続した。昨年確立した BAC ライブラリーのスクリーニングキットを作成した。ヒトゲノム情報を基に、180 種のマイクロサテライトマーカー検出用プライマーを設計し、カニクイザルで増幅、多型性、遺伝性が確認されるマーカーの整備を行った。

4) 戦略的リソースおよび基盤技術開発：

昨年度導入した機能的 MRI (fMRI) を用いて非観血的、非侵襲的解析法を確立する。Aging Farm で維持している老齢ザル全頭について MRI 画像診断を実施するとともに、高次脳機能（記憶、認知、行動）調査を終了している老齢個体、パーキンソン病発症モデル個体について、

MRI 解析で得られた脳の構造との関連を解析した。また、代謝疾患ザルの検出を目的として、臨床検査および骨量測定などを定期的実施し、生理学的標準値を設定するとともに疾患モデルザルの効率的スクリーニングシステムの整備を開始した。

本研究では動物への処置を含む実験が含まれることから、動物福祉または動物実験倫理の問題に対する十分な配慮が必要である。この点に関しては

1) 各研究者が所属する研究機関に設置されている「動物倫理委員会」でのプロトコルの承認を前提とした。2) 個体レベルでの実験プロトコルの作成にあたっては、法律第 105 号「動物の愛護及び管理に関する法律」、日本霊長類学会「サル類を用いる実験遂行のための基本原則」を遵守するとともに、国立感染症研究所「動物実験委員会」でのプロトコル承認を前提とした。

C. D. 研究結果および考察

1) 個体レベルのリソース整備：

昨年度開発した超高感度 RT-nested PCR と SRV/D 分離培養を併用し SRV/D の感染源を調査した結果、抗体陽性ザルの 40% で唾液および血液から SRV 遺伝子が検出された。このことから、SRV/D の排除には汚染源による水平感染を防止する管理法が重要であると判断した（向井）。

繁殖育成コロニーのサルで HBV、SVV、SIV、STLV に対する定期的モニタリングを実施し、抗体陰性の環境が維持されていることを確認した。人工保育サルで SRV/D、EBV、SFV、CMV の感染率を調査した結果、58 頭中 37 頭（64%）が当該 4 ウイルス全てに未感染であることが判明し、人工保育ザルを用いて高度 SPF コロニーの拡大が可能と判断した（藤本）。

2) 細胞レベルでのリソース整備：

2-1) サルへの応用を視野に入れて、マウスを用いて始原生殖細胞を用いた体細胞クローン個体の作出に成功した。この技術はサル類の始原生殖細胞の開発および霊長類のゲノム・インプリンティングを解析する上でモデルとなる成果である。マウスで確立された技術をサルに応用して、体外受精、顕微授精等による受精卵の作出技術を検討した。アフリカミドリザルで顕微授精による受精卵の作出に成功した（小倉、山海）。

2-2) 昨年 5 種の霊長類で HSV による不死化細胞株を樹立したが、引き続きアフリカミドリ

ザル、マントヒヒ、アジルテナガザル、ボンネットザル、タイワンザル、ブタオザル、ケナカクモザル、コモンリスザル、コモンマーモセット、ヨザル等についても樹立を試みている。また新世界ザルの CD 抗原の検出法を検討し、サブセット解析により樹立細胞株の表現型を整理した（明里）。

3) 遺伝子レベルでのリソース整備：

繁殖コロニーを構成する家系の明らかな 100 頭の核 DNA を新たに保存した。カニクイザルの全ゲノムをカバーする BAC ライブラリーを作成し、BAC クローンのスクリーニングキットを作成した。疾患遺伝子の解析に必須のマイクロサテライトの整備に着手し、ヒト染色体上の位置が既知でかつカニクイザルで多型、遺伝性を示す 50 セットのマイクロサテライトを整備した。人のゲノム情報を基に設計したマイクロサテライトプライマーの約 1/3 がカニクイザルに適用可能であった。これにより、カニクイザルの遺伝子レベルでのリソースは、核 DNA ライブラリー、脳および生殖器由来の完全長 cDNA ライブラリー、BAC ライブラリー、マイクロサテライトの主要ツールが整備された（寺尾）。

4) 疾患モデル・基盤技術の開発：

自然発症疾患モデルに関しては、昨年度確立した 2 波長 X 線密度測定装置による定量的な肥満評価法を利用して肥満のモニタリングをおこなった。調査した 648 頭のメスカニクイザル中 150 頭 (23%) が肥満と判断され、飼育環境を改善する必要性が示唆されたとともに、肥満個体を生活習慣病モデルとして利用するための解析をおこなっている（吉田）。

実験誘発モデルについてはアルツハイマー病 (AD)、痴呆症モデルの開発を視野に入れた病理学的解析をおこない、アミロイド前駆体タンパク (APP)、Presenilin-1、 $A\beta$ が加齢に伴い神経終末 (シナプス領域) に蓄積することを明らかにした。神経終末における AD 関連タンパクの蓄積は、神経細胞におけるタンパク代謝機能の低下または神経細胞内軸索輸送機能の低下を示唆しており、軸索輸送機能を標的としたモデル開発戦略を検討している（吉川）。

カニクイザル脳の非観血的、非侵襲的イメージング技術として、fMRI を用いた画像解析システムの整備を開始した（吉川）。

E. 結論

医科学研究用のサル類の基盤的、戦略的リソ

ースを個体レベルから遺伝子レベルまで総合的に整備、維持、供給するシステムの構築を目的として研究を行い以下の成果を得た。

I) 基盤的リソース整備：

100 頭規模の SPF パイロットコロニーを確立するとともに、SRV/D の主たる感染経路が唾液および血液であることを明らかにした。

マウスをモデルとしてサル類に応用可能な顕微授精技術と核移植技術の確立を継続した。細胞レベルでの遺伝子保存を目的として、HSV を用いて広範な霊長類不死化細胞ライブラリーの整備を継続した。

カニクイザルの遺伝子レベルでのリソースとして、核 DNA ライブラリー、脳および生殖器由来の完全長 cDNA ライブラリー、BAC ライブラリー、マイクロサテライトの整備を完了した。

II) 戦略的リソース整備 (疾患モデル)

自然発症疾患モデルとして循環器疾患、脳神経疾患、骨粗鬆症をとりあげ、磁気共鳴画像 (MRI) 検査、超音波検査、X 線検査を中心としてサル類の画像データベース構築を進めた。

F. 健康危険情報

なし。

G. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Nagashima T, Ueda Y, Hanazono Y, Kume A, Shibata H, Ageyama N, Terao K, Ozawa K, Hasegawa M. In vivo expansion of gene-modified hematopoietic cells by a novel selective amplifier gene utilizing the erythropoietin receptor as a molecular switch. *J Gene Med.* 2004 Jan;6(1):22-31.
- 2) Uda A, Tanabayashi K, Mukai R, Terao K, Yamada A. Detection of CD3epsilon polymorphism in cynomolgus monkeys by a method based on RFLP. *J Med Primatol.* 2004 Feb;33(1):34-7.
- 3) Mimuro J, Mizukami H, Ono F, Madoiwa S, Terao K, Yoshioka A, Ozawa K, Sakata Y. Specific detection of human coagulation factor IX in cynomolgus macaques. *J Thromb Haemost.* 2004 Feb;2(2):275-80.
- 4) Asano T, Hanazono Y, Sasaki K, Ueda Y, Hasegawa M, Ageyama N, Terao K, Kitano Y, Momoeda M, Ozawa K, Harii K. Allogeneic transplantation of genetically modified primate embryonic stem cells. *Wound*

Repair Regen. 2004 Jan-Feb;12(1):A16.

5) Hayashi H, Kimura N, Yamaguchi H, Hasegawa K, Yokoseki T, Shibata M, Yamamoto N, Michikawa M, Yoshikawa Y, Terao K, Matsuzaki K, Lemere CA, Selkoe DJ, Naiki H, Yanagisawa K. A seed for Alzheimer amyloid in the brain. J Neurosci. 2004 May 19;24(20):4894-902.

6) Uda A, Tanabayashi K, Yamada YK, Akari H, Lee YJ, Mukai R, Terao K, Yamada A, Detection of 14 alleles derived from the MHC class I A locus in cynomolgus monkeys. Immunogenetics. 2004 Jun;56(3):155-63. Epub 2004 May 26.

7) Ueda K, Hanazono Y, Shibata H, Ageyama N, Ueda Y, Ogata S, Tabata T, Nagashima T, Takatoku M, Kume A, Ikehara S, Taniwaki M, Terao K, Hasegawa M, Ozawa K. High-level in vivo gene marking after gene-modified autologous hematopoietic stem cell transplantation without marrow conditioning in nonhuman primates. Mol Ther. 2004 Sep;10(3):469-77.

8) 寺尾恵治、小山高正、鈴木樹里、実験用霊長類の心理的ストレスを評価する免疫学的指標と飼育環境のエンリッチメント評価。実験動物技術、2004、39：97-104。

9) Umeda S, Ayyagari R, Allikmets R, Suzuki MT, Karoukis AJ, Ambasudhan R, Zernant J, Okamoto H, Ono F, Terao K, Mizota A, Yoshikawa Y, Tanaka Y, Iwata T. Early-Onset Macular Degeneration with Drusen in a Cynomolgus Monkey (*Macaca fascicularis*) Pedigree: Exclusion of 13 Candidate Genes and Loci. Invest Ophthalmol Vis Sci. 2005 Feb;46(2):683-91.

10) Yoshioka Y, Ageyama N, Shibata H, Yasu T, Misawa Y, Takeuchi K, Matsui K, Yamamoto K, Terao K, Shimada K, Ikeda U, Ozawa K, Hanazono Y. Repair of Infarcted Myocardium Mediated by Transplanted Bone Marrow-Derived CD34+ Stem Cells in A Nonhuman Primate Model.. Stem Cells 2005 23:355-364.

11) Asano T, Sasaki K, Kitano Y, Terao K, Hanazono Y. In vivo tumor formation from primate ES cells. In Embryonic Stem cells II: Methods and Protocols (edited by Turksen

K). Humana, Totowa, NJ, USA -in press-

12) Ueda K, Hanazono Y, Ageyama N, Shibata H, Ogata S, Ueda Y, Tabata T, Ikehara S, Taniwaki M, Hasegawa M, Terao K, Ozawa K. Method - Intra-bone marrow transplantation of hematopoietic stem cells in non-human primates: long-term engraftment without conditioning. Gene Therapy and Regulation, -in press-

13) Uda A, Tanabayashi K, Fujita O, Hotta A, Terao K, Yamada A. Identification of the MHC class I B locus in cynomolgus monkeys. Immunogenetics. 2005 Mar 3; -in press-

2. 学会発表

なし

H. 知的財産権の出願・登録状況

なし

II. 分担研究報告書

ウイルス学的モニタリングシステム開発、SPF コロニーの確立に関する研究

分担研究者 向井隼三郎（感染研・筑波医学実験用霊長類センター）室長
研究協力者 原 正幸、菊池 俊彦（感染研・筑波医学実験用霊長類センター）
小野 文子、成田 豊子、高野淳一郎（社団法人予防衛生協会）
佐多徹太郎（国立感染症研究所 感染病理部）部長

研究要旨：医科学研究用リソースとしてのカニクイザルを用いた研究基盤の高度化をはかるためには、微生物学的観点からみて、研究結果を攪乱する可能性のあるウイルスを除外しなければならない。筑波霊長類センターでは、ヒトに危険性のあるBウイルスとサル類に危険なサル水痘様ウイルス（SVV）をカニクイザルコロニーより排除してきた。本研究では、抗体陰性で且つ不顕性感染し、研究結果を攪乱し、希に致死的という厄介な、D型サルレトロウイルス（SRV/D）感染の実体と種々の体液・排泄物中へのSRV/Dの排出状況を明らかにし、サルコロニーの飼育管理システムへの有用な情報を提供することを第1の目的とした。最近、当センターで繁殖・育成されたカニクイザルを用いた実験で、通常は見られない、節外性リンパ組織やリンパ球の集簇・過形成がワクチンを接種したカニクイザルの全身の臓器に認められる例を認めたので、SRV/DとサルEBウイルスの関与を合わせて考慮しその原因を解析することを第2の目的とした。その結果、SRV/D感染症が発症するとすべての体液・排泄物中にウイルスが排出され、他のサルに感染が拡大する可能性があることが明らかになった。また、SRV/D感染症による免疫不全状態でサルEBウイルス感染リンパ球が活性化し、組織病変を来す可能性があることを示唆した。

A. 研究目的

サル類はヒトと同じ霊長類に属することから、医生物学領域の研究や安全性試験のための実験用動物として重要であり、マカク属サルはAIDS研究や種々のワクチン開発、移植実験等の研究として数多く用いられている。しかし、マカク属サルには simian immunodeficiency virus（SIV）と同様に免疫不全を引き起こす simian retrovirus type D（SRV/D）が自然感染していることが知られている。

従って、このSRV/Dに感染しているサルをAIDS研究やワクチンなどの免疫学関連研究や免疫抑制剤を用いる遺伝子治療モデル実

験に使用することは実験結果に影響を及ぼす可能性があり、SRV/Dに感染していないサルを用いることが望まれる。実際、6か月に亘る薬物安全性試験の途中で、SRV/Dの感染症による重度の貧血が見られたため、実験を再度繰り返したという報告がある（N.W.Lerche and K.G.Osborn *Tox. Path.* 31, 103-110 2003）。

また、SRV/Dの感染の特徴として、抗体産生を伴わない無症候キャリアになることがあるため、感度の高いゲノム検出法によるSRV/D感染サルの確認が必要となる。本年度は、我々が開発した超高感度SRV/Dゲノム検出法と培養法により、唾液以外に体液・排

排泄物中の感染性 SRV/D の有無を検討することを第一の目的とした。また、当センター産のカニクイザルを用いた実験で、通常は見られない、節外性リンパ組織やリンパ球の集簇・過形成が、ワクチン接種実験を行ったサルの全身の臓器に認められる例を数例経験したのでこれらの組織病変とウイルス感染との相関を検討することにした。

B. 研究方法

1. SRV/D の分離：

末梢血単核球 (PBMC) と Raji 細胞とを混合培養し、顕微鏡下で CPE を確認した。常法に従い、抗原スライドを作成し、標準抗 SRV/D 抗体を用いて間接蛍光抗体法を行った。また、感染細胞のゲノム DNA を調製し、PCR による感染の有無の確認も併用した (1, 2)。

抗体検査は SRV/D-2 もしくは、SRV/D-T 株を用いたウエスタンブロット法 (WB) を使い、gag, pol, env などのウイルス特異的バンドが 2 以上検出された場合を抗体陽性とし、1 本の場合は、不確定 (indeterminant) とした。

2. 免疫組織化学：

すべてのサル組織は 4% パラフォルムアルデヒド・PBS にて固定後、常法に従ってパラフィン包埋して保存した。使用にあたっては、キシレンで脱パラフィン化し、1 mM EDTA (pH 8.0) 121 °C 10 分、glycine-HCl buffer (pH 2.2) 25°C 90 分、処理後 0.3% H₂O₂ /methanol 30 min、5% 正常ヤギ血清処理を 20 分行ってから、SRV/D および、EBV に対する単クローン抗体との反応を行った。用いた抗体は、それぞれ、SRV/D-1 env transmembrane 領域 (gp20) に対する抗体と、抗 EBNA2 抗体 (clone: PE2) である。2 次抗体は biotin 化ヤギ抗マウス IgG 抗体を用い、検出系は、SA-HRP、DAB を用いた。また、電子顕微鏡は、2.5% グルタルアルデヒド固定後、洗浄液 (0.1M カコジル酸ナトリウム緩衝液、0.1M 蔗糖) で洗浄し、Epon812 に包

埋し、クエン酸鉛・酢酸ウラニウム染色して、電子顕微鏡撮影を行った。

3. ゲノム DNA 及びウイルス RNA の調製

SRV/D 感染 Raji 細胞にプロテイナーゼ K 溶液 (10 mM Tris.Cl pH 8.5, 150 mM EDTA, 0.4% SDS, 10 mg/ml proteinase K) を等量加え、65 °C で 15 分間保温後、37°C で一晩インキュベートした。

次に、フェノール抽出、エタノール沈殿を行い、TE (10 mM Tris, 1 mM EDTA) 0.4 ml に溶解した。その後 20 mg/ml RNase を 40 μl 加え、37 °C で 30 分間保温後、フェノール抽出法により調製した。また、100 頭以上の SPF 個体を対象として定期的にモニタリングを行うためには作業の簡便化をはかる必要がある。

そのために、NucleoSpin Blood

(MACHEREY-NAGEL, Duren, Germany) を採用し、サル全血から 2 時間でゲノム DNA を抽出し PCR を行った。

(倫理面への配慮)

本研究のうち、サルに関わる実験に関しては、国立感染症研究所動物実験委員会による審査の結果承認を受けた。また、サルの抗体検査に用いた血清は、筑波霊長類センターサルコロニーにおいて定期健康診断のために麻酔下で採血されたものを被験検体として用いた。また、動物の取り扱いにあたっては、筑波医学実験用霊長類センター諸内規、作業方式に従って繁殖育成サルを用い、動物に与える苦痛の軽減と排除に努めた。

C. 研究結果

1. 筑波霊長類センターカニクイザルコロニーの SRV/D のサブタイプ

昨年度、SRV/D 筑波株 (SRV/D-T) の全 gag 遺伝子配列に基づき開発した SRV/D-T 特異的検出 PCR 系を用い、当センターのカニクイザルより分離された 11 株の SRV/D を調査したところ、SRV/D-1, -2, -3 株は検出されず、そのすべてが SRV/D-T であった (表 1)。ま

た、その後分離された 18 株についても SRV/D-T であったことから、当センターのカニクイザルコロニーにおいては、本ウイルス株のみが感染していることが確実となった。ここで検査を行った通常のコロニーのサルは退役した繁殖用親ザルであり、その感染率は 22.5 % (11/ 49) であった (1, 2)。

2. 臨床症状と SRV/D 感染

当センターサル室の改築工事のため、サルが別の棟に移動され、通常の間飼育から 2 段飼育をされていた。飼育担当者より、下痢がみられる個体の報告があったので、採血と体重測定を依頼した。SRV/D に対する抗体の有無、末梢血単核球 (PBMC) からの培養によるウイルス分離を行い、これら臨床症状とウイルス学的所見をまとめたのが表 2 である。

BW Loss: 体重が 1 年間で 15 % 以上減少した個体。Diarrhea: 下痢が 5 日間以上持続している個体。Diarr & BW: 双方の合併症を示す個体としてその動物数を示した。

当センターで下痢が 5 日以上継続する個体のうち 95.2% (20/21) は SRV/D 感染サルであった。また、抗 SRV/D 抗体陽性であっても、宿主の免疫によりウイルス血症が抑えられていると、症状を示す個体の割合は低い (21.9 %)。しかしながら、抗体の有無に関わらず、ウイルス血症を示すグループでは有症率が高く、特に、抗 SRV/D 抗体陰性で免疫不全状態の感染グループでは、有症率は 72.8 % で著しく高い。

3. 体液・排泄物中への SRV/D の排出

昨年度は、SRV/D 感染症に特徴的な貧血と下痢を示したサルより血漿と唾液を採取し、RT-nested PCR 法と培養によりウイルスの検出に成功した。本年度は、表 3 に示した臨床症状を持つカニクイザル 5 頭について、血漿、唾液、尿、糞便を採取し、宿主細胞との混合培養による SRV/D の分離培養と RT-nested PCR 法によるウイルスゲノムの検出を試みた。その結果、採取可能であった 5 頭すべての体液・排泄物中にウイルスゲノムを検出した。

また、感染性のある SRV/D も、3 頭の尿、2 頭の糞を含め、すべての体液・排泄物から検出された。

4. 組織病変と免疫反応に異常がみられたサル

筑波霊長類センターで繁殖・育成されたカニクイザルを用いた実験で、通常は見られない、節外性リンパ組織やリンパ球の集簇・過形成が、弱毒化生ワクチンを接種したカニクイザルの脳、下垂体、甲状腺、胸腺、顎下腺、肺、肝臓、腎臓、子宮頸管等の全身の臓器や腺組織の間葉系結合組織に認められる例や抗体産生低応答例を経験した。図 1 には、その例として、生ワクチン接種後 3 日目の唾液腺 (上) 及び腎臓 (下) の 2 次濾胞の組織像を示す。免疫組織化学的解析により、腎臓の節外性リンパ組織は、T および B リンパ球よりなることが明らかである。表 4 には、今回解析したサルの組織病変の有無、及び抗体産生異常を示した個体について、カテゴリー毎に示した。

表 4

群	組織病変	抗体産生	動物数
A	有り	低/無	n=2
B	有り	有り	n=2
C	なし	低/無	n=3
D	なし	有り	n=2

5. 免疫系に影響を与える可能性のあるウイルスの選択

下記の理由で、免疫不全、貧血、下痢等を示す SRV/D に加えて、サル EB ウイルスの感染の有無を表 4 の A 群 2 頭、B 群 2 頭、C 群 3 頭、D 群 2 頭のカニクイザルについて検討した。

サル EB ウイルス: カニクイザルの EB ウイルス産生 B 細胞株 (Ts-B6) は、当センターで 1988 年に偶然に分離された。筑波霊長類センターカニクイザルの疫学調査では、生後 4~7 ヶ月齢で 26%、1~3 歳 52.5%、4~9 歳 69%、10 歳以上の 100% が抗体陽性である。ヒトに於いては、ほとんどが小児期から青年期にか

けて EB ウイルスが感染する。伝染性単核球症以外は、感冒症状を伴うか無症候性の感染を受け、例外なく B リンパ球に潜伏するが、通常はリンパ腫を形成しない。

しかし、エイズや臓器移植後などの免疫不全状態では、B リンパ球増殖症や、節外性リンフォーマを形成することがある。当センターにおいても、エイズ発症アカゲザルにおいて、咽頭部にサル EB ウイルスによる節外性リンフォーマを持つ症例を得た経験がある。サル EB ウイルス感染の検出系の検討:サルの血清診断については、カニクイザル由来 EBV 産生細胞株 Ts-B6 より作成した EBV 抗原 (VCA) を用いた蛍光抗体法を適用した。

免疫組織化学的検出については、サル Ts-B6 細胞株を検体として市販の抗ヒト EBV 検出用抗体および RNA 用プローブの反応性を検討した結果、抗 LMP-1 と抗 ZEBRA 単クローン抗体に反応性はみられず、抗 EBNA2 抗体 (clone: PE2) のみに反応性がみられた (図 2)。EB ウイルス潜伏感染のいずれの状態 (Latency I, II, III) でも普遍的に発現している small RNA である EBER 用 プローブ (DAKO Y5203, ヒト用) は Ts-B6 株には反応しなかった。

6. 組織病変とウイルス感染

表 5 に示したように、組織病変のみられた A 群の 2 頭と B 群の 2 頭のサルは、SRV/D とサル EB ウイルスに対する抗体が陽性であった。また、免疫組織化学的解析では、A 群と B 群すべてサルの唾液腺の腺組織に SRV/D 抗原 (gp20) が認められたので、既感染 SRV/D が再活性化して、免疫異常になり、EBV の潜伏したリンパ球が活性化して組織病変を形成したものと推測される。一方、EBNA2 抗原は節外性リンパ組織、リンパ球の集簇部位、腺組織のいずれにも見られなかった。

組織病変のみられなかった C 群と D 群のサルについては、抗体も陰性であり、免疫組織化学的解析でも SRV/D が認められなかった。免疫異常のみられなかった D 群の 2 頭につ

いては、いずれも抗 SRV/D 抗体陽性であったが、組織免疫化学的解析では陰性であったので、SRV/D 感染に関して潜伏感染 (不顕性感染) 状態にあると考えられる。図 3 には A 群の 1 頭のサルにおける組織免疫化学的解析結果と唾液腺、腺導管部位に排出された SRV/D 粒子の電子顕微鏡写真を示す。

7. 抗体産生低応答とウイルス感染

接種ワクチン株に対する抗体産生能が低レベルであった群は、A 群と C 群であるが、両群に共通のウイルス感染パターンは認められなかった。しかしながら、A 群では、表 5 に明らかなように、潜伏感染していた SRV/D が再活性化していることが免疫組織化学的解析により明らかである。従って、A 群に関する限り、SRV/D の再活性化に伴い抗体産生能が低下していた可能性が考えられる。データは示さないが、SRV/D の再活性化に伴い、抗 SRV/D 抗体価の低下したカニクイザル 3 例を経験している。一方、C 群に関しては、SRV/D の感染・再活性化はなく、サル EB ウイルス感染も認められないので、MHC を含めた遺伝的バックグラウンドによる可能性が考えられる。

D. 考 察

1. 筑波霊長類センターカニクイザルコロニーの SRV/D のサブタイプ

当センターのカニクイザルは、フィリピン、マレーシア、インドネシア産のサルが輸入され、繁殖コロニーが作成された。インドネシアの現地での検査の結果 SRV/D-2 が検出されたという報告がある。

しかしながら、表 1 に示したように、当センターのカニクイザルより分離された 11 株の SRV/D はそのすべてが SRV/D-T であった。当センターのサル飼育環境下で SRV/D-T の伝播性が他の SRV/D サブタイプよりも強力である可能性もあるが、現時点でその理由は不明である。

2. 臨床症状と SRV/D 感染

当センターで下痢が 5 日以上継続する個体のうち 95.2% (20/21) は SRV/D 感染サルであったことから、コロニーから感染個体を排除するためには、観察のみでもおよそその感染個体の推測が可能であることが明らかになった。また、抗体の有無に関わらず、SRV/D のウイルス血症を示す感染グループでは有症率が高く、特に、抗 SRV/D 抗体陰性で免疫不全状態のグループでは、有症率は 72.8% で著しく高い。

3. 体液・排泄物中への SRV/D の排出

下痢などの臨床症状を持つカニクイザルについて、血漿、唾液、尿、糞便を採取し、SRV/D の分離培養と RT-nested PCR 法によるウイルスゲノムの検出を試みたところ、採取可能であった 5 頭すべての体液・排泄物中にウイルスゲノムを検出した。また、感染性のある SRV/D も、3 頭の尿、2 頭の糞を含め、すべての体液・排泄物から回収可能であった。さらに、サル 027 は母サル 161 の胎内で感染したと考えられるが、生後の発育も正常範囲内であるし、SRV/D 感染症に特徴的な貧血と下痢もみられていない。しかし、この個体においては、調査したすべての体液中にウイルスが検出され、このようなサルが、当センターカニクイザルコロニーにおける感染源になっていることが推測される。

4. 組織病変と免疫反応に異常がみられたサル

組織病変のみられた A 群の 2 頭と B 群の 2 頭のサルは、SRV/D とサル EB ウイルスに対する抗体が陽性であり、免疫組織化学的解析により、A 群と B 群すべてサルの唾液腺の腺組織に SRV/D 抗原 (gp20) が認められた。従って、既感染 SRV/D が再活性化して、免疫異常になり、EBV の潜伏したリンパ球が活性化して組織病変を形成したものと推測される。しかし、EB ウイルスは節外性リンパ組織、リンパ球の集簇部位、腺組織のいずれにも見られなかった。今後、検出法の開発が必要であ

る。

E. 結論

1. 実験モデル動物として、SHIV, SIV の感染実験や免疫学的実験に SRV/D や EB ウイルス感染サルを用いることは望ましくないと考えられる。特に SRV/D の感染の診断には、抗体検査のみではなく、我々の開発した PCR 診断も複数回行って、SRV/D 感染のない動物を選ぶべきである。

2. SRV/D-T 感染症の主症状は、下痢であることが明らかになった (20/21)。SRV/D 感染症が発症するとすべての体液・排泄物中にウイルスが排出され、他のサルに感染が拡大することが明らかになった。

3. EBV が潜伏感染したサルに、SRV/D 感染症が合併すると、リンパ系組織病変がみられる可能性が示唆された。

G. 研究発表

1. 論文発表

1) Hara, M., Sata, T., Kikuchi, T., Nakajima N., Uda A., Fujimoto, K., Baba, T., Mukai. R.: Isolation and characterization of a new simian retrovirus type D subtype from monkeys at TPC Japan. *Microbes and Infection*, in Press.

2) Hara, M., Kikuchi, T., Ono, F., Takano, J., Ageyama, N., Fujimoto, K., Terao, K., Baba, T., Mukai. R.: Survey of Captive Cynomolgus Macaque Colonies for SRV/D Infection by PCR, *Comparative Medicine*, in Press.

2. 学会発表

1) 徳永恵一、中山大介、清永康平、三隅将吾、高宗暢暁、向井隼三郎、橘 園臣、梅田衛、柴田英昭、庄司省三: HIV-1 coreceptor に元づいたキメラ環状抗原免疫カニクイザル抗血清による種々 clade 由来の R5X4 HIV-1 への多様な感染阻害

第 18 回日本エイズ学会 (静岡) 2004 年 12 月

- 2) 中山大介、徳永恵一、清永康平、三隅将吾、高宗暢暁、向井隼三郎、橘 罔臣、梅田衛、柴田英昭、庄司省三：CCR5-CXCR4キメラ環状抗原により得られた種々の単クローン抗体のCross-clade HIV-1 感染防御。第52回日本ウイルス学会（横浜）2004年11月
- 3) 原正幸、小野文子、菊池俊彦、高野淳一郎、成田豊子、藤本浩二、馬場忠、寺尾恵治、向井隼三郎：霊長類センターのカニクイザルコロニーにおける SRV/D の疫学調査、第51回日本実験動物学会（長崎）2004年5月

表 1

Epidemiological investigation of SRV/D infection using PCR in SPF colony and conventional colony at TPC.

	Positive		Negative	Total
	SRV/D-T	SRV/D-1, -2, -3		
SPF	0	0	60	60
Conventional	11	0	38	49

The blood DNAs from 60 and 49 cynomolgus monkeys in SPF and conventional breeding colonies, respectively, were prepared as described in Materials & Methods. The Tga1 - Tga2 and Tga3 - Tga4 primer sets were used to detect SRV/D-T sequences, WH1 - WH3 and RC12 - RC13 primer sets were used for SRV/D-1 and SRV/D-3, and WH1 - WH3 and RC14 - RC15 primer sets used for SRV/D-2 (6).

表 2

Epidemics of Diarrhea in Monkeys in several animal rooms

WB*	Isolation**	Diarrhea (%)	BW Loss (%)	Diarr & BW (%)	Asymptomatic (%)	total
-	-	1 (5.9)	0 (0.0)	0 (0.0)	16 (94.1)	17
+	-	8 (12.5)	5 (7.8)	1 (1.6)	50 (78.1)	64
+	+	3 (20.0)	1 (6.7)	2 (13.3)	9 (60.0)	15
-	+	2 (18.2)	2 (18.2)	4 (36.4)	3 (27.2)	11
±	+	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	3 (100.0)	3
±	-	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	4 (100.0)	4
total		14	8	7	85	n = 114

* : Serum Ab to SRV/D-T by WB

** : SRV/D-T from PBMC

表 3

Virus isolation and detection from the plasma, saliva, urine, and stool of Cynomolgus Monkeys naturally infected with SRV/D-T .

Animal No.	Virus Isoln. from PBMC	Clinical signs
003	+	anemia, diarrhea
027	+	apparently healthy
048	+	diarrhea
087	+	leucopenia, diarrhea
161	+	anemia, leukemia

No	virus isolation				RT-PCR			
	plasma	saliva	urine	stool	plasma	saliva	urine	stool
003	+	+	-	-	+	+	+	+
027	+	+	+	-	+	+	+	+
048	+	+	-	+	+	+	+	+
087	+	+	+	+	+	+	+	+
161	+	+	+		+	+	+	

表 5

Summary of Serology and Imm-Histo Chem on SRV/D & EBV

Group	Lesion	Imm Response	Number
A	有	低/無	2
B	有	有	2
C	無	低/無	3
D	無	有	2

Group	SRV/D (gp20)		EBV (EBNA2)	
	W.B	Histo.Chem.	IFA(VCAg)	Histo.Chem.
A	Indeterminant	+	+	-
A	+	+	+	-
B	+	+	+	-
B	+	+	+	-
C	-	-	-	-
C	-	-	-	-
C	-	-	-	-
D	+	-	-	-
D	+	-	-	-

図1 カニクイザル唾液腺及び腎臓にみられた2次濾胞

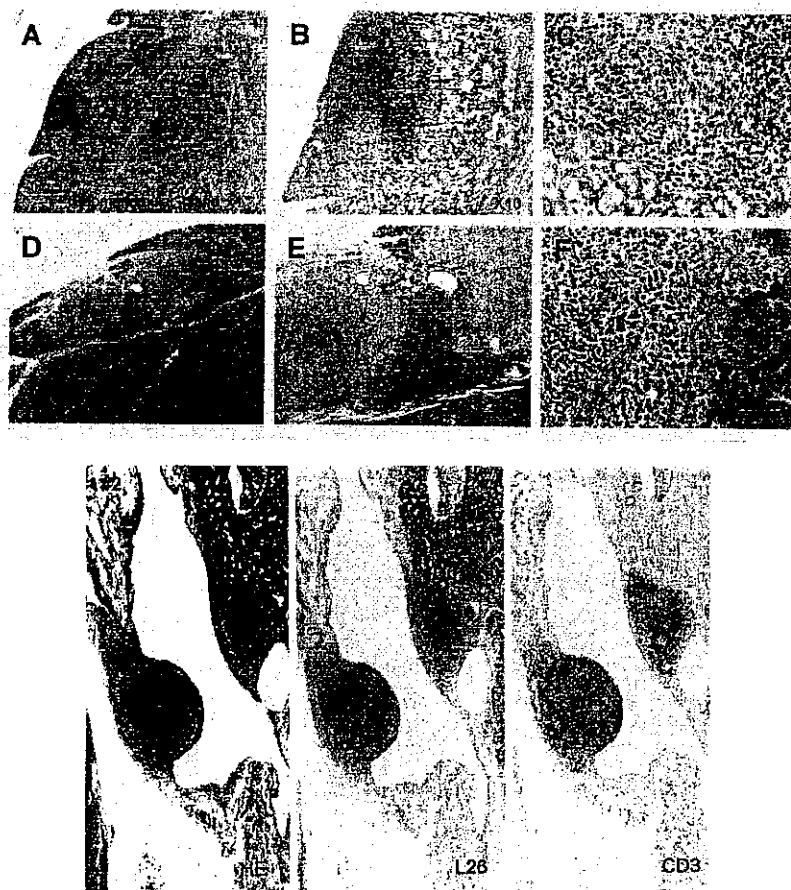
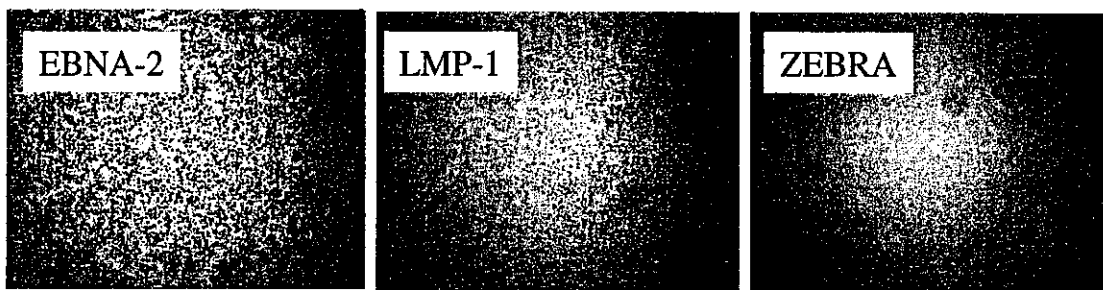


図2 カニクイザルEBウイルス検出用プローブ

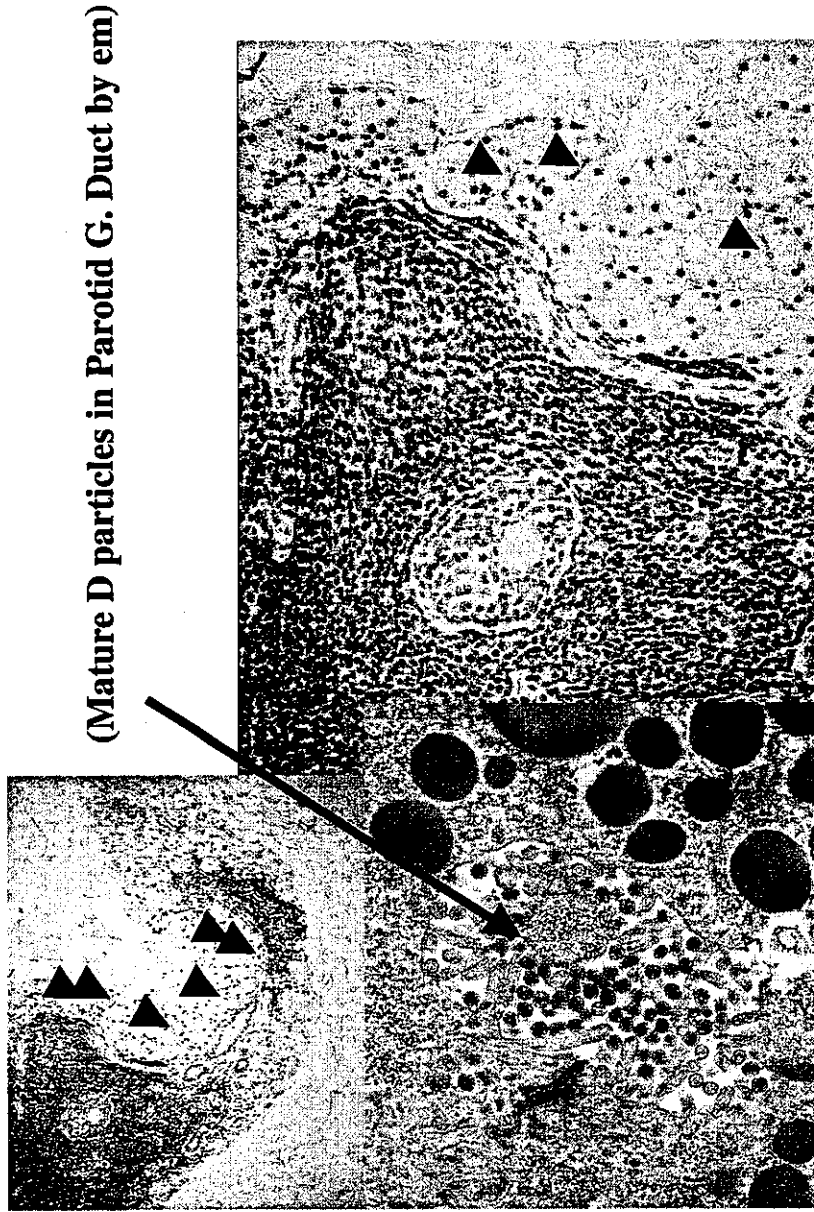
Antibody probes for Imm-histo-Chemistry of EBV detection



Cell line (Ts-B6): Simian EVB producing cells from Cynomolgus monkey

- ZEBRA : Immediate Early
- BZLF-1 : Early
- EBNA-1 : Latency I (w/EBER 1,2)
- LMP-1,2 : Latency II (LMP-1, -2A, -2B)膜蛋白
- EBNA-1,2,3: Latency III (w/3LMPS, EBER 1,2)

☒ 3 Imm-Histo Chem (anti-SRV/D gp20)



(Parotid G; No9071)

人工哺育を利用した SPF カニクイザルの作出と カニクイザル繁殖コロニーの SRV/D 感染状況調査

分担研究者 藤本浩二（社団法人予防衛生協会 研究資源開発）部長
協力研究者 成田豊子（社団法人予防衛生協会試験検査）室長
羽成光二（社団法人予防衛生協会繁殖育成）室長
高野淳一郎（社団法人予防衛生協会繁殖育成室）研究員

研究要旨：①カニクイザル新生仔について人工哺育を実施して、サルD型レトロウイルス(SRV/D)、サルフォーミーウイルス(SFV)、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)について未感染ザルを分離した。人工哺育を行った58頭について、離乳時にSRV/D、SFV、EBV、CMVに対する抗体及びPCR検査を実施した結果、37頭(64%)が4種のウイルス全てに対し未感染であることが確認され、SPF群として隔離飼育とした。

② 10ヶ月齢から24歳齢の筑波霊長類センター(TPC)一般繁殖群のカニクイザルについて、SRV/Dに対する抗体ならびに、唾液中、血液中のウイルス検出を行った。SRV/D抗体陽性率は離乳時30%であったが、2歳齢以降は75%以上に上昇した。一方、唾液中、血液中のウイルス検出率は10ヶ月齢～24歳齢では25%～40%の範囲であった。本調査の結果、TPCカニクイザル繁殖群では、育成時のウイルス排出仔ザルを感染源として、若齢期に全コロニーにSRV/D感染が及ぶことが明らかとなった。

また、0日齢から人工哺育した仔ザルにおいても、離乳時に約30%でSRV/Dの感染が確認され、SRV/Dの垂直感染も予想された。

A. 研究目的

筑波霊長類センターの全カニクイザル繁殖コロニーにおいては、すでに、Bウイルス、サル水痘ウイルス、SIV、STLV、麻疹ウイルスについてSPF化を完了し、定期検査によりSPF状態を維持している。一方、最近の移植研究、AIDS研究等重度免疫抑制処置を伴う研究においては、持続感染性を示すその他のレトロウイルスやヘルペスウイルスに対してSPFザルが求められる。また、一般試験においても、これら持続感染ウイルスに対する宿主免疫反応が、試験結果に影響を与える場合がある。

昨年度の当該研究事業では、SRV/D-SPF群内の、人工哺育を経た成体ザルにおいてはSFV、EBVの感染率が低い事を明らかにした。

本年度の研究では、母ザル哺育行動不良の仔ザルについて、早期に人工哺育を実施し、離乳時にSRV/D、SFV、EBV、CMVの感染状況を検査し、SPFザル作出における人工哺育の有効性を検討した。

米国霊長類研究センターの職員がSRV/Dに感染した事故例(2001年)が発表され、人獣共通病原体としてSRV/Dの感染防御対策が求められている。これまで、TPCのカニクイザルコロニーでは、SRV/Dの抗体陽性率が輸入ザル(14%)に比べて高いことが調べられており、屋内環境での高密度飼育と汚物に手足尾が届くケージ方式が感染拡大の原因と推察された。本年度の研究では、繁殖群の各年齢層でSRV/D抗体とウイルス分離およびウイルスゲノムを検出し、その感染様式を考察し、

繁殖コロニーSPF化の方法を検討した。

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で生まれた仔ザルのうち、母ザルの哺育行動不良等の理由で人工哺育を実施し、離乳に至った6ヶ月～14ヶ月齢の58頭、一般繁殖群で母ザル哺育の後離乳した16頭についてSRV/D、SFV、EBV、CMVの感染状況を調査した。また、2歳～4歳齢の13頭、5歳～10歳齢32頭、10歳～20歳齢16頭、20歳～24歳齢11頭についてSRV/D抗体検査、ウイルス分離およびRT-PCR検査を実施した。

(2) 材料：各ウイルス抗体検査には血清を用いた。SRV/D分離にはPBMCを、RT-PCR検査には血漿と唾液を用いた。13ヶ月齢未満の離乳時仔ザルについては、必要量の唾液の採取が難しいため、血漿によるRT-PCR検査のみを行った。

C. 研究結果

(1) 人工哺育サルおよび母親哺育ザルにおけるSRV/D、SFV、EBV、CMVの感染状況結果
(表1)

人工哺育仔ザルの離乳時検査においては、58頭中4種ウイルスのいずれかに感染が認められたサルは36% (21/58)であった。この21頭は全てSRV/D陽性であり、その内1頭はSFV抗体も陽性であった。人工哺育ザルのEBV、SFV、CMV感染は全頭陰性であった。

一方、母親哺育の離乳ザル16頭では、4ウイルスのいずれかに感染が認められたサルは、81% (13/16)であり、SRV/D陽性は7/16(43%)、EBV陽性は9/16(56%)であった。

(1) 一般繁殖群における年齢別のSRV/D感染率とウイルス検出率(図1)

SRV/D抗体陽性率は離乳時約30%、2歳齢～24歳齢では75%以上であった。

各年齢群で、血漿からのSRV/D分離、PCR検査、また唾液のRT-PCR検査結果に大きな差は認められなかった。離乳仔～20歳齢群の血漿におけるPCR陽性率は25～40%、20歳齢以上群が約10%であった。

人工哺育離乳ザル58頭のSRV/D抗体陽性率は17/58(29%)、PCR陽性率は11/58(19%)であった。

D. 考察

移植実験等で要求される高度SPFザル作成を目的とした人工哺育では、離乳仔の64%がSRV/D、SFV、EBV、CMV全てに未感染であった。対象とした母親哺育群での4ウイルス全てに未感染であるサルの割合は19%であり、人工哺育がSPF化に有効であることが明らかとなった。特にEBVについては、母ザル哺育群で離乳時に56%が既感染であったのに対し、人工哺育群では感染は認められず、人工哺育がより有効であることが明らかとなった。

TPCのカニクイザル繁殖コロニーのSRV/D感染率は2歳齢以上で75%を超えており、最近の同年齢の輸入ザル(14%)に比べて感染率が高い。原因の一つとして、汚物に手足が届く2段ケージ飼育方式、圧力水による洗浄汚物の飛散等が考えられてきた。さらに、今回の調査で、離乳時仔ザルの25%でウイルス排出が確認され、これらのサルを感染源として、離乳後の複数同居飼育期間に、SRV/D感染が急速に広がることが推察された。

SRV/Dの感染は唾液等を介した水平感染が主と考えられるが、0日齢から人工哺育した仔ザルにおいても、離乳時にSRV/Dの感染が認められたことから、胎内あるいは産道感染も予想される。

霊長類センターのカニクイザルの取り扱いにおいては、仔ザル、成獣共に、咬傷あるいは針刺し事故時の研究者SRV/D感染に注意